



HAL
open science

Exposition périnatale à un mélange d'Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques chez le rat : évaluation des effets neurotoxiques à court et à long terme

Guillemette Crépeaux

► To cite this version:

Guillemette Crépeaux. Exposition périnatale à un mélange d'Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques chez le rat : évaluation des effets neurotoxiques à court et à long terme. Médecine humaine et pathologie. Université de Lorraine, 2012. Français. NNT : 2012LORR0198 . tel-01749414

HAL Id: tel-01749414

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01749414v1>

Submitted on 29 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



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>

UNIVERSITE DE LORRAINE

Ecole Doctorale **Ressources Procédés Produits Environnement**

Thèse

présentée pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université de Lorraine

mention Sciences Agronomiques

par **Guillemette CREPEAUX**

**Exposition périnatale à un mélange d'Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques chez le rat :
Evaluation des effets neurotoxiques à court et à long terme**

Soutenue publiquement le 29 octobre 2012

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

Sous la direction de :

Rachid SOULIMANI, Professeur (Directeur de thèse)

Henri SCHROEDER, MCU (Codirecteur de thèse)

Membres du jury

Rapporteurs

Dominique LAGADIC-GOSSMANN DR2 CNRS, Inserm U1085/IRSET/Université de Rennes 1, Rennes

Catherine BELZUNG Professeur, INSERM U930 CNRS 2448, Tours

Examineurs

Thomas STROHEKER Toxicologue, DANONE, Palaiseau

Rachid SOULIMANI Professeur, Université de Lorraine, Metz

Henri SCHROEDER MCU, Université de Lorraine, Vandœuvre-lès-Nancy

UNIVERSITE DE LORRAINE

Ecole Doctorale **Ressources Procédés Produits Environnement**

Thèse

présentée pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université de Lorraine

mention Sciences Agronomiques

par **Guillemette CREPEAUX**

**Exposition périnatale à un mélange d'Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques chez le rat :
Evaluation des effets neurotoxiques à court et à long terme**

Soutenue publiquement le 29 octobre 2012

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

Sous la direction de :

Rachid SOULIMANI, Professeur (Directeur de thèse)

Henri SCHROEDER, MCU (Codirecteur de thèse)

Membres du jury

Rapporteurs

Dominique LAGADIC-GOSSMANN DR2 CNRS, Inserm U1085/IRSET/Université de Rennes 1, Rennes

Catherine BELZUNG Professeur, INSERM U930 CNRS 2448, Tours

Examineurs

Thomas STROHEKER Toxicologue, DANONE, Palaiseau

Rachid SOULIMANI Professeur, Université de Lorraine, Metz

Henri SCHROEDER MCU, Université de Lorraine, Vandœuvre-lès-Nancy

REMERCIEMENTS

Mes premiers remerciements vont au Professeur Dominique Schneider et à Evelyne Coursange, du Laboratoire Adaptation et Pathogénie des Micro-organismes à Grenoble, qui les premiers (il y a déjà bien longtemps...) m'ont fait découvrir le monde de la recherche, et ont su me faire partager et me transmettre leur passion. Le choix de m'orienter vers une thèse est en partie la conséquence de nos échanges.

J'adresse mes remerciements aux membres du jury, Dominique Lagadic-Gossmann, Catherine Belzung et Thomas Stroheker, pour avoir accepté d'être rapporteurs et examinateur de ce travail.

A l'URAFPA à Nancy, je tiens à remercier chaleureusement Guido Rychen, de m'avoir accueillie au sein de son unité, de m'avoir fait confiance sur ce beau projet, et d'avoir toujours su m'encourager et me guider. Merci pour votre réinterprétation de la règle des trois R : *Rédiger, Rédiger, Rédiger*.

Merci à Rachid Soulimani, mon directeur messin, pour son implication dans la réflexion du projet, dans l'interprétation des résultats et la valorisation de ce travail. Merci pour toute l'aide apportée notamment au moment de la rédaction du premier article. Merci de m'avoir fait confiance et d'avoir été à l'écoute de chacune de mes idées.

Merci à Henri Schroeder d'avoir co-encadré ce travail. Merci de m'avoir fait confiance et de m'avoir laissé toute l'autonomie nécessaire à sa réalisation. Merci de m'avoir permis de découvrir les joies de l'enseignement universitaire à plusieurs reprises, et de m'avoir souvent donné l'occasion de présenter ces résultats à un public lors de différents colloques.

Un merci spécial à Didier Desor pour ses nombreux conseils, sa bonne humeur et son enthousiasme terriblement contagieux. Ma foy, merci de m'avoir aidée à réfléchir et à prendre du recul sur les résultats obtenus.

Au labo, merci à Frédéric Desor pour ses précieux conseils et ses encouragements pendant les manips et la rédaction de ce travail, merci pour l'idée du sirop de grenadine. Merci à Yann Guiavar'ch pour sa gentillesse et les quelques jours passés en manip à m'expliquer la mesure de l'activité EROD dans la bonne humeur. Merci à Pascaline Bouillaud-Kremarik pour son aide apportée dans la mise en œuvre des protocoles

d'histologie. Merci à Jean Charles Olry pour les soins apportés aux animaux. Pour leurs conseils techniques et leur gentillesse, merci à Claire, Christine, Marie-Antoinette et Paméla.

Un grand merci à Catherine Larrière, pour ta patience face à ma phobie des tâches administratives, merci pour ton sourire et ton rire tellement communicatif.

A la fac de médecine de Nancy, je tiens à remercier Catherine Strazielle, pour sa grande disponibilité et ses conseils quand à la coupe de cerveaux.

Au LAHB, au Luxembourg, un grand merci à toute l'équipe pour les analyses des concentrations de HAP et métabolites dans les échantillons issus des expérimentations de ce travail. Merci à Nathalie Grova, Brice Appenzeller et Guillaume Salquèbre.

Au LABERCA, à Nantes, merci à Bruno Veyrand pour ses explications et ses réponses à mes questions.

A l'INRS à Vandœuvre-lès-Nancy, je remercie vivement Marie-Jo Décret, pour ses conseils, son aide et sa gentillesse.

Un immense merci à mes collègues thésards, pour tous vos conseils et votre amitié ; merci Marie-Do pour nos discussions de couloirs ou paliers (et plus si affinités) ; merci Stéphanie pour tes encouragements, et pour nous avoir joliment prouvé qu'il y a une vie après la thèse... ; merci Angélique pour ton soutien même de l'autre côté de l'océan ; merci Fayçal pour ton rire sonore et efficace ! Merci Xavier pour le chocolat et les kinders !

Arpie !! Merci ma belle pour ta présence... Ton enthousiasme, ta volonté et ton professionnalisme sont un exemple ! Bonne chance pour la suite !

Agnès, grand maître Yoda, comment te remercier en quelques lignes sans oublier les $\frac{3}{4}$ de ce que tu as fait pour moi ?! Merci pour ton soutien et tes conseils depuis le 1^{er} jour, merci pour ta capacité d'écoute incroyable, pour les dimanches de travail, pour les soirées boudins (aux pommes !) pour les ballades en voiture sous la grêle, pour le we en Normandie....Tu fais partie de ceux à qui ce travail doit beaucoup... Bref, merci Agnès.

Julie, il faudrait plus d'un manuscrit pour te remercier suffisamment. Alors en vrac quelques mots clés que tu comprendras...biblio HAP (et autres...), nesquik, manip en tous genres et à toute heure, azote liquide, Olton tonique, sandalettes roses, www, macarons & cup cakes, eye of the tiger, coaching, chocolat, 205, piscine, ratons, benne verte, B&B,...Plus sérieusement Julie, MERCI d'y avoir toujours cru, MERCI de m'avoir soutenu

chaque jour, MERCI pour tous les moments de détente, MERCI d'être une amie aussi formidable.

Le plus grand des remerciements à toutes les petites mains qui m'ont aidée sur les longues expérimentations...merci à vous pour toutes ces heures passées à tester des animaux et analyser des coupes de cerveaux....merci d'être venu semaines, soirs et week-ends, merci pour votre bonne humeur, et pour votre implication sans faille dans ce travail...merci de m'avoir permis de réaliser tout cela....merci à Nurgul (finitos ma jolie !!), Jean-Luc (merci pour tes logiciels), Jean-Daniel, Mickaël, Sophie L, Delphine, Jessica, Tiphaine, Sophie D, Amaury, Paul N (enchanté, Paul, 21 ans), Paul J, François. En espérant que vous trouviez la voie professionnelle qui vous permette de vous épanouir, et que vous ayez la chance d'y être aussi bien entouré que je l'ai été avec vous.

Loin de Nancy, mais tout proche quand même (merci les forfaits illimités et internet), à celles et ceux qui m'ont soutenu et suivie pendant ces longs mois en Lorraine, merci pour votre patience, vos encouragements incessants, votre confiance absolue, votre amitié inaltérable, merci pour vos conseils (« quitte à rien faire fais le bien »), un merci particulier à celles qui ont affronté le climat local à plusieurs reprises pour me rendre visite, bref merci à Audrey, Béné, Gaëlle, Léa, Marie, Mélissa, Thomas (bon courage pour la fin de thèse de ton côté), Arnaud et Elodie...

Je vous adore et je suis fière de vous avoir dans ma vie.

Un merci particulier à ma Maman pour le réconfort apporté par tes visites, merci de croire en moi, toujours. Un grand merci à Dominique, merci pour la dégustation de produits savoyards qui remontent le moral.

Merci à l'ensemble de ma famille pour leurs encouragements, Juliette, Olivier, Aliette, Blandine et Guilhem. Une pensée remplie d'affection pour ceux qui m'ont permis de me détendre grâce aux aventures passionnantes de Martine et des playmobils, je vous embrasse, Alice, Arthur, Samuel, Maxime et Juliette.

Alexy...la dernière place dans les remerciements, mais la première dans mon cœur. Merci à toi, sans qui je ne serai pas arrivé au bout de ce travail, merci pour les nombreux allers retours en train, merci pour tes encouragements, ton soutien, ta patience, ta confiance, ton amour, tes projets d'avenir....merci pour ce que tu es et ce que tu me permets d'être...

« Il n'y a pas de vent favorable pour le marin qui ne sait pas où il va »

Sénèque

ABREVIATIONS

AhR : Aryl hydrocarbon Receptor
AFSSA : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments
AFSSET : Agence Française de Sécurité Sanitaire de l'Environnement et du Travail
AMPA : α -amino-3-hydroxy-5-méthylisozazol-4-propionate
ANOVA : Analyse de la variance
ANSES : Agence Nationale de Sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

B(a)P : Benzo(a)Pyrène
BF : Branche Fermée
BO : Branche Ouverte

CAS : Chemical Abstracts Service
CDC : Center for Disease Control
CE : Communauté Européenne
CIRC : Centre International de Recherche sur le Cancer
CITEPA : Centre Interprofessionnel Technique d'Etudes de la Pollution Atmosphérique
CYP450 : Cytochromes P450

DAB : Diaminobenzidine
DDT : Dichlorodiphényltrichloroéthane
DG SANCO : Direction Générale Santé Consommation de l'Union européenne
DOHAD : Developmental Origins of Health And Diseases

EAT : Etude de l'Alimentation Totale
ECHA : European CHEmicals Agency
EFSA : European Food Safety Authority
EH : époxydes hydrolases
EINECS : European INventory of Existing Chemical Substances
ESM : Ecart Standard à la Moyenne
EWG : Environmental Working Group

FAO : Food and Agriculture Organization (of the United Nations)
FDA : Food and Drug Administration
FQPA : Food Quality Protection Act

GEMS/Food : Global Environment Monitoring System - Food Contamination Monitoring and Assessment Programme
GD : Gestation Day
GST : Gluthation-S-transférase

HAP : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques
HCB : Hexachlorobenzène
HCH : Hexachlorocyclohexane
HECA : Healthy Environments for Children Alliance

INERIS : Institut National de l'EnviRonnement Industriel et des Risques

JECFA : Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives

LABERCA : Laboratoire d'Etude des Résidus et Contaminants dans les Aliments

LCS : Labyrinthe en Croix Surélevé

LdD : Limite de détection

LdQ : Limite de quantification

LY : Labyrinthe en Y

MFO : oxydases à fonctions multiples

NMDA : N-méthyl-D-aspartate

NOAEL : No Observable Adverse Effect Level

n.s. : non significatif

OCDE : Organisation de Coopération et de Développement Economiques

OF : Open Field

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

ONU : Organisation des Nations Unies

PCB : PolyChloroBiphényles

PCDD : PolyChloroDiBenzo-para-Dioxines

PCDF : PolyChloroDibenzoFuranes

PNSE : Plan National Santé-Environnement

PNUE : Programme des Nations Unies pour l'Environnement

POP : Polluants Organiques Persistants

PND : PostNatal Day

REACH : Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals

SCF : Scientific Committee on Food

SULT : Sulfotransférase

TDS_Exposure : Total Diet Study_Exposure

TEQ : Toxic Equivalent Quantity

UGT : UDP-glucuronyl transférase

US-EPA : United States Environmental Protection Agency

WWF : World Wide Fund for Nature

ZC : Zone Centrale

ZI : Zone Intermédiaire

ZO : Zone Ouverte

ZP : Zone Périphérique

LISTES DES TABLEAUX, FIGURES ET PHOTOS

TABLEAUX

Tableau 1 : Substances neurotoxiques pour le développement (d'après Miodovnik 2011) ...	12
Tableau 2 : Liste des POP établie dans le cadre du Protocole d'Aarhus et de la Convention de Stockholm (d'après Rychen et al., 2005)	24
Tableau 3 : Historique des principaux événements ayant conduit à une contamination environnementale et alimentaire en PCB, PCDD ou PCDF	28
Tableau 4 : Liste des 16 HAP classés par l'US-EPA, structure chimique, numéro CAS et classification pour le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC).....	45
Tableau 5 : Teneur maximale autorisée pour le B(a)P dans différents types d'aliments (réglementation EC 1881/2006)	49
Tableau 6 : Concentrations de 8 HAP dans différents aliments préparés (en µg/kg) (d'après EFSA 2008).....	51
Tableau 7 : Concentrations des 16 HAP de l'US-EPA dans différents aliments non préparés (en µg/kg) (d'après Martorell et al., 2010).....	52
Tableau 8 : Estimation de l'ingestion quotidienne moyenne de HAP pour un adulte non fumeur, synthèse de plusieurs études nationales (d'après SCF 2002 et EFSA 2008).....	58
Tableau 9 : Ingestion quotidienne de HAP totaux pour un homme adulte	59
Tableau 10 : Ingestion quotidienne de HAP au Royaume-Uni, en fonction de l'âge (en ng/kg de poids corporel/jour) (d'après SCF 2002).....	60
Tableau 11 : Ingestion quotidienne de B(a)P et des 16 HAP de l'US-EPA, en fonction de l'âge et du sexe, en 2000, 2006 et 2008 (en µg/jour/personne) (d'après (Falcó et al., 2003; Martí-Cid et al., 2008; Martorell et al., 2010)	61
Tableau 12 : Récapitulatif des effets neurotoxiques des HAP pour l'Homme adulte (1/2) ...	75
Tableau 13 : Récapitulatif des effets neurotoxiques des HAP pour l'Homme adulte (2/2) ...	76
Tableau 14 : Récapitulatif des effets neurotoxiques des HAP pour l'animal adulte (1/3)	77
Tableau 15 : Récapitulatif des effets neurotoxiques des HAP pour l'animal adulte (2/3)	78
Tableau 16 : Récapitulatif des effets neurotoxiques des HAP pour l'animal adulte (3/3)	79
Tableau 17 : Récapitulatif des effets neurotoxiques des HAP pour l'enfant (1/3)	80
Tableau 18 : Récapitulatif des effets neurotoxiques des HAP pour l'enfant (2/3)	81
Tableau 19 : Récapitulatif des effets neurotoxiques des HAP pour l'enfant (3/3)	82
Tableau 20 : Récapitulatif des effets neurotoxiques des HAP pour le jeune animal (1/2)	83
Tableau 21 : Récapitulatif des effets neurotoxiques des HAP pour le jeune animal (2/2)	84

Tableau 22 : Tableau récapitulatif des tests de développement sensori-moteur et des tests du comportement maternel.....	133
Tableau 23 : Tableau récapitulatif des tests de comportement individuel et social.....	148
Tableau 24 : Données relatives à la reproduction.....	167
Tableau 25 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante sur le poids corporel du jeune rat.....	169
Tableau 26 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante sur la coordination locomotrice du jeune rat à PND19, 20 et 21.....	176
Tableau 27 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante sur l'activité comportementale du jeune rat dans l'open-field à PND25.....	178
Tableau 28 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante sur le comportement maternel de ramassage des jeunes.....	182
Tableau 29 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante sur l'activité comportementale du rat adulte dans le labyrinthe en croix surélevé.....	184
Tableau 30 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante sur l'activité comportementale du rat adulte dans l'open-field.....	186
Tableau 31 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante sur l'activité comportementale du rat adulte dans le labyrinthe en Y.....	188
Tableau 32 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante sur l'activité comportementale du rat adulte dans le labyrinthe radial à 8 branches (1/2).....	190
Tableau 33 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante sur l'activité comportementale du rat adulte dans le labyrinthe radial à 8 branches (2/2).....	191
Tableau 34 : Répartition des animaux en Transporteurs et Non Transporteurs au sein de chaque groupe expérimental.....	193
Tableau 35 : Nombre de transports effectués par les animaux Transporteurs au sein de chaque groupe expérimental.....	194
Tableau 36 : Répartition des animaux Transporteurs en Ravitailleurs et Autonomes au sein de chaque groupe expérimental.....	195
Tableau 37 : Transferts de nourriture au sein des groupes composés d'animaux témoins et d'animaux exposés à la Dose 1.....	195
Tableau 38 : Transferts de nourriture au sein des groupes composés d'animaux témoins et d'animaux exposés à la Dose 2.....	196
Tableau 39 : Répartition des animaux des groupes Témoin et Dose 1 en Transporteurs et Non Transporteurs.....	196

Tableau 40 : Nombre de transports effectués par les animaux Transporteurs des groupes Témoin et Dose 1	197
Tableau 41 : Répartition des animaux Transporteurs des groupes Témoin et Dose 1 en Ravitailleurs et Autonomes	197
Tableau 42 : Transferts de nourriture en fonction de l'exposition, au sein des groupes composés d'animaux témoins et d'animaux exposés à la Dose 1	198
Tableau 43 : Répartition des animaux des groupes Témoin et Dose 2 en Transporteurs et Non Transporteurs.....	198
Tableau 44 : Nombre de transports effectués par les animaux Transporteurs des groupes Témoin et Dose 2	199
Tableau 45 : Répartition des animaux Transporteurs des groupes Témoin et Dose 2 en Ravitailleurs et Autonomes	199
Tableau 46 : Transferts de nourriture en fonction de l'exposition, au sein des groupes composés d'animaux témoins et d'animaux exposés à la Dose 2.....	200
Tableau 47 : Nombre de structures cérébrales qui présentent des différences significatives d'activité de la cytochrome oxydase par rapport aux animaux témoins, à PND10, PND21 et PND60.....	201
Tableau 48 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante sur l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase à PND 10 (1/8).....	202
Tableau 49 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante sur l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase à PND 10 (2/8).....	203
Tableau 50 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante sur l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase à PND 10 (3/8).....	204
Tableau 51 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante sur l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase à PND 10 (4/8).....	205
Tableau 52 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante sur l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase à PND 10 (5/8).....	206
Tableau 53 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante sur l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase à PND 10 (6/8).....	207
Tableau 54 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante sur l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase à PND 10 (7/8).....	208
Tableau 55 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante sur l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase à PND 10 (8/8).....	209

Tableau 56 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante sur l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase à PND 21 (1/8).....	210
Tableau 57 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante sur l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase à PND 21 (2/8).....	211
Tableau 58 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante sur l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase à PND 21 (3/8).....	212
Tableau 59 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante sur l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase à PND 21 (4/8).....	213
Tableau 60 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante sur l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase à PND 21 (5/8).....	214
Tableau 61 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante sur l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase à PND 21 (6/8).....	215
Tableau 62 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante sur l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase à PND 21 (7/8).....	216
Tableau 63 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante sur l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase à PND 21 (8/8).....	217
Tableau 64 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante sur l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase à PND 60 (1/8).....	218
Tableau 65 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante sur l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase à PND 60 (2/8).....	219
Tableau 66 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante sur l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase à PND 60 (3/8).....	220
Tableau 67 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante sur l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase à PND 60 (4/8).....	221
Tableau 68 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante sur l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase à PND 60 (5/8).....	222
Tableau 69 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante sur l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase à PND 60 (6/8).....	223
Tableau 70 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante sur l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase à PND 60 (7/8).....	224
Tableau 71 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante sur l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase à PND 60 (8/8).....	225

Tableau 72 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante sur les concentrations cérébrales de HAP et de métabolites mono-hydroxylés chez les ratons à PND0 (ng/g de tissu).....	228
Tableau 73 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante sur les concentrations cérébrales de HAP et de métabolites mono-hydroxylés chez les ratons à PND21 (ng/g de tissu).....	229
Tableau 74 : Données relatives à la reproduction.....	237
Tableau 75 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante puis allaitante sur le poids corporel du jeune rat.....	239
Tableau 76 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante sur la coordination locomotrice du jeune rat à PND19, 20 et 21	246
Tableau 77 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante puis allaitante sur l'activité comportementale du jeune rat dans l'open-field à PND25	248
Tableau 78 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante puis allaitante sur le comportement maternel de ramassage des jeunes	251
Tableau 79 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante puis allaitante sur l'activité comportementale du rat adulte dans le labyrinthe en croix surélevé .	254
Tableau 80 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante puis allaitante sur l'activité comportementale du rat adulte dans l'open-field.....	256
Tableau 81 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante puis allaitante sur l'activité comportementale du rat adulte dans le labyrinthe en Y.....	258
Tableau 82 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante puis allaitante sur l'activité comportementale du rat adulte dans le labyrinthe radial à 8 branches (1/2).....	260
Tableau 83 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante puis allaitante sur l'activité comportementale du rat adulte dans le labyrinthe radial à 8 branches (2/2).....	261
Tableau 84 : Répartition des animaux en Transporteurs et Non Transporteurs au sein de chaque groupe expérimental.....	263
Tableau 85 : Nombre de transports effectués par les animaux Transporteurs au sein de chaque groupe expérimental.....	264
Tableau 86 : Répartition des animaux Transporteurs en Ravitailleurs et Autonomes au sein de chaque groupe expérimental.....	265

Tableau 87 : Transferts de nourriture au sein des groupes composés d'animaux témoins et d'animaux exposés à la Dose 1	265
Tableau 88 : Transferts de nourriture au sein des groupes composés d'animaux témoins et d'animaux exposés à la Dose 2	266
Tableau 89 : Répartition des animaux des groupes Témoin et Dose 1 en Transporteurs et Non Transporteurs.....	266
Tableau 90 : Nombre de transports effectués par les animaux Transporteurs des groupes Témoin et Dose 1	267
Tableau 91 : Répartition des animaux Transporteurs des groupes Témoin et Dose 1 en Ravitailleurs et Autonomes	267
Tableau 92 : Transferts de nourriture en fonction de l'exposition, au sein des groupes composés d'animaux témoins et d'animaux exposés à la Dose 1	268
Tableau 93 : Répartition des animaux des groupes Témoin et Dose 2 en Transporteurs et Non Transporteurs.....	268
Tableau 94 : Nombre de transports effectués par les animaux Transporteurs des groupes Témoin et Dose 2	269
Tableau 95 : Répartition des animaux Transporteurs des groupes Témoin et Dose 2 en Ravitailleurs et Autonomes	269
Tableau 96 : Transferts de nourriture en fonction de l'exposition, au sein des groupes composés d'animaux témoins et d'animaux exposés à la Dose 2	270
Tableau 97 : Nombre de structures cérébrales qui présentent des différences significatives d'activité de la cytochrome oxydase par rapport aux animaux témoins, à PND10, PND21 et PND60.....	271
Tableau 98 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante puis allaitante sur l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase à PND10 (1/8)	272
Tableau 99 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante puis allaitante sur l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase à PND10 (2/8)	273
Tableau 100 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante puis allaitante sur l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase à PND10 (3/8)	274
Tableau 101 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante puis allaitante sur l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase à PND10 (4/8)	275
Tableau 102 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante puis allaitante sur l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase à PND10 (5/8)	276

- Tableau 103** : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante puis allaitante sur l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase à PND10 (6/8) ... 277
- Tableau 104** : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante puis allaitante sur l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase à PND10 (7/8) ... 278
- Tableau 105** : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante puis allaitante sur l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase à PND10 (8/8) ... 279
- Tableau 106** : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante puis allaitante sur l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase à PND 21 (1/8) ... 280
- Tableau 107** : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante puis allaitante sur l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase à PND 21 (2/8) ... 281
- Tableau 108** : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante puis allaitante sur l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase à PND 21 (3/8) ... 282
- Tableau 109** : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante puis allaitante sur l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase à PND 21 (4/8) ... 283
- Tableau 110** : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante puis allaitante sur l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase à PND 21 (5/8) ... 284
- Tableau 111** : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante puis allaitante sur l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase à PND 21 (6/8) ... 285
- Tableau 112** : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante puis allaitante sur l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase à PND 21 (7/8) ... 286
- Tableau 113** : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante puis allaitante sur l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase à PND 21 (8/8) ... 287
- Tableau 114** : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante puis allaitante sur l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase à PND 60 (1/8) ... 288
- Tableau 115** : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante puis allaitante sur l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase à PND 60 (2/8) ... 289
- Tableau 116** : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante puis allaitante sur l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase à PND 60 (3/8) ... 290
- Tableau 117** : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante puis allaitante sur l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase à PND 60 (4/8) ... 291
- Tableau 118** : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante puis allaitante sur l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase à PND 60 (5/8) ... 292
- Tableau 119** : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante puis allaitante sur l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase à PND 60 (6/8) ... 293

Tableau 120 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante puis allaitante sur l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase à PND 60 (7/8) ...	294
Tableau 121 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante puis allaitante sur l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase à PND 60 (8/8) ...	295
Tableau 122 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante puis allaitante sur les concentrations cérébrales de HAP et de métabolites mono-hydroxylés chez les rats à PND0 (ng/g de tissu)	299
Tableau 123 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante puis allaitante sur les concentrations cérébrales de HAP et de métabolites mono-hydroxylés chez les rats à PND21 (ng/g de tissu)	300
Tableau 124 : Effets précoces induits après exposition de la femelle gestante et/ou allaitante à un mélange de 16 HAP.....	314
Tableau 125 : Effets comportementaux induits à l'âge adulte, suite à une exposition de la femelle gestante ou gestante puis allaitante à un mélange de 16 HAP	317
Tableau 126 : Résumé des analyses de l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase au niveau des systèmes sensoriels (1/8)	324
Tableau 127 : Résumé des analyses de l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase au niveau du système moteur (2/8)	325
Tableau 128 : Résumé des analyses de l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase au niveau du tronc cérébral (3/8)	326
Tableau 129 : Résumé des analyses de l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase au niveau des cortex cérébraux (4/8).....	326
Tableau 130 : Résumé des analyses de l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase au niveau des noyaux thalamiques (5/8)	327
Tableau 131 : Résumé des analyses de l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase au niveau des noyaux hypothalamiques (6/8)	327
Tableau 132 : Résumé des analyses de l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase au niveau du système limbique (7/8)	328
Tableau 133 : Résumé des analyses de l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase au niveau des zones de substance blanche (8/8)	328
Tableau 134 : Proportions (en %) des 16 HAP au sein du mélange administré aux femelles gestantes et/ou allaitantes, et au niveau des cerveaux des rats témoins et exposés, à PND0 et PND21	338

Tableau 135 : Concentrations en HAP dans le sirop de grenadine, l'huile Isio 4 et l'alimentation des rats utilisés pour administrer le mélange de HAP aux animaux (concentrations en $\mu\text{g}/\text{kg}$ ou $\mu\text{g}/\text{l}$) 339

FIGURES

Figure 1 : Proportion relative des substances chimiques dont l'action sur le développement cérébral est documentée (d'après Grandjean et Landrigan, 2006).....	10
Figure 2 : Organisation générale du cerveau (d'après Bear et al., 2010).....	41
Figure 3 : Comparaison du cerveau du rat et du cerveau humain (d'après Bear et al., 2010)	43
Figure 4 : Quantité moyenne de B(a)P absorbé chaque jour à partir de différentes sources (d'après EFSA 2008).....	48
Figure 5 : Concentrations totales des 16 HAP de l'US-EPA dans différents types d'aliments (en µg/kg) (d'après Martorell et al., 2010).....	53
Figure 6 : Concentration de B(a)P dans différents types d'aliments (en µg/kg) (d'après Martorell et al., 2010).....	53
Figure 7 : Contribution relative de 8 congénères à la concentration totale en HAP dans 4065 échantillons d'aliments (d'après EFSA 2008)	54
Figure 8 : Contribution relative des 16 HAP de l'US-EPA à la concentration totale en HAP dans 4065 échantillons d'aliments (d'après Martorell et al., 2010)	55
Figure 9 : Contribution (en pourcentage) de chaque groupe d'aliments à l'ingestion quotidienne des 16 HAP de l'US-EPA (d'après Falcó et al., 2003; Martí-Cid et al., 2008; Martorell et al., 2010).....	57
Figure 10 : Les différentes étapes du métabolisme hépatique	65
Figure 11 : Principales voies de métabolisation du B(a)P (D'après Xue and Warshawsky, 2005).....	66
Figure 12 : Métabolisme du B(a)P (adapté d'après Besarati, 2001)	68
Figure 13 : Période développement cérébral rapide de 5 mammifères différents.....	94
Figure 14 : Représentation schématique du déroulement des expérimentations	110
Figure 15 : Développement des capacités sensorielles et motrices chez le rat	112
Figure 16 : Echelle d'évaluation du développement neuromoteur chez le rat	115
Figure 17 : Dispositif expérimental pour l'évaluation du comportement social.....	146
Figure 18 : Représentation schématique du marquage histochimique de la cytochrome oxydase.....	151
Figure 19 : Représentation du déroulement de l'expérimentation	165
Figures 20 a et b : Pourcentage de réussite au test de retournement (20a) et temps mis par les animaux des trois groupes pour se retourner (médianes et quartiles) (20b).....	171

Figures 21 a et b : Pourcentage de réussite au test d'agrippement (21a) et angle atteint par les animaux des trois groupes pour se retourner (médianes et quartiles) (21b).....	172
Figures 22 a et b : Pourcentage de réussite au test du <i>cliff avoidance</i> (22a) et temps mis par les animaux des trois groupes pour reculer sur la plate-forme (médianes et quartiles) (22b)	173
Figures 23 a et b : Pourcentage de réussite au test de la réaction anti-gravitaire (23a) et temps mis par les animaux des trois groupes pour effectuer une rotation de 180° (médianes et quartiles) (23b)	174
Figure 24 : Temps de suspension des animaux des trois groupes avant la chute (médianes et quartiles).....	175
Figures 25 a et b : Pourcentage de réussite au test de la coordination locomotrice (25a) et temps mis par les animaux des trois groupes pour atteindre la plate-forme (médianes et quartiles) (25b)	177
Figures 26 a et b : Pourcentage d'animaux des trois groupes présentant une réactivité au bruit entre PND11 et PND14 (26a) et ayant les yeux ouverts entre PND13 et PND16 (26b).....	179
Figures 27a, b et c : Pourcentage de mères des trois groupes ayant construit un nid à PND3 (27a), PND6 (27b) et PND8 (27b)	181
Figure 28 : Représentation du déroulement de l'expérimentation	235
Figures 29 a et b : Pourcentage de réussite au test de retournement (29a) et temps mis par les animaux des trois groupes pour se retourner (médianes et quartiles) (29b).....	241
Figures 30 a et b : Pourcentage de réussite au test d'agrippement (30a) et angle atteint par les animaux des trois groupes pour se retourner (médianes et quartiles) (30b).....	242
Figures 31 a et b : Pourcentage de réussite au test du <i>cliff avoidance</i> (31a) et temps mis par les animaux des trois groupes pour reculer sur la plate-forme (médianes et quartiles) (31b)	243
Figures 32 a et b : Pourcentage de réussite au test de la réaction anti-gravitaire (32a) et temps mis par les animaux des trois groupes pour effectuer une rotation de 180° (médianes et quartiles) (32b)	244
Figure 33 : Temps de suspension des animaux des trois groupes avant la chute (médianes et quartiles).....	245
Figures 34 a et b : Pourcentage de réussite au test de la coordination locomotrice (34a) et temps mis par les animaux des trois groupes pour atteindre la plate-forme (médianes et quartiles) (34b)	247
Figures 35 a et b : Pourcentage d'animaux des trois groupes présentant une réactivité au bruit entre PND11 et PND14 (35a) et ayant les yeux ouverts entre PND14 et PND16 (35b).....	249

Figures 36 a, b et c : Pourcentage de mères des trois groupes ayant construit un nid à PND3 (36a), PND6 (36b) et PND8 (36c) 250

PHOTOS

Photo 1 : Harvey W. Wiley (au 2 ^{ème} plan, le 3 ^{ème} à partir de la droite) et les membres de la « <i>poison squad</i> » (FDA History Office, 1905).....	18
Photo 2 : Salle à manger de la « <i>poison squad</i> » (FDA History Office, 1905).....	18
Photo 3 : Ajout des HAP à une boulette.....	108
Photo 4 : Distribution d'une boulette.....	107
Photo 5 : Consommation d'une boulette	108
Photo 6 : Test de retournement.....	117
Photo 7 : Test d'agrippement	118
Photo 8 : <i>Cliff Avoidance</i>	120
Photo 9 : Réaction anti-gravitaire.....	122
Photo 10 : Test de suspension	123
Photo 11 : Test de coordination locomotrice.....	125
Photo 12 : Open-field (PND25).....	126
Photo 13 : Observation de l'ouverture des yeux	128
Photo 14 : Construction du nid.....	131
Photo 15 : Labyrinthe en croix surélevé.....	139
Photo 16 : Open-field	140
Photo 17 : Labyrinthe en Y	141
Photo 18 : Labyrinthe radial à 8 branches	143

TABLE DES MATIERES

AVANT PROPOS

SECTION BIBLIOGRAPHIQUE

I. Contexte de l'étude	7
I.1. Neurotoxicité développementale	7
I.1.1. Historique	7
I.1.2. Définition	9
I.1.3. Substances neurotoxiques connues	9
I.1.4. Conséquences comportementales d'expositions précoces	13
I.1.5. Difficultés actuelles	14
I.2. Sécurité alimentaire	16
I.2.1. Définition	16
I.2.2. Instances réglementaires	17
I.2.2.1. Historique	17
I.2.2.2. Niveau national	19
I.2.2.3. Niveau européen	20
I.2.2.4. Niveau international	20
I.3. Les Polluants Organiques Persistants	22
I.3.1. Introduction	22
I.3.2. Caractéristiques	22
I.3.3. Classification	23
I.3.4. Réglementation	24
I.3.5. Emissions	26
I.3.6. Les Polluants Organiques Persistants dans l'alimentation	27
II. Problématique de l'étude	30
II.1. L'individu en développement : une population à risque	30
II.1.1. Introduction	30
II.1.2. Sensibilité particulière de l'organisme en développement	30
II.1.3. Transferts mère-jeune de composés chimiques	35
II.1.3.1. Transfert placentaire	35
II.1.3.2. Transfert <i>via</i> le lait maternel	37
II.1.4. La protection de l'individu en développement : un enjeu international	39
II.2. Développement et organisation du système nerveux central	40

II.3. Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques	44
II.3.1. Propriétés physico-chimiques.....	44
II.3.2. Emissions	46
II.3.3. Sources d'exposition	47
II.3.3.1. Exposition directe	47
Sources d'exposition.....	47
Réglementation pour l'alimentation	48
Contamination des denrées alimentaires et teneurs en HAP dans les aliments	49
Ingestion quotidienne de HAP	55
II.3.3.2. Expositions <i>via</i> l'organisme maternel	62
a) Exposition <i>in utero</i>	62
b) Exposition <i>via</i> le lait maternel.....	63
II.3.4. Devenir dans l'organisme et métabolisme	64
II.3.5. Toxicité.....	69
II.3.5.1. Généralités	69
II.3.5.2. Neurotoxicité	70
II.3.6. Mécanismes d'action.....	85
II.3.6.1. Généralités	85
II.3.6.2. Mécanismes d'action des HAP	85
a) Effets pour le placenta.....	85
b) Effets pour le fœtus	86
c) Perturbations de l'expression de gènes	86
d) Perturbations des systèmes de neurotransmission.....	87
e) Perturbations endocriniennes	89
f) Perturbations <i>via</i> le stress oxydant	89
g) Action des HAP sur les cellules gliales.....	91
II.4. Expertise animale.....	92
III.4.1. Extrapolation des données en neurotoxicologie développementale	92
III.4.2. Particularités du développement cérébral du rat par rapport à l'Homme	93

OBJECTIFS

SECTION METHODOLOGIQUE

I. Animaux.....	103
------------------------	------------

II. Exposition au mélange d'Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques	104
II.1. Composition du mélange	104
II.2. Doses choisies	105
II.3. Protocole d'exposition des mères	106
II.4. Périodes d'exposition	109
III. Evaluation du développement sensori-moteur.....	111
III.1. Introduction	111
III.2. Considérations méthodologiques.....	113
III.3. Procédures des tests	115
III.3.1. Evaluation du développement locomoteur.....	116
III.3.1.1. Test de retournement (<i>righting reflex</i>)	116
III.3.1.2. Test d'agrippement (<i>grasping reflex</i>).....	118
III.3.1.3. <i>Cliff avoidance</i>	119
III.3.1.4. Test de réaction anti-gravitaire (<i>negative geotaxis</i>)	121
III.3.1.5. Test de suspension.....	123
III.3.1.6. Test de coordination locomotrice	124
III.3.1.7. Open-field.....	126
III.3.2. Evaluation du développement sensoriel.....	127
III.3.2.1. Test du sursaut au bruit (<i>auditory startle</i>)	127
III.3.2.2. Ouverture des yeux.....	127
IV. Evaluation du comportement maternel	129
IV.1. Introduction	129
IV.2. Procédures des tests	129
IV.2.1. Construction du nid (<i>nest building</i>)	129
IV.2.1. Test de ramassage des jeunes (<i>retrieving</i>)	132
V. Evaluation du comportement individuel à l'âge adulte	135
V.1. Introduction.....	135
V.2. Considérations méthodologiques	136
V.3. Procédures des tests	137
V.3.1. Labyrinthe en croix surélevé.....	137
V.3.2. Open-field	139
V.3.3. Labyrinthe en Y	141
V.3.3. Labyrinthe radial à huit branches	142

VI. Evaluation du comportement social à l'âge adulte.....	145
VI.1. Introduction	145
VI.2. Considérations méthodologiques	145
VI.3. Procédure du test	146
VII. Analyses histochimiques : évaluation du métabolisme cérébral	149
VII.1. Introduction	149
VII.2. Protocoles.....	149
VII.2.1. Préparation des tissus	149
VII.2.2. Gélatinisation des lames	150
VII.2.3. Révélation de l'activité de la cytochrome oxydase	150
VII.2.4. Quantification de l'activité de la cytochrome oxydase	152
VIII. Dosages des HAP et de leurs métabolites	155
VIII.1. Dosages des HAP dans les aliments administrés aux femelles	155
VIII.1.1. Introduction	155
VIII.1.2. Dosages	155
VIII.2. Dosages au niveau des cerveaux des jeunes	156
VIII.2.1. Introduction	156
VIII.2.2. Dosages	156
IX. Analyses statistiques	158

SECTION EXPERIMENTALE

Chapitre 1 : Etude des effets d'une exposition répétée par voie alimentaire à un mélange de 16 HAP chez la rate gestante. Effets neurocomportementaux à court et à long terme.	165
I. Protocole	165
II. Effectifs	166
III. Effets de l'exposition précoce aux HAP	167
III.1. Reproduction	167
III.2. Poids corporel	168
III.3. Tests neurodéveloppementaux	171
III.3.1. Test de retournement.....	171

III.3.2. Test d'agrippement	172
III.3.3. Cliff Avoidance.....	173
III.3.4. Test de réaction anti-gravitaire	174
III.3.5. Test de suspension	175
III.3.6. Test de coordination locomotrice.....	176
III.3.7. Open-field	177
III.3.8. Test du sursaut au bruit	178
III.3.9. Ouverture des yeux	178
III.4. Comportement maternel	180
III.4.1. Construction du nid.....	180
III.4.2. Ramassage des jeunes	180
III.5. Comportement individuel à l'âge adulte	183
III.5.1. Labyrinthe en croix surélevé.....	183
III.5.2. Open-field	185
III.5.3. Labyrinthe en Y	187
III.5.4. Labyrinthe radial à 8 branches	189
III.6. Comportement social à l'âge adulte	193
III.6.1. Analyse de l'ensemble des groupes	193
III.6.1.1. Différenciation comportementale : Transporteurs et Non Transporteurs	193
III.6.1.2. Nombre moyen de transports effectués.....	194
III.6.1.3. Différenciation comportementale : Ravitailleurs et Autonomes	194
III.6.1.4. Transferts de nourriture	195
III.6.2. Influence de l'exposition prénatale à la dose 1 de HAP sur le comportement social	196
III.6.2.1. Différenciation comportementale : Transporteurs et Non Transporteurs	196
III.6.2.2. Nombre moyen de transports effectués	197
III.6.2.3. Différenciation comportementale : Ravitailleurs et Autonomes.....	197
III.6.2.4. Transferts de nourriture	198
III.6.3. Influence de l'exposition prénatale à la dose 2 de HAP sur le comportement social	198
III.6.3.1. Différenciation comportementale : Transporteurs et Non Transporteurs	198
III.6.3.2. Nombre de transports effectués.....	199
III.6.3.3. Différenciation comportementale : Ravitailleurs et Autonomes.....	199
III.6.3.4. Transferts de nourriture	200

III.7. Analyses histologiques	201
III.7.1. PND10.....	201
III.7.1.1. Système sensoriel	201
III.7.1.2. Système moteur	202
III.7.1.3. Tronc cérébral	204
III.7.1.4. Cortex cérébraux	205
III.7.1.5. Noyaux thalamiques	206
III.7.1.6. Noyaux hypothalamiques	207
III.7.1.7. Système limbique	208
III.7.1.8. Substance blanche	209
III.7.2. PND21.....	210
III.7.2.1. Systèmes sensoriels	210
III.7.2.2. Système moteur	211
III.7.2.3. Tronc cérébral	212
III.7.2.4. Cortex cérébraux	213
III.7.2.5. Noyaux thalamiques	214
III.7.2.6. Noyaux hypothalamiques	215
III.7.2.7. Système limbique	216
III.7.2.8. Substance blanche	217
III.7.3. PND60.....	218
III.7.3.1. Systèmes sensoriels	218
III.7.3.2. Système moteur	219
III.7.3.3. Tronc cérébral	220
III.7.3.4. Cortex cérébraux	221
III.7.3.5. Noyaux thalamiques	222
III.7.3.6. Noyaux hypothalamiques	223
III.7.3.7. Système limbique	224
III.7.3.8. Substance blanche	225
III.7.4. Récapitulatif.....	226
III.8. Dosages cérébraux des HAP et métabolites	227
III.8.1. PND0.....	227
III.8.2. PND21.....	228
III.9. Conclusion des résultats	230

III.9.1. Effets d'une exposition prénatale aux HAP sur le poids corporel	230
III.9.2. Effets d'une exposition prénatale aux HAP sur le développement moteur et sensoriel	230
III.9.3. Effets d'une exposition prénatale aux HAP sur le comportement individuel à l'âge adulte.....	230
III.9.4. Effets d'une exposition prénatale aux HAP sur le comportement social à l'âge adulte.....	232
III.9.5. Effets d'une exposition prénatale aux HAP sur le métabolisme cérébral.....	232
III.9.6. Effets d'une exposition prénatale aux HAP sur la concentration cérébrale de molécules mères et de métabolites mono-hydroxylés chez les ratons	233
Chapitre 2 : Etude des effets d'une exposition répétée par voie alimentaire à un mélange de 16 HAP chez la rate gestante puis allaitante. Effets neurocomportementaux à court et à long terme.	235
I. Protocole	235
II. Effectifs	236
III. Effets de l'exposition précoce aux HAP.....	237
III.1. Reproduction	237
III.2. Poids corporel.....	238
III.3. Tests neurodéveloppementaux	241
III.3.1. Test de retournement.....	241
III.3.2. Test d'agrippement	242
III.3.3. Cliff Avoidance.....	243
III.3.4. Test de réaction anti-gravitaire	244
III.3.5. Test de suspension	245
III.3.6. Test de coordination locomotrice.....	246
III.3.7. Open-field	248
III.3.8. Test du sursaut au bruit	248
III.3.9. Ouverture des yeux	248
III.4. Comportement maternel	249
III.4.1. Construction du nid.....	249
III.4.2. Ramassage des jeunes	250
III.5. Comportement individuel à l'âge adulte	253
III.5.1. Labyrinthe en croix surélevé.....	253

III.5.2. Open-field	255
III.5.3. Labyrinthe en Y	257
III.5.4. Labyrinthe radial à 8 branches	259
III.6. Comportement social à l'âge adulte	263
III.6.1. Analyse de l'ensemble des groupes	263
III.6.1.1. Différenciation comportementale : Transporteurs et Non Transporteurs	263
III.6.1.2. Nombre moyen de transports effectués.....	264
III.6.1.3. Différenciation comportementale : Ravitailleurs et Autonomes.....	264
III.6.1.4. Transferts de nourriture	265
III.6.2. Influence de l'exposition périnatale à la dose 1 de HAP sur le comportement social	266
III.6.2.1. Différenciation comportementale : Transporteurs et Non Transporteurs	266
III.6.2.2. Nombre de transports effectués	266
III.6.2.3. Différenciation comportementale : Ravitailleurs et Autonomes	267
III.6.2.4. Transferts de nourriture	267
III.6.3. Influence de l'exposition périnatale à la dose 2 de HAP sur le comportement social	268
III.6.3.1. Différenciation comportementale : Transporteurs et Non Transporteurs	268
III.6.3.2. Nombre de transports effectués	269
III.6.3.3. Différenciation comportementale : Ravitailleurs et Autonomes	269
III.6.3.4. Transferts de nourriture	270
III.7. Analyses histologiques	271
III.7.1. PND10.....	271
III.7.1.1. Systèmes sensoriels	271
III.7.1.2. Système moteur	273
III.7.1.3. Tronc cérébral	274
III.7.1.4. Cortex cérébraux	275
III.7.1.5. Noyaux thalamiques	276
III.7.1.6. Noyaux hypothalamiques	277
III.7.1.7. Système limbique	278
III.7.1.8. Substance blanche	279
III.7.2. PND21.....	280
III.7.2.1. Systèmes sensoriels	280
III.7.2.2. Système moteur	281

III.7.2.3. Tronc cérébral	282
III.7.2.4. Cortex cérébraux	283
III.7.2.5. Noyaux thalamiques	284
III.7.2.6. Noyaux hypothalamiques	285
III.7.2.7. Système limbique	286
III.7.2.8. Substance blanche	287
III.7.3. PND60.....	288
III.7.3.1. Systèmes sensoriels	288
III.7.3.2. Système moteur	289
III.7.3.3. Tronc cérébral	290
III.7.3.4. Cortex cérébraux	291
III.7.3.5. Noyaux thalamiques	292
III.7.3.6. Noyaux hypothalamiques	293
III.7.3.7. Système limbique	294
III.7.3.8. Substance blanche	295
III.7.4. Récapitulatif.....	296
III.8. Dosages des HAP et métabolites	298
III.8.1. PND0.....	298
III.8.2. PND21.....	299
III.9. Conclusion des résultats	301
III.9.1. Effets d'une exposition périnatale aux HAP sur le poids corporel	301
III.9.2. Effets d'une exposition périnatale aux HAP sur le développement moteur et sensoriel	301
III.9.3. Effets d'une exposition périnatale aux HAP sur le comportement individuel à l'âge adulte	302
III.9.4. Effets d'une exposition périnatale aux HAP sur le comportement social à l'âge adulte.....	303
III.9.5. Effets d'une exposition périnatale aux HAP sur le métabolisme cérébral.....	304
III.9.6. Effets d'une exposition périnatale aux HAP sur la concentration cérébrale de molécules mères et de métabolites mono-hydroxylés chez les ratons	305

DISCUSSION GENERALE

I. Rappels des objectifs.....	309
II. Originalité du modèle d'étude	310

III. Effets d'une exposition répétée par voie alimentaire à un mélange de 16 HAP chez la rate gestante et/ou allaitante. 312

III.1. Effets d'une exposition périnatale à un mélange de HAP sur la reproduction et le poids des animaux	312
III.2. Effets d'une exposition périnatale à un mélange de HAP sur le développement moteur et sensoriel	314
III.3. Effets d'une exposition périnatale à un mélange de HAP sur le comportement individuel et social à l'âge adulte	317
III.3.1. Effet sexe.....	317
III.3. 2. Niveau d'activité.....	318
III.3.3. Capacités d'apprentissage et de mémorisation	318
III.3.4. Niveau d'anxiété	319
III.3.5. Effets selon les doses	321
III.3.6. Effets selon la période d'exposition.....	321
III.4. Effets d'une exposition périnatale à un mélange de HAP sur le métabolisme cérébral	324
III.4.1. Utilisation de la cytochrome oxydase comme marqueur de l'activité neuronale.....	329
III.4.2. Evolution des perturbations au cours du temps	329
III.4.3. Effets selon les doses	330
III.4.4. Structures atteintes	331
III.4.5. Diminutions de l'activité enzymatique de la cytochrome oxydase.....	332
III.4.6. Augmentations de l'activité enzymatique de la cytochrome oxydase	333
III.5. Effets d'une exposition périnatale à un mélange de HAP sur la présence de HAP et de leurs métabolites au niveau du cerveau des jeunes.....	336
III.5.1. Dosage des HAP et de leurs métabolites	336
III.5.2. Présence des molécules dosées et effets neurotoxiques observés.....	341
IV. Facteurs de modulation de la toxicité observée	344
IV.1. Effets doses-réponses	344
IV.2. Effets des mélanges	347
IV.2.1. Généralités sur l'évaluation des mélanges.....	347
IV.2.2. Connaissances sur les mélanges de HAP	349
IV.3. Périodes d'exposition	350
IV.3.1. Hypothèse d'origines développementales de troubles observés chez l'adulte ...	350
IV.3.2. Anxiété.....	351

IV.3.3. Origines développementale de l'anxiété.....	352
IV.3.4. Conséquences à long terme d'une exposition précoce à un mélange de 16 HAP	352
IV.3.5. Contribution relative de chacune des deux périodes dans les effets observés....	353

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

I. Conclusion générale	359
II. Perspectives.....	362

BIBLIOGRAPHIE

VALORISATION SCIENTIFIQUE

AVANT PROPOS

Le travail de thèse présenté dans ce manuscrit a débuté en octobre 2009 et a été réalisé au sein de l'**Unité de Recherche Animal et Fonctionnalités des Produits Animaux**, à Vandœuvre-lès-Nancy, unité associée à l'INRA (USC340) au niveau des départements AlimH (Alimentation Humaine) et PhASE (Physiologie Animale et Systèmes d'Élevages) Il a bénéficié du soutien financier de l'**Institut National de la Recherche Agronomique** et de la **région Lorraine**.

Ce travail s'inscrit dans des problématiques actuelles en termes de santé publique, puisqu'il a pour objectif principal d'évaluer la **toxicité** pour le **système nerveux en développement** d'une exposition périnatale, *via* l'organisme de la mère, à de **faibles doses** d'un **mélange** de contaminants alimentaires, les **Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques**.

Plusieurs approches expérimentales ont été mises en œuvre dans ce but. Tout d'abord, le **développement moteur et sensoriel** des jeunes rats a été évalué, puis le **comportement individuel et social à l'âge adulte**, en termes de niveau d'**activité**, d'**anxiété**, et de capacités d'**apprentissage** et de **mémorisation**. En parallèle, des **analyses histologiques** sur coupes sériées de cerveau ont été réalisées afin d'évaluer l'impact potentiel de l'exposition aux HAP sur le **métabolisme énergétique** de plusieurs régions cérébrales. Enfin, le **transfert des HAP et de leurs métabolites**, entre l'organisme de la mère et celui des jeunes, a été quantifié, au **Laboratoire de Biosurveillance Humaine Analytique** au Luxembourg.

Le manuscrit se compose tout d'abord d'une **section bibliographique**, visant à situer la problématique de ces études dans un contexte historique et scientifique ; d'une **section méthodologique** présentant précisément les différents protocoles mis en place ; d'une **section expérimentale** décrivant les résultats obtenus au cours des deux principales expérimentations réalisées ; d'une **discussion générale** permettant de confronter ces résultats avec un ensemble plus large d'études déjà publiées ; puis d'une **conclusion** et de **perspectives** à ce travail. La **valorisation scientifique** de ce travail de thèse sera présentée à la fin du manuscrit.

SECTION BIBLIOGRAPHIQUE

« *We live in a chemical world* » (De Rosa et al., 2006).

I. Contexte de l'étude

I.1. Neurotoxicité développementale

I.1.1. Historique

La neurotoxicité pour l'organisme adulte de certaines substances comme le plomb et le mercure est connue depuis l'Antiquité (Weiss, 2000 ; Mendola et al., 2002 ; Grandjean & Landrigan, 2006). Par ailleurs, alors que l'idée de vulnérabilité particulière du système nerveux pendant le développement a été documentée pour la première fois au début des années 1920 (Barone et al., 2000), relativement peu d'attention a été portée à la notion de neurotoxicité développementale jusqu'à la fin du 20^{ème} siècle (Weiss, 2000).

L'affaire de la **thalidomide** représente sans doute l'un des premiers signaux d'alerte concernant la vulnérabilité de l'organisme en développement face à des expositions précoces à des substances peu ou pas toxiques chez l'adulte, mais dont les conséquences peuvent être tragiques chez le jeune. A la fin des années 1950, la thalidomide a été prescrite aux femmes enceintes comme sédatif ou pour lutter contre les nausées matinales, dans de nombreux pays dont l'Allemagne, où la molécule a été synthétisée et commercialisée en premier (Weiss, 2000). Les graves malformations congénitales (absence de membres, doigts surnuméraires) observées dans les années qui ont suivi, chez près de 15 000 enfants nés de mères ayant pris de la thalidomide pendant leur grossesse, ont eu un impact fort auprès du grand public, du monde scientifique et des gouvernements (Weiss & Landrigan, 2000). A Atlanta en 1967, un programme de surveillance des malformations congénitales a été mis en place à la suite de cette affaire au sein du Centre pour la prévention et le contrôle des maladies (*Center for Disease Control*, CDC) (Weiss & Landrigan, 2000), et la réglementation des médicaments a fortement évolué, notamment grâce à la création du centre mondial de la pharmacovigilance, aujourd'hui situé en Suède.

Ce n'est que 40 ans après l'affaire de la thalidomide, que le monde scientifique et institutionnel a commencé à comprendre que d'importants risques pouvaient être liés à une exposition précoce à des substances chimiques médicamenteuses ou environnementales

(Weiss & Landrigan, 2000). Il est apparu par la suite que ce cas n'était pas une exception, et au fur et à mesure des années, d'autres agents chimiques ou physiques ont été identifiés comme toxiques pour le système nerveux en cours de développement. D'une manière générale, les expositions de femmes étaient accidentelles, et les observations de troubles comportementaux ont eu lieu souvent plusieurs années après l'exposition.

Ainsi, au début des années 1970, et après des siècles d'observations anecdotiques (Weiss, 2000), le syndrome d'**alcoolisation** fœtale a finalement été décrit (Jones & Smith, 1973). Au même moment, il a été démontré qu'une exposition infantile à de l'**arsenic** *via* de la poudre de lait contaminée en 1955 au Japon, a induit des dommages cérébraux permanents chez les adolescents et les adultes ayant survécu (Dakeishi et al., 2006). Les effets neurotoxiques du **plomb** chez l'enfant avaient eux été décrit pour la première fois en 1943 par Byers et Lord, mais les preuves les plus convaincantes de conséquences de ce type d'exposition sur les capacités intellectuelles des enfants n'ont été publiées que 36 ans plus tard (Needleman et al., 1979).

En ce qui concerne le **mercure**, autre métal dont la toxicité est connue depuis des siècles, il a fallu attendre plusieurs années d'études et d'observations, pour que soit établi le lien entre l'intoxication de femmes consommant du poisson contaminé à Minamata au Japon dans les années 1960 ou des grains de semence traités au méthyl-mercure en Irak pendant l'hiver 1971-1972, et des effets sur le système nerveux d'enfants nés de ces mères exposées (Study Group of Minamata Disease, 1968 ; Marsh et al., 1987 ; Grandjean & Landrigan, 2006). D'autres études plus récentes en Nouvelle Zélande (Kjellstrom et al., 1989) et aux Iles Féroé (Grandjean et al., 1997), montrant les mêmes effets, ont contribué à l'établissement au niveau international en 2003, soit plus de 40 ans après les premières données d'exposition, d'une valeur limite d'exposition au méthyl-mercure dans le but de protéger l'organisme en développement (JEFCA, 2003).

L'association entre la consommation de **tabac** de la mère et des diminutions des capacités intellectuelles chez l'enfant a quand à elle été établie seulement à la fin des années 1980 (Mendola et al., 2002).

Plus récemment enfin, de forts niveaux de contamination aux PolyChloroBiphényles (**PCB**) au Japon et à Taiwan, respectivement en 1969 et 1979 (**Tableau 3**), ont conduit, dans les années 1990, à la reconnaissance de l'existence d'une corrélation entre une forte exposition

périnatale à cette famille de molécules, et des dysfonctionnements cognitifs et développementaux importants (Mendola et al., 2002 ; Grandjean & Landrigan, 2006).

Les exemples décrits dans cette première partie illustrent le fait que la compréhension de la vulnérabilité unique de l'organisme en développement face à des agents chimiques ou physiques, qu'ils soient médicamenteux ou environnementaux, a évolué progressivement, au fur et à mesure d'observations de cas d'expositions précoces à des doses fortes. Les études menées ensuite chez l'animal ont conforté l'idée qu'une large gamme de molécules, qui ne sont pas nocives chez l'adulte, sont susceptibles d'entraîner des troubles neurodéveloppementaux chez le jeune, qui n'apparaîtront que lorsque l'animal aura atteint sa maturité.

I.1.2. Définition

La **neurotoxicité développementale** est aujourd'hui définie de manière précise, comme « toute action d'un agent toxique (chimique, physique, ou biologique) sur le système nerveux en développement, avant ou après la naissance, et qui interfère avec les structures et les fonctions normales. L'exposition à des xénobiotiques pendant le développement peut induire des effets délétères sur un plan structural, fonctionnel, neurochimique, et comportemental » (Dorman et al., 2001 ; Slikker & Bowyer, 2005).

Les conséquences concrètes de la prise en compte de la sensibilité particulière du système nerveux dans les phases précoces de son développement, ont été par exemple la création d'agences dédiées à la surveillance des effets neurotoxiques pour le jeune, comme la *Food Quality Protection Act* (FQPA) en 1996 aux Etats-Unis. Ainsi, l'un des premiers buts de cette organisation a été de surveiller l'exposition des enfants aux pesticides contenus dans l'alimentation.

I.1.3. Substances neurotoxiques connues

Le développement scientifique et technologique s'accompagne d'une augmentation du nombre et de la diversité de ces substances, à l'origine d'une exposition croissante de

l'individu. Les produits chimiques font ainsi partie intégrante de notre vie quotidienne, et près de 100 000 substances chimiques sont recensées dans l'inventaire européen EINECS (*European Inventory of Existing Chemical Substances*) établi en 1981. Parmi ces substances, moins de 3 000 ont fait l'objet d'analyses approfondies afin d'évaluer et de quantifier leurs propriétés toxiques et écotoxiques (Afsset 2006 ; INRS 2008). Aux Etats-Unis, 80 000 substances chimiques sont enregistrées par l'agence américaine de protection de l'environnement (*United States Environmental Protection Agency*, US-EPA), et près de 700 nouvelles substances sont introduites chaque année (US-EPA, 1998). Parmi ces 80 000 produits, environ 200 sont connues pour leurs propriétés neurotoxiques pour l'Homme, et moins de 10 sont reconnues pour être des molécules toxiques pour le cerveau en développement (**Figure 1**) (Grandjean & Landrigan, 2006 ; Miodovnik, 2011).

De plus, sur 3 000 produits chimiques produits ou importés dans des quantités supérieures à 1 million de livres par an aux Etats-Unis, 43% subissent une évaluation toxicologique minimale, et seulement 23% sont évalués en termes de risques pour l'organisme en développement (Weiss & Landrigan, 2000).

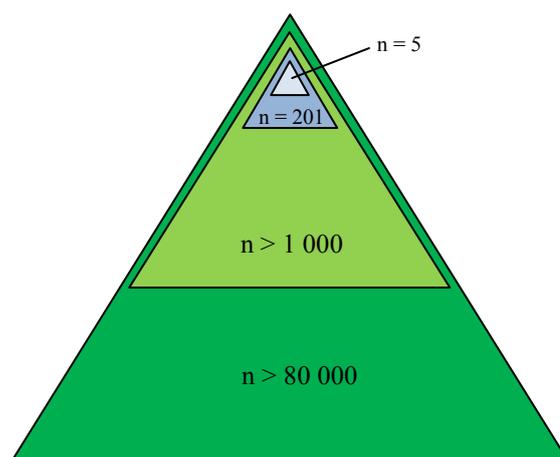


Figure 1 : Proportion relative des substances chimiques dont l'action sur le développement cérébral est documentée (d'après Grandjean et Landrigan, 2006)

Malgré l'ampleur de la tâche, de nombreux efforts sont réalisés pour améliorer la connaissance des risques liés à une exposition à ce type de produits. Ainsi, la commission européenne a mis en place depuis le 1^{er} juin 2007 une nouvelle stratégie, le règlement

REACH (*Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals*), géré par l'agence ECHA (*European CHemicals Agency*). Les buts principaux de REACH sont d'accroître les connaissances sur la toxicité des substances chimiques dont le volume produit ou importé est supérieur à une tonne par an, afin d'améliorer la protection de la santé humaine et de l'environnement tout en maintenant un niveau de compétitivité élevé de l'industrie chimique européenne. Cependant, l'évaluation des effets neurotoxiques pour l'organisme en développement n'est pas l'un des objectifs majeurs de ce programme européen (Grandjean & Landrigan, 2006).

Comme le montre la figure 1, une très faible proportion de produits est reconnue comme neurotoxique pendant le développement, peu d'entre eux étant étudiés dans ce but. Le vrai potentiel des substances chimiques pour causer des troubles neurotoxiques pour l'organisme en développement est sans doute fortement sous-estimé. Néanmoins, la prévention dans ce domaine est possible, à condition de bien connaître les risques (Grandjean & Landrigan, 2006). Il semble ainsi absolument nécessaire de connaître la toxicité d'un produit avant de l'utiliser dans le monde entier, afin de protéger les femmes enceintes et les jeunes enfants (Lanphear et al., 2005).

Le tableau 1 indique les différentes molécules ou familles de molécules reconnues comme neurotoxiques pour l'organisme en développement, et celles pour lesquelles les données sont jugées encore insuffisantes.

Tableau 1 : Substances neurotoxiques pour le développement (d'après Miodovnik, 2011)

Neurotoxiques reconnus, sur la base de nombreuses données expérimentales sur l'animal, et de larges études épidémiologiques

Métaux ou composés métalliques

- *Plomb
- *Méthyl mercure
- *Arsenic
- Manganèse

Produits chimiques et solvants

- Pesticides organophosphorés
- Pesticides organochlorés
- *Polychlorobiphényles (PCB)
- Ethanol
- *Toluène

Polluants atmosphériques

- Fumée de cigarette

Neurotoxiques potentiels, sur la base de peu de données expérimentales sur l'animal, et de peu d'études épidémiologiques

Métaux ou composés métalliques

- Cadmium
- Tributyltine

Produits chimiques et solvants

- Polybromodiphényléther
- Phtalates
- Bisphénol A
- Perfluorocarbures
- Trichloroéthylène
- PolyChloroDiBenzo-para-Dioxines (PCDD)
- PolyChloroDibenzoFuranes (PCDF)

Polluants atmosphériques

- Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP)
-

* : Substances reconnues comme neurotoxiques pour l'organisme en développement dans l'étude de Grandjean & Landrigan, 2006.

Pour le pédiatre américain HL Needleman, « nous menons actuellement une vaste expérimentation toxicologique dans notre société, dans laquelle nos enfants et les enfants de nos enfants sont les sujets expérimentaux » (Weiss & Landrigan, 2000).

Le problème peut être résumé en deux questions majeures : dans quelle mesure les substances chimiques environnementales causent-elles des troubles neurodéveloppementaux ? Quelles sont les substances chimiques, en plus du plomb, de l'éthanol, des PCB et du mercure, capables d'induire de tels troubles ? (Weiss & Landrigan, 2000).

Apporter des réponses à ces questions représente un point essentiel en termes de prévention des risques, et deux guides ont été mis au point pour aider la recherche dans le domaine de la neurotoxicologie développementale ; le premier par l'US-EPA en 1998, et le deuxième par l'OCDE (Organisation de Coopération et de Développement Economiques) en 2007 (Dubovický et al., 2008). Ces directives renseignent notamment sur les doses et le type d'exposition, le choix des espèces animales, et les tests à mettre en place au niveau moteur, sensoriel et comportemental.

I.1.4. Conséquences comportementales d'expositions précoces

Les malformations anatomiques induites par la thalidomide sont une conséquence très visible des risques liés à une exposition précoce à une substance chimique en particulier ; mais au même moment, l'idée nouvelle de l'existence de troubles comportementaux plus subtils induits par des expositions précoces à des agents chimiques ou physiques a été évoquée. Le concept de tératologie comportementale a ainsi été proposé pour la 1^{ère} fois en 1963 par Werboff et Gottlieb. Par la suite, la mise en place de tests spécifiques visant à évaluer chez l'animal la neurotoxicité comportementale de médicaments a été réalisée à partir de 1975 par la Grande-Bretagne et le Japon ; puis l'utilisation de batteries de tests comportementaux dans l'industrie pharmaceutique est devenue routinière au début des années 1980 (Ulbrich & Palmer, 1996).

Actuellement, selon l'Académie Nationale des Sciences aux Etats-Unis, 3% des désordres développementaux pourraient directement être attribués à une exposition précoce à des substances environnementales, et 25% seraient le résultat d'une telle exposition en

combinaison avec une prédisposition génétique (National Research Council, 2000). Les troubles les plus fréquemment décrits sont l'hyperactivité, les troubles d'hyperactivité avec déficits attentionnels, les difficultés d'apprentissage, la dyslexie, les troubles sensoriels, les retards mentaux, les troubles autistiques, les troubles de l'anxiété (Yeargin-Allsopp et al., 1992 ; Labie, 2007).

Des études récentes montrent que 9,5 millions d'enfants américains de moins de 18 ans, soit 13,2% d'entre eux, présentent au moins l'un de ces troubles (Boulet et al., 2009). En 2008, des difficultés d'apprentissage étaient décrites chez 5 millions d'enfants aux Etats-Unis, et le même nombre d'enfants étaient suivis pour des déficits attentionnels et de l'hyperactivité, soit 30% de plus qu'en 1997 (Bloom et al., 2009), cette augmentation étant liée entre autre à un meilleur diagnostic (Miodovnik, 2011). Par ailleurs, d'après le CDC, le nombre d'enfants atteint de troubles autistiques aux Etats-Unis a été multiplié par dix depuis les années 1980, ceux-ci toucheraient aujourd'hui près de 1% des enfants entre 3 et 17 ans, soit 700 000 cas (CDC 2006 ; Kogan et al., 2009). Cette forte augmentation peut en partie être expliquée par des meilleurs moyens de diagnostic, la prise en compte de cas moins sévères, et des diagnostics réalisés plus précocement, mais ces raisons ne suffisent pas à écarter une réelle augmentation du nombre de cas (Hertz-Picciotto & Delwiche, 2009).

I.1.5. Difficultés actuelles

S'il a fallu plusieurs décennies pour comprendre que les effets neurotoxiques d'une substance pouvaient être très différents chez l'adulte et chez le jeune, il a aussi fallu prendre en compte que la neurotoxicité d'une molécule pour l'organisme en développement pouvait se traduire par des troubles moins visibles du comportement ou des fonctions intellectuelles. Les difficultés liées à l'évaluation d'une exposition précoce et à la mise en évidence de ce type d'effets chez l'Homme sont multiples.

Tout d'abord, en ce qui concerne l'exposition, il est difficile, sauf dans le cas d'une prescription de médicaments, d'évaluer précisément le niveau d'exposition à une substance environnementale pendant la grossesse et/ou l'allaitement. Le niveau d'exposition de l'organisme en développement est également très difficile à quantifier *a posteriori*. De plus, l'exposition à une même molécule peut provenir de plusieurs sources, et l'Homme est exposé

en permanence à des milliers de molécules différentes. Les effets additifs ou synergiques des co-contaminants représentent une difficulté supplémentaire dans l'évaluation des risques, et la toxicité de mélanges de molécules toxiques peut être égale, inférieure, ou supérieure à la somme de la toxicité de chaque composé, et est ainsi difficile à prédire (Mumtaz et al., 2007). A l'heure actuelle, les interrogations dans le domaine général de la toxicologie, et en particulier en neurotoxicologie développementale, se focalisent ainsi progressivement notamment sur la notion de l'exposition de l'individu à des mélanges de polluants.

Par ailleurs, l'exposition de l'organisme en développement à des substances environnementales, seules ou en mélanges, peut être difficile à quantifier, et les effets difficiles à déterminer, les niveaux d'exposition environnementale étant souvent faibles, voir très faibles. Ainsi, les études actuelles se concentrent également sur cette notion d'exposition longue de l'organisme, mais à de faibles doses, qui peuvent induire des effets très différents de ceux résultant d'une exposition à de fortes doses (Calabrese, 2010).

La connaissance et la possibilité technique d'analyser les biomarqueurs d'exposition pertinents sur des tissus humains compliquent encore davantage la tâche en matière d'évaluation des risques (Miodovnik, 2011), et représentent des enjeux pour le monde moderne de la toxicologie.

Concernant l'évaluation plus spécifique des effets sur le comportement, plusieurs difficultés peuvent être relevées. Le développement du système nerveux se déroule sur une période relativement longue, et offre ainsi une grande fenêtre de sensibilité. Selon la période et la durée d'exposition, il peut en résulter un large spectre de troubles (Miodovnik, 2011). D'autre part, ces troubles sont souvent détectés bien après l'exposition, quand le cerveau est mature ; et pour certains d'entre eux comme dans le cas de difficultés d'apprentissage, ils sont détectés en utilisant des tests précis, et dans des conditions particulières, une fois que l'enfant est scolarisé par exemple (Weiss, 2000). Par ailleurs, il est de plus en plus suggéré dans la littérature, qu'un lien pourrait être établi entre une exposition précoce à certains polluants, comme les pesticides notamment, et l'apparition tardive de maladies neurodégénératives comme les maladies de Parkinson ou d'Alzheimer (Landrigan et al., 2005).

Ce type de toxicité latente est qualifiée par certains auteurs de « toxicité silencieuse », si l'on tient compte des cas évalués et observés, et de tous les cas encore inconnus (Weiss, 2000). D'autres auteurs évoquent l'idée d'une « pandémie silencieuse », pour mettre en

évidence le fait que la neurotoxicité développementale suite à une exposition à des substances environnementales peut être retrouvée partout dans le monde, compte-tenu des propriétés de certaines de ces molécules ; mais que le nombre des cas est sans doute sous-estimé, et n'est pas reflété par les statistiques de santé classiquement disponibles (Grandjean & Landrigan, 2006).

Finalement, il apparaît très difficile, sans études expérimentales menées chez l'animal, de lier un trouble tardif du comportement, à une exposition à une substance chimique environnementale pendant la grossesse, l'allaitement, ou la petite enfance (Dubovický et al., 2008).

I.2. Sécurité alimentaire

I.2.1. Définition

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, la contamination de l'alimentation est un problème de santé public international : « la nutrition et la sécurité sanitaire des aliments sont deux composantes interdépendantes de la santé publique (...). La sécurité sanitaire des aliments veille à ce que les denrées alimentaires soient aussi sûres que possible en termes de santé publique et ce, d'un bout à l'autre de la chaîne alimentaire, du producteur au consommateur ».

La toxicité d'un certain nombre de substances chimiques retrouvées dans les aliments est clairement connue, ce qui permet d'établir des réglementations. C'est le cas notamment pour les substances ajoutées volontairement, telles que les additifs, ou pour d'autres produits trouvés dans les aliments, comme les pesticides ou les médicaments pour animaux. En revanche, pour d'autres types de contaminants, il n'y a pas toujours d'information concernant les éventuels effets sur la santé de l'Homme, ni de réglementations précises.

Les termes « contaminants alimentaires » désignent toute substance qui n'est pas ajoutée intentionnellement à la denrée alimentaire, mais qui est cependant présente dans celle-ci. Les matières étrangères telles que, par exemple, les débris d'insectes ou les poils d'animaux ne sont pas couvertes par cette définition. Les denrées alimentaires peuvent faire l'objet de contaminations à l'une ou l'autre des étapes de leur élaboration, depuis la production des

matières premières jusqu'à la consommation du produit fini. Ces différentes contaminations présentent un risque potentiel pour la santé des consommateurs.

Il existe différents types de contaminants pouvant être retrouvés dans les denrées alimentaires, résultant de deux types de contamination : une contamination des matières premières d'une part, et une contamination issue du procédé industriel de fabrication ou de conditionnement de l'aliment d'autre part.

Dans la première catégorie se trouvent les résidus provenant de traitements phytosanitaires (insecticides, herbicides, engrais,...) ou zootechniques (antibiotiques, hormones,...), les contaminants de l'environnement (métaux lourds, polluants organiques persistants), et des produits naturels (mycotoxines).

Dans la seconde catégorie de contaminants alimentaires se trouvent les additifs alimentaires (colorants, conservateurs, édulcorants, gélifiants), les molécules provenant de la migration des matériaux (Bisphénol A, chlorure de vinyle, phtalates) et les molécules néoformées (hydrocarbures aromatiques polycycliques, prion).

Actuellement, l'un des principaux enjeux en termes de sécurité des aliments est de limiter la présence de contaminants chimiques, organiques, ou microbiologiques dans les aliments, et de réduire ainsi le risque pour la santé humaine.

I.2.2. Instances réglementaires

I.2.2.1. Historique

Aux niveaux national, européen et international, plusieurs instances réglementaires sont notamment chargées d'évaluer la présence de contaminants dans les denrées alimentaires, les risques potentiels pour la santé du consommateur, et d'en informer le grand public. La création de ces agences date généralement de la deuxième moitié du 20^{ème} siècle, ou du début du 21^{ème} siècle. Néanmoins, les premières interrogations concernant la sécurité sanitaire des aliments et le besoin de cadres juridiques précis sont plus anciennes, comme le montrent les origines de la création de la *Food and Drug Administration* (FDA) aux Etats-Unis. Les prémices de cette organisation officielle se situent au début du 20^{ème} siècle et sont assez surprenantes (Weiss, 2000). Celui qui en deviendra le 1^{er} directeur, Harvey W. Wiley, alors chimiste au sein du ministère américain de l'agriculture, a mis en place dès 1902 un groupe de

volontaires, pour la plupart des chimistes, afin de tester les effets des conservateurs alimentaires sur la santé. Cette équipe, nommée « *poison squad* », ingérait volontairement de fortes doses de conservateurs (borax, acide salicylique, formaldéhyde, saccharine, benzoate de sodium, et sels de cuivre) (Photo 1 et 2). La santé des membres de l'équipe était évaluée une fois par semaine par des médecins, et c'est ainsi que le formaldéhyde a été officiellement interdit en tant que conservateur alimentaire à cause des effets néfastes (nausées, vomissements, ...) causés sur les hommes de l'équipe. A la suite de cette étude, l'intérêt de la population américaine pour la sécurité des aliments et la protection du consommateur a augmenté, et la FDA a été officiellement créée par le président Roosevelt en 1906.



Photo 1 : Harvey W. Wiley (au 2^{ème} plan, le 3^{ème} à partir de la droite) et les membres de la « *poison squad* » (FDA History Office, 1905)

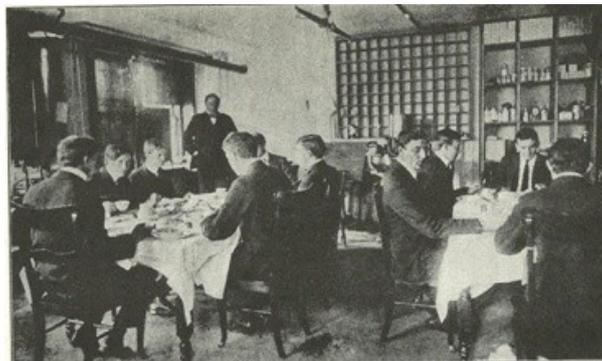


Photo 2 : Salle à manger de la « *poison squad* » (FDA History Office, 1905)

I.2.2.2. Niveau national

En France :

➤ **Agence Nationale de Sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES)**

L'ANSES a été créée le 1^{er} juillet 2010 par la fusion de deux agences sanitaires françaises : l'AFSSA (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments) et l'AFSSET (Agence Française de Sécurité Sanitaire de l'Environnement et du Travail). L'ANSES reprend ainsi les missions et les moyens respectifs de ces deux agences.

L'ANSES intervient dans les domaines du travail, de l'environnement, de l'alimentation, de la santé et du bien-être des animaux, de la santé des végétaux. L'objectif principal de cette agence est de contribuer à assurer la sécurité des travailleurs et des consommateurs. En santé humaine, l'Agence évalue les propriétés nutritionnelles et fonctionnelles des aliments, ainsi que l'ensemble des risques auquel l'Homme peut être exposé au travers du travail, de l'environnement et de l'alimentation.

Pour cela, l'ANSES a récemment réalisé deux Etudes de l'Alimentation Totale française, EAT 1 et EAT 2. Le but de ces études est d'évaluer la présence d'un certain nombre de substances contaminantes ou de nutriments au sein d'aliments. L'Agence mène actuellement une autre EAT, centrée sur l'alimentation des enfants âgés de 0 à 3 ans.

Aux Etats-Unis :

➤ **Agence fédérale américaine des produits alimentaires et médicamenteux (*Food and Drug Administration, FDA*) :**

La FDA est l'une des premières agences créée dans le but de surveiller la qualité sanitaire des aliments. Elle a été créée en 1906 aux Etats-Unis, et possède actuellement des bureaux dans plus de cinquante pays. Elle a notamment en charge de délivrer pour les Etats-Unis des autorisations de mises sur le marché pour les médicaments et produits alimentaires.

➤ **Agence américaine de protection de l'environnement (US-EPA) :**

L'US-EPA a été créée en 1970 à Washington, dans le but de réunir au sein d'une seule agence plusieurs domaines de recherche, de surveillance et de réglementation de la qualité de

l'air, de l'eau et des sols. L'une des missions de l'US-EPA est de protéger la santé humaine et de préserver l'environnement.

La FDA et l'US-EPA sont des agences nationales américaines, mais elles sont citées ici car les études issues du travail de ces agences font autorité dans les domaines de la sécurité alimentaire et de l'évaluation des risques toxicologiques liées à une exposition à des polluants.

I.2.2.3. Niveau européen

➤ **Autorité européenne de sécurité des aliments (*European Food Safety Authority, EFSA*) :**

Créée en janvier 2002 à la suite d'une série de crises liées à la sécurité des aliments survenues à la fin des années 1990 (notamment la crise dite de la « vache folle »), l'EFSA est une source de conseils scientifiques et de communication dans le domaine des risques liés à la chaîne alimentaire. En Europe, le domaine de l'évaluation du risque est séparé de celui de la gestion du risque, qui dépend entre autre de la Commission Européenne et du Parlement Européen.

L'EFSA est reconnue au niveau international en tant qu'organisme européen de référence notamment pour l'évaluation des risques liés à la sécurité des aliments destinés à l'alimentation humaine et animale.

I.2.2.4. Niveau international

➤ **Organisation Mondiale de la Santé (OMS) :**

Les diplomates réunis pour créer l'Organisation des Nations Unies en 1945 ont notamment abordé la création d'une organisation mondiale de la Santé. La Constitution de l'OMS est entrée en vigueur le 7 avril 1948. L'OMS est l'autorité directrice et coordinatrice, dans le domaine de la santé, des travaux ayant un caractère international au sein du système des Nations Unies.

En termes de sécurité alimentaire, l'OMS a mis en place depuis 1976 un comité, le « *Global Environment Monitoring System - Food Contamination Monitoring and Assessment Programme* » ou **GEMS/Food**, qui a pour but d'informer à la fois les gouvernements, la

commission du *Codex Alimentarius*, ainsi que le public, sur les concentrations des contaminants dans les aliments, leur contribution à l'exposition humaine totale, et leur impact sur la santé des consommateurs. Ainsi, l'OMS, à travers le programme GEMS/Food rend disponibles les données de surveillance relatives aux contaminants alimentaires et à l'exposition des populations à travers leur régime alimentaire.

Par ailleurs, il existe un autre acteur en matière de protection contre les contaminants environnementaux, le Programme des Nations Unies pour l'Environnement (PNUE). Les états membres de l'OMS ont ainsi adopté en 2000 une résolution reconnaissant que la sécurité sanitaire des aliments est un aspect essentiel de la santé publique.

➤ **Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (*Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO*) :**

L'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture a été créée en 1945, et joue un rôle essentiellement dans la lutte contre la faim.

➤ **Commission du *Codex Alimentarius* :**

La Commission du *Codex Alimentarius* a été créée en 1963 par la FAO et l'OMS afin d'élaborer des normes alimentaires, des lignes directrices et d'autres textes, tels que des Codes d'usages, dans le cadre du Programme mixte FAO/OMS sur les normes alimentaires. L'un des buts principaux de ce programme est la protection de la santé des consommateurs.

➤ **Comité mixte FAO/OMS d'experts sur les additifs alimentaires (*Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives JECFA*) :**

Créé en 1956, initialement pour évaluer l'innocuité des additifs alimentaires, le Comité mixte FAO/OMS d'experts des additifs alimentaires travaille actuellement aussi sur les contaminants, les composés toxiques naturels et les résidus des produits vétérinaires présents dans les aliments. Le comité a évalué plus de 1500 composés, dont 40 contaminants et 90 résidus de médicaments vétérinaires.

Bien qu'il ne soit pas officiellement inclus dans la structure de la Commission du *Codex Alimentarius*, ce comité transmet les avis d'experts scientifiques indépendants à la Commission et aux comités spécialisés y afférents. La FAO et l'OMS disposent, pour le Comité, de sites Web distincts où leurs travaux sont présentés selon le point de vue de chaque organisation.

I.3. Les Polluants Organiques Persistants

I.3.1. Introduction

Depuis le début du 20^{ème} siècle, l'utilisation de milliers de substances chimiques s'est développée dans l'agriculture et l'industrie, dans le but d'améliorer les conditions de vie de l'Homme. Ainsi, les molécules synthétisées ont permis d'augmenter le rendement des cultures, ou ont contribué à créer toutes sortes de produits du quotidien. Mais, en ce début du 21^{ème} siècle, et malgré des réglementations strictes, notre environnement est envahi par beaucoup de ces substances toxiques, que l'on retrouve partout, y compris dans les tissus animaux et de la plupart des êtres humains à travers le monde (Schafer & Kegley, 2002). On détecte par exemple des PCB dans les tissus de 90% de la population américaine, 30 ans après leur interdiction (US-CDC, 2005).

Parmi ces substances chimiques produites volontairement ou non par l'Homme, un groupe particulier fait l'objet d'un grand intérêt scientifique et de réglementations strictes : celui des Polluants Organiques Persistants (POP). Les POP ont été largement rejetés dans l'environnement depuis plusieurs dizaines d'années, et sont en conséquence aujourd'hui omniprésents dans tous les écosystèmes. On en trouve des quantités mesurables sur tous les continents, dans toutes les zones climatiques et dans tous les secteurs géographiques, y compris dans des zones isolées (en pleine mer, dans les déserts, dans l'Arctique et l'Antarctique), où il n'existe aucune source locale significative.

I.3.2. Caractéristiques

Les POP sont des composés organiques lipophiles, souvent halogénés, qui résistent à la dégradation photolytique, biologique et chimique. Ils partagent un ensemble de caractéristiques servant à les définir.

➤ **Persistence** : les POP sont persistants dans l'environnement car ils ne sont pas sensibles aux dégradations biologiques naturelles. Leur demi-vie se situe généralement entre 7 et 8 ans.

➤ **Transport** : les POP sont facilement transportés sur de longues distances, par voie aérienne ou maritime, et se déposent loin de leur lieu d'émission. Ainsi, bien que les POP soient interdits dans plusieurs pays, leur présence n'est pas réduite à certaines zones géographiques.

➤ **Toxicité** : les POP ont de fortes probabilités d'engendrer des effets nocifs importants sur la santé et l'environnement, aussi bien à proximité qu'à une grande distance de leur source. Ces caractéristiques toxiques relèvent de plusieurs domaines : développement de cancers et de troubles neurologiques, perturbations des systèmes immunitaire et endocrinien, troubles de la reproduction. Il est difficile d'attribuer directement la cause d'une pathologie à l'exposition à un polluant ou à un groupe de POP en particulier. En effet, l'Homme est exposé à toute une gamme de POP, le plus souvent de manière continue, à de faibles doses, et sous forme de mélanges complexes.

➤ **Bioaccumulation** : de par leur caractère liposoluble, les POP sont susceptibles de bioaccumulation, notamment dans la chaîne alimentaire. Ils se concentrent dans les organismes qui occupent les plus hauts niveaux trophiques. L'Homme étant au sommet de la chaîne alimentaire, il est fortement exposé aux POP par la consommation d'aliments contaminés, essentiellement d'origine animale.

C'est la combinaison de ces quatre propriétés qui peut rendre les POP si néfastes. La persistance et la mobilité de ces molécules font qu'ils peuvent se trouver dans le monde entier. On trouve parmi les peuples autochtones de l'Arctique, qui se nourrissent traditionnellement de poissons à fort contenu en graisse, des niveaux très élevés de POP, alors qu'ils se trouvent à des centaines ou des milliers de kilomètres des endroits où ces substances chimiques ont été libérées, et qu'ils n'ont probablement pas bénéficié de leur utilisation initiale.

I.3.3. Classification

L'ensemble des POP est réparti en trois catégories différentes (**Tableau 2**) : les substances produites non intentionnellement par des activités humaines, les substances issues

de la fabrication et de l'utilisation de produits chimiques et enfin les substances issues de l'utilisation de pesticides.

Tableau 2 : Liste des POP établie dans le cadre du Protocole d'Aarhus et de la Convention de Stockholm (d'après Rychen et al., 2005)

Produits de synthèse		Sous-produits involontaires des processus industriels et de combustion
Pesticides	Produits industriels	
Hexachlorobenzène	Hexabromobiphényl	HAP (Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques)
Mirex	PCB (PolyChloroBiphényles)	PCDD (PolyChloroDiBenzo-para-Dioxines)
Toxaphène		PCDF (PolyChloroDibenzoFuranes)
DDT		
Lindane		
Aldrine		
Chlordane		
Dieldrine		
Heptachlore		
Endrine		

I.3.4. Réglementation

Compte tenu de la large diffusion des POP et de leur potentiel toxique, la surveillance et la gestion des risques liés à ces substances représentent aujourd'hui une priorité. Pour guider l'action des pouvoirs publics, les émissions de POP sont réglementées à l'échelle internationale depuis plusieurs années, par deux accords majeurs.

➤ Protocole d'Aarhus :

En juin 1998, le protocole d'Aarhus a été adopté dans le cadre de la Convention de Genève sur la pollution atmosphérique transfrontière à longue distance. Le protocole vise 16 substances prioritaires, parmi lesquelles 11 pesticides, 2 substances chimiques industrielles, et

3 sous-produits de réaction. Par ce protocole, la production et l'utilisation de plusieurs produits sont interdites (aldrine, chlordane, chlordecone, dieldrine, endrine, mirex, toxaphène, hexabromobiphényle). Le protocole d'Aarhus prévoit également l'interdiction future du dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT), de l'heptachlore, de l'hexachlorobenzène (HCB), et des PCB. Enfin, le protocole vise à limiter considérablement l'utilisation du DDT, de l'hexachlorocyclohexane (HCH, dont le lindane), et des PCB. Les Parties se voient obligées de réduire les niveaux d'émissions des dioxines, furannes, HCB et Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP).

Le protocole d'Aarhus a pour objectif la réduction des émissions des HAP en dessous des niveaux d'émissions observés en 1990. Ce traité a été ratifié par la France le 25 juillet 2003 et est entré en vigueur le 23 octobre 2003. Il a été revu en décembre 2009 et prend désormais en compte les PCB.

➤ Convention de Stockholm :

La convention de Stockholm, réunissant 122 pays le 10 décembre 2000 sous l'égide du Programme des Nations Unies pour l'Environnement, a préconisé l'interdiction de l'utilisation et de la production de 12 composés extrêmement toxiques, (appelés « sale douzaine »), à l'origine de la plupart des préoccupations actuelles. Neuf d'entre eux ont été utilisés comme pesticides (aldrine, DDT, chlordane, dieldrine, endrine, heptachlore, hexachlorobenzène, mirex, toxaphène). Les 3 autres familles de POP qui posent d'importantes questions sont les PCB, les PCDD (Polychlorodibenzo-para-dioxines) et les PCDF (Polychlorodibenzofurannes). Par principe de précaution, d'autres molécules, telles que les PBDE (Polybromodiphényléther), le HCH, et les HAP ont par la suite été ajoutés à cette liste.

Enfin, la convention recommande également que les parties engagées s'assurent qu'aucun nouveau composé chimique, possédant des caractéristiques propres aux POP, ne soit produit et qu'aucune installation ne génère ou n'émette des composés de ce type ; et que les composés interdits soient substitués par d'autres produits.

La convention est entrée en vigueur le 17 mai 2004 et fait maintenant partie du droit international. En avril 2005, plus de 90 pays l'avaient signée. En mai 2009, des avancées

significatives ont eu lieu à la 4^e Conférence des Parties à la Convention. Ainsi, 7 nouvelles substances sont prises en compte, dont le pentachlorobenzène.

Au niveau de l'Union Européenne, il n'existe pas de texte spécifique concernant la limitation des rejets de POP. En revanche, plusieurs textes visant à diminuer la contamination en dioxines et furannes le long de la chaîne alimentaire ont été signés entre 2001 et 2002. Le protocole d'Aarhus et la convention de Stockholm sont intégrés au sein de la réglementation européenne par le règlement européen (CE) 850/2004 du 29 avril 2004.

Au niveau national, deux plans nationaux santé-environnement (PNSE) (2004-2008 et 2009-2013) recommandent de réduire les émissions de certains composés, tels que les dioxines, les PCB, et les HAP.

I.3.5. Emissions

La quantification de l'émission des POP semble difficile, car ils sont émis en petites quantités et de manière diffuse. Le Centre Interprofessionnel Technique d'Etudes de la Pollution Atmosphérique (CITEPA) fourni les valeurs suivantes pour l'année 2009, en France :

- Dioxines et furannes : 89 g TEQ (*Toxic Equivalent Quantity*)
- HAP : 19 tonnes
- PCB : 58 kg
- HCB : 15,2 kg

Cet inventaire des émissions montre également que les POP sont majoritairement émis par le secteur résidentiel (18% pour les dioxines et furannes, 66% pour les HAP, 20% pour les PCB et 6,3% pour le HCB). De plus, les émissions de dioxines, HAP, PCB et HCB ont largement diminué depuis 1990.

I.3.6. Les Polluants Organiques Persistants dans l'alimentation

A cause de leur caractère lipophile et de leur capacité de persistance, les POP ont tendance à s'accumuler dans la chaîne alimentaire, particulièrement dans les tissus gras, et ainsi contaminer l'Homme via l'ingestion de produits tels que le poisson, la viande, les œufs ou les produits laitiers.

La surveillance de la concentration des POP dans les denrées alimentaires est fortement recommandée depuis plusieurs années par l'OMS, par l'intermédiaire de son système mondial de surveillance continue de l'environnement (GMS/Programme alimentaire). Depuis 1976, des données sur les concentrations de nombreux POP dans l'alimentation humaine et animale ont ainsi pu être collectées. En 2002, le comité mixte d'experts FAO/OMS a estimé qu'une forte proportion de la population était exposée à des concentrations de dioxines, furannes et PCB-*dioxin like* supérieures aux doses mensuelles tolérables provisoires fixées pour ce groupe de POP. La quasi-totalité de cette exposition se fait par voie alimentaire, en particulier *via* les produits d'origine animale.

De nombreuses études renseignent sur les concentrations de POP dans certains groupes d'aliments, mais il semble que peu d'entre elles ne prennent en compte les habitudes alimentaires des populations étudiées (Gasull et al., 2011). Il s'agit pourtant d'un facteur essentiel pour établir précisément l'exposition humaine par voie alimentaire aux POP.

L'exposition aux POP par voie alimentaire, en particulier aux PCB ou aux dioxines, peut être chronique ou aiguë, suite par exemple à une contamination forte et souvent accidentelle de denrées alimentaires. Le tableau 3 résume les principaux événements des 60 dernières années dans le monde ayant eu pour conséquence une forte contamination environnementale et alimentaire en PCB, PCDD ou PCDF.

Tableau 3 : Historique des principaux événements ayant conduit à une contamination environnementale et alimentaire en PCB, PCDD ou PCDF

Origine de la contamination	Pays	Usine/Ville ou événements	Année
Contamination industrielle dans des usines de production de PCDD et PCDF	Etats-Unis	Monsanto/Nitro	1949
	Allemagne	BASF/Ludwigshafen	1953
	France	Rhône Poulenc/Grenoble	1956
	Hollande	Phillips-Duphar/Amsterdam	1963
	Etats-Unis	Dow Chemical/Midland	1964
	Tchécoslovaquie	Spolana/Prague	1964-69
	France	Rhône Poulenc/Grenoble	1966
	Grande-Bretagne	Coalite & Chemical products/Derbyshire	1968
	Italie	ICMESA/Seveso	1976
Contamination frauduleuse par des dioxines	Belgique	Contamination de graisse destinée à l'alimentation animale par de l'huile de vidange	1999
Contamination accidentelle	Etats-Unis	Contamination animale par des peintures aux PCB	1940-50
	Japon (Yusho)	Huile de riz alimentaire contaminée par une fuite d'un liquide riche en PCB et par des dioxines au niveau d'une presse hydraulique	1969
	Taiwan		1979
	Etats-Unis	Contamination d'un abattoir de porc par une fuite au niveau d'un transformateur électrique	1979
	Vietnam	Pulvérisation d'herbicides contaminés avec des dioxines	Fin 1960-70
Intoxication chronique aux dioxines	France (Gilly sur Isère)	Proximité d'une usine d'incinération d'ordures ménagères non conforme	2001

En 2002, une étude américaine reprenant des données de la FDA, montre que des concentrations de POP peuvent être mesurées dans pratiquement tous les groupes d'aliments (fruits, légumes, viandes, volailles, produits laitiers, pain et viennoiseries) ; et qu'il n'est pas rare de détecter au moins 5 résidus de POP différents pour un seul groupe d'aliments, dont le DDT et le dieldrine, qui sont pourtant interdits aux Etats-Unis depuis les années 1970

(Schafer & Kegley, 2002). Ces données montrent donc que l'exposition aux POP par voie alimentaire est d'origine multiple.

En 2002, une étude européenne a permis d'évaluer la présence de pesticides dans des fruits et légumes. Les données indiquent que la moitié des échantillons analysés en France contient des résidus de pesticides, et que la teneur en pesticides de 8% de ces échantillons dépasse les valeurs autorisées pour ce type de produits (Afsset, 2006).

En France, l'ANSES a réalisé 2 études successives (EAT 1 et EAT 2), pour mesurer les concentrations en nutriments et substances chimiques potentiellement toxiques, dans des aliments achetés en différents points de vente et préparés de la manière dont ils sont habituellement consommés. Ces études reposent sur les recommandations de l'OMS, et permettent ainsi de mesurer la quantité moyenne d'une substance chimique ingérée par la population générale et au sein de différents sous-groupes, en fonction notamment de la région, de l'âge et du sexe. En ce qui concerne l'exposition au POP, les résultats de l'EAT 2 publiés en 2011, montrent une forte diminution des expositions aux dioxines, PCB et PBDE par rapport aux résultats issus d'études précédentes. Cette réduction peut être liée à la diminution des contaminations alimentaires et environnementales observées en Europe et dans le monde, suite aux différentes réglementations visant à réduire ou interdire l'émission de ces substances.

Des EAT sont réalisées dans une trentaine de pays à travers le monde et il existe au niveau européen une volonté d'harmoniser les protocoles, afin de comparer facilement les résultats obtenus dans différents pays, dans le but final de permettre une prise de décision réglementaire plus facile au niveau européen. Ainsi, le projet européen *Total Diet Study_Exposure (TDS_Exposure)* a démarré au début du mois de mars 2012. Les contaminants alimentaires visés par ce projet sont les métaux lourds, les mycotoxines, les résidus de pesticides ou encore les polluants organiques persistants tels que les dioxines. Ce projet, d'une durée de 4 ans, réunit 26 partenaires de 19 pays européens ; il est coordonné par l'ANSES, et sera suivi par les différentes parties prenantes, telles que l'EFSA, la Direction Générale Santé Consommation de l'Union européenne (DG SANCO), l'OMS et la FAO.

II. Problématique de l'étude

II.1. L'individu en développement : une population à risque

II.1.1. Introduction

Au cours du siècle dernier, l'ensemble des pathologies touchant les enfants a considérablement évolué. En effet, dans la plupart des pays industrialisés, les infections infantiles classiques (variole, rougeole, diphtérie, poliomyélite, tétanos, choléra) ont été contrôlées, grâce notamment à une meilleure hygiène et à des progrès en termes de programmes de vaccination. L'espérance de vie d'un enfant aux Etats-Unis est ainsi aujourd'hui supérieure de plus de 20 ans à celle d'un enfant né au début du 20^{ème} siècle (Landrigan et al., 2004). En revanche, le 21^{ème} siècle a vu l'apparition d'un grand nombre de maladies chroniques (asthme, cancers, perturbations endocriniennes, troubles neurodéveloppementaux et neurocomportementaux), dont l'étiologie est liée à la combinaison entre des facteurs de prédisposition génétique et l'exposition à certains agents environnementaux pendant le développement (Suk et al., 2003).

Les enfants sont aujourd'hui confrontés à des substances environnementales, et donc à des risques pour leur santé, que les générations antérieures ne rencontraient pas. Il semble désormais évident que la plupart des pathologies qui visent actuellement les enfants sont causées ou aggravées par les substances chimiques présentes dans notre environnement (Landrigan et al., 2004).

II.1.2. Sensibilité particulière de l'organisme en développement

Jusqu'à récemment, l'évaluation des risques liés à une exposition à des substances environnementales était essentiellement focalisée sur la nature et le niveau des expositions chez l'adulte, et sur les effets toxiques également caractérisés chez l'individu adulte. Peu de considération a été apportée pour l'organisme à des stades de vie plus vulnérables, comme la période de développement fœtal ou la petite enfance (Landrigan et al., 2004).

Néanmoins, depuis les années 1990, les pédiatres et les toxicologues s'accordent à dire que l'enfant n'est pas un adulte miniature, et qu'il représente un groupe au sein de la population, présentant à la fois une exposition particulière face aux substances qui l'entourent, et une sensibilité unique face à certains agents chimiques, physiques, ou biologiques (Landrigan et al., 2004 ; Landrigan & Goldman, 2011).

La sensibilité accrue de l'organisme en développement en général, et plus particulièrement du système nerveux en développement, par rapport à un organisme mature est la résultante de plusieurs facteurs :

➤ Le jeune est souvent exposé de manière plus importante que l'adulte, pour des niveaux de contamination environnementale équivalents. Cela peut être expliqué de différentes manières. Tout d'abord, par rapport à leur poids corporel, les enfants ont des besoins énergétiques plus importants que les adultes, et consomment ainsi plus de nourriture (Landrigan et al., 2002). Ils peuvent alors être exposés à des quantités de contaminants contenus dans l'alimentation 2 à 3 fois plus importantes que celles auxquelles les adultes sont exposés (Sly & Flack, 2008). De plus, le comportement d'exploration des jeunes enfants (entre 6 mois et 2 ans), qui consiste à introduire un grand nombre d'objets dans la bouche (comportement dit de « pica »), représente un autre facteur qui peut augmenter le niveau d'exposition d'un enfant (Graeter & Mortensen, 1996 ; Weiss, 2000). Enfin, le lait maternel, unique aliment des nouveau-nés, représente un important vecteur de nombreux composés chimiques liposolubles, auxquels peut être exposé l'organisme après la naissance (Graeter & Mortensen, 1996 ; Weiss, 2000).

Par ailleurs, les enfants ont un rythme respiratoire plus élevé que celui des adultes, et inspirent ainsi plus d'air par kg de poids corporel (Sly & Flack, 2008). Ils sont ainsi susceptibles d'inhaler des niveaux plus élevés de polluants atmosphériques que les adultes. De plus, l'air inspiré par les enfants se trouve à une hauteur plus faible que celui inspiré par un adulte (25 cm au dessus du sol *versus* 100 à 150 cm pour un adulte), ce qui augmente l'exposition potentielle à des pesticides se trouvant au sol, ou à des vapeurs lourdes, telles que les vapeurs de mercure (Weiss, 2000 ; Sly & Flack, 2008).

Enfin, l'exposition par voie cutanée est considérée comme plus importante chez le jeune enfant que chez l'adulte, car la fonction de barrière de la peau est encore immature dans les premiers mois de la vie (Graeter & Mortensen, 1996).

➤ Le métabolisme de l'organisme en développement est encore immature, ce qui induit de moins bonnes capacités de détoxification (Grandjean & Landrigan, 2006), et le rend ainsi plus sensible à certains agents chimiques par rapport à un organisme adulte. Le fœtus, par exemple, dépend essentiellement des capacités de métabolisation de sa mère, puisque les enzymes de phase I (cytochrome P450) et de phase II sont peu actives (Reed & Besunder, 1989), bien que présentes (Dorman et al., 2001). D'une manière générale, les enzymes du métabolisme des xénobiotiques commencent à être développées à partir du milieu de la grossesse, pour atteindre les niveaux de l'organisme adulte à environ 6 mois (Sly & Flack, 2008). Cependant, certaines enzymes impliquées dans le contrôle du stress oxydant ne sont exprimées à des niveaux comparables à ceux de l'adulte que vers l'âge de 1 ou 2 ans, ce qui rend le jeune enfant particulièrement sensible au stress oxydant (Sly & Flack, 2008). L'immaturation des systèmes enzymatiques de détoxification augmente la quantité de xénobiotiques parents présents dans l'organisme, et leur durée de présence. Cela peut représenter un risque de toxicité important pour l'organisme en développement, sauf dans le cas particulier où les métabolites sont plus toxiques que les molécules mères (Sly & Flack, 2008).

➤ L'enfant a une espérance de vie longue, ce qui laisse de nombreuses années pendant lesquelles les conséquences d'une exposition précoce à des agents toxiques peuvent être observées (Suk et al., 2003 ; Sly & Flack, 2008). Ainsi, dans le cas d'une toxicité pour le système nerveux, un agent peut provoquer des dommages dits « silencieux » pour le cerveau en développement, mais visibles plus tard, quand le cerveau est mature (Olney, 2002).

➤ Le système nerveux en développement semble particulièrement sensible à l'action de facteurs chimiques, biologiques ou physiques. En effet, même s'il possède des capacités pour s'adapter ou pour compenser des atteintes précoces, il reste néanmoins plus vulnérable à beaucoup d'agents que le système nerveux mature (Tilson, 1998), et cela à des niveaux plus bas que ceux connus pour être néfastes pour l'adulte (Sly & Flack, 2008 ; Miodovnik, 2011). Cette grande susceptibilité du système nerveux immature s'explique notamment par l'extraordinaire complexité des mécanismes successifs impliqués dans son développement. Le cerveau se développe en effet à partir de quelques cellules le long de l'ectoderme dorsal du fœtus, pour devenir finalement un organe complexe de plusieurs milliards de cellules précisément localisées, hautement spécialisées, et interconnectées. Le

développement cérébral est ainsi une longue succession de nombreux processus complexes, précisément contrôlés, et finement régulés dans le temps (prolifération cellulaire, migration, différenciation, synaptogénèse, apoptose, myélinisation), mais très sensibles, notamment à l'action de substances environnementales (Weiss, 2000 ; Mendola et al., 2002 ; Grandjean & Landrigan, 2006). La complexité du système nerveux et de son développement offre alors une multitude de mécanismes par lesquels des agents toxiques peuvent induire des dommages (Slikker & Bowyer, 2005 ; Walker, 2005).

De plus, les recherches menées en pédiatrie ont permis d'identifier des fenêtres de vulnérabilité, c'est-à-dire des stades critiques dans le développement, pendant lesquels une exposition à des agents toxiques peut interférer avec le développement normal et causer des dommages importants (Landrigan & Goldman, 2011 ; Miodovnik, 2011).

Pendant la période de croissance du cerveau, les différentes phases de développement fondamentales (maturation des axones et des dendrites, établissement des connections neuronales, synaptogénèse, prolifération des cellules gliales, myélinisation) représentent autant de fenêtres pour l'induction d'effets neurotoxiques persistants (Andersen et al., 2000), absolument uniques, et n'ayant pas de contreparties chez l'adulte (Grandjean & Landrigan, 2006). Ainsi, une exposition au même type de substances neurotoxiques n'aura pas les mêmes conséquences chez l'adulte ou chez le jeune. Par exemple, chez l'adulte, les neurotransmetteurs modulent la transmission synaptique, alors que pendant le développement cérébral, les neurotransmetteurs interagissent avec leurs récepteurs pour influencer la formation de l'architecture des différentes régions et des différents noyaux du cerveau. Ainsi, une substance environnementale qui est neurotoxique *via* une action sur les systèmes de neurotransmission, comme les pesticides, a un effet très différent sur le cerveau de l'adulte ou sur celui du jeune (Mendola et al., 2002). De plus, la perturbation d'un événement en particulier par un agent neurotoxique peut avoir des conséquences délétères sur l'ensemble des processus de développement ultérieurs (Smart, 1991).

Par ailleurs, même si la plupart des neurones est formée avant la naissance, la croissance des cellules gliales et la myélinisation des axones se poursuit pendant 2 ou 3 ans (Grandjean & Landrigan, 2006), donnant lieu à une fenêtre de sensibilité qui s'étend sur plusieurs années, du développement fœtal jusqu'à l'enfance (Graeter & Mortensen, 1996). La sensibilité du système nerveux central persistant ainsi pendant toute son ontogénie, un mauvais développement du cerveau peut se manifester plus tard dans la vie, pendant l'enfance, à

l'adolescence, à l'âge adulte, ou pendant la vieillesse, sous forme de troubles neurologiques, comportementaux, émotionnels ou cognitifs (Dubovický et al., 2008).

Enfin, la séquence d'événements (neurogénèse, migration neuronale, formation synaptique, myélinisation) diffère dans le temps selon les régions cérébrales. Puisque les différentes régions du cerveau se développent à des moments différents pendant la vie pré et postnatale, un agent environnemental ayant des propriétés neurotoxiques peut alors produire des perturbations dans des fonctions cérébrales différentes selon la période d'exposition. De la même manière, une exposition à différentes concentrations, ou sur des durées plus ou moins longues, peut potentiellement produire des effets différents (Mendola et al., 2002). Finalement, selon la durée et la période d'exposition, il existe un large spectre de déficits structuraux ou fonctionnels (Miodovnik, 2011) et une exposition avec la même substance peut finalement résulter en une grande variété de troubles (Rodier, 1994).

➤ La barrière hémato-encéphalique, qui empêche le passage de nombreuses substances chimiques vers le cerveau chez l'adulte, n'est mature que vers 6 mois après la naissance (Grandjean & Landrigan, 2006), ce qui rend le cerveau en développement moins protégé face à certains agents. De plus, l'accès des substances chimiques au système nerveux central est modifié pendant tout le développement de la barrière hémato-encéphalique, ce qui complique l'évaluation des risques pour le jeune (Dorman et al., 2001).

En conclusion, lorsque l'on considère la toxicité d'une substance pour le jeune, il faut prendre en compte le stade de développement pendant lequel l'exposition a lieu. La particularité de facteurs physiologiques, biologiques ou comportementaux contribue à la sensibilité unique de l'organisme en développement (Graeter & Mortensen, 1996). Par ailleurs, les effets produits par un agent neurotoxique dépendent de plusieurs facteurs parmi lesquels la période et la durée d'exposition, l'activation métabolique d'intermédiaires réactifs, la distribution de la molécule ou de ses métabolites au sein du compartiment cérébral, la quantité présente dans le cerveau et leur capacité à interférer avec les processus de développement (Rice & Barone, 2000 ; Mendola et al., 2002 ; Wormley et al., 2004a). Dès lors, les conséquences neurodéveloppementales d'une exposition précoce à un agent neurotoxique peuvent fortement varier (Mendola et al., 2002).

II.1.3. Transferts mère-jeune de composés chimiques

Pendant les périodes précoces de développement, le jeune est principalement exposé par l'organisme maternel à des substances potentiellement toxiques pour lui. Le développement normal du fœtus dépend alors largement du niveau d'exposition de la mère à certains agents (Graeter & Mortensen, 1996). Les deux modes de transferts majeurs des xénobiotiques de la mère vers le jeune sont le transfert placentaire pendant la grossesse, et le transfert *via* le lait maternel pendant les premiers mois de vie postnatale. Le transfert d'un composé de l'organisme maternel à l'organisme du jeune dépend entre autre de la dose administrée à la mère, et des caractéristiques pharmacocinétiques dans les différents compartiments (organismes de la mère et du jeune, placenta, lait maternel) (Dorman et al., 2001). Ces deux types de transfert ne sont pas identiques en termes de facteurs pharmacocinétiques, et peuvent donc conduire à des doses disponibles différentes chez le jeune, pour une même exposition de la mère (Barton, 2005). Peu de données sont disponibles quand à la différence du taux de transfert par le placenta *versus* le taux de transfert par le lait maternel. Néanmoins, il semble que le taux de transfert par le lait soit supérieur au taux de transfert placentaire. Par exemple, le transfert placentaire des composés *dioxin-like* est estimé entre 0,5 et 3%, alors que le transfert *via* le lait maternel de ces mêmes composés est estimé entre 7 et 28% (Wormley et al., 2004a).

II.1.3.1. Transfert placentaire

Le placenta est une interface dynamique permettant le transport de composés essentiels et de nutriments entre deux organismes, celui de la mère et celui du fœtus (Andersen et al., 2000). Jusqu'à récemment, le placenta était vu comme une barrière impénétrable, mais ce concept a été révisé suite à l'affaire de la thalidomide, dans les années 1960 (Grandjean, 2008). Pendant le développement fœtal, le placenta offre une relative protection contre les expositions aux substances chimiques non désirées, mais ne constitue pas une barrière efficace contre tous les composés, notamment contre les polluants environnementaux. Par exemple, certains métaux comme le mercure peuvent traverser le placenta, et la concentration dans le sang du cordon ombilical peut alors être supérieure à celle du sang maternel

(Grandjean & Landrigan, 2006). En 2004, une étude de l'*Environmental Working Group* (EWG) réalisée aux Etats-Unis a mis en évidence la présence de 287 substances chimiques étrangères dans le sang du cordon ombilical de 10 bébés, parmi lesquels 180 composés cancérogènes pour l'Homme ou pour l'animal, 217 composés neurotoxiques, et 208 composés responsables de malformations chez l'animal.

Le transfert placentaire est influencé par différents facteurs, tels que le contenu lipidique et protéique du sang, la présence de transporteurs plasmatiques, le pH des circulations sanguines maternelle et fœtale, l'épaisseur et la surface de la membrane placentaire, le débit sanguin et la perméabilité placentaire, le métabolisme placentaire, et les caractéristiques physico-chimiques du xénobiotique (masse moléculaire et lipophilie) (Andersen et al., 2000 ; Dorman et al., 2001). Certains de ces facteurs évoluent tout au long de la grossesse (Andersen et al., 2000).

Il existe des différences de structures et de capacités de métabolisation du placenta entre les espèces, bien que l'influence de telles disparités soit minime et concerne surtout le transfert de composés plus hydrophiles (Andersen et al., 2000 ; Dorman et al., 2001). Le placenta humain tout comme celui du rat subit des changements considérables au cours de la gestation (Dorman et al., 2001).

Relativement peu de données sur le rôle du métabolisme placentaire dans les mécanismes de toxicité développementale sont disponibles (Dorman et al., 2001). De plus, les niveaux d'enzymes du métabolisme des xénobiotiques au niveau placentaire varient au cours de la gestation et d'une espèce à l'autre. Leur activité est probablement négligeable par rapport aux capacités de métabolisation de l'organisme maternel, mais l'activation intra-utérine de substances chimiques pourrait jouer un rôle dans la toxicité pour l'embryon ou le fœtus (Dorman et al., 2001).

II.1.3.2. Transfert *via* le lait maternel

Après la naissance, l'exposition du jeune à certains agents peut continuer *via* le lait maternel (Dorman et al., 2001), qui constitue un milieu efficace pour le transfert de substances chimiques lipophiles de la mère vers l'enfant (Weiss, 2000).

La présence de POP dans le lait maternel est la conséquence de plusieurs décennies de pollution non contrôlée dans l'environnement (Landrigan et al., 2002), et représente à l'heure actuelle une préoccupation importante, qui justifie la surveillance des concentrations en xénobiotiques dans le lait maternel, ainsi que le recommande l'OMS. De plus, les techniques de dosages se perfectionnent, et ainsi un plus grand nombre de molécules contaminantes est détecté dans le lait maternel. Dans un rapport de 1999, le *World Wide Fund for Nature* (WWF) montre la présence de 350 substances potentiellement toxiques dans le lait maternel, parmi lesquelles des dioxines, des métaux lourds, des pesticides, des résidus de parfums ou d'huile solaire, des HAP, des PCB. De plus, certains xénobiotiques sont encore retrouvés dans le lait maternel plusieurs décennies après leur interdiction (DDT) ou après un accident ayant conduit à une forte pollution environnementale (HCB) (Sonawane, 1995). En revanche, le niveau de contamination du lait maternel humain par certaines substances environnementales comme les PBDE est globalement en train de diminuer, suite à la prise de décisions importantes au niveau international, visant à réduire l'émission ou l'utilisation de plusieurs molécules (Sonawane, 1995 ; Solomon & Weiss, 2002).

Certains polluants comme les PCB ou les pesticides peuvent s'accumuler dans le tissu adipeux de la mère puis être mobilisés pendant la période d'allaitement, avant d'être transférés au nourrisson par le lait maternel (Grandjean & Landrigan, 2006). Proportionnellement à leur poids respectif, l'exposition de l'enfant peut alors être cent fois supérieure à celle de la mère (Dorman et al., 2001 ; Grandjean & Landrigan, 2006). La concentration en polluants comme les dioxines dans le lait maternel, diminue au cours de l'allaitement, et est généralement plus faible pour un deuxième enfant allaité que pour le premier. Cependant, l'exposition d'un enfant aux dioxines *via* le lait de sa mère peut atteindre 20 fois la dose journalière tolérée, à l'âge de 1 mois (Sonawane, 1995). De plus, 20% de la charge corporelle maternelle en certains POP, comme les PCB, peuvent être transférés vers le jeune en 6 mois d'allaitement (Landrigan et al., 2002). La concentration de certaines substances dans le tissu adipeux du bébé peut atteindre celle de la mère au bout de 1,5 mois.

La charge corporelle de l'enfant peut être 2 fois supérieure à celle de la mère après 3 mois d'allaitement, et 3 fois supérieure après 6 mois (Neubert, 1988).

La concentration en xénobiotiques dans le lait maternel dépend de plusieurs facteurs, parmi lesquels la teneur en lipides du lait, le taux de transfert à travers l'épithélium, la demi-vie du composé dans le plasma, sa masse moléculaire et sa lipophilie (Dorman et al., 2001). Le contenu en graisse du lait est l'un des principaux critères affectant la concentration en un composé donné dans le lait maternel, et varie d'une espèce à l'autre (3 à 5% pour le lait maternel humain, et entre 11 et 15% pour le lait de rat) (Dorman et al., 2001).

Enfin, la concentration d'un composé transféré par le lait maternel dans le sang du jeune dépend du taux d'absorption au niveau du tractus gastro-intestinal du jeune, puis de ses capacités de métabolisme et d'excrétion (Dorman et al., 2001).

Malgré la présence d'un grand nombre de xénobiotiques dans le lait maternel, l'allaitement au sein est encouragé pendant au moins 6 mois, aux vues des bénéfices nutritionnels, physiologiques, immunitaires et psychologiques qu'il apporte à l'enfant et à la mère. Selon la plupart des experts, le lait maternel est le meilleur aliment pour un enfant pendant les premiers mois de sa vie (Sonawane, 1995 ; Landrigan et al., 2002).

Par ailleurs, il semble qu'un risque plus grand puisse être attribué à une exposition prénatale à un composé *versus* une exposition postnatale, et qu'ainsi il ne faille pas sacrifier les bienfaits du lait maternel dans le but de réduire une exposition postnatale. C'est pourquoi l'allaitement maternel est toujours encouragé, y compris pour des populations fortement exposées à certains polluants environnementaux (Dietrich, 1999).

De plus, une étude réalisée aux Etats-Unis montre qu'il n'y a pas de conséquence sur un plan cognitif pour les enfants allaités plus longtemps avec du lait contenant de forts taux en PCB, par rapport à des enfants allaités moins longtemps. Il semble dans ce cas précis que les bénéfices importants de l'allaitement maternel, et notamment la présence de certains nutriments, compense la toxicité liée à la présence de PCB (Jacobson et al., 1990).

II.1.4. La protection de l'individu en développement : un enjeu international

Pour certains auteurs, la protection des enfants face aux substances chimiques présentes dans l'environnement représente un enjeu majeur dans notre société moderne. L'individu en développement n'est pas seulement un groupe sensible au sein de la population, puisque ces périodes de développement sont un passage obligatoire pour chaque individu. Il devient ainsi absolument essentiel de protéger l'organisme en développement (Landrigan et al., 2004).

Au niveau international, des efforts communs ont été réalisés depuis les années 1990, notamment au sein de l'OMS et l'ONU, pour identifier les liens entre la santé de l'enfant et l'environnement, et définir des actions visant à protéger l'organisme en développement.

Par exemple, en 1997 à Miami, les pays du G8 (Canada, France, Allemagne, Italie, Japon, Russie, Etats-Unis, Royaume-Uni) se sont engagés *via* leur ministre de l'environnement à agir pour réduire l'impact sur la santé d'un certain nombre de contaminants prioritaires comme le plomb. Cet engagement a été renouvelé en 2002 devant les Nations Unis. Par ailleurs, la même année, l'alliance HECA (*Healthy Environments for Children Alliance*), ou « un environnement sain pour les enfants », a été créée lors du sommet de l'OMS sur le développement durable à Johannesburg. Elle vise notamment à consolider les connaissances scientifiques sur les liens entre l'environnement et la santé des enfants.

Au niveau national, cette problématique est au cœur des deux plans nationaux santé environnement. Dans le PNSE1 (2004-2008), « protéger les populations sensibles (enfants et femmes enceintes) » et « prévenir les pathologies d'origine environnementale » font partie des objectifs majeurs. Dans la continuité du premier plan, le PNSE2 (2009-2013), vise entre autre à « protéger la santé et l'environnement des enfants ».

Ainsi, malgré le fait que la compréhension de la sensibilité particulière de l'organisme en développement face à certains agents environnementaux soit relativement récente, de nombreuses actions sont entreprises au niveau national et international pour améliorer les connaissances et les recherches, ainsi que la protection de l'individu lors des périodes très sensibles du développement. L'un des challenges actuels est de maîtriser l'exposition du jeune, notamment du fœtus, aux contaminants environnementaux, mais dont les effets peuvent rester silencieux pendant des décennies et émerger à un âge plus avancé (Walker, 2005)

II.2. Développement et organisation du système nerveux central

La compréhension du développement du système nerveux à partir du tube neural permet d'expliquer l'organisation du cerveau, et l'ajustement des différentes régions les unes par rapport aux autres. Dans cette partie, le développement et l'organisation générale du système nerveux central chez l'Homme seront brièvement décrits.

Le système nerveux dérive de l'une des trois couches de cellules présentes initialement chez l'embryon, l'ectoderme, plus particulièrement au niveau de la plaque neurale. Le sillon neural se forme dans la plaque neurale, et la parcourt de la partie la plus rostrale vers la partie la plus caudale. Les parois de ce sillon forment la gouttière neurale, qui en se développant va former le tube neural. Ce processus de formation du tube neural à partir de la plaque neurale s'appelle la neurulation, et a lieu 22 jours après la conception chez l'embryon humain. Après la neurulation, trois vésicules se différencient à l'extrémité rostrale du tube neural : le prosencéphale (ou cerveau antérieur), le mésencéphale (ou cerveau médian), et le rhombencéphale (ou cerveau postérieur). Chacune de ses vésicules va subir différentes étapes de développement (**Figure 2**).

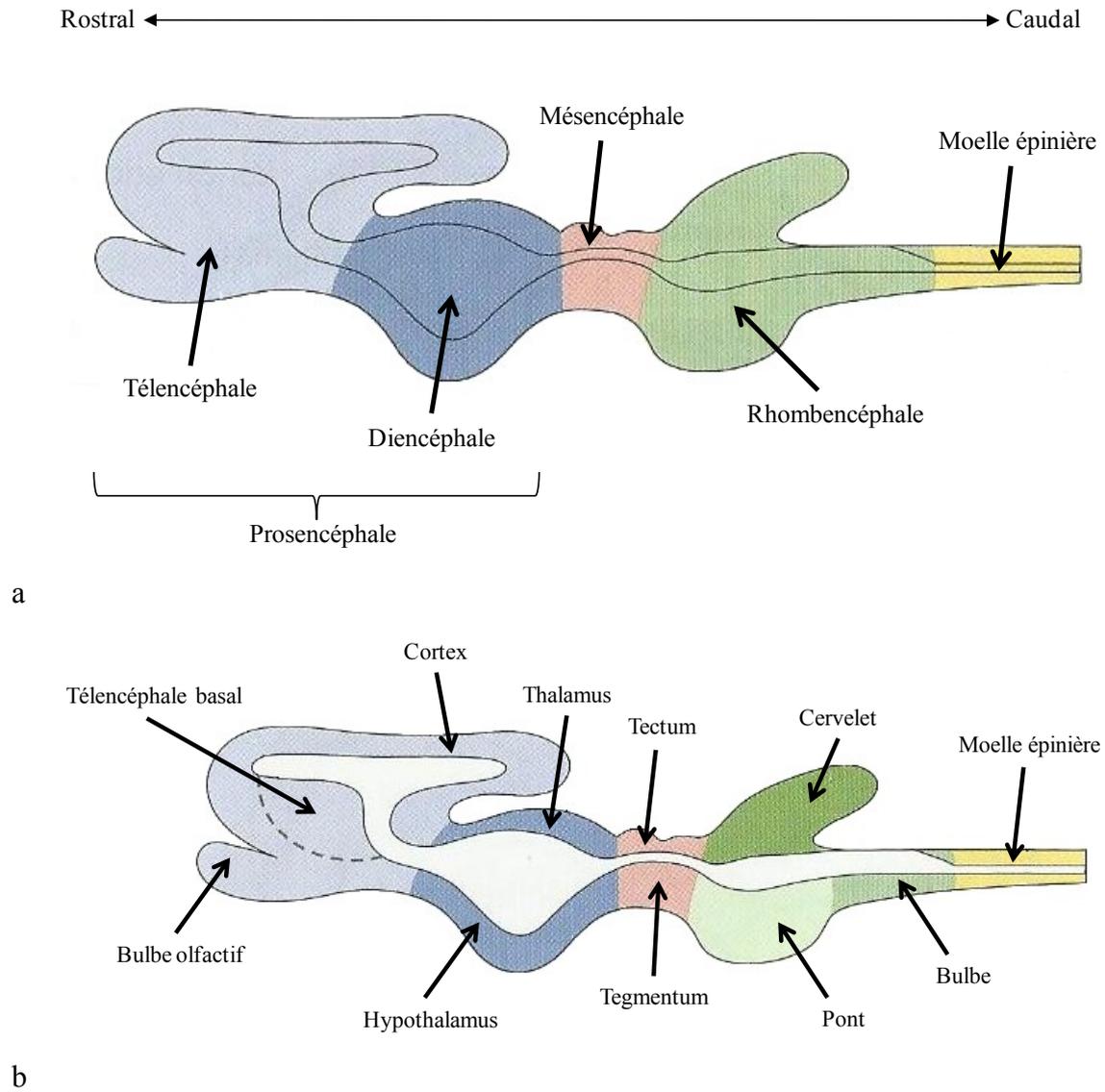


Figure 2 : Organisation générale du cerveau (d'après Bear et al., 2010)

- (a) Organisation générale du cerveau des mammifères
- (b) Principales structures dans chaque région

➤ Différenciation du **prosencephale** : des vésicules secondaires bourgeonnent de chaque côté du prosencephale, les vésicules optiques et les vésicules télencéphaliques. La structure qui demeure au milieu est le diencephale. Les vésicules optiques forment par la suite les rétines et les nerfs optiques ; les vésicules télencéphaliques sont à l'origine du télencéphale, qui comprend les deux hémisphères cérébraux. Deux territoires distincts sont ensuite formés au niveau du télencéphale : le cortex cérébral et le télencéphale basal. Les bulbes olfactifs proviennent du bourgeonnement de nouvelles vésicules télencéphaliques. Les axones des neurones du télencéphale constituent progressivement le corps calleux, la substance blanche corticale et la capsule interne. Des structures comme les ganglions de la base ou l'amygdale font partie du télencéphale. De même, le diencephale se différencie en deux structures : le thalamus et l'hypothalamus.

Le cerveau antérieur représente entre autre le siège de la perception, de la conscience, de la cognition, du mouvement volontaire.

➤ Différenciation du **mésencéphale** : le mésencéphale se différencie relativement peu au cours du développement. La surface dorsale forme le tectum (à l'origine des collicules inférieur et supérieur), le plancher du mésencéphale se différencie pour former le tegmentum (contenant la substance noire et le noyau rouge), et l'espace entre ces deux structures forme l'aqueduc cérébral.

Néanmoins, les fonctions du mésencéphale sont très variées. Il est impliqué notamment dans les systèmes sensoriels et le contrôle du mouvement. De plus, cette région contribue au passage de faisceaux de fibres très importants, reliant le cortex cérébral et la moelle épinière.

➤ Différenciation du **rhombencéphale** : le cerveau postérieur se différencie en trois structures principales, le cervelet, le pont, et le bulbe rachidien.

Le cerveau postérieur constitue, comme le cerveau médian, une voie importante de l'information entre le cerveau antérieur et la moelle épinière. Les neurones du cerveau postérieur contribuent au traitement de l'information sensorielle, au contrôle du mouvement volontaire et à la régulation de l'activité du système nerveux autonome.

La figure 3 représente la comparaison d'un point de vue structural entre le cerveau du rat et celui de l'Homme.

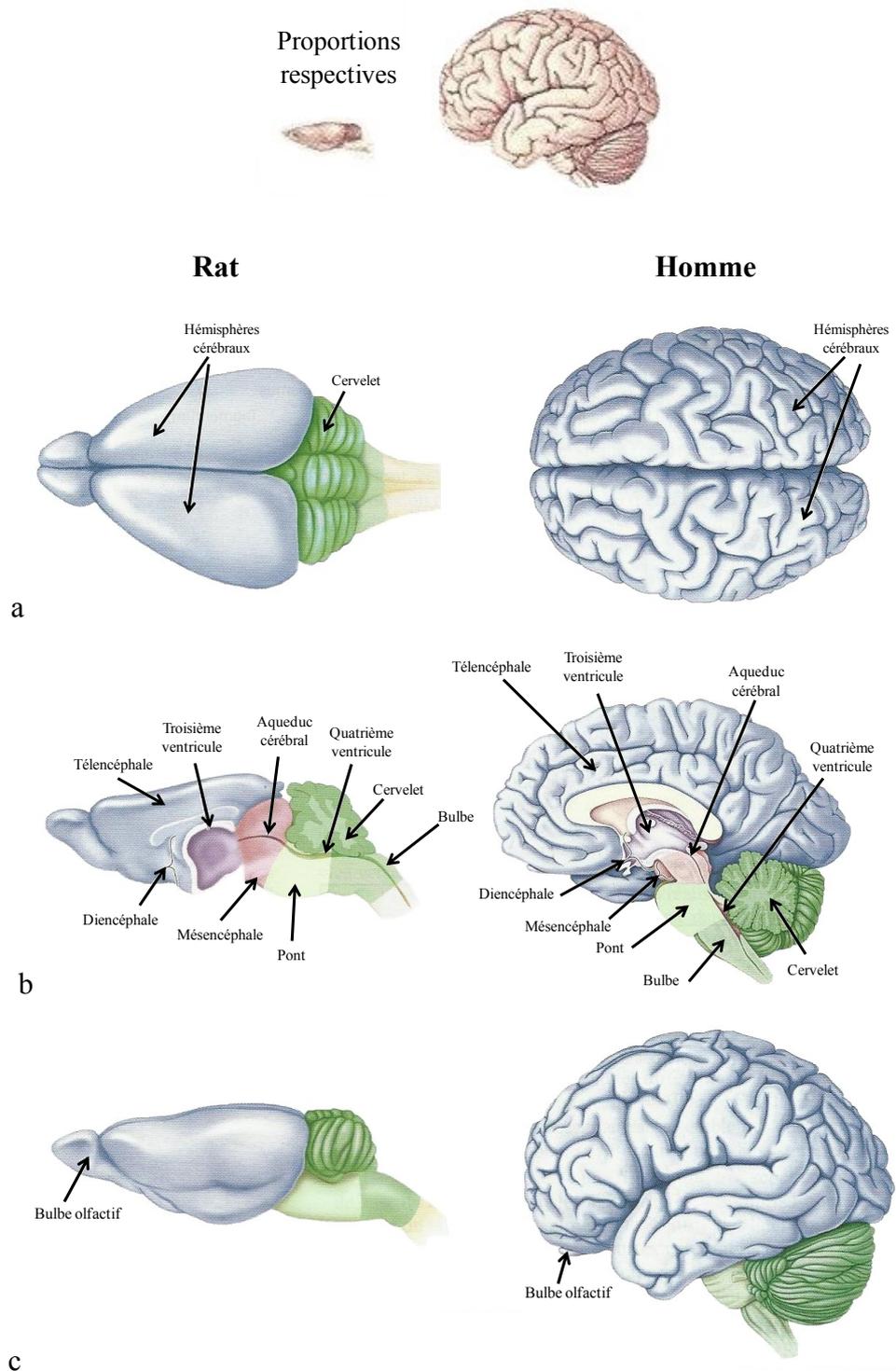


Figure 3 : Comparaison du cerveau du rat et du cerveau humain (d'après Bear et al., 2010)

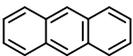
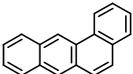
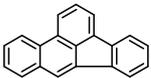
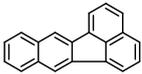
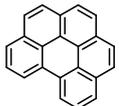
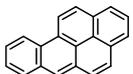
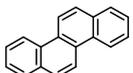
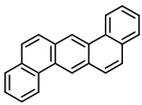
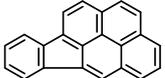
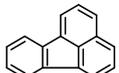
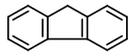
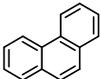
- (a) Vue dorsale
- (b) Vue médiosagittale
- (c) Vue latérale (les cerveaux ne sont pas représentés à la même échelle).

II.3. Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques

II.3.1. Propriétés physico-chimiques

Classés parmi les POP, les HAP sont des composés organiques constitués de carbone et d'hydrogène, possédant entre deux et sept cycles benzéniques fusionnés, et issus de processus de combustion incomplète de la matière organique (charbon, pétrole, bois,...). Cette famille chimique compte environ 500 composés (EFSA, 2008), dont 16 sont considérés comme prioritaires par l'US-EPA (**Tableau 4**), en raison de leur toxicité et de leurs fortes concentrations dans l'environnement (ATSDR, 2005). Les propriétés physico-chimiques des HAP varient en fonction de leur masse molaire et de leur structure. De manière générale, ils sont volatils et peu ou pas solubles dans l'eau. La masse molaire des HAP varie de 166 à plus de 300 g.mol⁻¹. Ils ont un point de fusion supérieur à 100°C, et un point d'ébullition supérieur à 300°C (Palayer et al., 1997). Les HAP purs à température ambiante sont des solides cristallins souvent colorés.

Tableau 4 : Liste des 16 HAP classés par l'US-EPA, structure chimique, numéro CAS et classification pour le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC)

HAP	Structure chimique	Numéro CAS	CIRC
Acénaphène		83-32-9	nd
Acénaphthylène		208-96-8	nd
Anthracène		120-12-7	3
Benz(a)anthracène		56-55-3	2B
Benzo(b)fluoranthène		205-99-2	2B
Benzo(k)fluoranthène		207-08-9	2B
Benzo(ghi)pérylène		191-24-2	3
Benzo(a)pyrène		50-32-8	1
Chrysène		218-01-9	2B
Dibenzo(a,h)anthracène		53-70-3	2A
Indéno(1,2,3-cd)pyrène		193-39-5	2B
Fluoranthène		206-44-0	3
Fluorène		86-73-7	3
Naphtalène		91-20-3	2B
Phénanthrène		85-01-8	3
Pyrène		129-00-0	3

Classification du Centre International de Recherche sur le Cancer :

Groupe 1 : L'agent est cancérigène pour l'homme

Groupe 2 : 2A : L'agent ou le mélange est probablement cancérigène pour l'homme

2B : L'agent ou le mélange est un cancérigène possible pour l'homme

Groupe 3 : L'agent (le mélange ou le mode d'exposition) est inclassable quand à sa cancérigénicité pour l'homme

Groupe 4 : L'agent (le mélange ou le mode d'exposition) n'est probablement pas cancérigène pour l'homme

(nd : non déterminé)

II.3.2. Emissions

Les HAP sont formés par pyrolyse (décomposition thermique) et par pyrosynthèse (formation de produits nouveaux) lors de la combustion incomplète des matières organiques tels que les combustibles fossiles ou plus généralement les matières composées de carbone et d'hydrogène. Dans l'atmosphère, les HAP peuvent être sous forme gazeuse (HAP à 2 ou 3 cycles), ou particulaire (HAP à 4 à 6 cycles). Les HAP à 3 ou 4 cycles peuvent être trouvés à la fois sous forme gazeuse et sous forme particulaire (Sheu et al., 1997). Les HAP sont rarement présents à de très fortes concentrations dans l'environnement et le sont sous forme de mélanges plus ou moins complexes (INERIS, 2003).

Les émissions de HAP peuvent être naturelles ou anthropiques. Les principales sources naturelles de HAP sont les feux de forêts et les éruptions volcaniques (Menzie et al., 1992). La principale voie d'émission des HAP est anthropique, et peut être séparée en sources mobiles et sources stationnaires. Parmi les sources mobiles, les principaux contributeurs sont les moteurs et véhicules diesel. Parmi la grande variété de sources stationnaires, se trouvent le chauffage résidentiel, les activités industrielles (production d'aluminium et de coke), et l'incinération de déchets. La nature et la concentration des HAP présents dans l'air varient selon les sources émettrices (Baek et al., 1991).

Les HAP sont utilisés dans un nombre limité de produits, et leur production volontaire est ainsi peu importante. Le naphthalène, l'acénaphthène, l'anthracène, le fluorène, le fluoranthène, le phénanthrène et le pyrène sont utilisés dans des polymères, des teintures, des pigments, des surfactants, des dispersants, des agents tannants, des solvants, des résines insecticides et des ramollissants de caoutchouc (INERIS, 2006). Peu de données sont

disponibles sur les volumes utilisés. Les HAP sont avant tout considérés comme des sous produits involontaires de réactions de combustion incomplète, et à ce titre les rejets de HAP liés à leur production sont négligeables par rapport aux rejets totaux (Holland et al. 2001).

D'après les données du CITEPA pour l'année 2009, le secteur résidentiel/tertiaire représente 67,0% des émissions totales de quatre HAP (Benzo(a)Pyrène (B(a)P), benzo(b)fluoranthène, benzo(k)fluoranthène et indeno(1,2,3-cd)pyrène), et le transport routier (en particulier les véhicules diesel) représente 25,5% des émissions. La production de ces 4 HAP a progressivement diminuée depuis 1991 et est actuellement légèrement inférieure à 20 tonnes par an en France métropolitaine.

II.3.3. Sources d'exposition

II.3.3.1. Exposition directe

➤ Sources d'exposition

Les HAP sont des polluants ubiquitaires de l'environnement, et l'Homme peut être exposé par différentes voies : par contact cutané, par inhalation (tabagisme actif ou passif et pollution atmosphérique), et par ingestion d'eau ou de nourriture contaminée (IARC, 2010). L'exposition aux HAP est ainsi multiple, les sources sont diverses et simultanées, et l'Homme peut ainsi être exposé à des mélanges plus ou moins complexes de plusieurs dizaines de composés.

Quantitativement, la voie majoritaire d'exposition aux HAP est l'alimentation, devant l'inhalation d'air pollué ou de fumée de cigarettes (Afssa 2003 ; EFSA 2008). Pour un non-fumeur, l'exposition par la nourriture représente ainsi plus de 96% de l'exposition totale aux HAP (Menzie et al., 1992). La figure 4 montre les quantités moyennes de B(a)P absorbé chaque jour par les différentes voies. Ainsi, d'après le rapport EFSA (2008), un individu ingère 235 ng *via* l'alimentation et 2 ng par l'eau qu'il consomme. Il inhale 20 ng de B(a)P par l'air ambiant, 105 ng si il fume et 40 ng s'il est exposé à du tabagisme passif (EFSA, 2008).

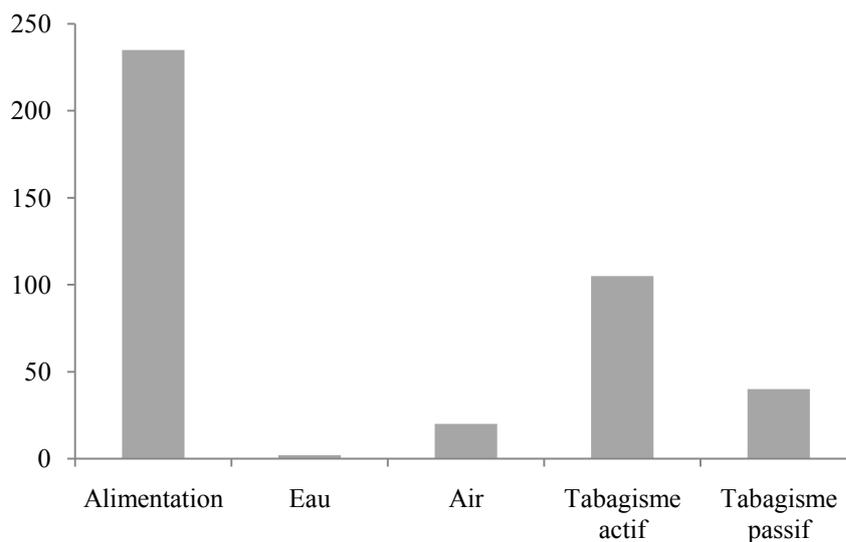


Figure 4 : Quantité moyenne de B(a)P absorbé chaque jour à partir de différentes sources (en ng/jour) (d'après EFSA, 2008)

➤ Réglementation pour l'alimentation

La teneur maximale autorisée pour plusieurs types d'aliments est fixé par la commission de régulation européenne (EC) N° 1881/2006 pour le B(a)P, et par la commission de régulation européenne N° 835/2011 pour la somme de 4 HAP (B(a)P, chrysène, benzo(a)anthracène, benzo(b)fluoranthène), considérée comme un bon marqueur de la présence de HAP dans les denrées alimentaires (**Tableau 5**).

Tableau 5 : Teneur maximale autorisée pour le B(a)P dans différents types d'aliments (en $\mu\text{g}/\text{kg}$ de poids frais) (réglementations EC 1881/2006 et 835/2011)

Catégories d'aliments	Teneur maximale (B(a)P)	Teneur maximale (somme des 4 HAP)
Huiles et graisses	2,0	10,0
Viandes fumées	5,0	30,0
Poissons fumés	5,0	30,0
Poissons, autres que fumés	2,0	
Crustacés et céphalopodes (moule, pieuvre, seiche), autres que fumés	5,0	30,0
Mollusques bivalves (huîtres, moules, palourdes)	10,0	
Produits à base de céréales et aliments pour bébés et enfants	1,0	1,0
Lait maternisé	1,0	1,0
Aliments à visée médicale	1,0	1,0

➤ Contamination des denrées alimentaires et teneurs en HAP dans les aliments

Sources de contamination : La contamination des produits alimentaires par les HAP peut être d'origine environnementale, par dépôt ou transfert des HAP contenus dans l'air et dans l'eau. Cependant la source majeure de contamination des denrées alimentaires par les HAP est liée aux procédés de traitement thermique des aliments (transformation industrielle et cuisson ménagère) (Afssa, 2003 ; EFSA, 2008). Les concentrations de HAP dans les aliments non cuits dépendent principalement de leur origine. Par exemple, les légumes, les fruits et les poissons provenant de zones polluées contiennent généralement de plus fortes concentrations de HAP que ceux qui viennent de régions moins polluées. A proximité de zones industrielles ou d'autoroutes, la contamination de la végétation en HAP peut ainsi être 10 fois plus élevée que dans une zone rurale (Larsson et al., 1983). Dans les aliments cuits, la méthode de cuisson est généralement le principal facteur influant la teneur en HAP, et cette teneur varie considérablement selon les habitudes de cuisine (Santodonato et al., 1981).

Teneurs en HAP dans les aliments : De nombreuses études indiquent les concentrations de HAP contenus dans un certain nombre de denrées alimentaires. Certaines études sont très spécifiques d'un lieu, d'un type d'aliment, de certaines habitudes alimentaires, ou d'événements particuliers ayant entraînés une forte pollution environnementale. D'une manière générale, les 16 HAP listés par l'US-EPA sont ceux qui sont le plus souvent analysés. Par ailleurs, pour analyser et comparer des données issues de différentes études, il faut prendre en compte le fait que les produits soient ou non préparés, ce qui peut influencer très fortement les résultats.

Les concentrations de HAP sont élevées dans les denrées alimentaires ayant subi un traitement thermique à haute température (plus de 200°C), comme dans les aliments séchés, fumés, rôtis, frits, ou grillés (Guillén et al., 1997 ; Phillips, 1999). Ainsi, la concentration en B(a)P peut atteindre des valeurs de 130 µg/kg dans de la viande cuite au barbecue, et 200 µg/kg dans du poisson et de la viande séchés, alors que les valeurs sont de l'ordre de 0,01 à 1 µg/kg dans les mêmes produits non cuits (SCF, 2002). Par ailleurs, les huiles végétales sont fortement contaminées en HAP, du fait de la torréfaction des pépins.

Les tableaux 6 et 7 indiquent les valeurs de concentrations en HAP dans plusieurs types d'aliments. Le tableau 6 est issu du rapport EFSA 2008, pour lequel 8 HAP de haut poids moléculaire (B(a)P, chrysène, benz(a)anthracène, benzo(b)fluoranthène, benzo(k)fluoranthène, benzo(ghi)pérylène, dibenzo(a,h)anthracène, et indéno(1,2,3-cd)pyrène) ont été analysés dans des aliments cuits, « prêts à consommer ». Ces 8 HAP ont été initialement choisis car ils sont considérés comme « les seuls indicateurs possibles du potentiel cancérigène des HAP dans l'alimentation » (EFSA, 2008).

Parallèlement, le tableau 7 reprend les résultats d'une récente étude espagnole (Martorell et al., 2010), dans laquelle les 16 HAP listés par l'US-EPA ont été analysés, mais dans des denrées alimentaires non préparées. Il est important de prendre en compte ces deux différences majeures (nombre de molécules étudiées et préparation des aliments) pour comprendre quels sont les HAP retrouvés dans l'alimentation, et dans quelles proportions.

Tableau 6 : Concentrations de 8 HAP dans différents aliments préparés (en µg/kg) (d'après EFSA, 2008)

HAP (en µg/kg)	Viandes et produits carnés	Poissons et produits de la mer	Légumes et noix	Fruits	Céréales transformées	Céréales non transformées	Chocolat	Huiles et graisses	Cacao en poudre	Café en poudre	Thé	Boissons alcoolisées	Produits laitiers	Total
Benzo(a)anthracène	0,39-0,43	3,96-4,01	0,14-0,23	0,91-0,95	0,15-0,32	0,56-0,73	0,35-0,38	1,23-1,28	1,19-1,36	3,09-3,22	7,90-7,91	0,0-0,1	0,06-0,12	19,93-21,04
Chrysène	0,47-0,49	4,24-4,31	0,31-0,38	1,19-1,23	0,20-0,25	0,35-1,42	0,57-0,62	3,59-3,69	0,08-0,18	3,76-3,87	16,48-16,49	0,01-0,02	0,10-0,14	31,35-33,09
Benzo(b)fluoranthène	0,20-0,23	1,77-1,84	0,21-0,27	0,27-0,32	0,13-0,18	0,34-0,41	0,39-0,44	1,26-1,37	0,04-0,15	2,57-2,69	9,91	0-0,1	0,04-0,10	17,13-18,01
Benzo(k)fluoranthène	0,14-0,16	0,69-0,75	0,08-0,16	0,07-0,11	0,02-0,09	0,10-0,17	0,15-0,17	0,52-0,57	0,01-0,11	1,20-1,32	4,30	0,0-0,1	0,04-0,08	7,32-8,09
B(a)P	0,29-0,32	1,26-1,30	0,16-0,26	0,13-0,17	0,03-0,26	0,30-0,47	0,30-0,32	0,97-1	0,02-0,35	2,33-2,46	8,37-8,38	0,0-0,01	0,08-0,13	14,24-15,43
Indéno(1,2,3-cd)pyrène	0,10-0,17	0,58-0,71	0,11-0,23	0,03-0,11	0,02-0,26	0,0-0,49	0,18-0,33	0,68-0,86	0,0-0,34	1,96-2,10	6,51	0,0-0,04	0,0-0,11	10,17-12,26
Dibenzo(a,h)anthracène	0,03-0,09	0,17-0,25	0,0-0,15	0,0-0,08	0,0-0,08	0,15-0,25	0,0-0,05	0,12-0,20	0,0-0,11	0,04-0,19	0,36-0,42	0,0-0,03	0,0-0,08	0,87-1,98
Benzo(ghi)pérylène	0,15-0,21	0,57-0,64	0,11-0,27	0,07-0,12	0,03-0,10	0,97-1,02	0,43-0,45	0,75-0,83	1,69-1,74	1,98-2,09	7,20-7,21	0-0,03	0,01-0,09	13,96-14,8
Total	1,77-3,15	13,24-22,52	1,12-2,10	2,67-4,43	0,58-1,01	2,77-4,98	2,37-4,39	9,12-17,01	3,03-4,87	16,93-30,77	61,03-114,16	0,01-0,02	0,33-0,60	

(Les valeurs les plus élevées dans chaque catégorie d'aliments sont surlignées en gris)

En ne considérant que 8 HAP lourds dans des aliments préparés, le chrysène et le benzo(a)anthracène sont les plus fortement présents dans les denrées alimentaires. De plus, le thé et le café en poudre d'une part, et les produits de la mer et les matières grasses d'autre part sont les groupes d'aliments qui contiennent les plus forts taux des 8 HAP.

Tableau 7 : Concentrations des 16 HAP de l'US-EPA dans différents aliments non préparés (en µg/kg) (d'après Martorell et al., 2010)

HAP (en µg/kg)	Viandes et produits carnés	Poissons et produits de la mer	Légumes	Tubercules	Fruits	Œufs	Lait	Produits laitiers	Céréales	Pois	Huiles et matières grasses	Viennoiseries industrielles	Total
Naphthalène	2,48	0,50	0,27	0,24	0,27	1,20	0,16	0,63	0,41	0,50	6,25	0,41	13,31
Acénaphtylène	2,10	0,12	0,05	0,05	0,05	0,24	0,03	0,13	0,08	0,10	1,23	0,08	4,26
Acénaphène	0,34	0,11	0,05	0,05	0,05	0,24	0,03	0,13	0,11	0,10	1,23	0,19	2,63
Fluorène	2,03	0,10	0,05	0,05	0,05	0,24	0,03	0,13	0,08	0,10	1,23	0,13	4,21
Phénanthrène	15,95	0,15	0,09	0,05	0,05	0,24	0,03	0,13	0,08	0,10	1,23	0,08	18,18
Anthracène	3,38	0,12	0,06	0,05	0,05	0,24	0,03	0,13	0,08	0,10	1,23	0,08	5,55
Fluoranthène	5,21	0,41	0,05	0,05	0,05	0,24	0,03	0,13	0,08	0,10	1,23	0,08	7,66
Pyrène	5,78	0,48	0,21	0,05	0,05	0,24	0,03	0,13	0,08	0,10	1,23	0,08	8,46
Benzo(a)anthracène	0,51	0,11	0,07	0,02	0,02	0,10	0,01	0,05	0,03	0,04	0,49	0,04	1,49
Chrysène	0,55	0,19	0,05	0,02	0,02	0,10	0,01	0,05	0,03	0,04	0,49	0,03	1,59
Benzo(b)fluoranthène	0,25	0,20	0,04	0,02	0,02	0,10	0,01	0,05	0,03	0,04	0,49	0,03	1,29
Benzo(k)fluoranthène	0,09	0,09	0,02	0,02	0,02	0,10	0,01	0,05	0,03	0,04	0,49	0,03	1,00
B(a)P	0,14	0,07	0,07	0,02	0,02	0,10	0,01	0,05	0,03	0,04	0,49	0,03	1,08
Indéno(1,2,3-cd)pyrène	0,06	0,07	0,02	0,02	0,02	0,10	0,01	0,05	0,03	0,04	0,49	0,03	0,94
Dibenzo(a,h)anthracène	0,03	0,04	0,02	0,02	0,02	0,10	0,01	0,05	0,03	0,04	0,49	0,03	0,89
Benzo(ghi)pérylène	0,07	0,09	0,07	0,02	0,02	0,10	0,01	0,05	0,03	0,04	0,49	0,03	1,03
HAP totaux	38,99	2,86	1,22	0,73	0,81	3,62	0,47	7,57	1,27	1,50	18,75	1,43	79,23

(Les valeurs les plus élevées dans chaque catégorie d'aliments sont surlignées en gris)

Pour des aliments non préparés, les HAP les plus légers sont plus fortement présents dans les denrées alimentaires. De plus, les produits carnés et les matières grasses sont les deux groupes d'aliments qui contiennent les plus forts taux des 16 HAP.

Les figures 5 et 6 montrent les quantités de HAP (respectivement les 16 HAP de l'US-EPA et le B(a)P seul) dans différentes catégories d'aliments, dans trois études réalisées en Espagne par la même équipe en 2000, 2006, et 2008 (Falcó et al., 2003 ; Martí-Cid et al., 2008 ; Martorell et al., 2010).

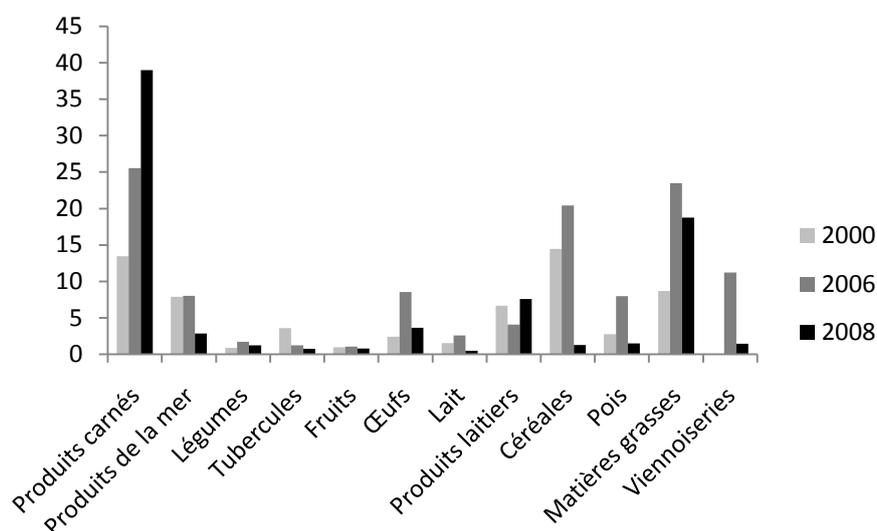


Figure 5 : Concentrations totales des 16 HAP de l'US-EPA dans différents types d'aliments (en µg/kg) (d'après Martorell et al., 2010)

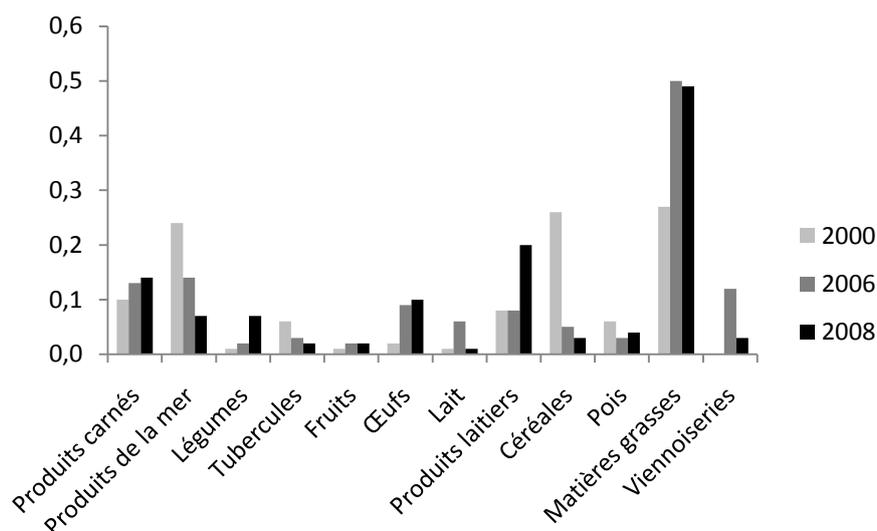


Figure 6 : Concentration de B(a)P dans différents types d'aliments (en µg/kg) (d'après Martorell et al., 2010)

D'après la figure 5, les produits non préparés les plus concentrés en HAP sont les produits carnés, les matières grasses, et les céréales, alors que d'après la figure 6, les produits non-préparés ayant les plus forts taux de B(a)P sont les matières grasses. Notons que ces graphiques ne représentent pas les groupes d'aliments qui contribuent le plus à l'ingestion quotidienne de HAP, puisqu'il faut pour cela tenir compte de la consommation de chaque groupe d'aliment.

Profil des HAP dans les aliments : En 2007, l'EFSA a évalué 100 000 résultats renseignant sur les taux de HAP dans différentes matières premières alimentaires, provenant d'études nationales réalisées dans 18 états de l'Union Européenne. Ces données indiquent que le B(a)P peut être détecté dans 50% des échantillons, et que 30% des échantillons totaux sont positifs pour d'autres HAP. Le chrysène est le congénère le plus souvent détecté dans les échantillons négatifs pour le B(a)P. D'après le rapport EFSA de 2008, parmi les 8 HAP de haut poids moléculaire analysés sur 4065 échantillons de nourriture, le chrysène représente à lui seul 33% de la concentration totale des HAP dans l'alimentation (Figure 7). Il faut toutefois rappeler que les HAP légers, en général plus fortement concentrés dans les aliments, ne sont pas pris en compte dans ce rapport.

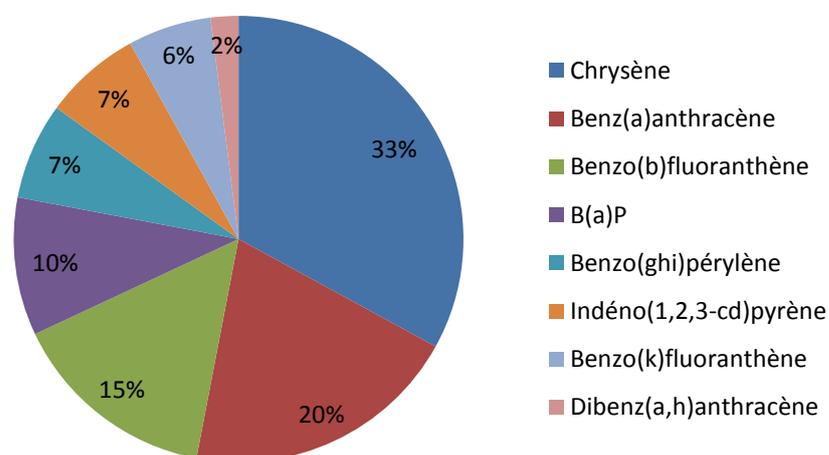


Figure 7 : Contribution relative de 8 congénères à la concentration totale en HAP dans 4065 échantillons d'aliments (d'après EFSA, 2008)

En revanche, si l'on considère les 16 HAP listés par l'US-EPA, il apparaît clairement que ce sont les HAP les plus légers qui contribuent majoritairement à la concentration totale des 16 HAP dans des aliments non préparés (**Figure 8**).

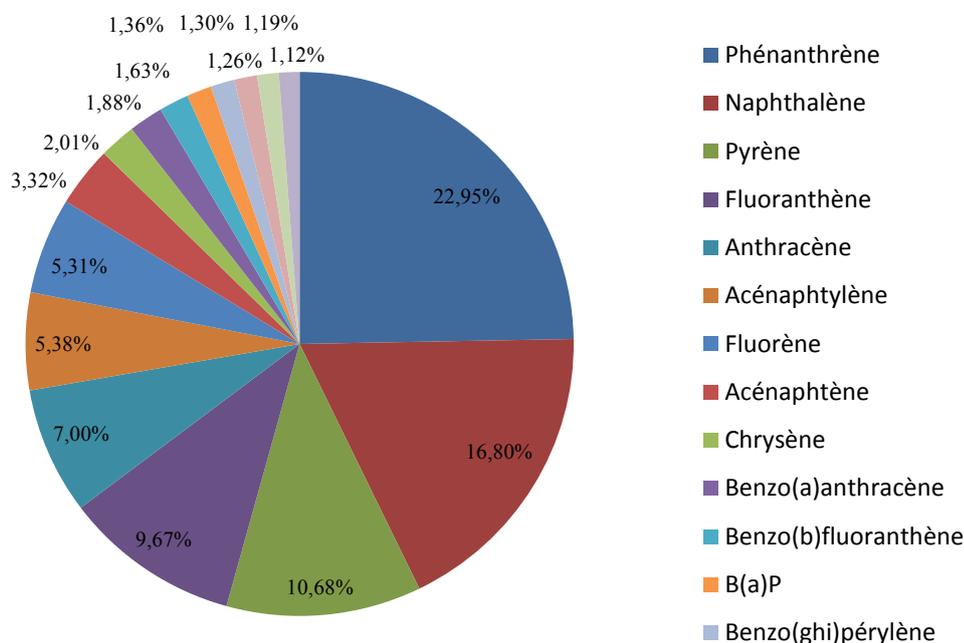


Figure 8 : Contribution relative des 16 HAP de l'US-EPA à la concentration totale en HAP dans 4065 échantillons d'aliments (d'après Martorell et al., 2010)

➤ Ingestion quotidienne de HAP

L'ingestion quotidienne de HAP pour une population donnée est la résultante de plusieurs facteurs : la concentration en HAP dans les aliments consommés, qui dépend elle-même fortement de la région (contamination environnementale) et des habitudes de préparation ; et la consommation d'un groupe d'aliments donné, directement liée aux habitudes alimentaires des individus. La prise en compte de ces facteurs rend difficile la comparaison des valeurs d'une étude à l'autre.

Par exemple, si le poisson fumé et la viande grillée contiennent de fortes concentrations en HAP, ces aliments ne contribueront à l'exposition d'une population que s'ils font partie de son régime alimentaire habituel (SCF, 2002). Ainsi, aux Etats-Unis, les steacks grillés ou cuits au barbecue et le poulet grillé sont des aliments qui contribuent à hauteur de 21% à l'ingestion

quotidienne de B(a)P, juste après les produits céréaliers (29%), à cause de leur importante consommation. Ces valeurs diffèrent alors de celles que l'on peut observer en Europe.

Aliments vecteurs : A l'exception de la catégorie très hétérogène des produits céréaliers, il ne semble pas se dégager d'aliments spécifiquement vecteurs de HAP. Cependant, il faut absolument prendre en compte le mode de préparation, et notamment de cuisson, des aliments, en particulier des poissons et produits carnés.

Selon l'Afssa (2003), les produits céréaliers contribuent à hauteur de 38% des apports en HAP chez les adultes et de 43% chez les enfants, en raison de la forte consommation de ce type d'aliments. La deuxième source dominante provient des charcuteries (27% chez les adultes et 25% chez les enfants). Les poissons ont une contribution faible (2,4% chez les adultes et 2,2% chez les enfants), en raison d'une faible contamination du produit cru.

Selon une étude anglaise (Dennis et al., 1983), les contributeurs majeurs sont les huiles et les matières grasses (50% pour le B(a)P et 34% pour 11 autres HAP), les céréales (30% et 31%), puis les légumes (8% et 12%). La part relativement modeste des produits carnés et des produits de la mer reflète surtout la faible consommation de ces produits. Dans une étude suédoise (Larsson, 1986), l'ingestion quotidienne de 11 HAP est essentiellement apportée par les produits céréaliers (34%), puis par les légumes (18%) et les huiles et matières grasses (16%). Selon une étude danoise (de Vos et al., 1990), les contributions les plus fortes pour l'apport quotidien de B(a)P sont les huiles et matières grasses (47%) et les céréales (36%), suivies par le sucre et les friandises (14%).

Les huiles et matières grasses végétales contribuent à l'exposition quotidienne en HAP, soit par consommation directe pour l'assaisonnement ou la cuisson, soit indirectement, par incorporation dans un grand nombre de préparations (plats préparés, gâteaux,...) (Dennis et al., 1991).

Selon une autre étude anglaise plus récente (SCF, 2002), les céréales et les légumes sont les aliments qui contribuent le plus fortement à l'exposition quotidienne aux HAP. Les produits céréaliers contribueraient ainsi à 24% de l'apport quotidien en B(a)P et 35% de l'ingestion de 19 HAP ; les légumes contribueraient respectivement à 12% et 13%. En revanche, la part des huiles et matières grasses végétales est faible (respectivement 6% et 3%), et une contribution significative de produits laitiers est observée (12% et 9%).

Selon le rapport EFSA de 2008, il apparaît que les groupes d'aliments qui contribuent le plus fortement à l'exposition quotidienne aux 8 HAP analysés sont les produits céréaliers et les produits de la mer.

Enfin, les résultats des différentes études menées en Espagne (Falcó et al., 2003 ; Martí-Cid et al., 2008 ; Martorell et al., 2010) montrent que les groupes d'aliments qui contribuent le plus à l'ingestion quotidienne de HAP sont les produits carnés, les céréales, et les huiles et matières grasses (**Figure 9**)

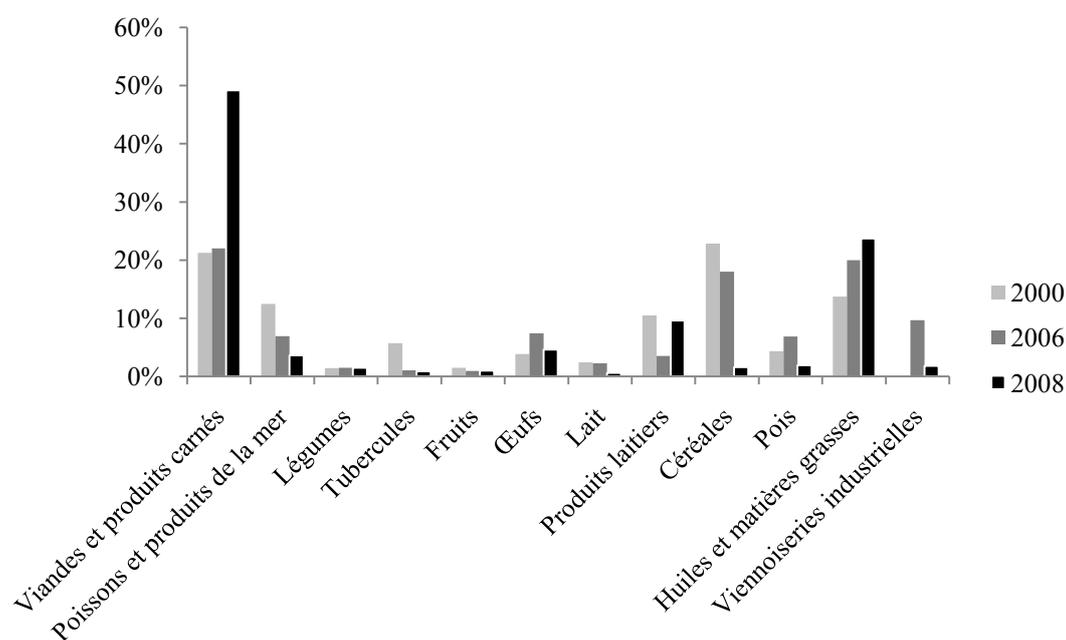


Figure 9 : Contribution (en pourcentage) de chaque groupe d'aliments à l'ingestion quotidienne des 16 HAP de l'US-EPA (d'après Falcó et al., 2003 ; Martí-Cid et al., 2008 ; Martorell et al., 2010)

Quantités de HAP ingérées : D'après le rapport EFSA (2008), qui a synthétisé un grand nombre d'études européennes, pour un consommateur moyen, l'exposition alimentaire au B(a)P seul est de 235 ng/jour ; de 641 ng/jour pour le B(a)P et le chrysène ; de 1168 ng/jour pour l'ensemble B(a)P, chrysène, benz(a)anthracène et benzo(b)fluoranthène ; et de 1720 ng/jour pour l'ensemble B(a)P, chrysène, benz(a)anthracène, benzo(b)fluoranthène, benzo(k)fluoranthène, benzo(ghi)pérylène, dibenzo(a,h)anthracène et indéno(1,2,3-cd)pyrène.

Le tableau 8 donne les valeurs issues des rapports SCF (2002) et EFSA (2008), concernant l'ingestion quotidienne de plusieurs HAP pour un homme adulte.

Tableau 8 : Estimation de l'ingestion quotidienne moyenne de HAP pour un adulte non fumeur, synthèse de plusieurs études nationales (d'après SCF, 2002 et EFSA, 2008)

HAP	Ingestion par l'alimentation (ng/jour/personne)
Acénaphthylène	140
Acénaphène	980
Fluorène	600
Anthracène	<30-640
Phénanthrène	<330-4510
Fluoranthène	350-1660
Pyrène	350-1090
Benz(a)anthracène	<20-410
Chrysène	110-1530
Benzo(b)fluoranthène	5-360
Benzo(j)fluoranthène	<30
Benzo(k)fluoranthène	40-140
Benzo(b+j+k)fluoranthène	<70-1100
B(a)P	50-290
Benzo(e)pyrène	200
Benzo(ghi)pérylène	60-360
Indéno(1,2,3-cd)pyrène	<20-460
Dibenzo(a,h)anthracène	<10-80

Au regard de ces données, il semble que les HAP les plus fortement ingérés quotidiennement soient les HAP de faible poids moléculaire (3 et 4 cycles).

Le tableau 9 donne les valeurs issues de plusieurs études publiées depuis 1981, concernant l'ingestion quotidienne de HAP totaux pour un homme adulte.

Tableau 9 : Ingestion quotidienne de HAP totaux pour un homme adulte

Ingestion quotidienne (en µg)	Pays	Référence
0,16 à 1,6	Etats-Unis	(Santodonato et al., 1981)
1,1 à 22,5	Pays-Bas	Vaessen et al., 1988
5 à 17	Danemark	(de Vos et al., 1990)
28	Autriche	Pfannhauser 1991
3	Etats-Unis	(Menzie et al., 1992)
3	Italie	(Lodovici et al., 1995)
1,2	Nouvelle Zélande	Thomson et al., 1996
1,6 à 4,5	Grèce	(Voutsas & Samara, 1998)
3,70	Royaume-Uni	(Phillips, 1999)
8,6	Espagne	(Falcó et al., 2003)
8,4	Espagne	Yoon et al., 2007
12	Espagne	(Martí-Cid et al., 2008)
6,72	Espagne	(Martorell et al., 2010)

Il apparaît qu'en termes d'ingestion quotidienne de HAP totaux, les valeurs sont cohérentes entre les différents Etats, de l'ordre de quelques µg par jour par personne.

Ingestion en fonction de l'âge : L'ingestion de HAP totaux peut varier avec l'âge, notamment parce que le régime alimentaire est fortement modifié tout au long de la vie d'un individu. Par ailleurs, en raison de besoins caloriques accrus, un enfant est susceptible d'être exposé à de plus forts taux de HAP par son alimentation.

Le tableau 10 indique les niveaux d'ingestion de 19 HAP par tranches d'âge, selon une étude réalisée au Royaume-Uni et rapportée par le SCF en 2002.

Tableau 10 : Ingestion quotidienne de HAP au Royaume-Uni, en fonction de l'âge (en ng/kg de poids corporel/jour) (d'après SCF, 2002)

HAP (en ng/kg/jour)	Age (en années)							Adultes
	1,5 à 2,5	2,5 à 3,5	3,5 à 4,5	4 à 6	7 à 10	11 à 14	15 à 18	
Acénaphthylène	4,4	4,0	3,8	3,8	2,9	2,1	1,7	2,0
Acénaphène	31	28	27	27	22	15	12	14
Fluorène	20	18	17	17	13	9,3	7,5	8
Anthracène	2,6	2,5	2,4	2,4	1,9	1,4	1,1	1,2
Phénanthrène	56	53	50	49	39	27	21	22
Fluoranthène	12	12	11	11	8,4	5,9	4,5	5,0
Pyrène	13	12	11	11	8,8	6,1	4,7	5,0
Cyclopenta(cd)pyrène	1,1	1,0	0,9	1,0	0,8	0,5	0,4	0,4
Benz(a)anthracène	1,8	1,8	1,7	1,7	1,4	1,0	0,8	0,8
Chrysène	3,5	3,3	3,2	3,3	2,6	1,8	1,4	1,6
Benzo(b)fluoranthène	3,6	3,3	3,0	3,2	2,5	1,7	1,4	1,5
Benzo(k)fluoranthène	3,2	2,8	2,6	2,7	2,1	1,4	1,2	1,3
B(a)P	3,8	3,4	3,1	3,3	2,6	1,8	1,4	1,6
Benzo(e)pyrène	1,8	1,7	1,6	1,7	1,3	0,9	0,7	0,8
Anthanthrène	0,8	0,7	0,6	0,6	0,5	0,3	0,3	0,3
Benzo(ghi)pérylène	2,0	1,9	1,8	1,9	1,5	1,1	0,8	0,9
Indéno(1,2,3-cd)pyrène	3,4	3,0	2,8	2,9	2,2	1,6	1,3	1,4
Dibenz(a,h)anthracène	1,2	1,1	1,0	1,1	0,9	0,6	0,5	0,5
Somme des 19 HAP	166	155	146	145	115	80	63	69

Il apparaît avec ces données, que le groupe des 1,5 à 2,5 ans ingère quotidiennement la plus forte quantité de HAP, équivalente à 2,4 fois le niveau des adultes.

Evolution au fil du temps : D'une manière générale, si l'on compare des études réalisées dans des conditions strictement comparables, en termes d'échantillons analysés et de techniques analytiques, une baisse de la quantité de HAP totaux ingérés est observée depuis quelques années (Martorell et al., 2010).

Par ailleurs, en France, 20 HAP ont été recherchés dans l'étude de l'ANSES EAT2. Ces HAP sont détectés de façon très variable selon le congénère considéré, dans 0 à 19% des analyses. Les résultats montrent une diminution générale de plus de moitié de l'exposition alimentaire à 6 de ces HAP (benz(a)anthracène, benzo(b+j)fluoranthène,

benzo(k)fluoranthène, benzo(ghi)pérylène, benzo(a)pyrène, dibenz(a,h)anthracène), par rapport à l'estimation de l'Agence réalisée en 2003.

Le tableau 11 est issu des données des trois études espagnoles citées précédemment. Il permet de comparer l'ingestion du B(a)P seul et des 16 HAP de l'US-EPA en fonction de l'âge et du sexe, et également de comparer les valeurs obtenues en 2000, 2006 et 2008.

Tableau 11 : Ingestion quotidienne de B(a)P et des 16 HAP de l'US-EPA, en fonction de l'âge et du sexe, en 2000, 2006 et 2008 (en $\mu\text{g}/\text{jour}/\text{personne}$) (d'après Falcó et al., 2003 ; Martí-Cid et al., 2008 ; Martorell et al., 2010)

	HAP (en $\mu\text{g}/\text{j}/\text{personne}$)	Enfants (4 à 9 ans)		Adolescents (10 à 19 ans)		Adultes (20 à 65 ans)		Seniors (> 65 ans)	
		♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
2000	B(a)P	0,110		0,123		0,128	0,097	0,100	
	Somme des 16	7,365		8,199		8,418	6,285	6,330	
2006	B(a)P	0,082	0,073	0,102	0,079	0,089	0,073	0,074	0,061
	Somme des 16	11,177	10,050	13,831	10,157	12,045	8,235	9,187	6,893
2008	B(a)P	0,068	0,061	0,075	0,064	0,076	0,064	0,073	0,062
	Somme des 16	6,051	5,441	8,278	5,605	6,705	3,918	3,560	2,683

Ces données montrent que l'ingestion de B(a)P seul ou des 16 HAP par les individus de sexe masculin est plus élevée que celle des individus de sexe féminin, quel que soit l'âge considéré. Par ailleurs, l'ingestion quotidienne de HAP semble avoir diminué entre 2006 et 2008, quels que soient les individus considérés. Ces données peuvent facilement être comparées, puisqu'elles sont issues d'études réalisées dans les mêmes conditions, et suivant le même protocole analytique. Cette diminution de la quantité de HAP ingérée, résultat direct de la diminution des niveaux de HAP présents dans les aliments, est expliquée par les auteurs de ces études comme étant la conséquence d'une baisse des taux de HAP émis par le trafic autoroutier et par les activités industrielles, ce qui conduit à des niveaux de HAP atmosphériques plus faibles (Martorell et al., 2010).

II.3.3.2. Expositions *via* l'organisme maternel

L'organisme peut être exposé aux HAP à des stades très précoces de son développement. En effet, plusieurs études montrent, tant chez l'Homme que chez l'animal, que les HAP sont capables de passer vers le fœtus *via* le placenta, et qu'ils peuvent également être retrouvés dans le lait maternel.

a) Exposition *in utero*

Différents auteurs ont évalué les concentrations de plusieurs HAP au niveau placentaire. Ainsi, dans une étude publiée en 1995, des taux de chrysène, B(a)P et dibenzo(a,c)anthracène ont été détectés dans le sang et le placenta de femmes non fumeuses en Inde, ainsi que dans le sang du cordon ombilical et dans le lait maternel (Madhavan & Naidu, 1995). En 2000, la concentration de 7 HAP (chrysène, benzo(a)anthracène, benzo(a)pyrène, benzo(b)fluoranthène, indéno(1,2,3,-cd)pyrène, dibenz(a,h)anthracène, benzo(ghi)pérylène) a été mesurée dans le placenta de 200 femmes ukrainiennes, les concentrations varient entre 1.38 ng/g pour le chrysène, et 0.73 ng/g pour le dibenz(a,h)anthracène et le benzo(ghi)pérylène (Gladden et al., 2000). La présence de plusieurs HAP (benzo(b)fluoranthène, fluoranthène, naphthalène, acénaphthylène, phénanthrène, anthracène, benzo(a)pyrène, dibenzo(a,h)anthracène) a également été mise en évidence plus récemment dans le placenta de femmes non fumeuses (Singh et al., 2008b), et dans le sang du cordon ombilical en Chine, suite à une exposition de la mère (Guo et al., 2012).

Par ailleurs, l'exposition aux HAP en période prénatale a été évaluée dans plusieurs études épidémiologiques, par la mesure du taux d'adduits à l'ADN dans le sang du cordon, ce qui montre clairement que les HAP auxquels la mère a été exposée pendant la grossesse sont capables de passer *via* le placenta, et d'atteindre les tissus fœtaux (Perera et al., 1998, 1999, 2011 ; Perera et al., 2012a ; Tang et al., 2006, 2008 ; Kelvin et al., 2009).

Chez le rongeur, plusieurs études ont montré le passage de HAP vers le jeune, suite à une exposition prénatale. Ainsi des concentrations de pyrène (Withey et al., 1992), et de B(a)P et de ses métabolites (Neubert & Tapken, 1988 ; Withey et al., 1993) ont été dosées chez le fœtus, après une exposition de la femelle gestante à la molécule mère, pendant la gestation. Par ailleurs, après avoir administré du B(a)P à des rates gestantes, des concentrations de B(a)P et de métabolites sont retrouvés dans le plasma et le cerveau des

jeunes jusqu'à plusieurs jours après la naissance (Brown et al., 2007 ; McCallister et al., 2008; Sheng et al., 2010 ; Li et al., 2011).

b) Exposition *via* le lait maternel

Plusieurs études ont montré la présence de HAP dans le lait maternel humain ou animal, et ainsi l'exposition potentielle pour le nouveau-né allaité.

Différentes études *in vivo* ont prouvé la présence de HAP dans la glande mammaire de rate (Daniel et al., 1967) ou de ruminants laitiers (Grova et al., 2002, 2005) après ingestion d'un ou plusieurs HAP. Il semble que la perméabilité de la glande mammaire aux HAP, et que leur distribution dans le lait soient fortement liés à leurs propriétés physico-chimiques, et en particulier à leur masse molaire et à leur caractère lipophile (Cavret et al., 2005).

Somogyi et Beck rapportent une étude menée en République Fédérale d'Allemagne (*Deutsche Forschungsgemeinschaft*) au cours des années 1980, qui indique que certains HAP sont retrouvés dans le lait maternel humain à des concentrations de 5 à 15 ng/kg de lait, et parmi eux le B(a)P, à une concentration de 6,5 ng/kg (Somogyi & Beck, 1993). En 2003, la concentration de plusieurs HAP a été mesurée dans du lait infantile commercial et dans du lait maternel au Japon (Kishikawa et al., 2003). En 2005 et 2007, des concentrations significatives de 11 HAP (naphthalène, acénaphthylène, acénaphthène, fluorène, phénanthrène, anthracène, fluoranthène, pyrène, benzo(a)anthracène, benzo(b)fluoranthène and benzo(k)fluoranthène) ont été mesurées dans le lait de femmes fumeuses et non fumeuses vivant en milieu rural ou urbain en Italie (Del Bubba et al., 2005 ; Zanieri et al., 2007). Les concentrations étaient comprises entre 0,06 µg/kg de lait pour le fluorène et 9,09 µg/kg de lait pour l'acénaphthylène. En 2008, 13 HAP ont été recherchés dans le lait de femmes américaines non fumeuses, et 4 d'entre eux (phénanthrène, fluorène, fluoranthène, pyrène) ont été détectés, à des concentrations comprises entre 1,1 et 11,8 ng/g de matière grasse (Kim et al., 2008). Cette même étude a permis d'établir que l'ingestion de lait compte pour 47,9 à 81,4% de l'exposition totale aux HAP pour un enfant.

II.3.4. Devenir dans l'organisme et métabolisme

Les données relatives au devenir des HAP dans l'organisme concernent principalement le B(a)P. L'absorption de B(a)P est estimée à 35-99% entre 2 et 4h après ingestion par voie alimentaire ou par gavage (EFSA, 2008). Les valeurs pour le chrysène et le phénanthrène sont respectivement de 75-87% et 42-99%. D'une manière générale, le taux d'absorption orale des HAP les plus légers (3 ou 4 cycles aromatiques) est plus élevé que celui des HAP les plus lourds.

L'absorption de B(a)P par inhalation est rapide, et dépend de la taille des particules sur lesquelles il est adsorbé (INERIS, 2006).

Enfin, par voie cutanée, le taux d'absorption du B(a)P est estimé à 3% après 24h sur un modèle *in vitro* de cellules de peau humaines (Kao et al., 1985).

La distribution des HAP dans l'organisme a essentiellement été étudiée chez le rongeur, suite à une administration par voie orale (gavage) ou par voie intraveineuse. Les HAP et leurs métabolites ont été détectés dans quasiment tous les organes (EFSA, 2008), en quelques minutes ou quelques heures (Kotin et al., 1959). Les concentrations les plus fortes sont mesurées d'abord dans les tissus les plus riches en lipides (WHO/IPCS, 1998), puis les HAP sont progressivement relargués dans la circulation sanguine (IARC, 1983). Plusieurs études ont montré notamment la capacité des HAP et de leurs métabolites à passer la barrière hémato-encéphalique (EFSA, 2008).

Les études de métabolisme des HAP, en particulier du B(a)P, réalisées chez l'animal comme sur des cellules humaines en culture montrent que le mécanisme de métabolisation des HAP observé chez l'animal est également pertinent chez l'Homme (SCF, 2002). Dans l'organisme, les HAP sont fortement métabolisés en composés polaires destinés à être excrétés, ou en métabolites réactifs capables de se lier à l'ADN (Ramesh et al., 2004). Le passage des HAP dans le cytoplasme entraîne l'induction spécifique de certaines enzymes métabolisant les xénobiotiques, par fixation sur un récepteur cytoplasmique, le récepteur Ah, ou AhR pour *aryl hydrocarbon receptor*.

Le foie est le principal site du métabolisme des HAP, mais en cas d'ingestion d'aliments contaminés ou d'inhalation de HAP présents dans l'air, il peut également y avoir des réactions

de métabolisme respectivement au niveau de la flore intestinale et des poumons (Ramesh et al., 2004).

D'une manière générale, les enzymes chargées de la biotransformation des xénobiotiques dans l'organisme peuvent être classées en deux catégories : les enzymes de phase I (ou phase de fonctionnalisation), parmi lesquelles on retrouve les cytochromes P450 (CYP450), les époxyde réductases et époxydes hydrolases (EH), et les enzymes de phase II (ou phase de conjugaison) avec la Gluthation-S-transférase (GST), l'UDP-glucuronyl transférase (UGT) et la Sulfotransférase (SULT) (Shimada, 2006). La figure 10 résume les différentes étapes du métabolisme hépatique. Cette classification est actuellement remise en cause, notamment parce qu'elle suggère un ordre dans la mise en place des réactions de métabolisation des xénobiotiques, qui ne reflète pas nécessairement la réalité, et qu'il peut être difficile de classer une enzyme dans une catégorie plutôt qu'une autre (Josephy et al., 2005).

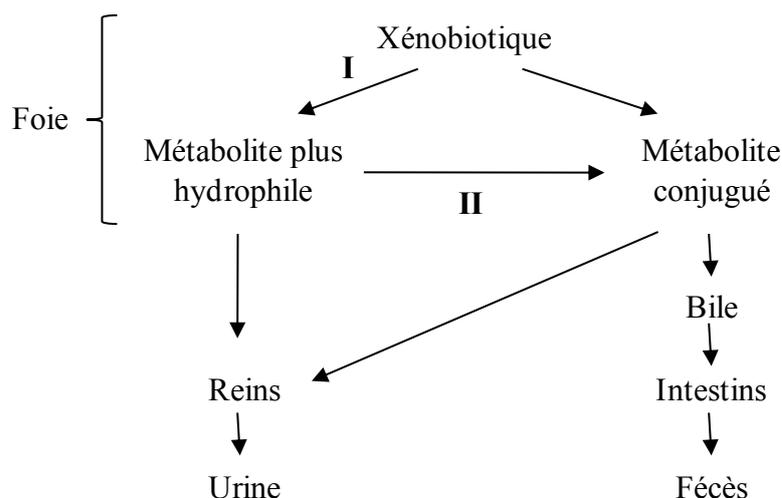


Figure 10 : Les différentes étapes du métabolisme hépatique

➤ Les enzymes de phase I

Les réactions de phase I sont des réactions d'oxydation, de réduction ou d'hydrolyse, qui permettent d'ajouter à la molécule cible un groupement polaire hydroxyl (OH), carboxyl (COOH) ou amino (NH₂) afin de la rendre plus hydrosoluble et faciliter sa conjugaison par les enzymes de phase II et son élimination dans les urines, les fèces et la bile. Les enzymes de la phase I sont catalysées par des mono-oxygénases à cytochrome P450 aussi appelées oxydases

à fonctions multiples (MFO), situées essentiellement au niveau du réticulum endoplasmique des cellules. A la suite du processus métabolique de phase I, certains substrats peuvent être conjugués avec des composés endogènes, et ainsi subir une réaction de phase II.

➤ Les enzymes de phase II

Les réactions de phase II sont catalysées principalement par des transférases, et aboutissent à la conjugaison du xénobiotique avec un substrat endogène, tel que l'acide glucuronique, le glutathion, les ions sulfate et acétate, le groupement méthyl, et la glycine, pour permettre à la molécule cible d'être éliminée via des pompes ou des transporteurs.

En ce qui concerne les HAP, 3 principales voies de métabolisation sont actuellement connues (**Figure 11**). La plus importante de ces voies implique la famille des cytochromes P450 (CYP450). La 2ème voie repose sur la formation d'un radical cation par oxydation catalysée par des cytochromes P450 peroxydases. Enfin une voie mise en évidence plus récemment implique la formation de *o*-quinones à partir de catéchols, catalysée par des dihydrodiols déshydrogénases (Xue & Warshawsky, 2005).

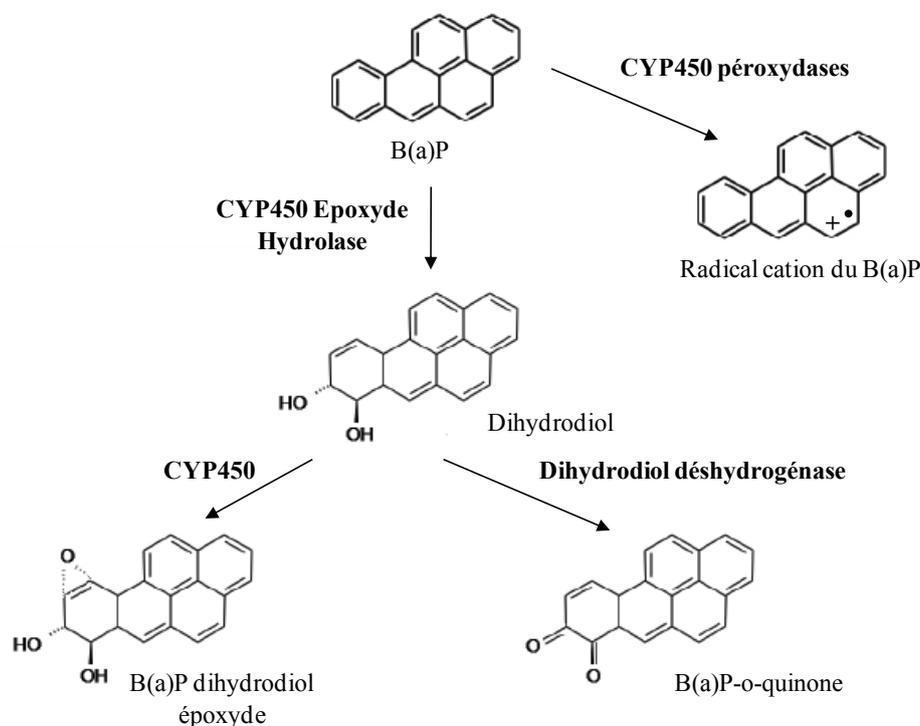


Figure 11 : Principales voies de métabolisation du B(a)P (d'après Xue & Warshawsky, 2005)

Le métabolisme du B(a)P, l'une des molécules les plus étudiées dans la famille des HAP, est relativement bien connu. Le B(a)P est transformé par différentes voies métaboliques, en une grande variété de métabolites primaires (époxydes, phénols, dihydrodiols) et secondaires (diols époxydes, tétrahydrotétrols, phénols époxydes) par les enzymes de phase I ; puis ces métabolites sont conjugués avec le glutathion, l'acide glucuronique ou le sulfate par les enzymes de phase II (**Figure 12**).

Les premières étapes de la biotransformation du B(a)P sont catalysées par une mono-oxygénase à cytochrome P450, présentes dans tous les tissus des mammifères (Brookes & Osborne, 1977). Certains métabolites du B(a)P ont la capacité de se fixer de manière covalente aux macromolécules des cellules, et en particulier à l'ADN et aux protéines, formant ainsi des adduits conduisant à des mutations ou à des mécanismes de carcinogénèse (Ramesh et al., 2004). Le métabolisme du B(a)P met en jeu des espèces radicalaires, dont la toxicité pour l'organisme pourrait être supérieure à celle des molécules mères.

Le B(a)P et ses métabolites sont principalement éliminés dans les fèces (70 à 75%) et seuls 4 à 12% sont éliminés par voie urinaire, à 80% sous la forme de métabolites (INERIS, 2006).

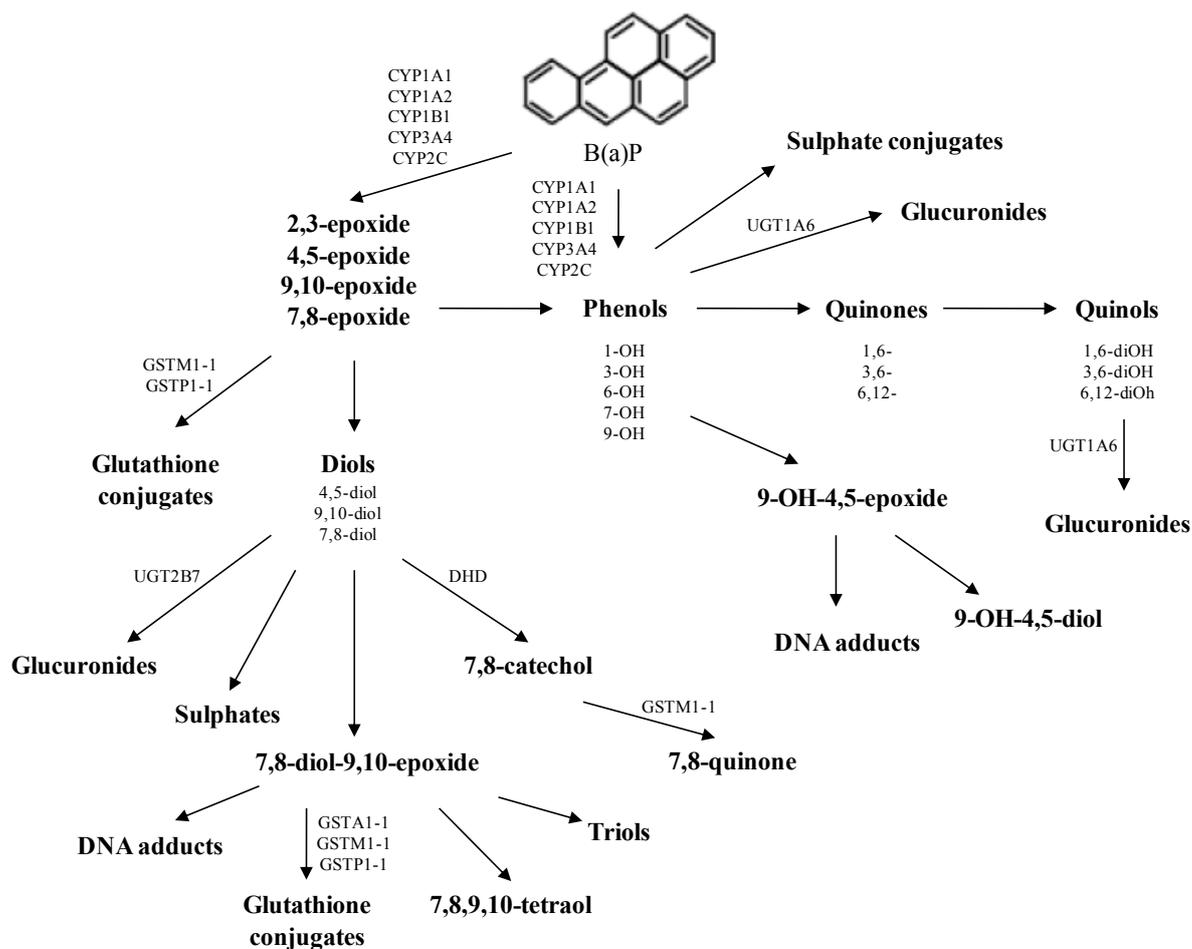


Figure 12 : Métabolisme du B(a)P (adapté d'après Besarati, 2001)

(Abréviations des enzymes : CYP1A1, Cytochrome P450 1A1 ; CYP1A2, Cytochrome P450 1A2 ; CYP1B1, Cytochrome P450 1B1 ; CYP3A4, Cytochrome P450 3A4 ; CYP3A5, Cytochrome P450 3A5 ; CYP2C, Cytochrome P450 2C ; UGT1A6, UDP Glucuronyl Transférase 1A6 ; UGT2B7, UDP Glucuronyl Transférase 2B7 ; GSTA1-1, Glutathione S-Transférase A1-1 ; GSTM1-1, Glutathione S-Transférase M1-1 ; GSTP1-1, Glutathione S-Transférase P1-1 ; DHD, Dihydrodiol déhydrogénase)

II.3.5. Toxicité

II.3.5.1. Généralités

Actuellement, les effets toxicologiques de tous les HAP sont encore mal connus, et les recherches sur les effets biologiques des HAP ont surtout porté sur la cancérogénicité. Le B(a)P est souvent considéré comme la molécule de référence, et comme la plus toxique pour l'Homme, puisque ses propriétés mutagène, tératogène, cancérogène et toxique pour le développement sont connues. Les données expérimentales disponibles chez l'animal ont montré que certains HAP pouvaient induire spécifiquement de nombreux effets sur la santé, des effets systémiques (effets hépatiques, hématologiques, cardiaques, immunologiques, rénaux, neurologiques et développement d'athérosclérose), et/ou des effets sur la reproduction ainsi que des effets génotoxiques et cancérogènes (INERIS, 2003 ; Ramesh et al., 2004). Quelques rares données disponibles chez l'Homme permettent de connaître les effets induits par un mélange de HAP et ainsi de prendre en compte les interactions entre les molécules, susceptibles de modifier la toxicité du mélange. Cependant, étant donné la diversité des sources d'émission de HAP, la composition chimique des mélanges auxquels sont exposés les individus peut considérablement varier. Il est alors difficile de prédire et d'évaluer les relations dose-réponse induites par tous les mélanges (INERIS, 2003).

Les HAP font partie des premières molécules identifiées comme cancérogènes (Baek et al., 1991), mais la plupart des études de cancérogénèse ont été réalisées par voie dermique, sous-cutanée, intramusculaire ou par inhalation, sur un nombre très limité de HAP (Afssa, 2003). Le Centre International de Recherche sur le Cancer a réévalué les HAP en 2006, et en a classé plusieurs parmi les substances cancérogènes, probablement ou possiblement cancérogènes pour l'Homme (**Tableau 4**). D'autres HAP sont suspectés d'être potentiellement mutagènes ou cancérogènes, mais ils ne remplissent pas les critères de cancérogénicité pour l'Homme.

Plusieurs études montrent que le récepteur Ah joue un rôle important dans l'induction des effets toxiques des HAP, en termes d'immunotoxicité, de cancérogénicité, et de toxicité pour le développement notamment (SCF, 2002). Les effets cancérogènes de certains HAP sont liés à la voie d'administration (EFSA, 2008). Il a été montré depuis la fin des années

1990, que certains HAP sont impliqués dans le développement de cancers du poumon, du sein, de l'œsophage, du pancréas, de l'estomac, du colon, de la vessie, de la peau, et de la prostate chez l'Homme ou chez l'animal (Ramesh et al., 2004).

II.3.5.2. Neurotoxicité

Si les effets cancérogènes des HAP ont déjà fait l'objet d'un certain nombre d'études (IARC, 1983), moins de données concernant les effets sur le système nerveux sont disponibles. Pourtant, depuis une vingtaine d'années le lien entre une exposition forte aux HAP, plus particulièrement au B(a)P, considéré comme une molécule de référence pour l'étude de la toxicité des HAP, et l'apparition de troubles neurologiques, tant chez l'Homme que chez l'animal, a été démontré. Les propriétés physico-chimiques des HAP leur permettent de franchir la barrière hémato-encéphalique et de s'accumuler au niveau du tissu cérébral. De plus, l'existence d'un système de métabolisation des xénobiotiques au niveau de cette barrière permet la fonctionnalisation de ces molécules, ce qui facilite potentiellement leur transfert dans le compartiment cérébral, où elles peuvent alors perturber le fonctionnement du cerveau (Rouet et al., 1981 ; Das et al., 1985). Des tableaux récapitulatifs des études montrant les effets neurotoxiques des HAP pour l'Homme et pour l'animal se trouvent à la fin de cette partie (Tableau 12 à 21).

➤ Toxicité chez l'adulte

Etudes chez l'Homme

Les premières observations d'effets toxiques des HAP sur le système nerveux de l'Homme adulte ont été faites au début des années 1990 en Pologne et aux Etats-Unis. Ainsi, Majchrzak et al. (1990) ont montré que la prévalence de certains troubles de la mémoire à court terme augmente avec le niveau d'exposition au B(a)P chez les ouvriers d'une cokerie en Pologne. De plus, Dayal et al. (1995) ont mis en évidence une corrélation entre l'apparition de symptômes neurologiques tels que des difficultés d'apprentissage, des tremblements, une perturbation du sommeil, un comportement nerveux et des modifications du goût et de l'odorat, avec le niveau d'exposition à un mélange de six HAP incluant le B(a)P, le benzo(a)anthracène, le chrysène, le naphthalène, le fluorène et le pyrène chez des adultes vivant à proximité d'une déchetterie au Texas. La même année, l'étude de Kilburn et

Warshaw a fait état du même type de résultats en montrant l'existence d'un lien entre le niveau élevé d'exposition en HAP (dont le B(a)P) d'une population riveraine d'un site de retraitement d'huiles de moteurs et de déchets chimiques en Louisiane (USA) et la survenue à terme de troubles neurophysiologiques, tels que dépression, confusion ou fatigue (Kilburn & Warshaw, 1995). En 2003, la même relation est faite dans une population résidant près d'un site de production de créosote au Mississippi (Dahlgren et al., 2003). Enfin, il est apparu dans des études récentes menées chez des ouvriers travaillant dans des fours à charbon en Chine, que la baisse de performance enregistrée dans des tests évaluant les capacités d'apprentissage et de mémorisation est corrélée avec une excrétion forte de 1-hydroxypyrene, métabolite du pyrene, utilisé comme marqueur de l'exposition aux HAP (Nie et al., 2008 ; Niu et al., 2009).

Etudes chez l'animal

La neurotoxicité des HAP a été mise en évidence expérimentalement depuis la fin des années 1990 dans des études réalisées chez le rongeur. Ainsi, il a été montré que des injections intracérébrales de fractions de diesel dans le cerveau de rats adultes provoquent des lésions au niveau de l'hippocampe et du striatum (Andersson et al., 1998). Par ailleurs, des études plus récentes réalisées chez la souris ont montré que le B(a)P est capable d'induire de manière dose-dépendante des troubles de l'anxiété et de l'apprentissage à court terme (Grova et al., 2007, 2008), des perturbations de l'activité motrice (Hood et al., 1998 ; Patin et al., 2005) ainsi que des altérations comportementales relatives à l'agressivité et au comportement sexuel (Bouayed et al., 2009b). Il a également été démontré qu'un autre HAP, le fluoranthène, est capable de provoquer différentes modifications comportementales relatives à l'activité (Saunders et al., 2001, 2003, 2006). Très récemment enfin, une diminution des capacités d'apprentissage de rats adultes suite à une exposition à du B(a)P par voie intra-péritonéale a été observée (Xia et al., 2011). Dans cette même étude, l'injection de B(a)P a induit chez les animaux exposés une modulation des systèmes de neurotransmission dopaminergique et cholinergique.

D'un point de vue du fonctionnement du système nerveux central, les modifications du comportement observées ont été corrélées avec l'induction d'un stress oxydant (Saunders et al., 2006) ainsi qu'avec des variations de l'expression des sous-unités NR1 et NR2A du récepteur au glutamate NMDA (N-méthyl-D-aspartate), au niveau de l'hippocampe, du cortex temporal et du cortex frontal (Grova et al., 2007, 2008). De plus, il a également été montré que l'intensité des effets comportementaux peut être corrélée avec les concentrations

cérébrales de fluoranthène, de B(a)P, ou de leurs métabolites, ce qui suggère fortement l'implication du métabolisme dans la neurotoxicité des HAP (Saunders et al., 2002 ; Grova et al., 2008). Enfin, des effets délétères d'une exposition au B(a)P sur les activités dopaminergique et sérotoninergique ont également été mis en évidence (Stephanou et al., 1998 ; Konstandi et al., 2007), ce qui montre que les polluants de cette famille sont capables de moduler l'activité de plusieurs systèmes de neurotransmission.

➤ Toxicité chez le jeune

Etudes chez l'Homme

La toxicité des HAP pour le cerveau en développement a été mise en évidence par les données épidémiologiques obtenues dans différentes cohortes d'enfants nés de mères exposées pendant leur grossesse. Les premières études réalisées en République tchèque et en Pologne ont montré des troubles du développement neuro-cognitif des enfants dont les mères habitent dans des zones fortement polluées en HAP (Otto et al., 1997 ; Perera et al., 1998). De même, l'émergence de troubles du comportement chez des enfants nés de femmes fortement exposés à des HAP comme le benzo(b)fluoranthène, le benzo(a)anthracène, l'indéno(1,2,3-cd)pyrène et le B(a)P a été démontrée (Jedrychowski et al., 2003). Depuis le début des années 2000, une équipe américaine a constitué une cohorte de femmes enceintes d'origine afro-américaine et dominicaine vivant dans différents quartiers de New York, et évalue régulièrement le développement neurocognitif de leurs enfants. Le degré d'exposition des mères pendant la grossesse a été évalué, d'une part par la mesure des HAP atmosphériques, et d'autre part en déterminant la concentration d'adduits des HAP à l'ADN dans le sang du cordon ombilical à la naissance. Les résultats obtenus ont ainsi fait apparaître à la naissance une corrélation entre le niveau d'exposition de la mère aux HAP et la diminution du périmètre crânien des nouveau-nés (Perera et al., 2003). Cette mesure peut être considérée comme un indicateur précoce d'un retard dans le futur développement psychomoteur de l'enfant (Chasnoff et al., 1992 ; Azuma & Chasnoff, 1993). Les résultats publiés en 2006, après l'évaluation des enfants alors âgés de 3 ans, ont montré que ceux qui ont été exposés pendant la grossesse aux taux les plus élevés de HAP présentent un indice de développement mental plus faible (Perera et al., 2006). A l'âge de cinq ans, une diminution du quotient intellectuel général (*full scale IQ*) de 4,3 points, et de 4,7 points pour l'indice de compréhension verbale (*Verbal Comprehension Index*) a été observée chez ces mêmes enfants (Perera et al., 2009). A

l'âge de 4,8 et 7 ans, les auteurs observent une augmentation des problèmes d'attention chez les enfants les plus fortement exposés, ainsi qu'une augmentation des scores renseignant sur l'anxiété et la dépression pour les enfants âgés de 4,8 ans (Perera et al., 2011 ; Perera et al., 2012b). Le même type d'étude a été mené en Chine, sur des femmes enceintes non fumeuses vivant à proximité d'une centrale à charbon. Les résultats indiquent que les enfants nés de mères fortement exposées à des HAP atmosphériques pendant la grossesse présentent une diminution de la circonférence de la tête à la naissance (Tang et al., 2006), ainsi qu'un retard de développement moteur et verbal évalué à l'âge de 2 ans (Tang et al., 2008) et 5 ans (Perera et al., 2012a).

L'ensemble de ces données épidémiologiques indiquent ainsi clairement que les HAP représentent des substances à risque pour le développement cérébral de l'enfant.

Etudes chez l'animal

En parallèle des études épidémiologiques, plusieurs équipes de chercheurs se sont attachés à étudier les effets des HAP pour le système nerveux en développement sur des modèles animaux. Ainsi, les études de neurotoxicité développementale réalisées chez l'animal ont montré des effets délétères d'une exposition précoce aux HAP pendant la gestation et/ou la période d'allaitement sur la maturation cérébrale et le développement neurocomportemental de l'individu (Hood et al., 2000 ; Wormley et al., 2004a ; Brown et al., 2007 ; McCallister et al., 2008 ; Bouayed et al., 2009a). D'une manière générale, les résultats indiquent que les jeunes présentent des troubles de l'apprentissage pouvant persister jusqu'à 100 jours après la naissance (Wormley et al., 2004a), des troubles du développement neuromoteur (Boussel et al., 2006 ; Buzanska et al., 2009), ainsi qu'une diminution de l'anxiété à court terme ou à long terme (Bouayed et al., 2009a ; Buzanska et al., 2009 ; Bouayed et al., 2009b ; Boussel et al., 2006) suite à une exposition aux HAP pendant la gestation ou la période d'allaitement. De plus, il a été montré chez ces mêmes animaux des modifications de l'expression de sous-unités des récepteurs au glutamate NMDA et AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-méthylisozazol-4-propionate) (Wormley et al., 2004b ; Brown et al., 2007 ; McCallister et al., 2008) en lien avec des altérations de la potentialisation à long terme, un mécanisme neurophysiologique impliqué dans l'apprentissage et la mémorisation. Par ailleurs, des altérations de l'expression du facteur de transcription sp1, marqueur du développement précoce du cerveau, dans différentes régions cérébrales ont été mises en évidence chez des jeunes rats dont les mères ont été exposées au B(a)P pendant la gestation (Hood et al., 2000). Très récemment, il a été

montré chez la souris qu'une exposition prénatale au B(a)P peut perturber au niveau cérébral l'expression d'un gène codant pour le récepteur tyrosine kinase MET (Sheng et al., 2010). Or ce gène est connu pour son rôle dans les processus de croissance neuronale et de synaptogenèse (Gutierrez et al., 2004 ; Nakano et al., 2007 ; Akita et al., 2008), et est suspecté d'être impliqué dans des mécanismes liés au développement de troubles autistiques (Jackson et al., 2009 ; Sousa et al., 2009). Cette étude a également révélé la présence de métabolites hydroxylés du B(a)P de manière dose-dépendante dans le tissu cérébral des jeunes exposés, ce qui renforce l'hypothèse selon laquelle les métabolites des HAP pourraient jouer un rôle dans l'apparition des effets délétères pour le système nerveux. L'importance de la métabolisation des HAP en molécules fortement réactives dans les mécanismes de neurotoxicité de cette famille de polluant a également été montrée dans une étude récente, réalisée chez des souris sauvages et des souris mutées n'ayant plus de cytochrome P450. Les effets induits notamment sur la mémoire à court terme par une exposition par inhalation à du B(a)P chez ces animaux sont plus marqués pour les animaux sauvages, qui ont une capacité normale à métaboliser les HAP. Les conclusions de cette étude confirment ainsi le fait que les métabolites du B(a)P semblent plus toxiques que la molécule mère (Li et al., 2011).

Tableau 12 : Récapitulatif des effets neurotoxiques des HAP pour l'Homme adulte (1/2)

Référence	Modèle	Molécules	Exposition	Principaux résultats
Majchrzak et al., 1990	Ouvriers d'une cokerie (Pologne)		240 ouvriers exposés et 76 personnes non exposées	Prévalence de symptômes neurologiques (altérations de la mémoire à court terme) augmente avec le niveau d'exposition au B(a)P
Dayal et al., 1995	Communauté noire, voisine de deux décharges, Texas (USA)	Site 1 (Sikes) : Benzène, 1,-2-dichloroéthane, toluène, 1,12-trichloroéthane, naphtalène, plomb, fluorène, pyrène. Site 2 (French, Ltd.) : benzène, benzo(a)anthracène, benzo(a)pyrène, cuivre, chrysène, chrome, dichlorodiphenyl-trichloroéthane, heptachlore, plomb, nickel, PCB, tetrachloroéthylène, trichloroéthylène, zinc.	Exposition évaluée par questionnaire et calcul 321 personnes fortement exposées et 351 personnes faiblement exposées	Prévalence de symptômes neurologiques augmentée de 50% pour le groupe fortement exposé. (difficultés d'apprentissage, sommeil perturbé, tremblements, fatigue inhabituelle, diminution du goût et de l'odorat, nervosité, engourdissement des doigts et des orteils)
Kilburn et Warshaw, 1995	Habitants près d'un site de retraitement d'huile de moteurs et de déchets chimiques, Louisiane (USA)		Exposition évaluée par questionnaire 131 personnes exposées et 66 personnes non exposées	Troubles cognitifs et neuropsychologiques (dépression, confusion, fatigue) corrélés à de hauts niveaux de HAP, dont le B(a)P
Dahlgren et al., 2003	Habitants près d'un site de production de créosote, Mississippi (USA)	HC totaux du pétrole, HAP, dioxines, furanes	Exposition évaluée par questionnaire 214 personnes exposées et 139 personnes non exposées	Prévalence de troubles neurologiques augmente pour personnes exposées

Tableau 13 : Récapitulatif des effets neurotoxiques des HAP pour l'Homme adulte (2/2)

Référence	Modèle	Molécules	Exposition	Principaux résultats
Nie et al., 2008	Ouvriers dans des fours à charbon, Taiyuan (Chine)	HAP, dont B(a)P	Concentration de B(a)P dans l'environnement et concentration de 1-OH pyrène urinaire mesurées par HPLC. [B(a)P] à proximité des fours : 0.0195 microg/m ³ , 0.186 microg/m ³ et 1.624 microg/m ³ [1-OH pyr] urinaire : 3.42 +/- 0.98 micromol/mol de créatinine versus 2.75 +/- 1.09 micromol/mol de créatinine 200 ouvriers exposés et 88 ouvriers non exposés	Corrélation entre forte concentration de 1-OH pyrène urinaire et troubles de la mémoire et de la perception
Niu et al., 2010	Ouvrier dans des fours à charbon	HAP, dont B(a)P	Concentration de B(a)P dans l'environnement et concentration de 1-OH pyrène urinaire mesurées par HPLC. 176 ouvriers exposés et 88 ouvriers non exposés	Corrélation entre une forte concentration de 1-OH pyrène urinaire et une diminution des scores aux tests reflétant l'apprentissage et la mémoire Corrélation entre un niveau fort de B(a)P et une augmentation de la concentration en acétylcholine (diminution de l'activité de l'AchE). Modifications de la concentration en Norepinephrine, 5-HT, dopamine, Asp, Glu, Gly, GABA
Zhang et al., 2008	Ouvriers dans des fours à charbon, Taiyuan (Chine)	HAP, dont B(a)P	Concentration de B(a)P dans l'environnement et concentration de 1-OH pyrène urinaire mesurées par HPLC. 184 ouvriers exposés et 93 ouvriers non exposés	Corrélation entre une exposition forte et une modulation de la fonction nerveuse parasymphatique.

Tableau 14 : Récapitulatif des effets neurotoxiques des HAP pour l'animal adulte (1/3)

Référence	Modèle	Molécules	Exposition	Principaux résultats
Konstandi et al., 1997	Rats Wistar mâles et femelles	3-méthylcholanthrène en ip	25 mg/kg, 2 fois /semaine, pendant 1 mois	Réduction des capacités d'apprentissage (test d'évitement actif) chez mâles et femelles adultes et chez mâles prépubères
Andersson et al., 1998	Rats Sprague-Dawley femelles	Micro-injections intracrâniennes (striatum et hippocampe) de fractions de diesel		Lésions neuronales dans striatum et hippocampe, inhibition de tyrosine hydroxylase et AchE, baisse de [GFAP], gliose
Hood et al., 1998	Rats	B(a)P inhalé	27 µg/m ³ (5,16 mg/kg)	A cette dose : diminution de 50% de l'activité motrice
Stéphanou et al., 1998	Rats Wistar femelles	B(a)P en ip	50 mg/kg 1 fois, ou 2 fois /semaine pendant 1 mois	<p>Dans le striatum : diminution de noradrénaline, dopamine acide dihydroxyphénylacétique, après 24h, et d'acide homovanillique après 6h. Pas de modifications majeures de 5-hydroxytryptamine et de l'acide 5-hydroxyindoloacétique</p> <p>Dans l'hypothalamus : diminution de noradrénaline après 96h</p> <p>Dans le mésencéphale : diminution de noradrénaline après 24h</p> <p>dans le cortex : augmentation de l'acide 5-hydroxyindoloacétique après 6h</p> <p>Le B(a)P induit des altérations des systèmes dopaminergique et sérotoninergique</p>

Tableau 15 : Récapitulatif des effets neurotoxiques des HAP pour l'animal adulte (2/3)

Référence	Modèle	Molécules	Exposition	Principaux résultats
Saunders et al., 2001	Rats Fisher 344 mâles et femelles	B(a)P par gavage	0; 12,5; 25; 50; 100; 200 mg/kg	Entre 25 et 200 mg/kg : suppression de 4 paramètres évaluant l'activité motrice (activité horizontale, verticale, distance totale, stéréotypie) 2 et 4h après administration A toutes les dose sauf 12,5 mg/kg : modifications des fonctions neuromusculaires, sensorimotrices, physiologiques et autonomes 2 et 4h après administration Absence d'effets après 72h Plus grande sensibilité des mâles
Saunders et al., 2002	Rats Fisher 344 mâles	B(a)P par gavage	0; 25; 50; 100; 200 mg/kg	Les effets neurotoxiques (baisse de l'activité motrice, modifications des fonctions neuromusculaires, sensorimotrices et autonomes) sont les plus forts 2h après l'ingestion, et durent jusqu'à 48h Le niveau de métabolites du B(a)P est le plus fort 6h après l'ingestion, puis il diminue graduellement et retourne au niveau de base 72h après l'ingestion Corrélation entre les effets neurotoxiques et les concentrations en métabolites dans le sang et le cerveau, suggérant un rôle important du métabolisme dans les effets neurocomportementaux du B(a)P
Saunders et al., 2003	Rats Fisher 344 mâles et femelles	Fluoranthène par gavage	0; 100; 200; 400 mg/kg	A 200 et 400 mg/kg : Diminution de 4 paramètres évaluant l'activité motrice (activité horizontale, verticale, distance totale, stéréotypie) A 200 et 400 mg/kg : Modifications des fonctions neuromusculaires, sensorimotrices et autonomes A 200 mg/kg, les effets débutent 4h après l'ingestion, et durent jusqu'à 24h A 400 mg/kg, les effets débutent 2h après l'ingestion, ils sont les plus forts 6h après l'ingestion, et durent jusqu'à 48h Plus grande sensibilité des mâles
Saunders et al., 2006	Rats Fisher 344 mâles	B(a)P par gavage	0; 25; 50; 100; 200 mg/kg	A toutes les doses : l'activité motrice chute de 70% 6h après l'ingestion, mais est réversible à 96h Le niveau de métabolites est fortement liée à l'importance des troubles de l'activité motrice Diminution de l'activité de la SOD et de la glutathion peroxydase. Augmentation de l'activité de la catalase et de la peroxydation lipidique dans le striatum et l'hippocampe à 6h et 96h respectivement Le B(a)P induit une toxicité neurocomportementale, via une augmentation de stress oxydant dû à une inhibition du système cérébral anti-oxydant
Konstandi et al., 2007	Rats Wistar mâles	B(a)P en ip	10 mg/kg 1 fois /jour pendant 3 jours	L'activité dopaminergique est altérée dans l'hippocampe, l'hypothalamus, le noyau caudé et le noyau accumbens

Tableau 16 : Récapitulatif des effets neurotoxiques des HAP pour l'animal adulte (3/3)

Référence	Modèle	Molécules	Exposition	Principaux résultats
Grova et al., 2007	Souris balb/c femelles	B(a)P en ip	0; 0,02; 0,2; 2; 20; 200 mg/kg 1 fois /jour pendant 10 jours	A 0,02 et 0,2 mg/kg : altérations de la mémoire à court terme et de la mémoire spatiale Sur-expression de la sous unité NR1 du récepteur au glutamate NMDA dans l'hippocampe, le cervelet et le mésencéphale Sous-expression de la sous unité NR1 du récepteur au glutamate NMDA dans le tronc cérébral et le cortex frontal
Grova et al., 2008	Souris balb/c femelles	B(a)P en ip	0; 0,02; 0,2; 2; 20; 200 mg/kg 1 fois /jour pendant 10 jours	A 20 et 200 mg/kg : accumulation de B(a)P et de ses métabolites dans le sang et encore plus dans le cerveau A 20 et 200 mg/kg : diminution de l'anxiété, sur-expression de la sous unité NR1 du récepteur au glutamate NMDA et sous-expression des sous unités NR2A et NR2B dans l'hippocampe, l'hypothalamus et le cervelet. Dans le cortex temporal, sous-expression de NR2A de manière dose-dépendante
Bouayed et al., 2009b	Souris Swiss mâles	B(a)P par gavage	0,02 et 0,2 mg/kg 1 fois /jour pendant 28 jours	Altérations comportementales relatives à l'agressivité (0,02 mg/kg) et au comportement sexuel (0,02 et 0,2 mg/kg/jour)
Zhang et al., 2008	Rats Sprague-Dawley	B(a)P, injections intracérébrales	0; 2,5; 5; 10 mmol/l	Diminution des performances d'apprentissage et de mémorisation pour les rats exposés Niveau de glutamate dans l'hippocampe plus bas pour les animaux exposés
Xia et al., 2011	Rats Sprague-Dawley mâles	B(a)P en ip	0; 1; 2,5; 6,25 mg/kg 1 fois /jour pendant 13 semaines	A 2,5 et 6,25 mg/kg/jour : diminution des performances d'apprentissage A toutes les doses : diminution des concentrations de malondialdéhyde, oxide nitrique, oxyde nitrique synthétase, superoxyde dismutase, acétylcholine, choline acétyltransférase et augmentation de l'activité de l'AchE A 2,5 et 6,25 mg/kg/jour : augmentation des concentrations de norépinéphrine, dopamine, acide dihydroxyphénylacétique et 5-hydroxytryptamine dans l'hippocampe

Tableau 17 : Récapitulatif des effets neurotoxiques des HAP pour l'enfant (1/3)

Référence	Modèle	Molécules	Exposition	Principaux résultats
Otto 1997	Femmes enceintes (République Tchèque)	pollution importante en HAP		Troubles de l'apprentissage chez les enfants nés de mères exposées
Perera et al., 1998	Femmes enceintes, Cracovie et Limanowa (Pologne)	HAP environnementaux	37 à 78 µg/m ³ (particules) 7 à 15 ng/m ³ (B(a)P) 70 femmes de Cracovie (zone industrialisée) et 90 femmes de Limanowa (zone rurale)	Corrélation entre de forts taux d'adduits à l'ADN dans le sang du cordon ombilical et une diminution de la taille, du poids et de la circonférence de la tête à la naissance
Jedrychowski et al., 2003	Femmes enceintes, Cracovie (Pologne)	HAP environnementaux	benzo(b)fluoranthène 23 ng/m ³ ; benzo(a)anthracène 16 ng/m ³ ; IP 14 ng/m ³ ; chrysène 13 ng/m ³ ; B(a)P 12 ng/m ³	Perturbations du développement neuro-cognitif chez les enfants nés de mères exposées
Perera et al., 2003	Femmes enceintes issues de populations afro-américaines et dominicaines, New-York (USA)	HAP environnementaux Mesure de 8 HAP : benz(a)anthracène, chrysène, benzo(b)fluoranthène, benzo(k)fluoranthène, B(a)P, IP, dibenzo(a,h)anthracène, benzo(g,h,i)pérylène	Exposition mesurée pendant 2 jours dans l'environnement des femmes 0,36 à 36,47 ng/m ³ (somme des 8 HAP) 263 femmes non fumeuses	Diminution de la circonférence de la tête à la naissance pour les enfants nés de femmes Afro-américaines fortement exposées

Tableau 18 : Récapitulatif des effets neurotoxiques des HAP pour l'enfant (2/3)

Référence	Modèle	Molécules	Exposition	Principaux résultats
Choi et al., 2006	Femmes enceintes non fumeuses, Cracovie (Pologne) et New-York (USA)	HAP environnementaux Mesure de 8 HAP : benz(a)anthracène, chrysène, benzo(b)fluoranthène, benzo(k)fluoranthène, B(a)P, IP, dibenzo(a,h)anthracène, benzo(g,h,i)pérylène	Exposition mesurée pendant 2 jours dans l'environnement des femmes somme des 8 HAP) 340 femmes non fumeuses à Cracovie et 534 femmes non fumeuses à New-York	Taux de HAP 10 fois plus élevés à Cracovie qu'à New-York Diminution du poids à la naissance pour les enfants nés de mères polonaises ou afroaméricaines fortement exposées
Perera et al., 2006	Femmes enceintes issues de populations afro-américaines et dominicaines, New-York (USA)	HAP environnementaux Mesure de 8 HAP : benz(a)anthracène, chrysène, benzo(b)fluoranthène, benzo(k)fluoranthène, B(a)P, IP, dibenzo(a,h)anthracène, benzo(g,h,i)pérylène	Exposition mesurée pendant 2 jours dans l'environnement des femmes 0,65 à 36,47 ng/m ³ (somme des 8 HAP) 183 enfants	Enfants de 12, 24 et 36 mois : association entre de forts taux de HAP en période prénatale et un indice de développement mental plus faible
Tang et al., 2006	Femmes enceintes non fumeuses, Tongliang (Chine)	Exposition aux HAP par une centrale à charbon voisine pendant la grossesse	Evaluation de l'exposition par mesure des taux d'adduits dans le sang de la mère et dans le sang du cordon ombilical 150 enfants	Association entre une forte exposition des mères et une diminution de la circonférence de la tête de l'enfant à la naissance, ainsi qu'une diminution du poids de l'enfant à 18, 24 et 30 mois. Potentielle plus grande sensibilité des fœtus féminins
Choi et al., 2008	Femmes enceintes issues de populations afro-américaines et dominicaines, New-York (USA)	HAP environnementaux Mesure de 8 HAP : benz(a)anthracène, chrysène, benzo(b)fluoranthène, benzo(k)fluoranthène, B(a)P, IP, dibenzo(a,h)anthracène, benzo(g,h,i)pérylène	Exposition mesurée pendant 2 jours dans l'environnement des femmes 616 femmes non fumeuses	Diminution du poids de l'enfant à la naissance, et augmentation du nombre d'accouchements prématurés pour les femmes Afro-américaines fortement exposées

Tableau 19 : Récapitulatif des effets neurotoxiques des HAP pour l'enfant (3/3)

Référence	Modèle	Molécules	Exposition	Principaux résultats
Tang et al., 2008	Femmes enceintes non fumeuses, Tongliang (Chine)	Exposition aux HAP par une centrale à charbon voisine pendant la grossesse	Evaluation de l'exposition par mesure taux d'adduits dans le sang du cordon ombilical 133 enfants	Enfants de 2 ans : associations entre une exposition forte et un retard de développement. Baisse d'indices de développement moteur/verbal/moyen
Perera et al., 2009	Femmes enceintes issues de populations afro-américaines et dominicaines, New-York (USA)	HAP environnementaux Mesure de 8 HAP : benz(a)anthracène, chrysène, benzo(b)fluoranthène, benzo(k)fluoranthène, B(a)P, IP, dibenzo(a,h)anthracène, benzo(g,h,i)pérylène	Exposition mesurée pendant 2 jours dans l'environnement des femmes 2,26 ng/m3 (médiane de la somme des 8 HAP) 249 enfants	Enfants de 5 ans : association entre de forts taux de HAP en période prénatale et une diminution des scores de QI (-4,31 et -4,67 points pour QI full-scale et QI verbal)
Edwards et al., 2010	Femmes enceintes non fumeuses, Cracovie (Pologne)	HAP environnementaux Mesure de 8 HAP : benz(a)anthracène, chrysène, benzo(b)fluoranthène, benzo(k)fluoranthène, B(a)P, IP, dibenzo(a,h)anthracène, benzo(g,h,i)pérylène	Exposition mesurée pendant 2 jours dans l'environnement des femmes 17,96 ng/m3 (médiane de la somme des 8 HAP) 214 enfants	Enfants de 5 ans : association entre de forts taux de HAP en période prénatale et une diminution des scores de QI non-verbal (-3,8 points)
Perera et al., 2011	Femmes enceintes issues de populations afro-américaines et dominicaines, New-York (USA)	HAP environnementaux Mesure de 8 HAP : benz(a)anthracène, chrysène, benzo(b)fluoranthène, benzo(k)fluoranthène, B(a)P, IP, dibenzo(a,h)anthracène, benzo(g,h,i)pérylène	Evaluation de l'exposition par mesure du taux d'adduits dans le sang du cordon ombilical 215 enfants	Corrélation entre les plus forts taux d'adduits et une augmentation des problèmes d'attention chez les enfants de 4,8 et 7 ans, ainsi qu'augmentation des scores renseignant sur l'anxiété et la dépression chez les enfants âgés de 4,8 ans
Perera et al., 2012	Femmes enceintes non fumeuses, Tongliang (Chine)	Exposition aux HAP par une centrale à charbon voisine pendant la grossesse	Evaluation de l'exposition par mesure des taux d'adduits dans le sang de la mère et dans le sang du cordon ombilical 122 enfants	Enfants de 5 ans : corrélation entre une forte exposition aux HAP pendant la grossesse, en association avec une exposition à la fumée de cigarette, et une diminution des scores de QI full-scale et verbal

Tableau 20 : Récapitulatif des effets neurotoxiques des HAP pour le jeune animal (1/2)

Référence	Modèle	Molécules	Exposition	Principaux résultats
Hood et al., 2000	Rats Sprague-Dawley femelles gestantes	B(a)P par inhalation	100 µg/m ³ 4h/jour, de GD15 à GD21	Ratons à PND 3, 5, 7, 10, 15 : perturbations de l'expression de gène sp1 au niveau cérébral (facteur de transcription pour les zones en développement)
Wormley et al., 2004	Rats Sprague-Dawley femelles gestantes	B(a)P par inhalation	100 µg/m ³ 4h/jour, de GD11 à GD21	Ratons à PND 60-70 : sous-expression de la sous-unité NR1 du récepteur au glutamate NMDA et diminution de l'amplitude de la potentialisation à long terme dans l'hippocampe des animaux nés de mères exposées Ratons à PND 100 : déficits d'apprentissage (thèse Wormley 2003)
Boussel 2006	Rats nouveaux-nés	B(a)P sous-cutané	2-20 mg/kg/jour tous les 3 jours, de PND3 à PND21	tests à J4, 9, 10, 20, 50 (labyrinthe à 8 branches, LCS, open field) Ratons à PND4 et 9 : moins bonnes performances aux tests de retournement et de réaction anti-gravitaire à 20 mg/kg Ratons à PND50 : diminution du poids du corps et du poids du cerveau ; diminution de l'anxiété à 20 mg/kg
Brown et al., 2007	Rats Long-Evans Hooded femelles gestantes	B(a)P par gavage	0; 25; 150 µg/kg/jour, de GD14 à GD17	Ratons à PND 2, 5, 10, 15, 20 : sous expression des sous-unité NR2A et NR2B du récepteur au glutamate NMDA, et du récepteur au glutamate GluR1 dans l'hippocampe Pic de métabolites à 2 jours,

(Abréviations : GD, Gestation Day ; PND, Post Natal Day)

Tableau 21 : Récapitulatif des effets neurotoxiques des HAP pour le jeune animal (2/2)

Référence	Modèle	Molécules	Exposition	Principaux résultats
Mc Callister et al., 2008	Rats Long-Evans Hooded femelles gestantes	B(a)P par gavage	300 µg/kg/jour, de GD14 à GD17	Métabolites de B(a)P chez les rats à PND 20 : 75 ng/ml dans le plasma et 100 ng/g dans le cerveau des rats exposés Rats à PND 100 et 120 : sous-expression cérébrale de la sous-unité NR2 du récepteur au glutamate NMDA dans le cortex et réduction de l'activité neuronale corticale
Bouayed et al., 2009	Souris Swiss femelles allaitantes	B(a)P par gavage	0; 2; 20 mg/kg/jour, de PND0 à PND14	Souris à PND 3-11 : effets de l'exposition au B(a)P sur la maturation cérébrale (diminution des performances aux tests de retournement et de réaction antigravitaire, augmentation de la masse musculaire) Souris à PND 14: sous-expression des gènes du récepteur à la sérotonine 5HT1A et du récepteur aux opioïdes MOR1 Souris à PND 32 et 40 : diminution de l'anxiété
Sheng et al., 2010	Souris C57BL/6J femelles gestantes (souris sauvages et souris mutées sans CytP450 cérébral)	B(a)P par gavage	0; 150; 300; 600 µg/kg/jour, de GD14 à GD17	Souris à PND 1 à 7 : sous-expression du gène MET (récepteur tyrosine kinase, potentiellement impliqués dans le développement de troubles de type autisme) à 300 et 600 µg/kg/jour Pic de métabolites dans le néocortex pendant la période de synaptogenèse Souris à PND 40 : mauvaises performances des souris exposées, à un test de reconnaissance d'objet
Li et al., 2011	Souris C57BL/6J femelles gestantes (souris sauvages et souris mutées sans CytP450 cérébral)	B(a)P par inhalation	100 µg/m3 4h/jour, de GD14 à GD17	<u>Souris sauvages exposées</u> : métabolites élevés dans le néocortex, expression précoce de sp4 (facteur de transcription), concentrations élevées de glutamate cortical, diminution du ratio des sous-unités du récepteur au glutamate NMDA NR2B/NR2A, moins bonnes performances dans un test de reconnaissance d'objet Les effets sont plus marqués que chez les souris mutées (sans CytP450), ce qui suggère un rôle du métabolisme dans la toxicité du B(a)P

(Abréviations : GD, Gestation Day ; PND, Post Natal Day)

II.3.6. Mécanismes d'action

II.3.6.1. Généralités

Les mécanismes d'action des HAP sur l'organisme, notamment en terme de neurotoxicité, ne sont pas clairement connus, et sont probablement multiples (Saunders et al., 2003 ; Wu et al., 2003 ; Wormley et al., 2004a). Les données issues d'études réalisées le plus souvent chez l'animal permettent néanmoins d'apporter des éléments de réponses quand aux mécanismes d'action des HAP sur le système nerveux, mais elles concernent pour la plupart un unique composé, le B(a)P, administré seul.

Différentes hypothèses ont été avancées pour expliquer la toxicité des HAP, comme l'interférence des HAP avec les voies de transduction du signal cellulaire ; des mécanismes dépendants de la liaison des HAP avec le récepteur Ah, et du métabolisme des xénobiotiques ; des mécanismes indépendants de la liaison des HAP avec le récepteur Ah ; des effets sur l'homéostasie cellulaire du calcium ; et des effets *via* une augmentation du stress oxydant (Ramesh et al., 2004).

Les HAP sont des molécules qui passent la barrière hémato-encéphalique, et peuvent être métabolisés au niveau du cerveau, grâce à la présence des cytochromes P450 (Ravindranath et al., 1995). Les molécules mères et leurs métabolites peuvent ainsi être dosés dans le système nerveux central, suite à une exposition directe de l'individu (Saunders et al., 2002, 2006 ; Grova et al., 2008, 2011), ou indirecte *via* l'organisme maternel (Brown et al., 2007 ; McCallister et al., 2008 ; Sheng et al., 2010).

II.3.6.2. Mécanismes d'action des HAP

a) Effets pour le placenta

Les mécanismes d'action des HAP sur la croissance fœtale sont encore peu connus (Duarte-Salles et al., 2012). Ils pourraient avoir un impact sur la prolifération des

trophoblastes (observé *in vitro*) (Zhang et al., 1995) ; mais des effets directs sur le placenta ne sont pas à exclure. En effet, les HAP sont capables de passer le placenta (Autrup & Vestergaard, 1996 ; Perera et al., 1999 ; Sanyal et al., 2007), et il a été montré qu'ils peuvent se lier à des récepteurs placentaires de facteurs de croissance d'une part, et à des récepteurs impliqués dans la régulation de l'activité des Cytochromes P450 d'autre part (Tang et al., 2006), avec pour conséquence une diminution des échanges d'oxygène et de nutriments à travers le placenta (Singh et al., 2008b ; Tang et al., 2006). Des conséquences similaires peuvent être attribuées à la liaison des HAP sur des récepteurs impliqués dans le métabolisme de l'insuline ou des facteurs de croissance (Guyda, 1991).

De plus, les HAP peuvent être toxiques pour le placenta *via* leurs métabolites, qui en formant des adduits avec l'ADN, peuvent d'une part interférer avec le déroulement de la grossesse (Singh et al., 2008b), et d'autre part conduire à l'initiation de la voie apoptotique chez le jeune pendant des périodes critiques de maturation cérébrale (Tang et al., 2006, 2008).

b) Effets pour le fœtus

En ce qui concerne la toxicité des HAP pour le fœtus suite à une exposition de la mère, deux hypothèses principales sont envisagées. Ainsi, les composés parents peuvent passer de l'organisme de la mère vers celui du jeune et induire **directement** des effets toxiques au niveau du système nerveux en développement ; ou les effets peuvent être plus **indirects**, soit par transfert des métabolites de la mère vers le jeune, soit par activation de métabolites réactifs au niveau du foie du fœtus (Wu et al., 2003). Ainsi, la toxicité du B(a)P pourrait être modulée par des mécanismes dépendants du récepteur Ah, *via* le métabolisme hépatique du fœtus, caractérisé par une activité CYP1A1 élevée (Wu et al., 2003).

c) Perturbations de l'expression de gènes

Il a été montré que le B(a)P peut induire des modifications de l'expression de certains gènes, notamment des gènes codant pour les récepteurs à la sérotonine et aux opioïdes, suite à une exposition post-natale chez la souris aux doses de 2 et 20 mg/kg/jour (Bouayed et al., 2009a) ; de gènes codant pour les facteurs de transcription sp1, impliqués dans la différenciation des neurones (Hood et al., 2000) et sp4 (Li et al., 2011) chez le rat exposé par

inhalation à 100 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (équivalent à une dose de 19 mg/kg administrée oralement) de GD15 à GD21, et d'un gène codant pour un récepteur à activité tyrosine kinase (gène Met) impliqué dans les processus de croissance neuronale, la formation des synapses et le développement du cortex, chez la souris exposée à 600 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pendant 3 jours de gestation (Sheng et al., 2010). Ce gène est fortement exprimé chez le rongeur pendant la formation des synapses, au cours des premières semaines de vie post-natale, et des perturbations de son expression sont associées à la survenue de troubles autistiques (Jackson et al., 2009 ; Sousa et al., 2009). Dès lors, du fait qu'une exposition au B(a)P peut provoquer des perturbations du développement des synapses, mécanisme classiquement observé dans les troubles autistiques, l'hypothèse du rôle d'expositions environnementales à des agents toxiques dans l'étiologie de tels troubles, a été émise (Sheng et al., 2010).

Des effets d'une exposition de B(a)P sur l'expression de gènes au stade embryonnaire, chez la souris, ont également été récemment observés, mais cette fois en exposant le mâle reproducteur, avant la période d'accouplements (Brevik et al., 2012). Les gènes dont l'expression est modifiée sont impliqués notamment dans la régulation de l'apoptose, du cycle cellulaire, et de la réparation de l'ADN. Cette étude pose la question de l'importance de l'exposition du père sur la toxicité des HAP pour le jeune.

Par ailleurs, il a été montré chez le vers annélide (*Polychaeta*), qu'une exposition au B(a)P est capable d'induire des modifications de l'expression de gènes impliqués dans plusieurs mécanismes fondamentaux pour le maintien de l'homéostasie cellulaire, tels que le métabolisme des neurotransmetteurs, le métabolisme des xénobiotiques, les processus de réparation de l'ADN, le cycle cellulaire, l'apoptose, les mécanismes de neurodégénération, les processus de cancérogénèse ; ainsi que de gènes impliqués dans la chaîne respiratoire mitochondriale, perturbant ainsi le métabolisme énergétique des cellules (Zheng et al., 2011).

d) Perturbations des systèmes de neurotransmission

Plusieurs études expérimentales ont montré que le B(a)P est neurotoxique *via* des perturbations sur différents systèmes de neurotransmission (Saunders et al., 2001). Il a ainsi été montré que les HAP administrés par ingestion ou inhalation chez l'animal ont des effets sur les systèmes dopaminergique, sérotoninergique, cholinergique et glutamatergique

(Andersson et al., 1998 ; Stephanou et al., 1998 ; Grova et al., 2007, 2008 ; Konstandi et al., 2007 ; Zhang et al., 2008 ; Xia et al., 2011).

➤ Monoamines

Ainsi, une exposition à du B(a)P chez le rongeur adulte, à des doses allant de 1 à 100 mg/kg, influence les niveaux de catécholamines et de sérotonine, au niveau cérébral (Jayasekara et al., 1992 ; Stephanou et al., 1998 ; Xia et al., 2011) ; et pourrait induire l'activité d'enzymes impliquées dans la synthèse et le métabolisme de la sérotonine (Stephanou et al., 1998). De plus, des fractions de diesel contenant des HAP, ou du B(a)P administré à la dose de 10 mg/kg altère chez le rongeur adulte l'activité dopaminergique, par induction ou inhibition de l'activité d'enzymes impliquées dans le métabolisme de la dopamine (Andersson et al., 1998 ; Konstandi et al., 2007), ou en bloquant le transport de tyrosine, acide aminé précurseur de la dopamine, du plasma vers le cerveau (Stephanou et al., 1998). L'ensemble de ces modifications pourraient ainsi avoir un effet sur les fonctions cognitives contrôlées par les voies sérotoninergiques et dopaminergiques.

Chez l'Homme, il semble que le B(a)P ait également un impact sur les concentrations de neurotransmetteurs monoaminergiques, chez des ouvriers travaillant dans des fours à charbon, et exposés à différents HAP dont le B(a)P (Niu et al., 2009).

➤ Acétylcholine

Par ailleurs, *in vitro* certains HAP comme le pyrène, le B(a)P, l'anthracène, le fluoranthène, et le chrysène sont des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase (Kang and Fang, 1997 ; Jett et al., 1999). En revanche, l'activité de l'acétylcholinestérase augmente suite à une exposition de B(a)P, à des doses variant entre 1 et 6,25 mg/kg, une fois par semaine pendant 13 semaines, chez le rat adulte (Xia et al., 2011).

➤ Glutamate

D'autres résultats suggèrent que le B(a)P influence la régulation de la neurotransmission glutamatergique, *via* la modulation de l'expression de sous-unités du récepteur NMDA, tant

chez l'animal adulte qu'en développement (Grova et al., 2007, 2008 ; McCallister et al., 2008). Le récepteur NMDA est impliqué dans les processus de mémorisation et d'apprentissage dans le cerveau mature, mais également dans la différenciation neuronale, la migration, la formation des synapses et la croissance des axones pendant le développement du système nerveux central (Wormley et al., 2004a ; Sheng et al., 2010).

e) Perturbations endocriniennes

Les HAP ne sont pas clairement considérés en tant que perturbateurs endocriniens comme d'autres substances toxiques telles que le bisphénol A. Deux études réalisées chez le adulte ont néanmoins montré des effets plus marqués chez les mâles exposés à du B(a)P ou du fluoranthène par gavage, par rapport aux femelles (Saunders et al., 2001, 2003). Les mécanismes conduisant à une toxicité plus ou moins sévère selon le sexe sont multiples, mais les auteurs de ces études mettent en évidence le fait que les capacités de métabolisation des xénobiotiques ne sont pas identiques entre mâles et femelles. Il existe notamment un dimorphisme sexuel dans l'expression des gènes codant pour les cytochromes P450 CYP1A1 et B1 (Tang et al., 2006).

f) Perturbations *via* le stress oxydant

Le stress oxydant est marqué par un déséquilibre entre les capacités anti-oxydantes d'une cellule et la génération d'espèces pro-oxydantes responsables notamment de dommages à l'ADN et de la peroxydation des lipides ; de plus il semble être un facteur commun à un grand nombre de pathologies, notamment des maladies neurodégénératives, telles que les maladies de Parkinson et Alzheimer (Facecchia et al., 2011). En effet, la formation des espèces réactives de l'oxygène et l'induction conséquente de stress oxydant par les xénobiotiques a été proposé comme l'un des principaux mécanismes à l'origine de pathologies dans l'organisme (Singh et al., 2008a).

En ce qui concerne la toxicité des HAP, un nombre important d'études montrent que le stress oxydant est certainement l'un des mécanismes d'action de ces composés, en termes de cancérogénèse mais également de neurotoxicité.

Tout d'abord, le B(a)P est un pro-oxydant potentiel, et le cerveau est sensible à son action à cause d'une forte consommation d'oxygène, d'une forte teneur en lipides, et d'une faible capacité de défense anti-oxydante (Bouayed et al., 2009a).

Ensuite, l'activation métabolique des HAP elle-même génère des métabolites électrophiles et autres espèces réactives de l'oxygène de manière dose dépendante, dont les anions superoxydes (Singh et al., 2008a), et joue un rôle important dans la toxicité des HAP (Li et al., 2011).

De plus, l'exposition aux HAP est associée à une augmentation du stress oxydant (Pan et al., 2008 ; Bae et al., 2010 ; Liu et al., 2010 ; Giannapas et al., 2011), qui serait causée notamment par une perturbation du système de défense anti-oxydante au sein des cellules (Saunders et al., 2001, 2003, 2006 ; Singh et al., 2008a). La diminution de l'activité anti-oxydante dans le système nerveux central résulterait en fait de la liaison de radicaux libres sur le site actif des enzymes anti-oxydantes, ce qui inhibe leur action. Il existe également une synergie entre les enzymes anti-oxydantes, c'est-à-dire qu'une diminution de l'activité de la superoxyde dismutase induit une augmentation du niveau d'anions superoxydes, ce qui inactive la glutathion peroxydase, induisant la production de composés peroxydes, qui inactivent en retour la superoxyde dismutase (Saunders et al., 2006). L'inhibition de la superoxyde dismutase provoque également une augmentation de la peroxydation lipidique (Xia et al., 2011).

Enfin, des études récentes, menées chez le rat adulte mâle exposé par voie orale à du B(a)P, suggèrent que la toxicité neurocomportementale de ce composé est causée par l'augmentation du stress oxydant, et que la génération de ROS résultant du métabolisme du B(a)P en est un mécanisme essentiel (Saunders et al., 2002, 2006). D'autres études permettent de faire le lien entre la concentration de métabolites de B(a)P dosés dans le cerveau de rats exposés avant la naissance, et les effets induits (Brown et al., 2007 ; McCallister et al., 2008 ; Sheng et al., 2010).

Par ailleurs, il a été montré que des nutriments anti-oxydants (vitamines C et E, α et β carotènes) réduisent les dommages à l'ADN liés à une exposition aux HAP, (Duarte-Salles et al., 2012), ce qui confirme que la toxicité de ce type de composés est bien liée au niveau de stress oxydant et aux capacités de l'organisme à lutter contre. La consommation de nutriments

anti-oxydants peut alors aider à protéger l'individu contre les effets délétères pour la santé des polluants comme les HAP (Duarte-Salles et al., 2012).

g) Action des HAP sur les cellules gliales

Plusieurs études montrent que les HAP et le B(a)P en particulier agissent non pas directement sur les neurones, mais sur les cellules gliales, induisant par exemple une astrogliose (Andersson et al., 1998), ou une augmentation du niveau d'espèces réactives de l'oxygène et de stress oxydant au sein des cellules microgliales (Dutta et al., 2010).

II.4. Expertise animale

III.4.1. Extrapolation des données en neurotoxicologie développementale

Pour des raisons évidentes d'éthique, les études expérimentales sur l'organisme humain en développement ne sont pas possibles. Cependant, même en l'absence de réglementation, il serait probablement encore très complexe de réaliser ce genre d'études dans le domaine de la neurotoxicologie développementale, à cause d'une part de la durée longue du développement humain, et d'autre part à cause de la complexité de la composition de l'environnement de l'Homme et de la difficulté importante à la contrôler (Dobbing & Sands, 1979). Dès lors, il devient indispensable d'utiliser un modèle, afin d'obtenir des données extrapolables.

L'extrapolation des données peut se faire de deux manières différentes : soit en utilisant des données obtenues chez un individu adulte de la même espèce, à condition que les effets soient qualitativement similaires à différents âges, soit en utilisant un modèle animal à des stades précoces de développement, à condition que les effets ne soient pas spécifiques à une espèce (Barton, 2005). En neurotoxicologie développementale et notamment dans le domaine de l'évaluation du risque, l'extrapolation des résultats entre espèces est possible, et le rongeur (rat, souris) est le modèle animal le plus couramment utilisé pour ces études, car la neuroanatomie et la neurophysiologie sont bien caractérisées pour ces animaux (Clancy et al., 2001 ; Dorman et al., 2001). Néanmoins, plusieurs facteurs sont à prendre en compte pour l'extrapolation des données d'un modèle animal à l'Homme, parmi lesquels les différences inter-espèces dans l'ontogénèse du système nerveux (Andersen et al., 2000 ; Slikker & Bowyer, 2005) et les variations de capacités de métabolisation des xénobiotiques chez le fœtus, qui diffèrent d'une espèce à l'autre. En effet, les enzymes du métabolisme comme les monooxygénases à cytochrome P450, sont bien développées chez le fœtus humain, même si leur activité est largement inférieure à celle de l'adulte, alors que le fœtus du rat est plus déficient en enzymes du métabolisme des xénobiotiques (Neubert, 1988 ; Dorman et al., 2001). Le fœtus humain est ainsi plus capable de métaboliser des xénobiotiques que le fœtus de rat, qui a des capacités de métabolisation plus faibles, jusqu'à plusieurs semaines de vie postnatale (Pelkonen, 1980b).

Enfin, la caractérisation et la quantification de l'exposition est importante pour extrapoler correctement les résultats de l'animal à l'Homme (Dorman et al., 2001).

Finalement, il est admis que l'on peut s'attendre à des effets neurotoxiques analogues entre l'Homme et le rongeur, car les processus biologiques impliqués dans la neurogénèse et la maturation du système nerveux central sont similaires (Andersen et al., 2000).

En revanche, certains auteurs précisent que la structure et le développement du cortex cérébral notamment variant d'une espèce à l'autre, l'effet d'un produit chimique peut alors être différent entre une espèce animale et l'Homme, et des doutes peuvent persister sur l'innocuité d'une molécule, même en l'absence d'effet sur l'animal. C'est pourquoi les études animales ne suffisent pas toujours, et devraient être complétées par des études épidémiologiques (Lanphear et al., 2005).

III.4.2. Particularités du développement cérébral du rat par rapport à l'Homme

Au cours du développement du système nerveux de beaucoup d'espèces de mammifères, il existe une phase essentielle et rapide de maturation cérébrale. Celle-ci est associée à un haut degré de plasticité et à un grand nombre de modifications fondamentales (croissance des axones et des dendrites, synaptogénèse et ajustement des connexions synaptiques, prolifération des cellules gliales, myélinisation), mais représente en même temps une période de vulnérabilité accrue (Dobbing & Sands, 1979). Selon l'espèce considérée cette période diffère dans le temps par rapport à la naissance (**Figure 13**) (Dobbing & Sands, 1979). Chez le rongeur, elle est entièrement postnatale, alors que chez l'Homme elle commence au 3^{ème} trimestre de la grossesse et s'achève plusieurs mois après la naissance (Andersen et al., 2000). Cette différence est l'un des facteurs les plus importants à prendre en compte pour l'extrapolation des données de l'animal à l'adulte (Dobbing & Sands, 1979).

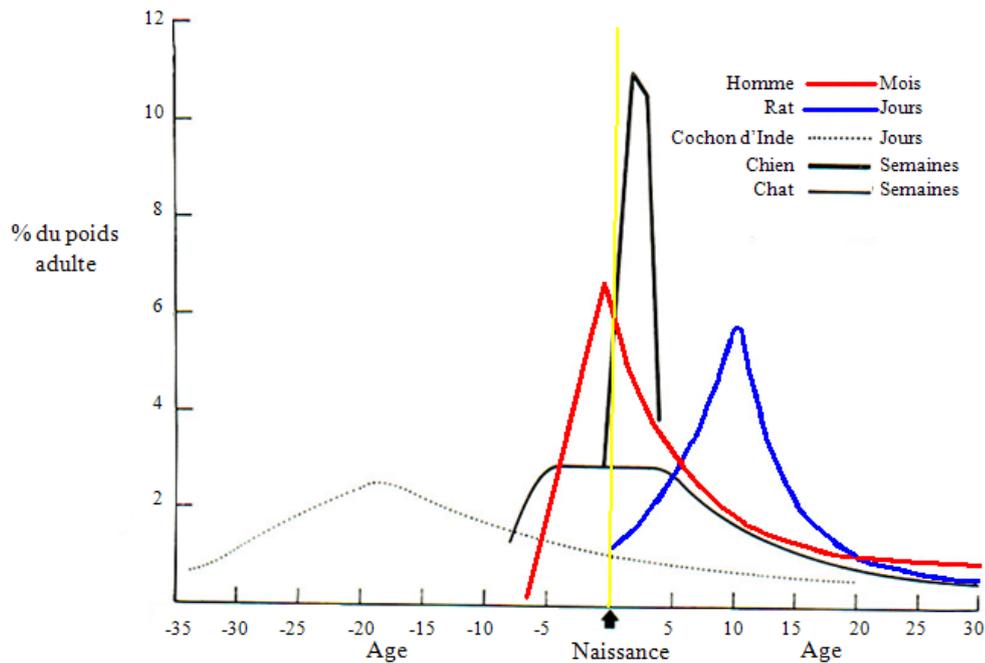


Figure 13 : Période développement cérébral rapide de 5 mammifères différents

(D'après Dobbing & Sands, 1979)

La figure 13 permet de classer les animaux en espèces précoces ou non précoces, selon la position du pic de croissance du cerveau dans le temps (exprimé en pourcentage du poids du cerveau adulte), par rapport à la naissance (Dobbing & Sands, 1979). Le rat est ainsi une espèce non précoce, pour qui la période de croissance et de maturation cérébrale intense se déroule en période postnatale, avec un pic vers le 10^{ème} et le 12^{ème} jour post-natal (*PostNatal Day*, PND10-12). Dans cette espèce, la neurogénèse et la migration neuronale sont terminées à PND10, alors que la synaptogénèse, la gliogénèse et la myélinisation commencent en période prénatale et ne sont pas achevées avant la maturité (Dubovický et al., 2008). Chez l'Homme en revanche, la période de croissance cérébrale rapide se situe autour de la naissance (Dubovický et al., 2008). Cette différence représente un avantage pour la réalisation d'études sur le cerveau immature, puisqu'en étudiant des rats nouveau-nés, il est possible d'évaluer les effets directs du traitement sur le cerveau en développement, sans passer par l'organisme de la mère (Dubovický et al., 2008).

D'une manière générale, l'ordre des processus du développement du cerveau des mammifères est hautement conservé entre les différentes espèces, et ils ne diffèrent qu'en

termes d'échelle de temps (Smart, 1991 ; Clancy et al., 2001 ; Connors et al., 2008). Les événements ayant lieu *in utero* chez l'Homme se déroulent en période postnatale précoce chez le rat (Barton, 2005). Par exemple, la prolifération neuronale au sein du cervelet est composée de deux phases, la première étant fœtale chez l'Homme et chez le rat, alors que la deuxième est encore fœtale chez l'Homme mais postnatale chez le rat (Sly & Flack, 2008). Ainsi les fenêtres de sensibilité et le type de transfert d'une substance potentiellement neurotoxique (placentaire *versus* lactationnel) diffèrent dans le temps d'une espèce à l'autre (Barton, 2005). Il peut alors être important de continuer l'exposition du jeune rat à un agent neurotoxique jusqu'à PND21, quand la maturation cérébrale de l'animal est bien avancée (Dubovický et al., 2008), afin de cibler certains processus critiques, comme la neurogénèse de certaines régions (hippocampe et cervelet), la synaptogénèse ou la myélinisation (Dorman et al., 2001).

Par ailleurs, les différentes structures cérébrales sont analogues entre l'Homme et le rongeur et ont les mêmes fonctions (Rice & Barone, 2000), mais leur taille relative varie d'une espèce à l'autre (Clancy et al., 2001) et le temps nécessaire à leur développement n'est pas identique. Il est en effet de l'ordre de quelques jours chez le rongeur, et de plusieurs semaines ou mois chez l'Homme (Rice & Barone, 2000).

Finalement, en termes de développement cérébral, le rat est considéré comme un bon modèle pour l'Homme. Il est admis qu'au plan de la maturité cérébrale, un raton à la naissance équivaut à un fœtus humain de 6 mois (Barton, 2005), et qu'à 10 jours de vie postnatale le jeune raton est représentatif d'un bébé humain à terme.

OBJECTIFS

Le travail de thèse présenté dans ce manuscrit a été initié compte tenu des différents éléments abordés dans la section bibliographique, en se basant plus particulièrement sur les points suivants :

- Le système nerveux en développement est particulièrement sensible aux substances environnementales toxiques,
- Une exposition précoce à des substances neurotoxiques peut induire des troubles comportementaux à long terme,
- Les HAP sont omniprésents dans l'environnement, et l'individu y est exposé quotidiennement, majoritairement *via* l'ingestion d'aliments contaminés,
- Les HAP sont retrouvés dans le placenta, les tissus fœtaux et le lait maternel, montrant ainsi que l'organisme en période périnatale est exposé à cette famille de polluants,
- Le potentiel neurotoxique des HAP a été démontré, suite à une exposition directe de l'individu, ou suite à une exposition de la mère pendant la gestation ou l'allaitement.

Alors que les HAP sont très présents dans l'environnement, que leur production est étroitement liée à l'activité humaine particulière et industrielle, et qu'ils sont fortement métabolisés par les organismes vivants, se posent les interrogations suivantes :

- Le B(a)P et le fluoranthène sont deux HAP dont la neurotoxicité a été montrée chez l'animal, mais qu'en est-il de la toxicité d'un mélange de HAP ?
- La neurotoxicité de certains HAP a été étudiée chez l'animal à des doses fortes, non réalistes de l'exposition humaine, mais qu'en est-il d'une exposition répétée à des niveaux plus faibles, représentatifs de l'exposition de l'Homme ?
- Par voie orale, les effets neurotoxiques des HAP sont étudiés en administrant par gavage, qu'en est-il d'une exposition alimentaire ?

➤ Existe-t-il une différence de sensibilité du système nerveux en développement selon la période d'exposition aux HAP ?

Ainsi, les objectifs principaux de ce travail ont été d'évaluer les effets neurotoxiques à court et à long terme d'une exposition périnatale par voie alimentaire à un mélange de 16 HAP à faibles doses.

Plusieurs approches ont été utilisées afin d'apporter des réponses aux différentes questions formulées :

➤ Evaluation du développement moteur et sensoriel des jeunes au cours des trois premières semaines de vie post natale,

➤ Evaluation à l'âge adulte du comportement individuel des animaux, en termes d'activité locomotrice, d'anxiété, de capacités de mémorisation et d'apprentissage,

➤ Evaluation à l'âge adulte du comportement social des animaux,

➤ Evaluation du métabolisme énergétique cérébral, afin de déterminer la sensibilité particulière de différentes zones du cerveau, impliquées dans diverses fonctions,

➤ Evaluation des concentrations de molécules mères et de métabolites d'une part au niveau des cerveaux des jeunes, afin de déterminer le transfert entre l'organisme de la mère et celui des jeunes à différents stades au cours de l'exposition,

L'ensemble de ce travail a été réalisé sur les jeunes exposés au mélange de HAP *via* l'organisme maternel soit uniquement pendant la gestation, du premier jour de gestation au jour de la naissance des jeunes (**section expérimentale, chapitre 1**), soit pendant la gestation puis la période d'allaitement, du premier jour de gestation au 21^{ème} jour de vie post natale, jour du sevrage des jeunes (**section expérimentale, chapitre 2**). Ces deux périodes ont été déterminées dans le but de mettre en évidence une différence éventuelle de sensibilité tout au long de la période périnatale.

SECTION METHODOLOGIQUE

Cette section est dédiée à la méthodologie utilisée lors des expérimentations mises en œuvre dans ce travail de thèse. Les protocoles sont les mêmes pour les deux expérimentations réalisées (i.e. exposition des animaux pendant la gestation seule ou pendant les périodes de gestation puis d'allaitement, **section expérimentale, chapitres 1 et 2** de ce manuscrit). La seule différence entre les deux expérimentations est la durée d'exposition des femelles aux HAP.

Une brève introduction sera suivie des procédures détaillées, pour l'ensemble des manipulations permettant en amont l'exposition des femelles aux HAP, puis pour l'ensemble des tests permettant ultérieurement l'étude du développement sensori-moteur du jeune rat, l'étude du comportement maternel, du comportement individuel et social de l'animal à l'âge adulte, l'étude histochimique du métabolisme cérébral et enfin les dosages des HAP et de leurs métabolites.

Pour la première partie de cette section méthodologique, nous nous intéresserons tout d'abord à ce qui concerne l'élevage des animaux, la reproduction, la composition du mélange de HAP, et l'exposition des animaux aux HAP en termes de doses, de voie et de périodes d'exposition.

I. Animaux

Pour chaque étude, des rats adultes femelles (175 – 199 g) et mâles de souche Wistar provenant de chez Harlan (Gannat, France) ont été utilisés. A leur arrivée au laboratoire, les animaux ont été répartis dans des cages d'habitation (2 animaux du même sexe par cage) et marqués individuellement pour permettre leur identification. Ces animaux ont été maintenus dans des conditions standards de température ($22\pm 2^\circ\text{C}$) et d'humidité ($50\pm 20\%$). Le cycle lumineux dans l'animalerie a été inversé (lumière allumée de 19h à 7h). Avant le début de toute expérimentation, une période de stabulation de 8 jours a été respectée. La nourriture (aliment Teklad Global 2016, Harlan, Gannat, France) et l'eau étaient disponibles *ad libitum* durant toute la durée de l'étude. 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).

Après la période de stabulation, les femelles ont été habituées au protocole d'exposition pendant une semaine (voir **paragraphe II.3**). A l'issue de ces deux semaines, les femelles ont été mises en accouplement durant 8 jours consécutifs. Préalablement à la première rencontre entre les mâles et les femelles, les mâles ont été placés individuellement dans des cages d'habitation. Pendant la semaine dédiée aux accouplements, chaque jour à 8h 2 femelles ont été placées dans la cage d'un mâle, pendant 12h. A partir de 20h, le succès des accouplements a été évalué en réalisant un frottis vaginal sur chaque femelle. L'observation des prélèvements au microscope a alors permis de confirmer ou d'invalider l'accouplement, par la présence ou l'absence de spermatozoïdes. Un frottis positif déterminait alors le jour 0 de la gestation. Les femelles considérées comme positives ont été isolées dans une nouvelle cage et les rates non accouplées remises en présence d'un mâle le lendemain matin à 8h.

Le jour de la naissance des ratons a été noté *Post Natal Day 0* (PND0). Ce jour là, les portées surnuméraires ont été réduites aléatoirement à 10 ratons. L'identification individuelle et le suivi des jeunes ont débuté à PND3. Le sexe des animaux a été identifié autour de PND5. Les animaux ont été pesés quotidiennement entre PND3 et PND25, puis tous les 5 cinq jours jusqu'à PND60. Les jeunes ont été maintenus avec leur mère jusqu'au sevrage, à PND21. A PND25, les mâles et les femelles d'une même portée ont été séparés.

II. Exposition au mélange d'Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques

Dans ce travail de thèse, nous avons choisi d'évaluer les effets sur le cerveau en développement d'un mélange de HAP, et non d'une molécule seule. En effet, il nous a paru dès le début de la mise au point des protocoles de ces études, que l'utilisation d'un mélange correspondait plus à la réalité de l'exposition humaine aux HAP, et que cela répondrait mieux aux attentes actuelles dans le domaine de la toxicologie alimentaire et environnementale.

II.1. Composition du mélange

Les données de la littérature (EC, 2002 ; Marti-Cid et al., 2008 ; EFSA, 2008) ont permis de déterminer de manière satisfaisante la quantité de HAP ingérée quotidiennement

par une femme, au moins pour les 16 HAP listés par l'US EPA. Le mélange utilisé pour l'ensemble des études présentées dans ce manuscrit contient ces 16 molécules, dans des proportions qui respectent les quantités ingérées chaque jour par une femme. Par exemple, les HAP légers étant ceux auxquels un adulte est le plus exposé via son alimentation, ils sont présents en quantités plus importantes au sein du mélange. Ce mode de calcul a été repris pour les 16 HAP.

Le mélange contient finalement les proportions suivantes (m/m) de HAP : phénanthrène (25%), naphthalène (17%), fluoranthène (11.5%), acénaphthène (10%), pyrène (8.5%), indeno(1,2,3,c,d)pyrène (6%), chrysène (4%), anthracène (3.5%), benz(a)pyrène (2.5%), benzo(b)fluoranthène (2.5%), fluorène (2.5%), benz(a)anthracène (2%), benzo(k)fluoranthène (2%), acénaphthylène (1.5%), benzo(g,h,i)pérylène (1%), dibenz(a,h)anthracène (0.5%).

Chaque HAP a été pesé séparément puis les 16 ont été dissous ensemble dans de l'huile Isio 4 (Lesieur, Asnières sur Seine, France). Le mélange a ensuite été soumis à des ultrasons (55 Hertz) pendant 2h, à température ambiante, puis conservé à l'abri de la lumière à 4°C pendant toute la durée des expérimentations.

II.2. Doses choisies

Pour l'ensemble des études réalisées dans ce travail de thèse, 2 doses du mélange de HAP ont été utilisées.

La première dose a été calculée de manière à modéliser la quantité de HAP ingérée quotidiennement par une femme, pendant toute la période de sa grossesse (9 mois), et toute la période d'allaitement, soit 6 mois selon les recommandations de l'OMS (Sguassero, 2008). Les quantités décrites par la littérature ont été rapportés au poids de l'animal utilisé, et aux durées de gestation et d'allaitement de cette espèce, soit deux fois 21 jours.

Calcul :

➤ On estime qu'une femme de 60 kg ingère quotidiennement **10 µg** de HAP totaux, soit **0,17 µg/kg/jour**.

➤ La quantité ingérée cumulée pendant la grossesse (**9 mois, soit 270 jours**) est de **45 µg/kg** ; et de **30,5 µg/kg** pendant l'allaitement (**6 mois, soit 183 jours**).

➤ La quantité de HAP totaux devant être apportée chaque jour aux animaux est donc de **2,14 µg/kg/jour** pendant la gestation (**21 jours**), et de **1,45 µg/kg/jour** pendant l'allaitement (**21 jours**).

Finalement, les animaux exposés à cette première dose ont reçu **2 µg/kg/jour** du mélange de HAP pendant la **gestation**, et **1,5 µg/kg/jour** du mélange de HAP pendant la période **d'allaitement**.

La deuxième dose a été choisie de manière à induire une toxicité pour le jeune, comme cela est recommandé par l'OCDE dans les lignes directrices pour les essais de produits chimiques dans les études de neurotoxicité pour le développement (OCDE 426, 2007). Pour cela, nous nous sommes référés aux doses les plus basses testées dans la littérature dans le cas d'un transfert mère-jeune de HAP, qui se trouvent autour de 150 et 300 µg/kg/jour de B(a)P pendant 4 jours au cours de la gestation (Brown et al., 2007 ; McCallister et al., 2008).

Finalement, les animaux exposés à cette deuxième dose ont reçu une dose 100 fois supérieure à ceux exposés à la première dose, c'est-à-dire **200 µg/kg/jour** du mélange de HAP pendant la **gestation**, et **150 µg/kg/jour** du mélange de HAP pendant la période **d'allaitement**.

II.3. Protocole d'exposition des mères

L'exposition des femelles aux HAP a été faite par voie orale, puisque la principale voie d'exposition aux HAP pour l'Homme est la voie alimentaire. Ainsi dans le but d'évaluer le risque pour le développement du système nerveux d'une exposition périnatale aux HAP dans un contexte de sécurité alimentaire, puis d'extrapoler les résultats obtenus sur le rat à l'Homme, il paraît indispensable de respecter la même voie d'administration. Pour l'administration par voie orale de substances chez l'animal, la méthode la plus couramment utilisée est le gavage. Elle consiste au maintien ferme de l'animal, puis à l'introduction d'une sonde de petit diamètre dans l'œsophage de l'animal jusqu'à l'estomac, où la solution à administrer peut être libérée à l'aide d'une seringue. Le principal avantage de cette technique est la précision dans le contrôle des doses réellement administrées. En revanche, plusieurs auteurs se sont intéressés aux inconvénients indissociables du gavage. Ainsi, cette méthode, qui demande une grande expérience de la part de l'expérimentateur, peut blesser ou tuer l'animal (Germann & Ockert, 1994 ; Atcha et al., 2010). De plus, la contention et le gavage

en lui-même engendrent un stress chez l'animal, montré par une augmentation de la pression sanguine et du rythme cardiaque (Bonnichsen et al., 2005), et de la concentration plasmatique en corticostérone (Brown et al., 2000). Le stress subi par l'animal peut avoir de fortes conséquences sur les résultats comportementaux, particulièrement dans des études de toxicité développementale. En effet le stress ressenti par la mère en période pré ou post-natale chez le rongeur peut avoir des conséquences sur différentes fonctions chez le jeune et modifier son comportement, masquant ainsi les effets réels des molécules testées (Ferguson & Boctor, 2009). Dans une étude récente menée chez la souris, la neurotoxicité d'un mélange de PCB suite à une exposition périnatale est modulée selon la voie d'exposition (gavage ou administration libre). En effet, les animaux nés de mères exposées au mélange de PCB par gavage sont plus anxieux que ceux nés de mères exposées par accès libre dans l'open-field à PND34, 60 et 90 (Branchi et al., 2005).

En tenant compte de ces différents éléments, il a été décidé dès le début de ce travail de thèse de ne pas exposer les animaux aux HAP par gavage, afin d'éviter un stress maternel important, ce qui aurait pu avoir des conséquences sur le bon développement des jeunes, et ainsi masquer ou biaiser les résultats attribués à l'exposition périnatale au mélange de HAP. Néanmoins, il semblait absolument nécessaire de contrôler correctement les quantités de HAP apportées à chaque jour à chaque animal. Ainsi, de manière à éviter les inconvénients d'une administration par gavage, tout en garantissant la quantité de HAP ingéré chaque jour par chaque animal, nous avons mis au point le protocole d'alimentation contrôlée suivant.

Des croquettes destinées à l'alimentation des animaux ont été réduites en poudre, et chaque matin l'équivalent de 1 g de cette poudre par animal a été mélangé avec de l'eau et du sirop de grenadine (Carrefour), pour fabriquer une boulette malléable sucrée et appétante pour l'animal, d'environ 1,5 g. En parallèle, les femelles ont été pesées tous les matins, et le volume de HAP ou d'huile seule (pour le groupe contrôle) à administrer a été calculé en fonction du poids corporel de chaque animal. Le volume d'huile adéquat avec ou sans HAP, a ensuite été introduit au centre de chaque boulette (**Photo 3**). Les femelles ont été isolées quelques minutes dans des cages sans sciure, et la distribution des boulettes a été faite (**Photo 4**). Seulement quelques secondes étaient nécessaires pour qu'une femelle mange entièrement sa boulette (**Photo 5**). Notons que sur l'ensemble des deux expérimentations mises en place, absolument toutes les femelles ont ingérés en totalité leurs boulettes, chaque matin. Ce protocole simple à mettre en place nécessite quelques jours d'habituation avec de la

nourriture non contaminée. Si un animal ne finissait pas sa boulette pendant la période d'habituation au protocole, il était exclu des manipulations ultérieures.

Le protocole décrit présente l'avantage de pouvoir contrôler précisément les quantités de HAP ingérées par chaque animal, par rapport à un protocole d'exposition par un accès libre à de la nourriture contaminée, pour lequel des fluctuations normales dans la prise alimentaire des animaux résulterait en une administration peu précise des molécules étudiées (Ferguson & Boctor, 2009). D'autre part, l'utilisation de poudre obtenue à partir des croquettes habituellement consommées par les animaux permet de ne pas modifier leur régime alimentaire. Certains auteurs utilisent en effet des préparations à base d'aliments tels que du chocolat, pour administrer des molécules potentiellement toxiques à des rongeurs. Le principal inconvénient de ce type de protocoles est d'exposer les animaux en parallèle à des substances telles que la caféine ou la théobromine (Atcha et al., 2010), qui peuvent exacerber les effets des molécules neurotoxiques étudiées (Branchi et al., 2005).



Photo 3 : Ajout des HAP à une boulette

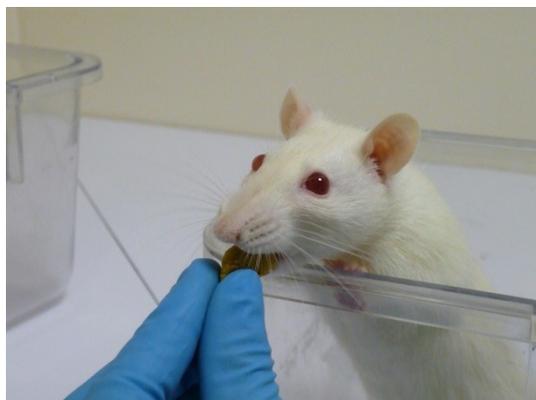


Photo 4 : Distribution d'une boulette



Photo 5 : Consommation d'une boulette

II.4. Périodes d'exposition

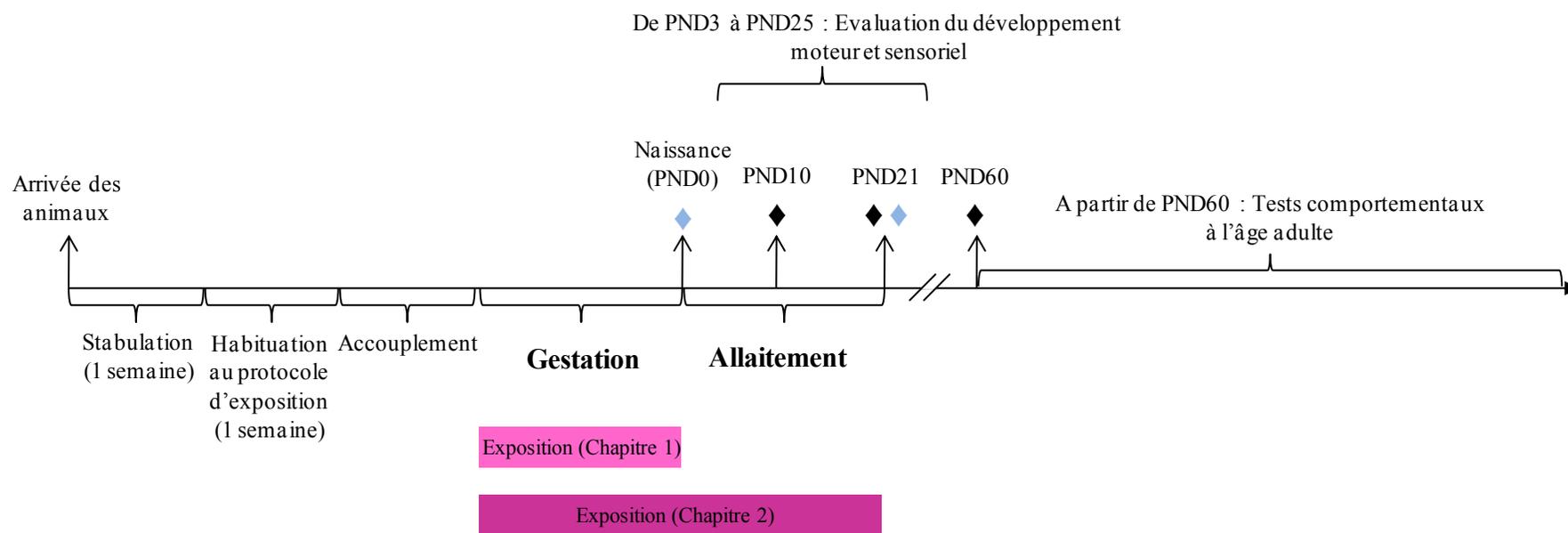
Ce point précis du protocole est le seul qui diffère pour les deux expérimentations réalisées pendant la totalité de ce travail de thèse. En effet, nous voulions évaluer si une exposition aux HAP pendant toute la vie fœtale et les premiers stades de vie prénatale pourrait avoir des conséquences similaires ou différentes à une exposition qui serait limitée à la vie prénatale. En d'autres termes, est-ce que la fenêtre d'exposition, ou la durée d'exposition, peuvent jouer un rôle sur les effets induits par les HAP sur le système nerveux central en développement ? Et est-ce que le fait de prolonger l'exposition pendant l'allaitement provoque des effets plus délétères encore, ou est-ce que le fait d'exposer pendant les stades les plus précoces du développement du système nerveux est seul responsable des effets observés ?

Pour répondre à ces questions, et en sachant bien que les mécanismes du développement du système nerveux, bien qu'étant très conservés entre l'Homme et le rat, diffèrent en termes d'échelles de temps, et qu'il faudra donc être prudent pour extrapoler les résultats obtenus, nous avons mis en place deux expérimentations différentes, quoique très semblables.

En effet, pendant la **première expérimentation (Chapitre 1)**, les femelles ont été exposées au mélange de HAP aux deux doses, **du Jour 1 de la gestation** (lendemain matin du frottis considéré comme positif), **jusqu'à la naissance des jeunes (PND0)**, c'est-à-dire pendant toute la durée de la gestation. Cette expérimentation modélise le cas où une femme n'allaiterait pas son enfant, et ainsi l'exposerait aux HAP qu'elle ingère uniquement pendant sa grossesse.

En revanche, pendant la **deuxième expérimentation (Chapitre 2)**, les femelles ont été exposées au mélange de HAP aux deux doses, **du Jour 1 de la gestation** (lendemain matin du frottis considéré comme positif), **jusqu'au sevrage des jeunes (PND21)**, c'est-à-dire pendant toute la durée de la gestation puis de l'allaitement. Cette expérimentation modélise le cas où une femme allaiterait son enfant, et ainsi l'exposerait aux HAP qu'elle ingère à la fois pendant sa grossesse, mais aussi pendant l'allaitement.

La figure 14 représente sur une échelle de temps le déroulement de ces deux expérimentations.



Expérimentation 1 (Chapitre 1) : exposition aux HAP pendant la Gestation : Exposition à 0 ; 2 ; 200 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{jour}$

Expérimentation 2 (Chapitre 2) : exposition aux HAP pendant la Gestation : Exposition à 0 ; 2 ; 200 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{jour}$ **puis l'Allaitement** : Exposition à 0 ; 1,5 ; 150 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{jour}$

◆ = prélèvements pour les dosages

◆ = prélèvements pour les analyses histochimiques

PND, *Post Natal Day*

Figure 14 : Représentation schématique du déroulement des expérimentations

Dans la suite de cette section méthodologique, nous nous intéresserons aux différents protocoles mis en œuvre pour évaluer les effets d'une exposition périnatale à un mélange de HAP, via l'alimentation de la mère.

III. Evaluation du développement sensori-moteur

III.1. Introduction

Le développement du comportement moteur résulte d'interactions complexes entre des mécanismes génétiques et les effets de stimuli externes précoces (Jamon & Clarac, 1998). Contrairement à certains animaux comme le cobaye, qui est une espèce dite « précoce », en raison de la mise en place dès la naissance des fonctions motrices de base, le rat fait partie des mammifères dits « non précoces », car à la naissance son organisme en général et son système nerveux en particulier sont particulièrement immatures (Fox, 1966). Le rat naît avec des aptitudes sensorielles et motrices très limitées et n'est pas capable d'assurer lui-même le maintien de sa température corporelle, il est de ce fait complètement dépendant de sa mère au début de la vie (**Figure 15**). A la naissance le jeune rat n'est capable que de quelques activités spécifiques telles vocaliser, téter, et rouler sur le côté. Ses mouvements ne sont pas coordonnés, sa sensibilité tactile n'est pas complètement développée, ses canaux auditifs et ses yeux sont encore fermés.

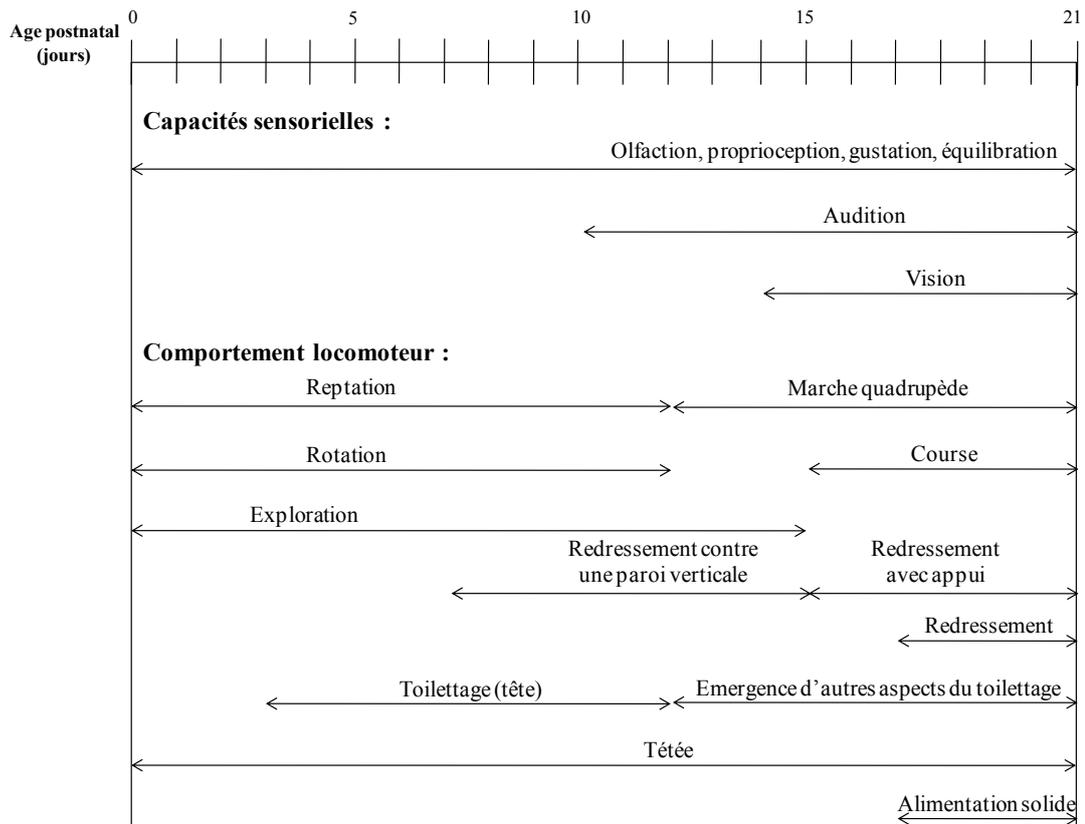


Figure 15 : Développement des capacités sensorielles et motrices chez le rat

(D'après Spear, 1990)

Le développement du rat est essentiellement post-natal, et la maturation des structures nerveuses est rapide pendant les trois premières semaines de vie. Elle est presque achevée au sevrage (Himwich, 1962a et 1962b), et amènera progressivement vers le répertoire de l'adulte. L'Homme, la souris, le chat ou le chien, à l'inverse d'autres espèces comme le cobaye, sont également des espèces dites non précoces. La différence en termes de maturation entre les espèces est essentiellement l'échelle de temps. Le développement post-natal consiste en fait en la continuité de processus déjà commencés avant la naissance.

Du fait de son développement sensori-moteur postnatal, le rat est un bon modèle pour l'étude de la maturation des fonctions cérébrales. En effet, l'observation des réactions du jeune animal dans différents tests permet d'évaluer facilement, de manière non invasive, la maturation de son système nerveux, et dès lors, de mettre en évidence des facteurs influençant

ce développement. Le but de ces tests est d'établir des relations entre l'évolution des réactions motrices ou sensorielles et l'ontogénèse du système nerveux. Plusieurs auteurs ont aussi établi de tels liens notamment chez l'animal (Bolles & Woods 1964 ; Stelzner, 1971 ; Altman & Sudarshan, 1975).

III.2. Considérations méthodologiques

La diversité des études a induit une grande difficulté pour comparer les résultats obtenus dans les différents travaux. En effet chaque équipe dispose de protocoles propres et de critères d'évaluation précis, qui peuvent différer d'une étude à l'autre. Pour ce type de travail, il est important de disposer d'une échelle précise et détaillée du niveau de maturation du jeune rat. Une batterie standardisée développée au laboratoire (Gelly, 1979), couvrant la période allant de la naissance au sevrage, a été reprise pour évaluer le développement sensori-moteur du jeune rat, dans les études présentées dans ce manuscrit.

Les réactions mesurées sont de trois types :

- Actes moteurs complexes : réflexe de retournement, réaction d'agrippement, perception de la gravité, coordination des quatre membres,
- Réaction motrice simple : sursaut suite à une stimulation sonore,
- Indice physique de développement : observation de l'ouverture des yeux.

A la naissance le nombre de ratons par portée varie. La taille de la portée peut influencer sur la croissance et le développement de chaque jeune, et rendre difficile la comparaison des performances des jeunes. Pour éviter ce facteur de variation, et permettre une croissance homogène entre chaque individu d'une même portée, nous avons choisi de réduire à 10 ratons chaque portée, le jour même de la naissance. Cependant, cette pratique peut avoir des conséquences sur le comportement maternel et influencer alors le bon développement des jeunes restants. Ainsi, parallèlement à l'expertise des jeunes, nous avons évalué le comportement maternel par la mise en place de deux tests permettant d'observer la qualité des soins apportés par la mère et les interactions mère-jeunes. Le poids des ratons a quand a lui été suivi quotidiennement dès le 3^{ème} jour de vie post-natale.

L'observation d'une réaction motrice nécessite de définir plusieurs ensembles de paramètres précis. Le premier concerne toutes les conditions de déclenchement de la réaction. Le deuxième est l'ensemble des critères qui permettent de considérer que la réaction a eu lieu. Le troisième concerne l'exploitation des résultats.

Ainsi, le matériel utilisé, l'heure du test dans le cycle d'activité de l'animal, l'ambiance lumineuse et la température de la salle d'expérimentation, la durée de séparation entre la mère et les jeunes sont autant d'éléments qui peuvent influencer les résultats obtenus. D'autre part, selon les études considérées, les animaux sont testés une seule fois ou de manière répétée, ce qui peut modifier le comportement de l'animal, à cause de la fatigue ou d'un effet de l'apprentissage, même sur de très jeunes animaux. De même, selon les différents auteurs, les animaux sont testés sur plusieurs jours consécutifs, ou à des âges plus ou moins différents.

Concernant la réussite ou l'échec à l'épreuve considérée, à nouveau la définition des critères de réussite est très variable d'une étude à l'autre. Il est important de choisir un paramètre précis, mais objectif et facile à relever, et représentatif de la réaction motrice testée. Ainsi, les notes qualitatives, définies par un indice, semblent plus subjectives et ainsi fortement dépendantes de l'expérimentateur, que d'autres types de relevés. Notons également que plus une réaction est complexe, plus il peut y avoir de facteurs susceptibles de varier d'un auteur à l'autre. D'une manière générale, l'évaluation de la durée réelle d'exécution du test semble plus représentative de la performance de l'animal qu'une évaluation en terme binaire (oui/non), et mieux adaptée à la mise en évidence de différences interindividuelles. De plus, certains auteurs proposent de fixer des critères de réussite aux tests, en général il s'agit de temps limite pour que l'animal réalise le test. Pour un critère donné, il est possible de calculer chaque jour le pourcentage d'animaux ayant réussi une épreuve. Les pourcentages de réussite sont croissants en fonction du temps, et le point d'inflexion des courbes obtenues définissent l'âge moyen de réussite des jeunes au test considéré (**Figure 16**). Cette approche a été utilisée dans plusieurs études antérieures (Smart & Dobbins, 1971a, 1971b ; Castellano & Oliverio, 1976 ; Sykes & Cheyne, 1976 ; Gelly, 1979 ; Deviterne, 1981). La sévérité du critère détermine l'âge de réussite aux tests. En effet, plus un critère est sévère, plus l'âge moyen de réussite va être tardif.

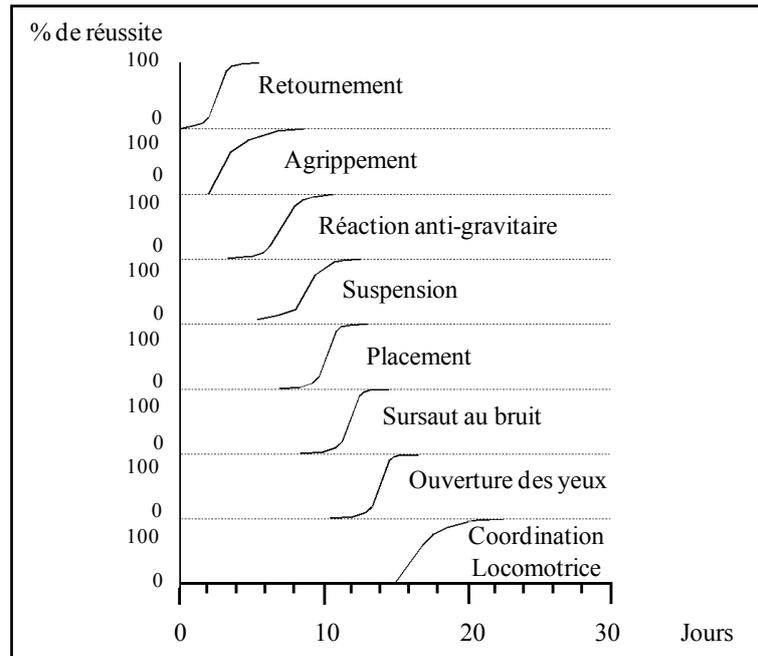


Figure 16 : Echelle d'évaluation du développement neuromoteur chez le rat

(d'après Gelly, 1979)

Concernant l'exploitation des résultats, les auteurs ne s'accordent pas tous. Certains auteurs conseillent en effet de suivre le même ensemble de rats sur plusieurs jours (Smart & Dobbing, 1971a, 1971b), alors que d'autres préfèrent observer des animaux différents chaque jour pour se soustraire d'éventuels biais posés par la manipulation successive des animaux ainsi que d'un effet de l'apprentissage (Gelly, 1979). D'un point de vue réglementaire, il est recommandé par la ligne directrice 426 de l'OCDE (2007), de tester un animal par sexe et par portée, choisi au hasard chaque jour. Compte tenu des différences interindividuelles pouvant exister au sein d'une même portée, cette approche ne nous semble pas être la plus représentative. Ainsi pour le travail présenté ici, nous avons choisi de tester quotidiennement tous les rats d'une même portée.

III.3. Procédures des tests

L'échelle de développement (Figure 16) et les tests utilisés dans ce travail sont ceux décrits par Gelly (1979). Cette échelle permet plusieurs évaluations du degré de maturation sensori-motrice du jeune rat, à des dates réparties sur les 3 premières semaines de vie. Le jour

de la naissance est appelé PND0. Les tests ont été réalisés pour la plupart sur trois jours consécutifs. Chaque raton a effectué tous les tests. Les tests ont été réalisés dans une pièce attenante à l'animalerie, suivant les mêmes conditions de température et d'humidité que la salle d'élevage. Les animaux ont été quotidiennement identifiés, pesés et observés. Pendant l'évaluation des jeunes, les mères ont été isolées dans une cage dans la salle d'élevage. La séparation mère-jeune n'a jamais excédé 30 minutes. Un tableau récapitulatif des procédures relatives aux tests évaluant le développement sensorimoteur des jeunes et le comportement maternel est présenté à la fin de cette partie (**Tableau 22**).

III.3.1. Evaluation du développement locomoteur

III.3.1.1. Test de retournement (*righting reflex*)

Principe : Le test de retournement est le premier effectué chez le raton. Le réflexe mis en jeu permet à l'animal de retrouver une position dorso-ventrale normale en cas de chute ou de déséquilibre.

Structures nerveuses impliquées : Les structures labyrinthiques jouent un rôle important dans le déclenchement du réflexe de retournement (Windle & Fish, 1932). Le centre d'organisation de réflexe est les régions bulbaire et pontique dans les premiers jours, puis il devient plus mésencéphalique (Bignall, 1974).

Dispositif : Le raton est testé sur une planche en bois recouverte de feutrine (**Photo 6**).

Procédure : Ce test est réalisé à PND3, 4 et 5. L'animal est initialement déposé sur la planche sur le dos. Aucune impulsion ne doit lui être donnée en le lâchant. La durée maximale du test est 3 minutes.

Réactions de l'animal : Le raton placé sur le dos effectue une série de balancements vers la droite et la gauche. La tête amorce le mouvement. Il peut arriver que le retournement ne soit pas complet, si les pattes postérieures restent sous l'abdomen de l'animal. Cette manœuvre,

appelée « pseudo-retournement », ne permet pas à l'animal de rester dans une position stable, et en général le déséquilibre, ce qui le ramène sur le dos, en position initiale.

Variables mesurées : Le temps mis par l'animal pour se retourner complètement est relevé. Le nombre d'animaux ayant réussi ce test en moins de 3 minutes permet de calculer le pourcentage de réussite, chaque jour et pour chaque groupe.



Photo 6 : Test de retournement

III.3.1.2. Test d'agrippement (*grasping reflex*)

Principe : Ce test permet de tester un réflexe présent également chez l'Homme. En effet, chez un bébé humain, la stimulation de la paume de la main induit une réaction de fermeture de la main (Koupernik & Dailly, 1972). Ce réflexe présent précocement dans la vie disparaît avec l'âge. La motricité et la sensibilité des membres antérieures est importante pour le jeune raton, pour accéder au lait maternel et pour s'agripper au pelage de la mère (Drewett et al., 1974).

Dispositif : Le dispositif de ce test est composé d'un plateau grillagé (15 x 9 cm, maillage 5 mm) fixé à l'axe d'un moteur (**Photo 7**). Le plateau grillagé effectue une rotation de 360° en 45 secondes. Un rapporteur, placé derrière le plateau mobile, permet d'évaluer sa position par rapport à un axe horizontal. Un matelas de coton est positionné sous le plateau, pour amortir la chute du raton.

Procédure : Ce test est réalisé à PND4, 5 et 6. L'animal est initialement placé sur le plateau, en position horizontale. Le moteur est alors mis en route, ce qui déclenche la rotation du plateau. Le test s'arrête lorsque l'animal tombe du plateau.

Réactions de l'animal : La rotation du plateau provoque le glissement de l'animal, ce qui induit l'agrippement des pattes sur le grillage afin d'éviter la chute.

Variables mesurées : L'angle de chute du raton est relevé. La réussite à ce test est positive si l'angle de chute est supérieur ou égal à 90°.



Photo 7 : Test d'agrippement

III.3.1.3. *Cliff avoidance*

Principe : Ce test permet d'évaluer la capacité de l'animal à éviter le vide. Il met en jeu la coordination des membres de l'animal, ainsi que sa force musculaire.

Dispositif : Le dispositif est composé d'un pavé en bois (L : 20 cm, l : 10 cm, h : 10 cm) et d'un matelas de coton pour amortir la chute du raton (**Photo 8**).

Procédure : Ce test est réalisé à PND6, 7 et 8. L'animal est initialement positionné au bord du vide, la tête et les pattes antérieures dans le vide. Deux essais successifs sont réalisés. La durée maximale de chaque essai est de 3 minutes.

Réactions de l'animal : Par peur du vide, l'animal va tenter de se rétablir complètement sur le pavé en bois, soit en reculant, soit en faisant un demi-tour.

Variables mesurées : Le temps mis par l'animal pour se retrouver entièrement sur le pavé est relevé. Seule la meilleure performance sur les deux essais quotidiens est conservée. Le pourcentage d'animaux ayant réussi ce test en moins de 3 minutes est calculé.



Photo 8 : *Cliff Avoidance*

III.3.1.4. Test de réaction anti-gravitaire (*negative geotaxis*)

Principe : Tout comme le test de retournement et le test d'agrippement, ce test a pour but d'évaluer la réaction motrice mise en œuvre en réponse à une position inhabituelle dans l'espace. Un très bon niveau de coordination des pattes antérieures est nécessaire pour réussir ce test. Il semble que l'immaturation du système moteur soit un facteur limitant, car la réaction du rat face à la position de départ met en œuvre des structures centrales matures très précocement (Hooker 1952 ; Altman & Sudarshan, 1975).

Structures nerveuses impliquées : Ce test permet de renseigner sur la maturation du système vestibulaire.

Dispositif : Ce test est composé d'une planche en bois (45 x 40 cm) recouverte de feutrine, et inclinée de 20° par rapport à l'horizontale (**Photo 9**). L'angle d'inclinaison de la planche varie selon les auteurs. Ce paramètre présente une importance fondamentale, puisque la difficulté du test augmente avec le degré d'inclinaison, et transforme ce test en un test d'agrippement. Dès lors, le réflexe évalué n'est plus celui souhaité.

Procédure : Ce test est réalisé à PND8, 9 et 10. L'animal est initialement placé sur la feutrine, la tête dirigée vers le bas. Le test est terminé lorsque l'animal a effectué une rotation de 180°, lui permettant d'avoir la tête dirigée vers le haut. La durée maximale de ce test est de 3 minutes.

Réactions de l'animal : Les mouvements de l'animal sont initiés au niveau de la tête, qui oscille vers la droite ou la gauche. Les pattes antérieures effectuent des mouvements de poussée latérale et vers le haut. Après une rotation de 90°, l'animal se trouve dans une position instable. Avec l'âge l'ajustement par rapport à la verticale se fait moins par oscillations, mais avec une plus grande rapidité et une plus grande précision.

Variables mesurées : Le temps mis par l'animal pour se rétablir en position verticale, la tête vers le haut, est noté. Le pourcentage d'animaux ayant réussi ce test est également calculé chaque jour et pour chaque groupe.



Photo 9 : Réaction anti-gravitaire

III.3.1.5. Test de suspension

Principe : Ce test, réalisé dans l'ensemble de ce travail avant l'ouverture des yeux, permet d'évaluer uniquement la force musculaire et la résistance physique des animaux.

Dispositif : Ce test est composé d'un fil de fer de 0,5 mm de diamètre, tendu entre les montants d'un châssis à 20 cm du sol (**Photo 10**). Un matelas de coton est positionné sous le fil, pour réceptionner l'animal lorsqu'il chute.

Procédure : Ce test est réalisé à PND10. L'animal est initialement amené devant le fil métallique, et il est lâché lorsque ses pattes antérieures agrippent correctement le fil. Le test est terminé lorsque le raton lâche le fil et chute.

Réactions de l'animal : Si les animaux sont encore aveugles, la plupart d'entre eux restent passivement suspendues jusqu'à la chute. D'autres tentent d'agripper le fil de fer avec les pattes postérieures ou avec la queue. Si ce test est réalisé lorsque les animaux ont les yeux ouverts, le temps de suspension est fortement impacté par la hauteur du fil. En effet, en dessous d'une certaine hauteur, les animaux « jugent » que la chute n'est pas dangereuse et se laissent tomber avant d'être fatigués. Ainsi quand la perception visuelle de l'environnement est bonne, ce test combine les notions de force musculaire et d'émotivité de l'animal.

Variables mesurées : Le temps entre le début du test et la chute du raton est chronométré.

Dans ses travaux Gelly a observé que les performances des animaux augmentent jusqu'à PND20, mais qu'ensuite, le poids corporel des rats devient un paramètre à prendre en compte pour ce test. En effet, les rats les plus lourds restent suspendus moins longtemps.



Photo 10 : Test de suspension

III.3.1.6. Test de coordination locomotrice

Principe : Dès la seconde moitié de la période d'allaitement, les rats explorent de plus en plus leur environnement, et font preuve d'une autonomie croissante. Pendant cette phase sa motricité et sa résistance physique évolue très rapidement. On peut alors mettre en place des épreuves motrices plus complexes et sévères. Ainsi, le test de coordination locomotrice nécessite un bon sens de l'équilibre, une coordination mature des quatre membres, ainsi qu'une grande résistance physique. Ce test est composé de plusieurs étapes, chacune représente une activité physique différente pour l'animal. La dépense d'énergie induite est importante et la fatigue peut contribuer à diminuer les performances à ce test.

Dispositif : Le dispositif est composé d'un récipient cylindrique (h : 50 cm, diamètre : 25 cm) rempli d'eau à mi-hauteur (**Photo 11**). Une tige filetée (diamètre : 8 mm) émerge du centre du récipient, et une plate-forme y est fixée, à 35 cm au dessus de l'eau.

Procédure : Ce test est réalisé à PND19, 20 et 21. Au début du test l'animal est placé dans l'eau, face contre la paroi du cylindre. Le test est terminé lorsque l'animal a réussi à se rétablir sur la plate-forme. La durée maximale du test est de 4 minutes.

Réactions de l'animal : L'animal commence par nager, puis escalade la tige filetée dès qu'il la saisit, l'eau représentant pour lui un milieu aversif. Le passage de la tige à la plate-forme puis le rétablissement sur la plate-forme constituent des étapes critiques dans la réussite de ce test, puisque l'animal se retrouve dans une position très instable. De manière générale, une chute est toujours suivie d'une nouvelle tentative pour atteindre la plate-forme, seul endroit où l'animal peut se reposer.

Variables mesurées : Le temps mis par l'animal dans chacune des trois étapes (temps de nage, temps d'escalade de la tige filetée, temps mis pour se rétablir sur la plate-forme) et le temps total sont chronométrés. Le nombre de chutes est également relevé. Le pourcentage d'animaux ayant finalement réussi ce test est calculé.



Photo 11 : Test de coordination locomotrice

III.3.1.7. Open-field

Principe : L'open-field est un test mis au point par Hall et Ballechey (1932). Il permet d'évaluer le niveau d'activité locomotrice et exploratoire de l'animal placé dans une situation nouvelle. Effectué chez le jeune, le but ici n'est pas de renseigner sur les réponses émotionnelles de l'animal.

Dispositif : Le dispositif de ce test (**Photo 12**) est composé d'une enceinte circulaire (h : 40 cm, diamètre : 50 cm). Le plancher est divisé en trois couronnes concentriques et en 22 cases.

Procédure : Ce test est effectué à PND25. Il est réalisé en lumière rouge. Le raton est placé initialement au centre de l'espace et est laissé libre d'explorer son environnement pendant 5 minutes. La session est filmée et enregistrée, les vidéos sont dépouillées ultérieurement.

Variables mesurées : Le nombre de cases totales parcourues et le nombre de redressements (l'animal se tient en appui sur ses pattes postérieurs) sont relevés.



Photo 12 : Open-field (PND25)

III.3.2. Evaluation du développement sensoriel

Le système sensoriel joue un rôle important dans la capacité d'un organisme à interagir avec son comportement (Cory-Slechta et al., 2001). Il est estimé que 44% des composés neurotoxiques soient capables d'affecter les fonctions sensorielles (Fox, 1998).

III.3.2.1. Test du sursaut au bruit (*auditory startle*)

Principe : Une réaction motrice de sursaut à une brusque stimulation sonore atteste de la maturation du système auditif. Les composantes motrices mises en jeu sont présentes avant la réaction du jeune rat aux stimulations sonores, le sursaut est donc bien lié à l'ouverture du canal auditif et à la maturation concomitante des structures auditives. Cette réaction est antérieure à l'ouverture des yeux et son évolution est très rapide, ce qui en fait un bon marqueur temporel dans le développement sensori-moteur du jeune rat.

Procédure : Un stimulus sonore bref et intense est produit à proximité de chaque animal à partir de PND11. L'animal sursaute (brève extension de la tête et des pattes) s'il perçoit le son. Le test est reconduit jusqu'à ce que l'ensemble des animaux répondent de manière positive, en général autour de PND14.

Variables mesurées : Une note de 0 ou 1 est attribuée chaque jour à chaque animal selon sa réponse. Quand un animal a la note de 1, il n'est plus testé les jours suivants.

III.3.2.2. Ouverture des yeux

Principe : L'ouverture des yeux est un indice de la maturation cérébrale très facile à évaluer par simple observation de l'animal.

Procédure : Chaque animal est observé quotidiennement, et l'ouverture des yeux est évaluée plus particulièrement entre PND14 et PND 16 (**Photo 13**).

Variables mesurées : Un indice (1) est attribué pour l'ouverture de chaque œil. L'ouverture du deuxième œil peut être décalée de 24h. L'observation s'arrête quand un animal a les deux yeux ouverts.



Photo 13 : Observation de l'ouverture des yeux

Il est important de noter que la taille de la portée peut avoir une influence sur l'ouverture des yeux. En effet, (Castellano & Oliverio, 1976), ont observé que les ratons issus de portées plus nombreuses ouvrent les yeux plus tard, sans doute à cause d'un léger retard de croissance. A contraire, Gelly (1979) met en évidence le fait que les ratons issus de portées composées de plus de 12 ratons, devant donc faire face à une certaine compétition pour se nourrir, ouvrent les yeux plus précocement.

IV. Evaluation du comportement maternel

IV.1. Introduction

Cette partie du travail constitue un moyen de mettre en évidence d'éventuelles perturbations dans le comportement de la mère vis-à-vis de ses jeunes. Le comportement de la mère est modulé par celui des jeunes, et inversement. De plus, la forte interaction entre la mère et ses jeunes est un facteur important pour le développement correct des jeunes. Ainsi, on considère que des variations interindividuelles d'expression du comportement maternel peuvent modifier les réponses comportementales des jeunes (Deviterne, 1981).

Dans les premiers jours de vie post-natale, le jeune raton est immature et complètement dépendant de sa mère pour survivre. Celle-ci doit non seulement le nourrir, mais aussi lui apporter des soins, le protéger de l'environnement et lui permettre de maintenir sa température corporelle. Une des activités principales de la mère dans les jours qui suivent la naissance est la construction d'un nid et le regroupement des jeunes. Le comportement de la mère peut ainsi être appréhendé par l'évaluation de ses caractéristiques. Face à l'impact connu d'un stress maternel sur la qualité des soins apportés par la mère aux jeunes, et aux conséquences sur le développement du raton (Patin et al., 2002), nous avons donc choisi d'évaluer le comportement maternel par la mise en place de deux tests, le test de construction du nid et le test du ramassage des jeunes.

IV.2. Procédures des tests

IV.2.1. Construction du nid (*nest building*)

Principe : La construction du nid par la mère est un comportement très présent à partir du jour précédant la parturition, et qui commence à décliner dix jours après la naissance des jeunes, proportionnellement à la prise d'autonomie des jeunes (Deviterne, 1981). Ce test permet d'évaluer la qualité du nid construit par la mère pour abriter ses jeunes.

Procédure : Ce test a été appliqué trois fois à chaque mère pendant la période la plus favorable à l'expression de ce comportement, soit à PND3, 6 et 8. Un matériau nécessaire à la construction d'un nid (carré de coton compressé) est déposé dans la cage d'habitation. En général, la femelle va le déchiqueter et le mélanger à la sciure pour construire un nid de qualité (**Photo 14**).

Variables mesurées : La qualité du nid construit est évalué 1h, 2h et 24h après la mise à disposition du coton. Un indice de 0 est attribué en cas d'absence de nid ou si l'animal n'a pas utilisé le matériau. Un indice de 1 est attribué si le nid est construit avec le coton.



Photo 14 : Construction du nid

IV.2.1. Test de ramassage des jeunes (*retrieving*)

Principe : L'activité de ramassage fait partie du répertoire comportemental du rat, mais se manifeste plus particulièrement chez les femelles allaitantes, pour qui cette activité est très élevée (Deviterne, 1981). L'observation du regroupement des jeunes au sein du nid par la mère est donc un deuxième moyen d'évaluer le comportement maternel.

Procédure : Ce test est réalisé à PND4, 7 et 10. Avant le début du test la mère est enlevée de la cage, les jeunes y sont dispersés et le nid initialement présent dans la sciure est détruit. La mère est réintroduite et son comportement est filmé pendant 20 min.

Variables mesurées : Les vidéos sont analysées ultérieurement. Les variables mesurées sont le temps de 1^{er} ramassage (temps mis par la mère pour saisir un 1^{er} jeune), le temps total de regroupement (temps mis par la mère pour regrouper tous les jeunes), le temps consacré aux jeunes (allaitement, regroupement, toilettage), la présence ou non d'un nid à la fin des 30 minutes (attribution d'un indice de 0 ou 1).

Tableau 22 : Tableau récapitulatif des tests de développement sensori-moteur et des tests du comportement maternel

	Tests	Age	Réflexe ou comportement évalué	Procédure				Variables relevées	Limites expérimentales
				Début du test	Fin du test	Temps	Nombre d'essais		
Développement moteur	Retournement	PND3 4 5	Réflexe impliquant les mécanorécepteurs du cou	Raton placé sur le dos	Raton en position quadrupède normale	Maximum 3 min	1	- Temps de retournement - Pourcentage de réussite	Placement du raton au début
	Agrippement	PND4 5 6	Agrippement des pattes antérieures	Raton placé sur la plaque grillagée	Chute		1	- Angle de chute - Pourcentage de réussite	
	Cliff avoidance	PND6 7 8	Perception du vide	Raton placé les deux pattes antérieures dans le vide	Rétablissement sur la plate forme ou chute	Maximum 3 min	2	- Temps pour se rétablir sur la plate forme - Pourcentage de réussite	Placement du raton au début
	Réaction anti gravitaire	PND8 9 10	Perception de la gravité	Raton placé la tête vers le bas, sur un plan incliné à 20°	Rétablissement la tête vers le haut, corps à la verticale	Maximum 3 min	1	- Temps pour se rétablir la tête en haut - Pourcentage de réussite	
	Suspension	PND10	Force musculaire	Raton accroché au fil de fer par les pattes antérieures	Chute		1	- Temps avant la chute	Positionnement des pattes antérieures
	Coordination locomotrice	PND19 20 21	Coordination des 4 pattes Force musculaire, résistance physique	Raton déposé dans l'eau	Rétablissement sur la plate forme	Maximum 4 min	1	- Temps de nage, temps de grimpe, temps pour se rétablir sur la plate forme, temps total - Nombre de chutes - Pourcentage de réussite	
	Open field	PND25	Activité motrice	Raton placé au centre du dispositif	Fin des 5 minutes	5 min	1	- Nombre de cases parcourues - Temps passé dans chaque zone	
Développement sensoriel	Ouverture des yeux	PND14 15 16	Maturation du système visuel	Observation				Indice pour l'ouverture de chaque œil	Variabilité pour un même jour
	Sursaut au bruit	PND11 12 13 14	Maturation du système auditif	Emission d'un son sec et fort à proximité de l'animal			1	Sursaut ou absence de réaction	Variabilité pour un même jour
Comportement maternel	Ramassage des jeunes	PND4 7 10	Soin apporté aux jeunes	Ratons éparpillés dans la cage d'habitation, destruction du nid, puis introduction de la mère	Fin des 20 minutes	20 min	- Temps mis pour rassembler les jeunes, temps passé pour les jeunes - Re-construction d'un nid		
	Construction du nid	PND3 6 8	Soin apporté aux jeunes	Apport d'une feuille de coton	Observation à 1h, 2h, 24h		Evaluation de la qualité du nid (0, 1, 2) aux 3 temps		

(Abréviations : PND, Post Natal Day)

V. Evaluation du comportement individuel à l'âge adulte

V.1. Introduction

En neurosciences, le comportement animal est très souvent étudié, cela aussi bien pour comprendre les mécanismes physiologiques liés à leur expression que pour évaluer les effets de substances (médicaments, substances addictives, polluants) sur le système nerveux central. L'observation d'effets sur le comportement est un pré-requis fondamental pour l'étude ultérieure des mécanismes biochimiques, cellulaires et moléculaires qui sous-tendent ces altérations. Ainsi, l'observation du comportement devient de plus en plus importante et la définition de l'existence d'altérations comportementales suite à une exposition à des substances chimiques est un concept important pour la compréhension des mécanismes de neurotoxicité (Lucchini et al., 2000).

Le comportement d'un individu peut être défini comme « le mouvement d'un organisme dans un contexte spatio-temporel précis, en réponse à des variables appelées stimuli » (Tilson, 1987). C'est la résultante de l'intégration au sein du système nerveux central de divers processus sensoriels, moteurs ou cognitifs. Ainsi, une altération dans le comportement suite à une exposition à un produit chimique, est un bon indicateur de perturbations induites par cette molécule au niveau du système nerveux central. Le principal défi de l'évaluation comportementale réside en la complexité inhérente du comportement lui-même. Il existe en effet de multiples domaines comportementaux hautement intégrés, parmi lesquels les fonctions motrices et sensorielles, les fonctions cognitives complexes, les émotions, et les comportements sociaux (Slikker et al., 2005). De plus, il apparaît que plusieurs de ces domaines sont interdépendants. Par exemple, des fonctions cognitives complexes peuvent impliquer des mécanismes tels que l'apprentissage, la mémoire et l'attention. Pour compliquer encore les choses, il existe une variété de méthodes qui peuvent être utilisés pour évaluer chacune de ces tâches. Néanmoins, l'étude du comportement animal en laboratoire présente des avantages certains : la relative simplicité et le faible coût liés à la mise en place de ce type d'expérimentations, et le caractère non invasif pour l'individu testé de l'ensemble des techniques utilisées.

V.2. Considérations méthodologiques

Les différents tests classiquement utilisés pour l'étude du comportement de l'animal adulte, et plus spécifiquement du rongeur, reposent sur un principe identique ; celui de laisser l'animal explorer spontanément son environnement, en le soumettant ou non à une contrainte ou à une tâche particulière, et en relevant des variables précises qui renseignent sur le registre comportemental de l'individu. Cette situation génère chez le rongeur un conflit entre un comportement exploratoire inné et la peur d'aller vers un environnement nouveau, potentiellement dangereux.

Les dispositifs utilisés sont communément appelés labyrinthes, et ont fait l'objet de nombreuses modifications et ajustements au cours du temps, depuis leur mise au point initiale. Ainsi, il est absolument nécessaire de standardiser les procédures, car un grand nombre de facteurs peuvent faire varier les résultats. Parmi ces facteurs, on retrouve des différences dans la construction même des labyrinthes (configuration, matériaux, taille, couleur), ainsi que dans les procédures mises en œuvre (conditions de tests, manipulations des animaux avant le passage dans le dispositif, moments de la journée, conditions d'éclairage de la pièce, répétition des essais pour un même animal, confrontation préalable de l'animal au dispositif). La validité des tests est importante pour pouvoir ensuite extrapoler les résultats à l'Homme.

D'une manière générale, chaque test classiquement utilisé permet d'évaluer une composante comportementale particulière de l'animal, parmi lesquelles le niveau d'anxiété, l'activité locomotrice, les capacités d'apprentissage et de mémorisation à court ou à long terme. Plusieurs tests permettent d'évaluer la même composante, et réciproquement, une composante telle que l'activité locomotrice peut être évaluée dans la plupart des tests connus.

D'autre part, il est important de noter que ces composantes ne sont pas indépendantes les unes des autres, mais interagissent constamment. En effet, le niveau d'anxiété par exemple joue sur le niveau d'activité de l'individu Homme ou animal, ou sur l'évaluation de ses capacités de mémorisation. Ainsi, si l'on demande à un enfant d'apprendre une poésie puis de la réciter devant une assemblée, une mauvaise restitution des vers est-elle forcément causée par une mauvaise mémorisation ? Ou est-elle la conséquence d'un trac trop important ?

Dans les études réalisées ici, le comportement individuel des animaux a été évalué à l'âge adulte, soit à partir de PND60. L'anxiété, l'activité locomotrice, les capacités d'apprentissage et la mémoire à court et à long terme des animaux ont ainsi été testés. Pour

cela, quatre tests ont été successivement mis en place, le labyrinthe en croix surélevé (LCS), l'open-field (OF), le labyrinthe en Y (LY), et le labyrinthe radial à huit branches (ou labyrinthe de Olton).

V.3. Procédures des tests

Pour l'ensemble des tests présentés dans cette section, les animaux ont été maintenus en cycle lumineux inversé, afin de réaliser les tests au cours de la journée pendant la phase nocturne du cycle lumineux, qui correspond à la phase d'activité du rat, qui correspond à leur période nocturne. Toutes les expérimentations ont eu lieu dans une salle attenante à la pièce d'habitation, dans des conditions de température et d'humidité similaires. La pièce d'expérimentation était éclairée en lumière rouge, faiblement perceptible par les rongeurs (Jacobs et al., 2001). Deux mêmes animaux de même sexe et issus d'une même portée ont été testés dans chaque dispositif. Chaque session a été filmée, mais a pu être analysée en direct à l'aide de logiciels mis au point au sein du laboratoire. Entre chaque animal les labyrinthes ont été soigneusement nettoyés avec une solution hydro-alcoolique à 30%. Pour éviter d'éventuels effets du passage des femelles dans les dispositifs sur le comportement des mâles, la première semaine a été consacrée exclusivement aux tests sur les mâles (LCS, OF, LY), puis la deuxième semaine a été dédiée aux mêmes tests sur les femelles. Le labyrinthe radial à huit branches a ensuite été réalisé sur 10 jours consécutifs, d'abord sur les mâles, puis sur les femelles.

Pour le dépouillement des données dans l'ensemble des tests, il a été considéré qu'un animal se trouvait dans une zone donnée lorsque ses quatre pattes s'y trouvaient. Dans une même journée, l'ordre des animaux testés a été randomisé entre les différents groupes, afin d'éviter l'effet du cycle circadien sur l'activité des rats. Un tableau récapitulatif des procédures relatives aux tests évaluant le comportement individuel et le comportement social est présenté à la fin de cette partie (**Tableau 23**).

V.3.1. Labyrinthe en croix surélevé

Principe : Basé sur les travaux de Montgomery (1955), le labyrinthe en croix surélevé a été mis au point par Handley & Mithani (1984) puis validé chez le rat par Pellow et al., (1985) en

1985. Il est considéré comme un modèle éthologique d'anxiété non conditionnée. Le comportement des rongeurs dans le LCS résulte d'un conflit entre la motivation innée du rongeur à explorer un environnement nouveau, et la tendance à éviter un espace potentiellement dangereux par crainte du vide (Ohl, 2003 ; Salum et al., 2003).

Dispositif : Le LCS est composé de quatre branches surélevées à 70 cm du sol (**Photo 15**). Deux branches (50 x 10 x 50 cm) entourées de parois verticales opaques, appelées branches fermées (BF), font face à deux branches dépourvues de parois, dites branches ouvertes (BO). L'intersection des branches (10 x 10 cm) est appelée zone centrale (ZC). Les BO sont délimitées par un rebord de 2 mm pour éviter que l'animal ne tombe.

En l'absence de tout traitement, un animal explorera préférentiellement l'espace non anxiogène constitué par les branches fermées, et une corrélation peut être établie entre le niveau d'anxiété de l'animal et le temps passé dans les BO, qui sont une zone découverte aversive (Hogg, 1996). La ZC constitue une zone de décision, et est considérée, avec les BF, comme un espace protégé. Le niveau d'activité est évalué par le nombre de branches visitées et par le nombre de redressements effectués.

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

Variables mesurées : Deux types de variables sont relevées

➤ Des variables spatio-temporelles :

- Le nombre total de branches visitées, le nombre d'entrées en BO, BF, ZC
- Le temps passé dans chaque zone (BO, BF, ZC)

➤ Des variables éthologiques, avec pour chacune leur localisation (BO, BF ou ZC) :

- Le nombre de « *head-dipping* » (plongeon de l'animal vers le sol)
- Le nombre de redressements



Photo 15 : Labyrinthe en croix surélevé

V.3.2. Open-field

Ce test est similaire à celui déjà utilisé pour évaluer l'activité locomotrice du jeune rat à PND25. Le dispositif est cependant plus grand, pour être adapté à la taille de l'animal adulte. Depuis sa mise au point dans les années 30, l'open-field est l'un des tests les plus couramment utilisés pour l'étude du comportement animal en laboratoire. Son succès repose sans doute sur sa simplicité et sa rapidité d'analyse (Walsh & Cummins, 1976).

Principe : A l'âge adulte, ce test permet d'évaluer à la fois le niveau d'activité de l'animal, mais également son niveau d'anxiété. Ce test est basé, comme le LCS, sur le comportement exploratoire spontané de l'animal, et sur le conflit généré par ce comportement et par l'aversion naturelle du rat pour les environnements découverts. La contrainte est par contre moins forte que celle créée dans le LCS, ce qui permet de détecter des variations plus sensibles du niveau d'anxiété des animaux (Carola et al., 2002).

Dispositif : Il est composé d'une enceinte circulaire (diamètre : 1 m) délimitée par une paroi verticale de 45 cm de hauteur (Photo 16). Le plancher est divisé en 29 cases réparties dans trois

zones concentriques : une zone centrale (ZC), une zone intermédiaire (ZI), et une zone périphérique (ZP) près de la paroi.

Pour évaluer le niveau d'anxiété de l'animal, on considère, par analogie avec le LCS, des zones protégées et des zones aversives, anxiogènes. Ainsi la ZP du dispositif représente une zone protégée, et la ZC une zone anxiogène, car découverte. Le temps passé dans chacune des zones permet ainsi d'évaluer le niveau d'anxiété de l'animal testé.

Procédure : L'animal est déposé au centre du dispositif et laissé libre de l'explorer pendant 5 minutes.

Variables mesurées : L'expérimentateur chronomètre le temps passé dans chaque zone, et compte le nombre total de cases parcourues (avec leur localisation), et le nombre de redressements (avec leur localisation).

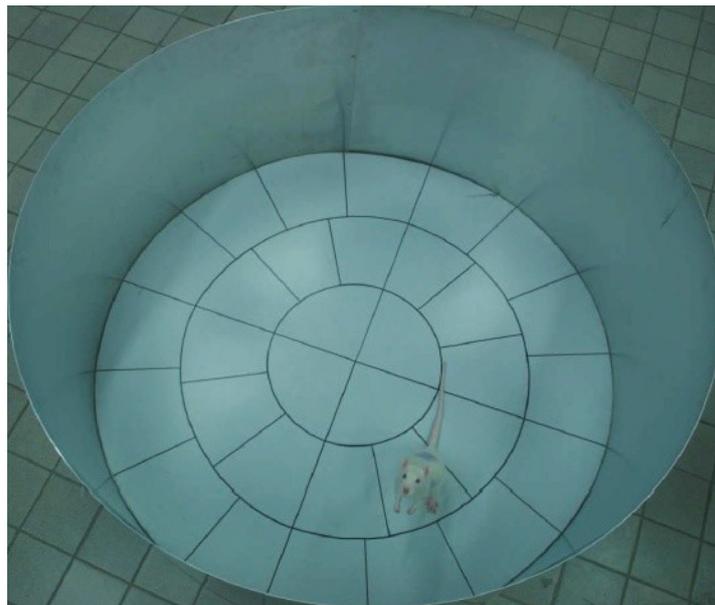


Photo 16 : Open-field

V.3.3. Labyrinthe en Y

Principe : Le labyrinthe en Y initié par Tolman en 1925 permet d'évaluer la mémoire à court terme du rat en déterminant son taux d'alternance spontanée, c'est-à-dire sa capacité à alterner l'ordre de visite des différentes branches du labyrinthe de manière à visiter successivement 3 branches successives différentes.

Dispositif : Le labyrinthe est composé de 3 branches (60 x 10 x 45 cm) pourvues de cloisons verticales, disposées en Y, l'angle étant le même entre chaque branche (**Photo 17**). Chaque branche est identifiée par un chiffre (1, 2, 3), pour le relevé des variables.

Procédure : Au début du test l'animal est placé au bout de la branche 1, la tête orientée vers la paroi. Il est ensuite laissé libre d'explorer le labyrinthe pendant 10 minutes.

Variables mesurées : La succession des branches visitées est relevée. Le pourcentage de triplets justes, ou pourcentage d'alternance, sera ensuite calculé. On considère qu'un triplet est juste lorsqu'il est composé de trois branches différentes (ex : 1-2-3, ou 2-1-3). Le pourcentage de triplets justes est calculé en divisant le nombre de triplets justes par le nombre total de triplets effectués par l'animal en 10 minutes. Le niveau d'activité de l'animal est évalué par le nombre total de branches visitées en 10 minutes, le nombre total de redressements, et par le nombre de branches visitées pendant la première minute.

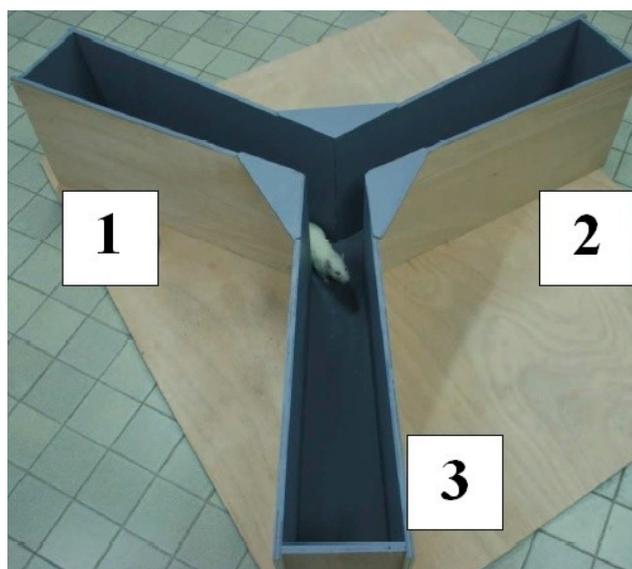


Photo 17 : Labyrinthe en Y

V.3.3. Labyrinthe radial à huit branches

Principe : Le labyrinthe radial à huit branches, mis au point en 1976 par Olton et Samuelson permet d'évaluer les capacités d'apprentissage spatial et la mémoire à long terme des animaux. Il nécessite l'utilisation d'un renforcement alimentaire, de manière à motiver l'animal à explorer chaque branche, et la mise en place d'une restriction alimentaire.

Dispositif : Le labyrinthe est composé de huit branches numérotées entièrement cloisonnées (60 x 10 x 10 cm), réparties autour d'une zone centrale circulaire de 30 cm de diamètre (**Photo 18**). Des repères visuels sont placés dans la pièce, pour permettre à l'animal de se repérer. Des céréales en chocolat, nourriture considérée comme appétante pour le rat, sont placées à l'extrémité de chaque branche.

Procédure : La restriction alimentaire débute 3 jours avant le premier contact des animaux avec le dispositif, dans le but de générer une sensation de faim et motiver ainsi l'animal à rechercher la nourriture disposée au bout de chaque branche. Au bout de ces 3 jours, une période d'entraînement (ou de familiarisation) de 3 jours est effectuée. Pour cela, les animaux sont libres d'explorer le dispositif 15 minutes par jour, par groupes de 3. Pendant cette phase les extrémités des branches contiennent une quantité importante de céréales chocolatées. Le test démarre à la suite de cette période d'entraînement. Chaque animal est alors testé individuellement une fois par jour pendant 10 jours consécutifs. Au début du test l'animal est isolé 1 minute dans la zone centrale, puis il est laissé libre d'explorer la totalité du dispositif. Le test se termine lorsque le rat a visité au moins une fois chaque branche. En cas d'échec, la durée maximale est fixée à 15 minutes.

Variables mesurées : A chaque séance l'expérimentateur relève dans l'ordre chronologique les branches visitées, le temps total mis pour visiter les branches, le nombre total de branches visitées et le nombre de branches visitées avant la première erreur. Le nombre de branches visitées par minute sera ensuite calculé, et renseignera sur le niveau d'activité de l'animal testé.

Au fur et à mesure des jours, les performances des animaux s'améliorent, le temps total mis pour trouver les 8 croquettes et le nombre de branches visitées par erreur diminuent. Cela

montre que les rats apprennent la topographie du labyrinthe pour devenir de plus en plus efficaces dans la recherche de nourriture. Ils sont ainsi capables de récupérer la totalité des céréales en chocolat, tout en réduisant le temps et les efforts fournis. Dans ce dispositif, les animaux s'orientent grâce aux indices visuels disposés dans la pièce (Suzuki et al., 1980 ; Mazmanian et Roberts 1983) et grâce à des indices associés à chacune des branches (Kraemer et al., 1983). En revanche, la réussite des animaux dans ce test n'est pas liée à la perception des croquettes par l'odorat, puisque les performances de rats anosmiques ne sont pas diminuées (Zoladek et Roberts 1978).

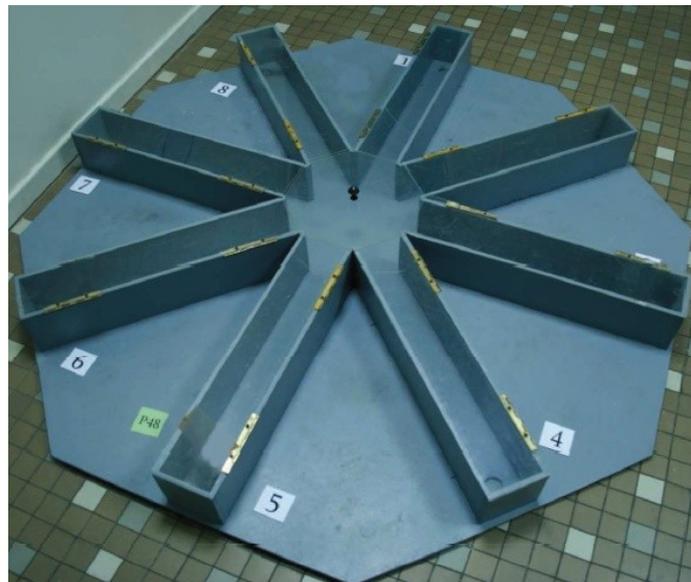


Photo 18 : Labyrinthe radial à 8 branches

VI. Evaluation du comportement social à l'âge adulte

VI.1. Introduction

L'étude du comportement social complète l'étude du comportement individuel à l'âge adulte, et représente ici un moyen supplémentaire d'évaluer l'anxiété des animaux dans une situation tout à fait particulière et complexe de contrainte d'accès à la nourriture. Ce travail reprend l'expérimentation originale initialement mise en place par Didier Desor au sein du laboratoire. La situation imposée à des groupes de 6 animaux est ici beaucoup plus complexe que ne l'est l'exposition à un environnement nouveau, tels que l'OF ou le LCS. Le modèle utilisé induit au sein des groupes une différenciation des statuts sociaux, où le rôle de chaque animal est lié entre autre à son état d'anxiété face aux contraintes imposées par la situation expérimentale. On peut alors considérer que l'adaptation que l'individu réalise en fonction du contexte social qui lui est imposé, et ainsi l'état d'anxiété qu'il manifeste, sont proches de la réalité humaine.

VI.2. Considérations méthodologiques

Le « *diving for food paradigm* », littéralement « plonger pour se nourrir » est un modèle expérimental qui consiste à contraindre les rats à nager en apnée le long d'un aquarium jusqu'à une mangeoire. N'ayant pas d'appui à cette extrémité de l'aquarium, les rats sont obligés de rapporter la croquette obtenue dans la cage de départ pour pouvoir la manger (Figure 17). C'est l'apparition de la contrainte aquatique qui provoque au sein du groupe de 6 animaux l'émergence d'une différenciation sociale. Dès lors, on voit émerger différents profils parmi les animaux, ceux dits « Transporteurs », qui ramènent la nourriture, et ceux dits « Non Transporteurs », qui ne plongent pas et se nourrissent en volant la nourriture au(x) Transporteur(s) du groupe. De plus, il est possible de distinguer deux sous-catégories pour le profil Transporteur. On trouve ainsi des animaux dits « Ravitailleurs », qui rapportent de la nourriture et n'opposent pas ou peu de résistance aux attaques des Non Transporteurs, ce qui permet de nourrir le reste du groupe ; et des animaux dits « Autonomes », qui plongent, ramènent de la nourriture, et opposent suffisamment de résistance pour conserver les croquettes rapportées, et ainsi assurer uniquement leur propre survie. Ce phénomène est

extrêmement stable dans le temps, les profils restent inchangés au sein d'un même groupe pendant 8 mois d'expérimentation, et cela même 2 semaines après la suspension de l'entraînement (Desor, 1994). Enfin, il a été montré que les animaux Transporteurs étaient moins anxieux que les animaux Non Transporteurs (Maitre, 1991). Ainsi il semble que la différenciation sociale soit le résultat de comportements modulés par le niveau individuel d'anxiété exprimé face à deux types de contraintes, l'eau et les congénères (Schroeder et al., 1998).

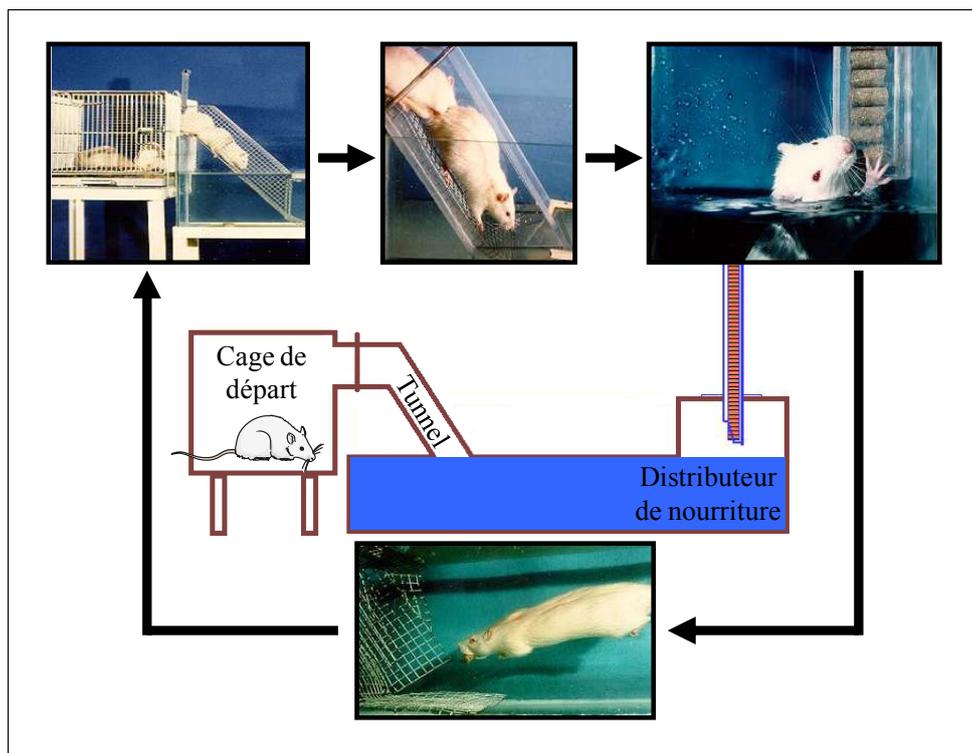


Figure 17 : Dispositif expérimental pour l'évaluation du comportement social

VI.3. Procédure du test

Dispositif : Le dispositif est constitué d'une cage de départ (50 x 40 x 30 cm) reliée par un tunnel à un aquarium en verre (120 x 20 x 30 cm). L'aquarium est progressivement rempli d'eau à température ambiante, et recouvert par une plaque de plexiglas. Une porte coulissante entre la cage d'habitation et le tunnel permet d'accéder à l'aquarium. A l'autre extrémité de l'aquarium se trouve un distributeur de croquettes. Un rat ne peut prendre qu'une seule croquette à la fois.

Procédure : Les animaux sont placés par groupe de 6 dans une cage de départ. Ils n'ont pas accès à de la nourriture dans leur cage d'élevage en dehors des périodes de tests, soit 2 à 3h par jour. L'expérimentation complète comprend plusieurs phases :

➤ Phase 1 : familiarisation avec le dispositif

Pendant 3 jours consécutifs les groupes de 6 animaux sont placés dans le dispositif pendant 3h. L'aquarium ne contient pas d'eau pendant cette phase. Les animaux apprennent à situer la mangeoire et sont remis dans leur cage d'habitation à l'issue de chaque séance.

➤ Phase 2 : familiarisation avec la contrainte

Pendant cette phase la mise en eau de l'aquarium se fait progressivement. Le niveau d'eau est augmenté d'1 ou 2 cm tous les jours, jusqu'à ce que l'aquarium soit complètement immergé.

➤ Phase 3 : test

C'est pendant cette phase que le profil de chaque rat est identifié. Au cours d'une séance de 1h30, les animaux sont contraints de nager en apnée pour aller chercher les croquettes. Cette séance est filmée puis analysée ultérieurement.

Variables mesurées : Lors de la séance filmée, pendant laquelle l'aquarium est totalement immergé, le profil des animaux est défini. L'expérimentateur note également le nombre de croquettes transportées par chaque individu, la durée de possession de chaque croquette, la manière de se procurer de la nourriture pour chaque animal (essentiellement par transport, vol ou ramassage d'une croquette perdue par un autre individu), la manière dont se termine chaque séquence de possession (épuisement de la croquette, vol, perte).

Tableau 23 : Tableau récapitulatif des tests de comportement individuel et social

	Tests	Age	Réflexe ou comportement évalué	Procédure				Variables relevées	Limites expérimentales
				Début du test	Fin du test	Temps	Nombre d'essais		
Comportement individuel	LCS	A partir de PND60	Anxiété, activité	Rat placé au bout d'une branche fermée	Fin des 5 min	5 min	1	- Temps passé dans chaque zone - Nombre de passages dans chaque zone - Nombre de redressements et de head-dipping	
	OF		Activité, anxiété	Rat placé au centre du dispositif	Fin des 5 min	5 min	1	- Temps passé dans chaque zone - Nombre de cases parcourues dans chaque zone - Nombre de redressements	
	LY		Mémoire à court terme, mémoire spatiale	Rat placé au bout de la branche 1	Fin des 10 min	10 min	1	- Nombre total de branches visitées - Nombre de redressements - Pourcentage de triplets justes - Nombre de branches visitées à la 1ère minute	
	Labyrinthe radial à 8 branches		Mémoire à long terme, apprentissage	Rat placé au centre du dispositif	8 branches visitées	Maximum 15 min	1 fois par jour pendant 10 jours	- Temps total - Nombre total de branches visitées - Nombre de branches visitées avant la 1ère erreur - Nombre de branches visitées par minute	Restriction alimentaire
Comportement social	Difficulté d'accès à la nourriture	A 6 mois	Différenciation sociale, Anxiété	6 rats placés dans la cage d'habitation	Fin des 3 h	3 h	1 séance par jour pendant 1 mois	Profils des rats (Plongeurs autonomes, Plongeurs ravitailleurs, Non-plongeurs) - Nombre de transport - Durée de possession des croquettes - Moyen d'obtention des croquettes (transport, vol, ramassage)	Motivation alimentaire

(Abréviations : PND, Post Natal Day ; LCS, Labyrinthe en croix surélevé ; OF, Open-field ; LY, labyrinthe en Y)

VII. Analyses histochimiques : évaluation du métabolisme cérébral

VII.1. Introduction

L'analyse histochimique de l'activité enzymatique de la cytochrome oxydase a pour but d'évaluer l'activité neuronale. La cytochrome oxydase est une enzyme du complexe IV de la chaîne de phosphorylation oxydative des mitochondries. Elle est donc fortement impliquée dans la synthèse d'ATP au sein des neurones. Ces derniers, contrairement aux cellules gliales qui utilisent des mécanismes énergétiques anaérobiques, fonctionnent en aérobie ; leur activité dépend donc de la consommation de glucose et du métabolisme oxydatif. L'activité neuronale, le métabolisme du glucose et le métabolisme énergétique sont très liés et concentrés principalement dans le compartiment cellulaire mitochondrial. En 1989, Wong-Riley a démontré que l'activité de la cytochrome oxydase est un indice valide et fiable de l'activité métabolique du neurone. Cette enzyme est synthétisée en fonction des besoins énergétiques de la cellule, son activité représente ainsi la capacité énergétique des neurones.

VII.2. Protocoles

Tous les produits utilisés ont été achetés chez Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France).

VII.2.1. Préparation des tissus

Les animaux ont été euthanasiés par décapitation à différents âges (PND10, PND21, PND60). Le cerveau a été rapidement prélevé et congelé dans une solution de 2-méthylbutane refroidi à l'azote liquide. Le cerveau a ensuite été enveloppé dans du papier aluminium et conservé jusqu'aux analyses à -80°C. La température du 2-méthylbutane dépend de l'âge des animaux prélevés. Pour les rats âgés de 10 jours, il a été refroidi à -13°C ; à -18°C pour les rats de 21 jours ; et à -25°C pour les rats adultes à PND60. Des coupes sériées de 20 µm d'épaisseur ont été réalisées dans le plan frontal au cryostat à -17°C. Les lames avaient été

préalablement gélatinées. Deux coupes adjacentes ont été déposées sur une même lame et 1 coupe sur 3 est jetée. Huit séries de lames ont été réalisées pour chaque cerveau. Une série complète a été utilisée pour un marquage donné. 78 structures cérébrales ont été analysées par cerveau.

VII.2.2. Gélatinisation des lames

La gélatinisation des lames histologiques favorise l'adhérence des coupes de tissu biologique sur la lame, ce qui permet de préserver l'intégrité des tissus lors des protocoles de marquage. Pour cela, les lames sont d'abord lavées, elles sont ainsi plongées dans de l'eau distillée additionnée de détergent pendant 3 heures, puis rincées sous eau courante pendant 3 heures. La solution de gélatine est ensuite préparée en mélangeant 0,5 g de gélatine bovine et 0,05 g de chrome alun à 100 ml d'eau distillée chauffée à 40°C. Cette solution est filtrée avant utilisation. Les lames propres et sèches sont plongées pendant 10 secondes dans la solution de gélatine, puis recouvertes de papier aluminium et mises à sécher pendant 2 jours à température ambiante. Les lames sont ensuite placées 1 heure à l'étuve à 180°C, puis rangées dans des boîtes hermétiques à l'abri de la poussière et de la lumière.

VII.2.3. Révélation de l'activité de la cytochrome oxydase

Principe : La révélation de l'activité de la cytochrome oxydase se fait par une réaction d'oxydo-réduction. Lors de l'incubation, le cytochrome c est oxydé par la cytochrome oxydase présente dans les tissus analysés. Le cytochrome c oxydé est ensuite de nouveau réduit, en transférant des électrons à la diaminobenzidine (DAB). Le DAB oxydé forme alors un précipité marron insoluble (**Figure 18**). L'intensité de ce marquage est proportionnelle à l'activité de la cytochrome oxydase présente dans les tissus.

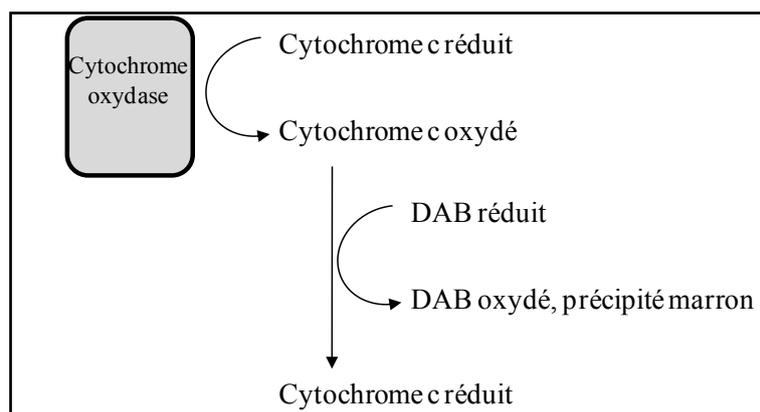


Figure 18 : Représentation schématique du marquage histochimique de la cytochrome oxydase

L'activité enzymatique de la cytochrome oxydase est révélée en histochimie par une coloration brune, issue de la précipitation de la diaminobenzidine (DAB). Dans cette technique, l'oxydation du cytochrome c par la cytochrome oxydase présente dans les tissus est couplée à la DAB : celle-ci devient insoluble et forme un précipité brun, démontrant ainsi l'activité enzymatique.

Procédure : le marquage des lames a été réalisé en effectuant les différentes étapes suivantes.

- Sécher les lames à température ambiante.
- Préparer la solution d'incubation : 180 ml de tampon phosphate 0,1 M, pH 7, 40 mg de cytochrome c de cheval, 100 mg de DAB-4HCl, 8 g de sucrose, 36 mg de catalase.
- Incuber les lames dans cette solution à 37°C, à l'obscurité et sous agitation pendant 65 minutes.
- Arrêter la réaction en rinçant pendant 5 minutes dans du tampon phosphate 0,1 M, pH 7 sucrosé à 10% à 4°C.
- Fixer pendant 30 minutes dans un bain de formaline (formaldéhyde 4% tamponné).
- Rincer 1 fois 5 minutes puis 2 fois 2 minutes au tampon phosphate 0,1 M, pH 7.
- Déshydrater dans des bains successifs d'alcool de concentration croissante (50°, 70°, 96°) pendant 3 minutes chacun, puis 2 fois 5 minutes dans de l'alcool à 100°. Terminer par 2 fois 5 minutes dans du toluène.
- Monter les lames à l'Eukitt.

Parallèlement, deux contrôles négatifs sont immergés dans la solution d'incubation 1) sans DAB, 2) avec du cyanide de potassium 0,01 M. Aucun marquage de cytochrome oxydase

n'est présent sur les lames contrôles. L'intensité du marquage brun est analysée par mesure d'absorbance, et converti en activité enzymatique.

VII.2.4. Quantification de l'activité de la cytochrome oxydase

➤ Préparation des standards : Ces standards permettent de vérifier la linéarité de la courbe des absorbances en fonction de l'épaisseur des coupes. Pour cela des coupes d'homogénats d'encéphales de rats adultes d'épaisseur variables (10-30 μm) sont incubées en même temps que les coupes. La standardisation de l'analyseur d'image (densirag, Biocom) est réalisée en mesurant au préalable l'activité enzymatique spécifique de la cytochrome oxydase en spectrophotométrie. Pour préparer les standards, plusieurs cerveaux de rats adultes sont prélevés et broyés manuellement à l'aide d'un broyeur Dounce. La pâte obtenue peut être conservée dans des tubes ependorfs à -80°C . Avant de réaliser le marquage, les cylindres de pâte obtenus sont coupés au cryostat, à plusieurs épaisseurs (10, 15, 20, 25, 30 μm), puis l'activité de la cytochrome oxydase sur ces coupes est révélée en même temps que pour les coupes de cerveau.

➤ Calcul de l'activité enzymatique spécifique de la cytochrome oxydase : Elle est calculée à partir de la mesure d'absorbance au spectrophotomètre selon la méthode de Hess & Pope (1953). Pour cela, les étapes suivantes sont réalisées :

- Diluer le cytochrome c à une concentration de 30 μM dans du tampon phosphate 0,05 M, pH 7.
- Ajouter 0,3 g de sodium hydrosulfite pour 100 ml de solution de cytochrome c (concentration de sodium hydrosulfite 17 mM). Le sodium hydrosulfite réduit le cytochrome c, qui passe d'une coloration saumon à une coloration rose.
- Mesurer l'absorbance à 550 nm et à 565 nm. Le rapport des deux mesures ($\text{DO}_{550 \text{ nm}} / \text{DO}_{565 \text{ nm}}$) doit être supérieur à 6.
- Mélanger l'homogénat de cerveau au déoxycholate (0,012 g de cerveau pour 5 ml de déoxycholate).
- Mélanger 0,9 ml de la solution de cytochrome c réduit et 0,1 ml d'homogénat & déoxycholate.
- Mesurer l'absorbance à 550 nm toutes les 10 secondes pendant 3 minutes. La densité optique doit décroître et la pente de cette courbe entre 10 et 30 secondes permet de

calculer l'activité enzymatique spécifique de la cytochrome oxydase, en appliquant la loi de Beer-Lambert.

$$(1) \text{ Absorbance} = \epsilon \cdot l \cdot C, \text{ soit } \Delta C = \Delta A / \epsilon \cdot l.$$

Avec :

ϵ = coefficient d'extinction molaire de la cytochrome oxydase, $19600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

l = largeur de la cuve du spectrophotomètre, 1 cm

C = concentration de substrat dégradé

$$(2) \text{ Activité Enzymatique} = (\Delta C \times \text{Volume réactionnel}) / (\epsilon \times l)$$

Avec :

$\Delta A = 2,1$ (par mesure)

Volume réactionnel = $1 \cdot 10^{-3}$ litre

$\epsilon = 19600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

$l = 1 \text{ cm}$

$$(3) \text{ Activité Enzymatique Spécifique} = \text{Activité Enzymatique} \times \text{masse de tissu contenu dans le Volume réactionnel.}$$

L'activité enzymatique spécifique de la cytochrome oxydase mesurée (**38,4 $\mu\text{mol/min/g}$**) reste stable pendant plusieurs mois.

➤ Quantification de l'activité de la cytochrome oxydase par l'analyseur d'images : Les coupes d'homogénats de cerveau et la mesure de l'activité enzymatique spécifique dans les standards permettent d'établir une relation de proportionnalité entre la densité optique mesurée et l'activité enzymatique de la cytochrome oxydase. L'activité de la cytochrome oxydase est évaluée en mesurant la densité optique des zones d'intérêts à l'aide de l'analyseur d'images étalonné.

VIII. Dosages des HAP et de leurs métabolites

VIII.1. Dosages des HAP dans les aliments administrés aux femelles

VIII.1.1. Introduction

Afin d'évaluer les quantités de HAP présents dans les aliments ingérés par les animaux lors des expérimentations, et d'estimer ainsi l'exposition environnementale par l'ingestion d'aliments potentiellement contaminés, plusieurs molécules mères ont été dosées par le LABERCA à Nantes, au niveau des croquettes, du sirop de grenadine, et de l'huile isio 4.

VIII.1.2. Dosages

Les analyses ont été faites par chromatographie gazeuse couplée à de la spectrométrie de masse, selon la méthode décrite par (Veyrand et al., 2007).

Brièvement, les matrices liquides ont été extraites avec du cyclohexane par extraction liquide/liquide, et les matrices solides ont été extraites par extraction liquide sous pression. Les huiles ont été directement déposées sur cartouches SPE. La purification a été réalisée sur cartouche SPE constitué de polystyrène-divinylbenzène. L'analyse a été réalisée par chromatographie gazeuse couplée à de la spectrométrie de masse, et la quantification par dilution isotopique (utilisation d'étalons internes marqués au ^{13}C).

Les HAP dosés sont les suivants Benzo(a)pyrène, Benzo(a)anthracène, Chrysène, Benzo(b)fluoranthène, Dibenz(a,h)anthracène, Indéno(1,2,3,c-d)pyrène, Benzo(k)fluoranthène, Benzo(g,h,i)pérylène, Benzo(j)fluoranthène, Cyclopenta(c,d)pyrène, Dibenzo(a,l)pyrène, Dibenzo(a,e)pyrène, Dibenzo(a,i)pyrène, Dibenzo(a,h)pyrène, 5-Méthylchrysène, Benzo(c)fluorène, Fluoranthène, Anthracène, Pyrène, Phénanthrène.

VIII.2. Dosages au niveau des cerveaux des jeunes

VIII.2.1. Introduction

Les 16 HAP et 53 de leurs hydroxy-métabolites ont été dosés sur les cerveaux des jeunes à PND0 et PND21, pour les deux expérimentations. En effet, il semble important, étant donné le peu de données de la littérature sur ce sujet, d'évaluer le transfert de ce type de molécules entre l'organisme de la mère et celui du jeune, et ainsi de s'assurer de la différence réelle de molécules biodisponibles dans l'organisme du jeune pour les deux doses testées. D'autre part, le but de ces dosages est de mettre en évidence un lien éventuel entre la présence des polluants ou de leurs métabolites dans le cerveau, et d'éventuels troubles comportementaux ou du métabolisme énergétique cérébral. Deux stades ont été choisis, le premier correspond à la fin de l'exposition du jeune via l'organisme maternel pendant la gestation (PND0), et le second correspond à la fin de l'exposition via le lait maternel (PND21) pour les rats exposés également pendant la période d'allaitement. Pour les rats dont l'exposition s'arrête à la naissance, ce stade devrait permettre d'évaluer l'accumulation, ou le niveau d'élimination 3 semaines après la fin de l'exposition.

VIII.2.2. Dosages

Dans le but de quantifier les concentrations de HAP et de leurs métabolites au sein du compartiment cérébral des jeunes rats à la fin de la période d'exposition, des cerveaux ont été prélevés à J0 et J21, puis les concentrations cérébrales des 16 HAP composant le mélange administré aux femelles, et de 53 hydroxy-métabolites ont été analysées suivant la méthode analytique décrite par Grova et al., (2011) et rappelée ici.

Les molécules dosées sont les suivantes :

HAP : Naphthalène, Acénaphthylène, Acénaphthène, Fluorène, Phénanthrène, Anthracène, Fluoranthène, Pyrène, Benzo(a)anthracène, Chrysène, Benzo(b)fluoranthène, Benzo(k)fluoranthène, Benzo(a)pyrène, Indeno(1,2,3-c,d)pyrène, Dibenzo(a,h)anthracène, Benzo(g,h,i)pérylène.

Métabolites : 1-OH-naphthalène, 2-OH-naphthalène, 1-OH-acénaphthène, 9-OH-fluorène, 3-OH-fluorène, 2-OH-fluorène, 4-OH-phénanthrène, 9-OH-phénanthrène, 3-OH-phénanthrène, 1-OH-phénanthrène, 2-OH-phénanthrène, 3-OH-fluoranthène-13C6, 3-OH-fluoranthène, 1-OH-pyrène-D9, 1-OH-pyrène, 2-OH-benzo(c)Phénanthrène, 1-OH-benzo(a)anthracène-13C6, 1-OH-benzo(a)anthracène, 4-OH-chrysène, 11-OH-benzo(a)anthracène, 6-OH-chrysène, 2+5-OH-B(a)A + 3-OH-B(c)P, 8-OH-benzo(a)anthracène, 3-OH-chrysène, 4-OH-benzo(a)anthracène, 1-OH-chrysène, 10-OH-benzo(a)anthracène, 3+9-OH-benzo(a)anthracène, 2-OH-chrysène, 8-OH-benzo(b)fluoranthène, 11-OH-B(a)P + 1,2,8,12-OH-B(b)F + 8-OH-B(k)F, 6,10,12-OH-B(a)P, 5-OH-B(a)P, 11-OH-benzo(b)fluoranthène, 10-OH-B(b)F + 3-OH-B(k)F, 9-OH-B(k)F + 4-OH-B(a)P, 7-OH-B(a)P, 9-OH-B(a)P, 1-OH-B(a)P, 2+3-OH-B(a)P, 8-OH-B(a)P, 6-OH-indeno(1,2,3-c,d)pyrène, 1-OH-indeno(1,2,3-c,d)pyrène, 2-OH-indeno(1,2,3-c,d)pyrène, 8-OH-indeno(1,2,3-c,d)pyrène, 3-OH-dibenzo(a,h)anthracène.

Les animaux ont été euthanasiés par décapitation à PND0 et PND21. Le cerveau a été rapidement prélevé et congelé dans de l'azote liquide, puis conservé à -80°C jusqu'aux analyses, réalisées au LAHB au Luxembourg.

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 d'étalons internes (MRI/NCI, Kansas City, Missouri, USA), puis 200 µl de tampon acétate (1M, pH 5,6) ont été ajoutés. Une hydrolyse a ensuite été réalisée avec 5 µl de sulfatase purifié (10 unités/µl) et 5 µl de glucuronidase (127 unités/µl), à 37°C durant une nuit. Les échantillons ont ensuite été transférés dans des tubes de 10 ml, et le volume a été ajusté à 2 ml avec de l'eau. Une 1^{ère} extraction liquide-liquide avec 2 ml d'un mélange cyclohexane/acétate d'éthyle (50:50, v/v) a été réalisée. Le mélange a été agité pendant 15 minutes puis centrifugé pendant 5 minutes à 1800 g à température ambiante. Les surnageants ont ensuite été collectés 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 préalablement conditionnée avec du cyclohexane. Les HAP et leurs hydroxy-métabolites ont ensuite été élués avec 2 ml d'un mélange cyclohexane/acétate d'éthyle (50:50, v/v), puis évaporés. Un volume de 50 µL d'eau a été ajouté à l'éluât afin d'éviter l'évaporation totale de l'extrait sous flux d'azote. Ensuite, les résidus ont été dissouts dans 2 mL de cyclohexane et 2 mL d'un mélange méthanol-eau (80:20, v/v), puis agités pendant 15 minutes à 300 tours/minute et centrifugés pendant 5

minutes à 1800 g. Les deux phases obtenues, contenant les HAP ou les métabolites, ont ensuite été séparées.

La phase contenant le cyclohexane et les HAP 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. Le mélange a été agité pendant 15 minutes (300 agitations/minute), puis centrifugé pendant 5 minutes à 1800 g à température ambiante. Finalement, 1 µL a été injecté en GC-MS/MS.

En parallèle, la phase contenant le mélange méthanol-eau et les hydroxy-métabolites des HAP a été évaporée à sec et l'extrait a été repris dans 40 µL de réactif de dérivation MSTFA - N-Méthyl-N-(triméthylsilyl) trifluoroacétamide. 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 des HAP et de leurs 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 en spectrométrie de masse sont détaillées dans l'étude de Grova et al. (2011). Les droites de calibration ont été réalisées en utilisant des échantillons de cerveau supplémentés par des concentrations croissantes de HAP et de métabolites entre 0 et 500 pg/mg de tissu cérébral pour les molécules mères, et comprises entre 0 et 5000 pg/mg de tissu cérébral.

IX. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel *SPSS 16.0* pour *Windows* (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Le seuil de significativité est fixé à $p = 0,05$.

L'évolution du **poids** des animaux a été analysée par une **ANOVA à 2 facteurs** (« traitement » et « sexe »).

Les effets de l'exposition sur le **développement sensori-moteur** des jeunes ont été déterminés par des tests non paramétriques. Le test du **Chi-Deux 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 les tests de **Friedman** et de **Wilcoxon**.

Concernant les tests de **comportement maternel**, le test de construction du nid a été étudié avec un test du **Chi-Deux de Pearson**, et le test de ramassage des jeunes a été analysé à l'aide d'une **ANOVA à 2 facteurs**, dont 1 répété, et du **Chi-Deux de Pearson**.

Les **données comportementales** 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 aux HAP et du sexe dans l'expression du comportement de l'animal. Dans le cas d'un effet significatif du facteur lié à l'exposition, des comparaisons *a posteriori* ont été réalisées par le test de **Bonferroni**. 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 le facteur « jour », pour déterminer, en plus des effets des facteurs « exposition » et « sexe », l'influence de la répétition du test sur les performances des animaux.

Les résultats relevés en comportement social ont été analysés par différents tests statistiques. La **typologie** des animaux Transporteurs (Ravitailleurs ou Autonomes) a été analysée par une méthode de classification hiérarchique ascendante (« *Cluster Analysis* ») basée sur la distance de Ward. La **proportion d'animaux Transporteurs et Non transporteurs**, ou **Ravitailleurs et Autonomes** a été analysée par le test du **Chi-Deux de Pearson** ou par le test de **Fisher des probabilités exactes**, selon la taille des effectifs. Le **nombre de transports effectués** a été analysé par le test de **Mann-Whitney**.

Les données obtenues pour les **analyses histologiques** ont été étudiées à l'aide d'une **ANOVA à 1 facteur**, suivie de tests *a posteriori* de **Bonferroni**.

Enfin, les résultats obtenus dans la partie dosages des HAP et de leurs métabolites ont été analysés par une **ANOVA à 1 facteur**, suivie de tests *a posteriori* de **Bonferroni**. Aucune analyse statistique n'a été réalisée lorsque les valeurs étaient supérieures à la limite de détection (LdD), mais inférieures à la limite de quantification (LdQ).

SECTION EXPERIMENTALE

Cette section est dédiée à la description des résultats de ce travail de thèse. Les résultats seront présentés dans l'ordre suivant pour chacune des deux expérimentations : résultats aux tests de développement moteur et sensoriel, évaluation du comportement maternel, évaluation du comportement adulte individuel puis social, analyses de l'activité de la cytochrome oxydase, résultats analytiques (dosage des HAP et métabolites sur le cerveau des jeunes).

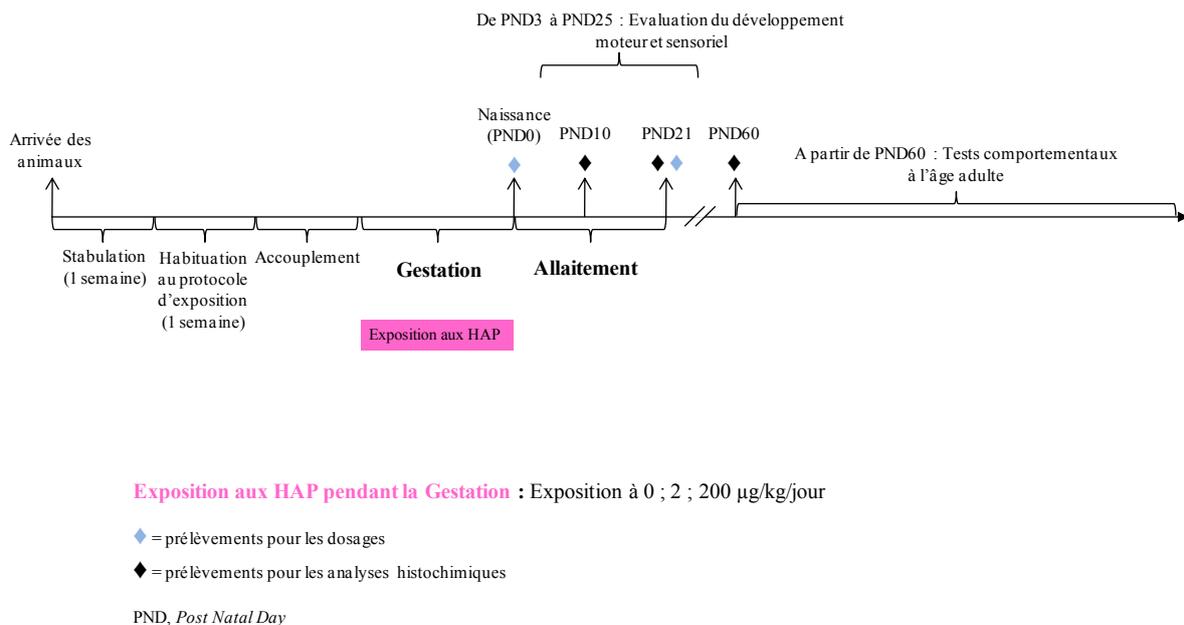
Les résultats des analyses de l'activité enzymatique de la cytochrome oxydase réalisées sur 78 structures cérébrales sont présentés par stade de développement (PND10, PND21 puis PND60). Pour chaque stade, les données sont regroupées par système ou par structure principale, et présentés dans l'ordre suivant : systèmes sensoriels, système moteur, tronc cérébral, cortex cérébraux, noyaux thalamiques, noyaux hypothalamiques, système limbique et zones de substances blanches.

Chapitre 1 : Etude des effets d'une exposition répétée par voie alimentaire à un mélange de 16 HAP chez la rate gestante. Effets neurocomportementaux à court et à long terme.

I. Protocole

Les données relatives à l'élevage, aux accouplements et à l'exposition des animaux ont été précédemment décrites (Section méthodologique : I. et II.3.).

La figure 19 illustre sur une échelle de temps le déroulement de cette expérimentation.



Exposition aux HAP pendant la Gestation : Exposition à 0 ; 2 ; 200 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{jour}$

◆ = prélèvements pour les dosages

◆ = prélèvements pour les analyses histochimiques

PND, Post Natal Day

Figure 19 : Représentation du déroulement de l'expérimentation

L'ensemble des protocoles des tests et des analyses histologiques a été décrit dans la section méthodologique.

II. Effectifs

Pour cette expérimentation, un total de 39 femelles ont été accouplées (**Tableau 24**), et 422 ratons sont nés. Le groupe témoin a été composé de 14 femelles (154 ratons), 12 femelles ont été exposées à la dose de 2 µg/kg/jour (**Dose 1**), de GD1 à PND0 (130 ratons), et 13 femelles ont été exposées à la dose de 200 µg/kg/jour (**Dose 2**), pendant la même période (138 ratons).

Pour les tests de développement sensorimoteur, 50 ratons témoins (21 mâles et 29 femelles), 51 ratons exposés à la dose 1 (24 mâles et 27 femelles), 52 ratons exposés à la dose 2 (24 mâles et 28 femelles) ont été testés.

Le comportement maternel a été observé sur 6 femelles témoins, 6 femelles exposées à la dose 1 et 6 femelles exposées à la dose 2.

A l'âge adulte, le comportement individuel de 24 rats témoins (12 mâles et 12 femelles), 24 rats exposés à la dose 1 (12 mâles et 12 femelles), 24 rats exposés à la dose 2 (12 mâles et 12 femelles) a été évalué.

Le comportement social des rats a été évalué sur 36 animaux témoins, 18 animaux exposés à la première dose (2 µg/kg/jour), et 18 animaux exposés à la deuxième dose (200 µg/kg/jour). L'ensemble des animaux a été réparti en 12 groupes de 6 individus, composé à chaque fois de 3 animaux témoins et 3 animaux exposés.

Les analyses histologiques ont été réalisées sur 15 mâles (5/groupe) à chacun des 3 stades (PND10, PND21, PND60).

Les dosages de HAP ont été réalisés sur les cerveaux de 9 jeunes (3/groupe) aux deux stades (PND0 et PND21).

III. Effets de l'exposition précoce aux HAP

III.1. Reproduction

Aucune différence significative concernant la durée de gestation des femelles, la taille des portées et le *sex ratio* n'a été relevée entre les 3 groupes (Tableau 24). Ces résultats montrent ainsi que l'exposition aux HAP pendant la gestation n'a pas eu d'influence sur son déroulement.

Tableau 24 : Données relatives à la reproduction

	Témoins	Dose 1	Dose 2	Significativité
Nombre de femelles accouplées	14	12	13	
Nombre de rats nés	154	130	138	
Nombre de rats par portée	11,50 (8,75 - 13,00)	10,00 (9,25 - 12,75)	12,00 (8,00 - 13,00)	n.s.
Sex ratio (%)	54,00	66,00	68,00	n.s.
Durée de gestation (j)	21 (21,00 - 22,00)	22 (21,25 - 22,00)	22 (21,50 - 22,00)	n.s.

Le Chi-Deux de Pearson et le test de Kruskal-Wallis ont été utilisés pour comparer les animaux des trois groupes. La durée de la gestation et le nombre de rats sont présentées sous forme de médianes et les rangs sont indiqués entre parenthèses.

n.s. : non significatif

III.2. Poids corporel

L'ANOVA à 2 facteurs réalisée pour déterminer l'effet d'une exposition prénatale aux HAP sur le poids corporel des rats entre PND3 et PND60 n'a mis en évidence aucune différence significative entre les trois groupes (**Tableau 25**).

Par ailleurs, un effet du facteur « sexe » a été observé entre PND3 et PND10, à PND12, entre PND16 et PND19, puis entre PND21 et PND60 (**Tableau 25**). Les femelles ont ainsi un poids plus faible que les mâles (**Tableau 25**).

Enfin, une interaction entre les deux facteurs étudiés a été observée uniquement à PND12 (**Tableau 25**).

Tableau 25 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante sur le poids corporel du jeune rat

Poids (g)	Témoïn		Dose 1		Dose 2		groupe		sexe		groupe*sexe	
	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles	F _(2,71)	p	F _(2,71)	p	F _(2,71)	p
PND3	8,56 ± 0,22	7,73 ± 0,18	7,94 ± 0,23	7,88 ± 0,31	7,79 ± 0,17	7,60 ± 0,17	2,103	n.s.	4,040	<0,05	1,753	n.s.
PND4	9,58 ± 0,25	8,67 ± 0,20	9,24 ± 0,26	9,05 ± 0,34	9,03 ± 0,18	8,62 ± 0,19	1,066	n.s.	6,310	<0,05	1,190	n.s.
PND5	11,08 ± 0,29	9,98 ± 0,22	10,58 ± 0,28	10,40 ± 0,38	10,03 ± 0,14	9,79 ± 0,20	3,422	n.s.	7,178	<0,05	1,608	n.s.
PND6	12,53 ± 0,33	11,39 ± 0,25	11,99 ± 0,31	11,84 ± 0,42	11,31 ± 0,23	11,14 ± 0,21	3,744	n.s.	3,971	<0,05	1,804	n.s.
PND7	13,87 ± 0,32	12,60 ± 0,25	13,29 ± 0,34	12,98 ± 0,45	12,94 ± 0,18	12,62 ± 0,26	1,161	n.s.	6,135	<0,05	1,556	n.s.
PND8	15,55 ± 0,33	14,18 ± 0,27	14,74 ± 0,34	14,45 ± 0,48	14,38 ± 0,17	14,00 ± 0,24	2,120	n.s.	6,622	<0,05	1,717	n.s.
PND9	17,03 ± 0,39	15,54 ± 0,28	16,23 ± 0,38	16,08 ± 0,54	16,01 ± 0,19	15,78 ± 0,28	0,591	n.s.	4,443	<0,05	2,181	n.s.
PND10	18,53 ± 0,44	17,11 ± 0,29	17,72 ± 0,42	17,71 ± 0,60	17,94 ± 0,37	17,48 ± 0,36	0,453	n.s.	4,358	<0,05	1,594	n.s.
PND11	20,47 ± 0,40	18,91 ± 0,28	19,16 ± 0,45	19,44 ± 0,63	19,58 ± 0,45	19,03 ± 0,38	0,792	n.s.	2,207	n.s.	2,395	n.s.
PND12	22,13 ± 0,42	20,44 ± 0,28	21,15 ± 0,45	21,22 ± 0,69	21,30 ± 0,39	20,76 ± 0,34	0,135	n.s.	6,959	<0,01	3,529	<0,05
PND13	24,00 ± 0,42	22,38 ± 0,31	22,83 ± 0,49	22,83 ± 0,75	22,94 ± 0,39	22,45 ± 0,37	1,062	n.s.	3,560	n.s.	1,665	n.s.
PND14	25,83 ± 0,44	24,13 ± 0,31	24,34 ± 0,56	24,13 ± 0,89	24,62 ± 0,40	24,22 ± 0,36	1,399	n.s.	3,342	n.s.	1,303	n.s.
PND15	27,41 ± 0,48	25,54 ± 0,37	26,11 ± 0,60	26,19 ± 1,05	26,28 ± 0,44	25,80 ± 0,39	0,294	n.s.	2,696	n.s.	1,529	n.s.
PND16	29,33 ± 0,51	27,01 ± 0,37	27,72 ± 0,62	27,14 ± 1,03	27,93 ± 0,47	27,46 ± 0,40	1,585	n.s.	7,726	<0,01	1,419	n.s.
PND17	31,10 ± 0,62	28,47 ± 0,38	29,16 ± 0,58	28,16 ± 0,89	29,46 ± 0,50	28,82 ± 0,41	1,532	n.s.	7,581	<0,01	1,452	n.s.
PND18	32,72 ± 0,67	30,21 ± 0,45	31,03 ± 0,60	29,66 ± 0,93	31,45 ± 0,54	31,03 ± 0,48	2,067	n.s.	9,251	<0,01	1,108	n.s.
PND19	34,38 ± 0,78	31,89 ± 0,49	33,05 ± 0,68	31,78 ± 1,03	33,01 ± 0,53	32,75 ± 0,49	0,528	n.s.	5,917	<0,05	0,729	n.s.
PND20	37,31 ± 0,88	34,85 ± 0,56	36,03 ± 0,79	34,61 ± 1,25	35,96 ± 0,69	35,93 ± 0,61	0,555	n.s.	5,534	n.s.	0,620	n.s.
PND21	40,83 ± 0,95	38,02 ± 0,58	39,44 ± 0,82	37,96 ± 1,28	38,95 ± 0,70	38,88 ± 0,61	0,395	n.s.	6,386	<0,05	0,772	n.s.
PND22	42,63 ± 0,96	39,56 ± 0,63	41,06 ± 0,88	39,80 ± 1,38	41,02 ± 0,85	40,73 ± 0,71	0,493	n.s.	5,511	<0,05	1,048	n.s.
PND23	45,17 ± 1,07	41,87 ± 0,71	43,67 ± 1,00	42,76 ± 1,46	44,15 ± 0,92	43,99 ± 0,75	0,317	n.s.	4,706	<0,05	1,097	n.s.
PND24	48,28 ± 1,09	45,04 ± 0,74	46,95 ± 1,11	45,61 ± 1,63	47,61 ± 1,02	47,28 ± 0,83	0,458	n.s.	4,956	<0,05	0,666	n.s.
PND25	51,72 ± 1,19	48,10 ± 0,79	49,97 ± 1,20	48,75 ± 1,69	51,13 ± 1,12	49,62 ± 1,34	1,127	n.s.	4,355	<0,05	0,931	n.s.
PND30	76,41 ± 1,52	69,16 ± 1,07	73,38 ± 2,02	70,52 ± 2,52	76,23 ± 1,59	73,63 ± 1,18	1,603	n.s.	10,723	<0,01	1,251	n.s.
PND35	106,31 ± 2,06	92,99 ± 1,34	102,61 ± 2,57	92,89 ± 3,00	106,06 ± 1,95	97,97 ± 1,50	2,144	n.s.	44,505	<0,01	0,537	n.s.
PND40	137,53 ± 2,36	109,76 ± 3,20	132,35 ± 3,94	113,40 ± 3,02	136,92 ± 3,11	118,61 ± 1,73	1,725	n.s.	95,016	<0,01	0,992	n.s.
PND45	165,95 ± 2,70	129,51 ± 1,86	159,77 ± 4,51	128,83 ± 3,62	164,68 ± 3,35	134,30 ± 2,09	2,475	n.s.	175,02	<0,01	1,024	n.s.
PND50	195,64 ± 3,39	143,47 ± 1,98	190,62 ± 4,98	144,69 ± 3,72	193,68 ± 3,90	149,37 ± 2,07	0,629	n.s.	291,289	<0,01	0,763	n.s.
PND55	225,02 ± 3,64	157,24 ± 2,30	214,80 ± 5,62	161,07 ± 5,65	223,56 ± 4,39	163,33 ± 2,42	0,883	n.s.	325,925	<0,01	1,474	n.s.
PND60	247,29 ± 3,36	168,78 ± 2,87	234,83 ± 6,46	170,97 ± 6,03	248,58 ± 4,83	175,39 ± 2,56	1,978	n.s.	379,395	<0,01	1,344	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 de Bonferroni a été utilisé pour comparaisons multiples.

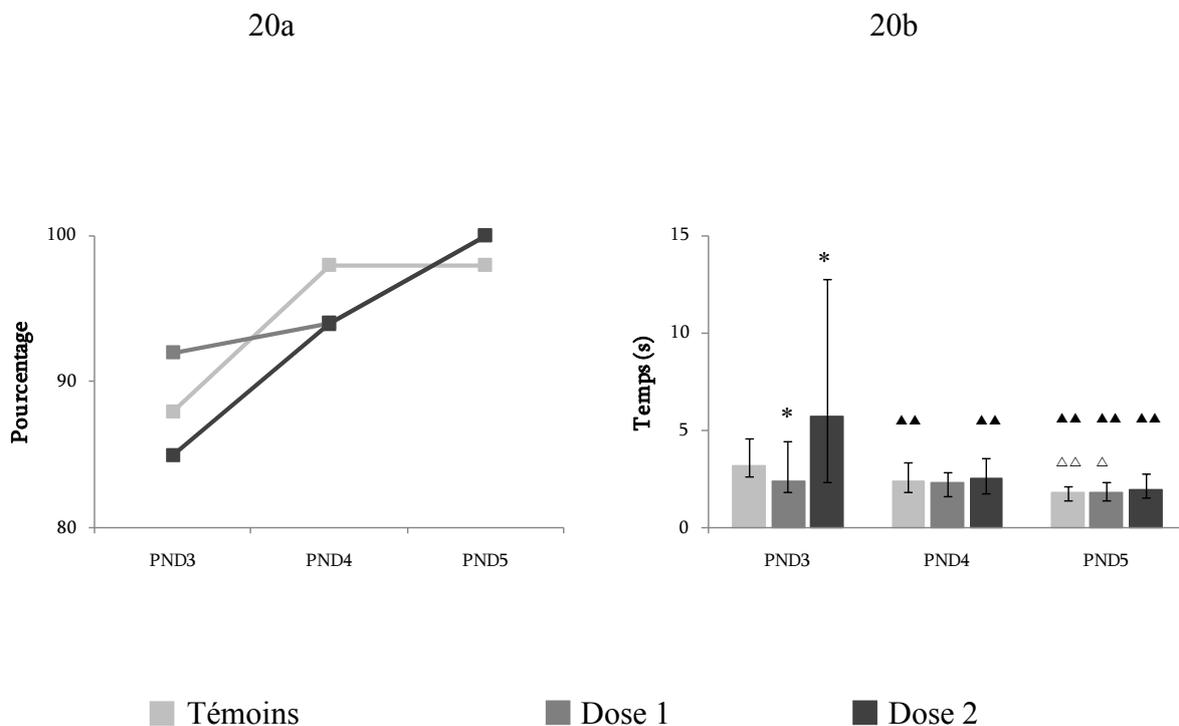
n.s. : non significatif

(Abréviations : PND, Post Natal Day)

III.3. Tests neurodéveloppementaux

III.3.1. Test de retournement

L'analyse statistique n'a montré aucune différence entre les groupes concernant le pourcentage de réussite à PND3, PND4 et PND5 (Figure 20a). En revanche, à PND3, les animaux exposés à la dose 1 mettent significativement moins de temps pour se retourner que les animaux témoins, et les animaux exposés à la dose 2 mettent significativement plus de temps pour se retourner (Figure 20b). De plus, l'ensemble des animaux améliorent leurs performances au cours des trois jours de test (Figure 20b).



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

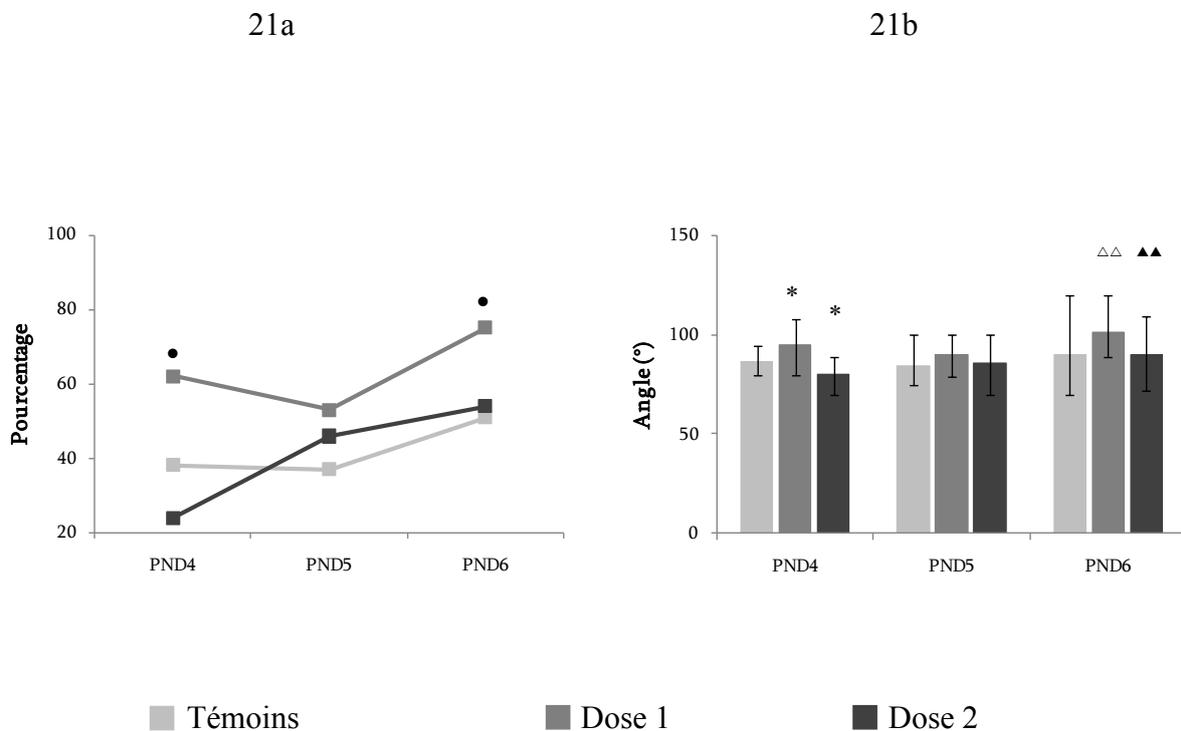
* : p < 0,05 différence statistiquement significative par rapport aux Témoins

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

Figures 20 a et b : Pourcentage de réussite au test de retournement (20a) et temps mis par les animaux des trois groupes pour se retourner (médianes et quartiles) (20b)

III.3.2. Test d'agrippement

L'analyse des données relevées dans ce test a montré une différence significative concernant le pourcentage de réussite à PND4 et PND6 (**Figure 21a**). De plus, à PND4, les animaux exposés à la dose 1 chutent à un angle significativement plus élevé que les animaux témoins, et les animaux exposés à la dose 2 chutent à un angle significativement moins élevé (**Figure 21b**). Par ailleurs, seuls les animaux exposés aux deux doses de HAP améliorent leurs performances à PND6 (**Figure 21b**).



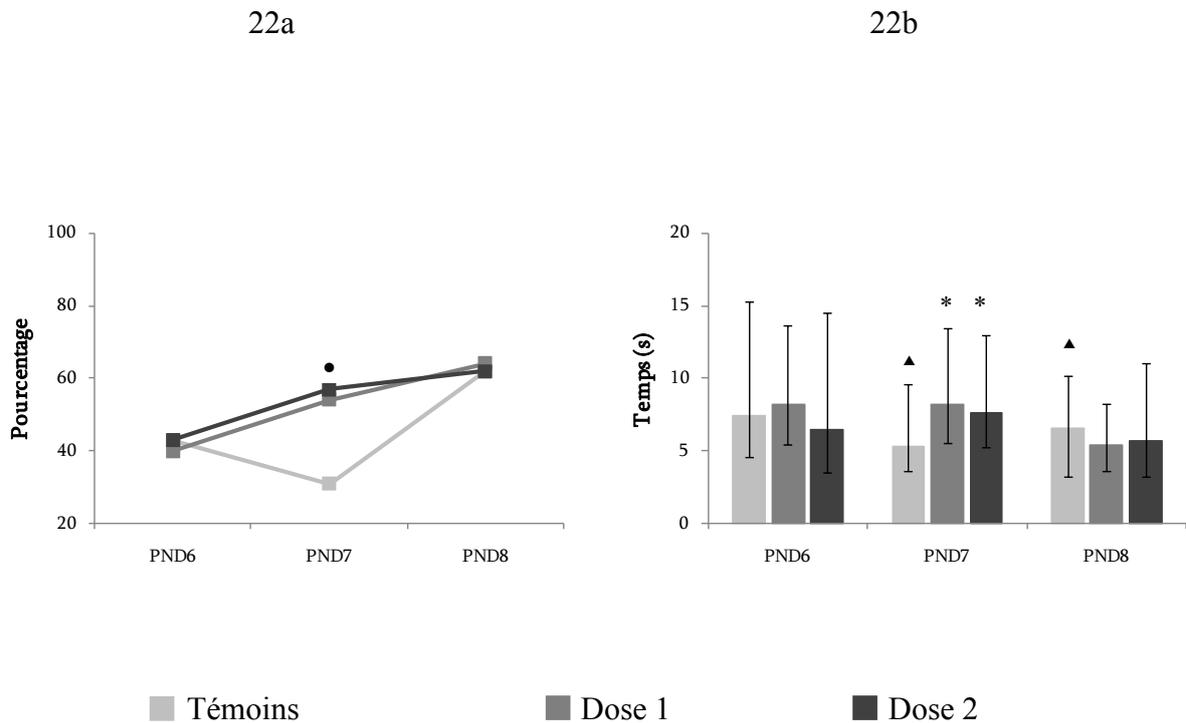
Le chi-deux de Pearson, le test de Kruskal-Wallis et le test de Friedman ont été réalisés pour comparer les animaux des trois groupes. Les tests de Mann-Whitney et Wilcoxon ont été utilisés pour les comparaisons multiples.

- * : p < 0,05 différence statistiquement significative par rapport aux Témoins
- : p < 0,05 différence statistiquement significative entre les 3 groupes
- ▲▲ : p < 0,01 différence statistiquement significative par rapport au 1er jour de test
- △△ : p < 0,01 différence statistiquement significative par rapport au 2ème jour de test

Figures 21 a et b : Pourcentage de réussite au test d'agrippement (21a) et angle atteint par les animaux des trois groupes pour se retourner (médianes et quartiles) (21b)

III.3.3. Cliff Avoidance

Le Chi-Deux de Pearson a permis de révéler à PND7 une variation significative du pourcentage de réussite entre les trois groupes (**Figure 22a**). A PND7, les animaux exposés doses 1 et 2 mettent significativement plus de temps pour reculer sur la plate-forme que les animaux témoins (**Figure 22b**). Enfin, seuls les animaux témoins améliorent leurs performances au cours des trois jours de test (**Figure 22b**).



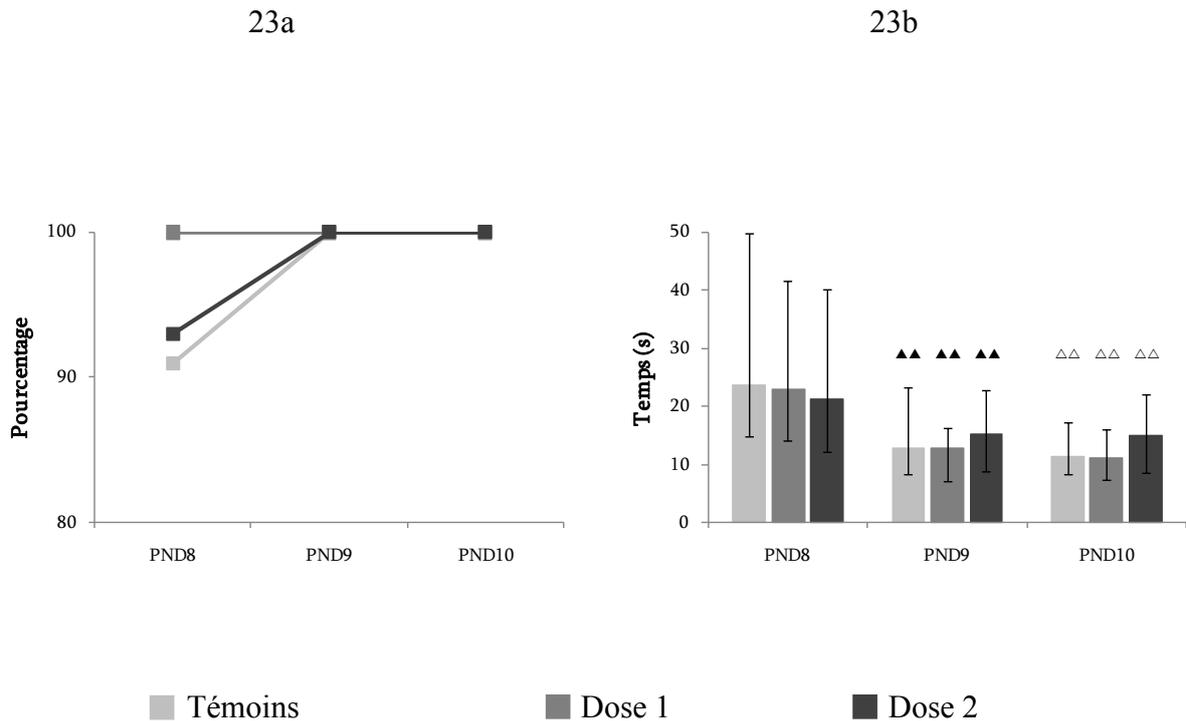
Le chi-deux de Pearson, le test de Kruskal-Wallis et le test de Friedman ont été réalisés pour comparer les animaux des trois groupes. Les tests de Mann-Whitney et Wilcoxon ont été utilisés pour les comparaisons multiples.

- * : $p < 0,05$ différence statistiquement significative par rapport aux Témoins
- : $p < 0,05$ différence statistiquement significative entre les 3 groupes
- ▲ : $p < 0,05$ différence statistiquement significative par rapport au 1er jour de test

Figures 22 a et b : Pourcentage de réussite au test du *cliff avoidance* (22a) et temps mis par les animaux des trois groupes pour reculer sur la plate-forme (médianes et quartiles) (22b)

III.3.4. Test de réaction anti-gravitaire

L'analyse du pourcentage de réussite n'a révélé aucune différence significative entre les trois groupes (Figure 23a). Aucune différence significative concernant le temps mis pour effectuer une rotation de 180°C n'a été observée (Figure 23b). L'ensemble des animaux améliorent leurs performances d'un jour à l'autre (Figure 23b).



Le chi-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 les comparaisons multiples.

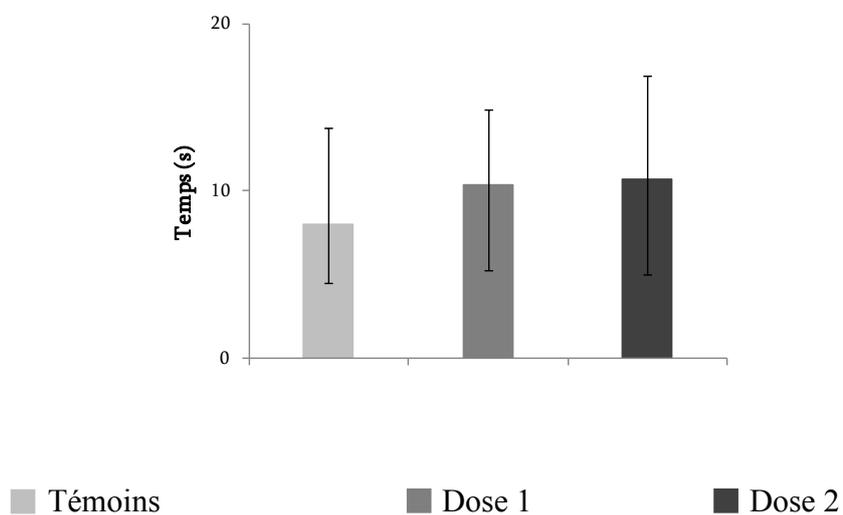
▲▲ : $p < 0,01$ différence statistiquement significative par rapport au 1er jour de test

▲▲▲ : $p < 0,01$ différence statistiquement significative par rapport au 2ème jour de test

Figures 23 a et b : Pourcentage de réussite au test de la réaction anti-gravitaire (23a) et temps mis par les animaux des trois groupes pour effectuer une rotation de 180° (médianes et quartiles) (23b)

III.3.5. Test de suspension

Aucune différence significative n'a été révélée par l'analyse des temps obtenus à ce test (Figure 24).



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

Figure 24 : Temps de suspension des animaux des trois groupes avant la chute (médianes et quartiles)

III.3.6. Test de coordination locomotrice

L'ensemble des résultats obtenus à ce test sont présentés dans le tableau 26.

Tableau 26 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante sur la coordination locomotrice du jeune rat à PND19, 20 et 21

	Témoins			Dose 1			Dose 2		
	PND19	PND20	PND21	PND19	PND20	PND21	PND19	PND20	PND21
temps de nage (s)	36,00 (31,00 - 43,00)	9,00 ▲▲ (5,00 - 15,00)	4,00 ▲▲△△ (3,00 - 7,00)	38,00 (29,00 - 49,00)	10,00 ▲▲ (8,00 - 14,00)	4,00 ▲▲△△ (3,00 - 7,50)	37,00 (28,00 - 45,75)	10,00 ▲▲ (7,00 - 14,00)	5,00 ▲▲△△ (3,00 - 9,00)
temps de grimpe (s)	18,00 (12,00 - 37,50)	10,00 ▲▲ (7,00 - 15,00)	7,00 ▲▲△△ (6,00 - 10,75)	21,00 (15,00 - 47,00)	10,00 ▲▲ (7,00 - 18,50)	8,00 ▲▲△△ (5,00 - 12,00)	20,00 (13,00 - 31,25)	9,00 ▲▲ (6,00 - 13,75)	9,00 ▲▲ (6,00 - 16,75)
temps de rétablissement	12,00 (9,00 - 18,50)	4,00 ▲▲ (3,00 - 9,00)	3,00 ▲▲△△ (1,25 - 4,00)	12,00 (6,00 - 21,00)	6,00 (3,00 - 10,00)	4,00 ▲▲△△ (2,00 - 7,00)	11,00 (7,75 - 16,25)	6,50 ▲▲ (3,25 - 8,00)	3,50 ▲▲△△ (1,00 - 6,00)
temps total (s)	70,00 (61,00 - 105,00)	27,00 ▲▲ (21,00 - 33,00)	17,00 ▲▲△△ (13,00 - 20,00)	86,00 (59,50 - 111,50)	30,00 ▲▲ (23,50 - 39,00)	17,00 ▲▲△△ (14,00 - 26,00)	70,50 (51,75 - 93,50)	27,00 ▲▲ (21,00 - 36,50)	20,00 ▲▲△△ (15,25 - 28,75)
réussite (%)	95,00 ●	100,00	100,00	79,00	100,00	98,00	90,00	97,00	98,00

Les résultats sont présentés sous forme de médianes et les rangs sont indiqués entre parenthèses. Le chi-deux de Pearson, le test de Kruskal-Wallis et le test de Friedman ont été réalisés pour comparer les animaux des trois groupes. Les tests de Mann-Whitney et Wilcoxon ont été utilisés pour comparaisons multiples.

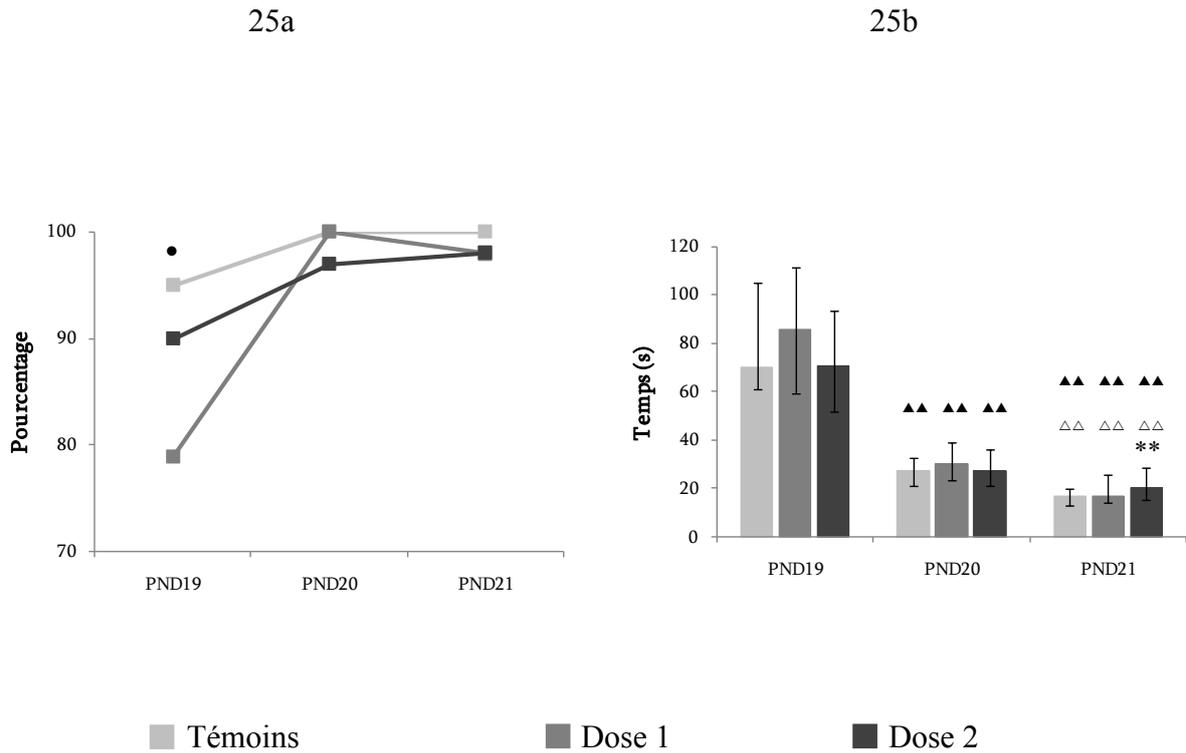
** : $p < 0,01$ différence statistiquement significative par rapport aux Témoins

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

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

● : $p < 0,05$ différence statistiquement significative entre les 3 groupes

Les résultats ont montré une différence significative entre les groupes concernant le pourcentage de réussite uniquement à PND19 (**Figure 25a**). Concernant les performances, les animaux exposés à la dose 2 mettent significativement plus de temps pour atteindre la plateforme que les animaux témoins à PND21 (**Figure 25b**), alors que l'ensemble des animaux met moins de temps pour réussir ce test au cours des trois jours (**Figure 25b**).



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

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

• : $p < 0,05$ différence statistiquement significative entre les 3 groupes

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

Figures 25 a et b : Pourcentage de réussite au test de la coordination locomotrice (25a) et temps mis par les animaux des trois groupes pour atteindre la plate-forme (médianes et quartiles) (25b)

III.3.7. Open-field

L'ANOVA à 1 facteur réalisée sur les données obtenues dans ce test a permis de mettre en évidence une augmentation significative du nombre de cases traversées et du nombre de redressements pour les animaux exposés à la dose 2 (Tableau 27).

Tableau 27 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante sur l'activité comportementale du jeune rat dans l'open-field à PND25

	Témoins		Dose 1		Dose 2		ANOVA	
							F(2, 106)	p
Nombre total de cases traversées	95,24	± 2,79	102,53	± 3,25	114,94	± 4,65 **	7,367	<0,01
Nombre total de redressements	19,43	± 1,48	23,14	± 1,9	28,15	± 2,12 **	5,447	<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 de Bonferroni a été utilisé pour comparaisons multiples.

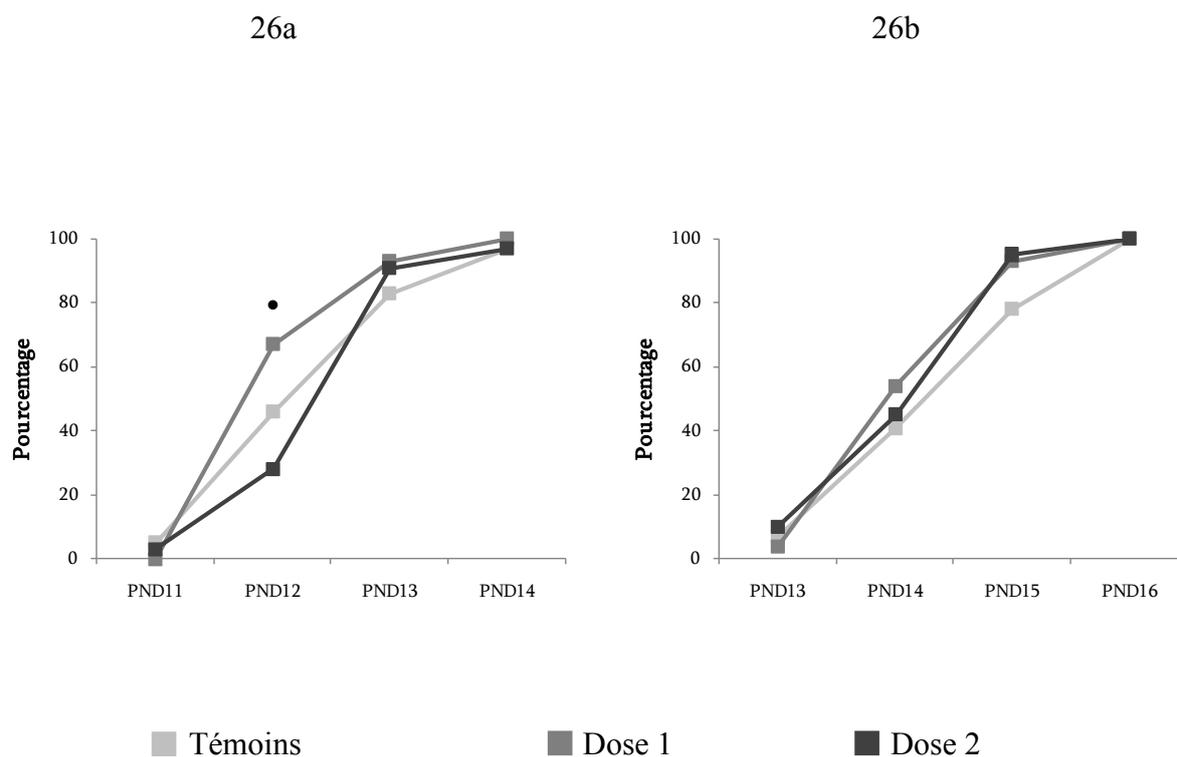
** : $p < 0,01$ différence statistiquement significative par rapport aux Témoins

III.3.8. Test du sursaut au bruit

L'analyse statistique des résultats a montré une différence significative entre les trois groupes, concernant le pourcentage d'animaux présentant une réactivité au bruit à PND12 (**Figure 26a**).

III.3.9. Ouverture des yeux

Aucune différence significative entre les trois groupes n'a été montrée, concernant le pourcentage d'animaux ayant les yeux ouverts entre PND13 et PND16 (**Figure 26b**).



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

- : $p < 0,05$ différence statistiquement significative entre les 3 groupes

Figures 26 a et b : Pourcentage d'animaux des trois groupes présentant une réactivité au bruit entre PND11 et PND14 (26a) et ayant les yeux ouverts entre PND13 et PND16 (26b)

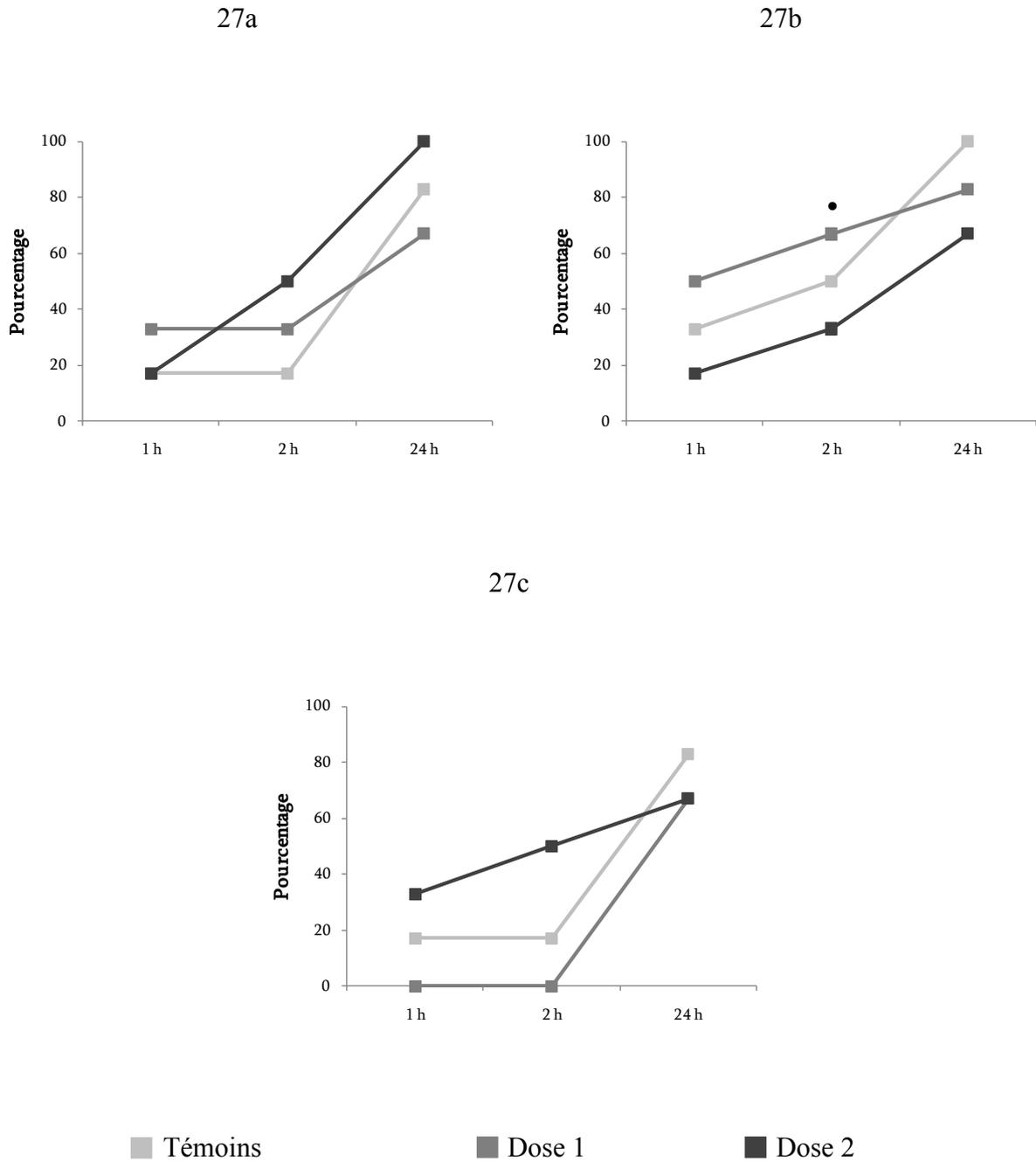
III.4. Comportement maternel

III.4.1. Construction du nid

Les femelles des trois groupes ont montré la même aptitude à construire un nid aux trois jours étudiés (PND3, 6 et 8). Seule une différence est observée après 2h à PND6 (**Figure 27a, 27b et 27c**).

III.4.2. Ramassage des jeunes

L'ANOVA à 2 facteurs, dont un répété, et le Chi-Deux de Pearson n'ont permis de révéler aucune différence significative, quelque soit la variable étudiée, dans le test de ramassage des jeunes (**Tableau 28**).



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

• : $p < 0,05$ différence statistiquement significative entre les 3 groupes

Figures 27a, b et c : Pourcentage de mères des trois groupes ayant construit un nid à PND3 (27a), PND6 (27b) et PND8 (27b)

Tableau 28 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante sur le comportement maternel de ramassage des jeunes

	1 ^{er} jour	2 ^{ème} jour	3 ^{ème} jour	groupe		jour de test		groupe*jour	
				F _(2,17)	P	F _(2,17)	P	F _(2,17)	P
Ramassage des jeunes (PND4, 7, 10)									
Temps de premier contact (s)									
Témoins	296,33 ± 199,48	375,67 ± 188,02	386,75 ± 146,79	1,902	n.s.	1,47	n.s.	0,476	n.s.
Dose 1	227,67 ± 138,42	160,40 ± 51,54	307,20 ± 203,11						
Dose 2	201,00 ± 172,88	111,75 ± 36,65	141,00 ± 20,15						
Temps de ramassage total (s)									
Témoins	541,50 ± 153,22	646,00 ± 166,44	792,33 ± 154,57	0,383	n.s.	1,799	n.s.	1,131	n.s.
Dose 1	672,50 ± 87,54	359,00 ± 81,16	671,83 ± 181,26						
Dose 2	813,67 ± 116,90	546,00 ± 187,80	685,67 ± 103,84						
Temps passé auprès des jeunes (s)									
Témoins	688,67 ± 148,21	385,50 ± 230,92	534,50 ± 367,50	0,353	n.s.	0,465	n.s.	1,863	n.s.
Dose 1	381,67 ± 130,80	540,60 ± 163,11	344,20 ± 194,18						
Dose 2	246,25 ± 97,13	207,33 ± 43,39	390,75 ± 118,59						
Reconstruction d'un nid (%)									
Témoins	0	0	0		n.s.				
Dose 1	67	33	17						
Dose 2	67	33	17						

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± E.S.M. Les variables de temps ont été étudiées par l'ANOVA à 2 facteurs, dont un répété. Le pourcentage d'animaux ayant reconstruit un nid a été analysé par le Chi-Deux de Pearson.

(Abréviations : PND, Post Natal Day)

III.5. Comportement individuel à l'âge adulte

III.5.1. Labyrinthe en croix surélevé

Dans ce labyrinthe, les animaux exposés à la dose 1 de HAP ont effectué significativement plus de passages dans chacune des zones (zc, BO, BF) et un plus grand nombre total de passages par rapport aux animaux témoins (**Tableau 29**). Par ailleurs, ces mêmes animaux ont passé significativement moins de temps en zc que les animaux témoins (**Tableau 29**).

L'ANOVA à 2 facteurs a permis de mettre en évidence un effet du sexe sur le comportement des animaux dans ce labyrinthe (**Tableau 29**). Les femelles ont ainsi visité un plus grand nombre de fois la zone centrale et les branches ouvertes, et ont effectué un plus grand nombre total de passages que les mâles (**Tableau 29**). De plus, elles ont effectué plus de redressements (**Tableau 29**).

Enfin, aucune interaction entre les facteurs exposition aux HAP et sexe n'a été mise en évidence, quelque soit la variable analysée (**Tableau 29**).

Tableau 29 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante sur l'activité comportementale du rat adulte dans le labyrinthe en croix surélevé

Variable	Témoin		Dose 1		Dose 2		groupe		sexe		groupe*sexe		
	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles	F (2,71)	p	F (2,71)	p	F (2,71)	p	
Nombre de passages	zone centrale	9,17 ± 0,64	12,10 ± 0,48	11,92 ± 1,05 **	14,25 ± 0,60 **	11,08 ± 0,60	12,50 ± 0,76	5,597	<0.01	14,055	<0.01	0,546	n.s.
	zone ouverte	5,17 ± 0,58	6,30 ± 0,52	6,67 ± 0,57 *	7,83 ± 0,46 **	5,67 ± 0,51	7,83 ± 0,77	3,459	<0.05	9,868	<0.01	0,52	n.s.
	zone fermée	3,83 ± 0,41	5,50 ± 0,34	5,70 ± 0,40 **	6,33 ± 0,56 **	5,00 ± 0,43 °	4,67 ± 0,40 °	5,626	<0.01	3,417	n.s.	2,692	n.s.
	Totaux	18,17 ± 1,31	23,90 ± 0,98	23,42 ± 2,09 **	28,42 ± 1,18 **	21,75 ± 1,14	25,00 ± 1,55	5,589	<0.01	15,48	<0.01	0,386	n.s.
	BO+BF	9,00 ± 0,69	11,80 ± 0,51	11,50 ± 1,04 **	14,17 ± 0,58 **	10,67 ± 0,56	12,50 ± 0,79	5,480	<0.01	16,672	<0.01	0,26	n.s.
	% entrées BO	0,60 ± 0,03	0,53 ± 0,03	0,57 ± 0,03	0,56 ± 0,03	0,55 ± 0,03	0,61 ± 0,03	0,275	n.s.	0,083	n.s.	2,076	n.s.
	% entrées BF	0,40 ± 0,03	0,47 ± 0,03	0,43 ± 0,03	0,45 ± 0,03	0,45 ± 0,03	0,39 ± 0,03	0,269	n.s.	0,083	n.s.	2,103	n.s.
% zone protégée	0,70 ± 0,02	0,72 ± 0,01	0,73 ± 0,01	0,72 ± 0,02	0,73 ± 0,01	0,69 ± 0,02	0,891	n.s.	0,471	n.s.	1,983	n.s.	
Temps (s)	zone centrale	87,14 ± 7,32	89,20 ± 7,96	64,08 ± 4,40 **	73,68 ± 5,33 **	78,35 ± 6,25^t	71,12 ± 5,14^t	5,066	<0.01	0,087	n.s.	0,971	n.s.
	BO	156,54 ± 9,89	131,69 ± 13,27	154,77 ± 13,74	156,69 ± 11,45	149,08 ± 12,11	168,21 ± 10,12	0,836	n.s.	0,017	n.s.	1,754	n.s.
	BF	60,38 ± 6,13	79,12 ± 7,93	72,87 ± 12,57	74,24 ± 8,43	64,71 ± 5,70	60,67 ± 6,86	0,854	n.s.	0,592	n.s.	0,939	n.s.
Head dipping	Totaux	11,25 ± 0,92	14,70 ± 1,61	13,58 ± 1,04	14,83 ± 1,13	11,58 ± 1,49	17,50 ± 0,88	1,588	n.s.	0,031	n.s.	2,777	n.s.
	% head dipping en BO	0,67 ± 0,07	0,64 ± 0,06	0,80 ± 0,03	0,76 ± 0,05	0,70 ± 0,06	0,80 ± 0,03	3,042	n.s.	0,048	n.s.	1,019	n.s.
Redressements	Totaux	12,25 ± 1,22	14,70 ± 1,24	12,17 ± 1,31	13,33 ± 0,85	16,42 ± 1,38	13,33 ± 1,29	0,932	n.s.	13,236	<0.01	1,984	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 de Bonferroni a été utilisé pour comparaisons multiples.

t : $p = 0,060$

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

° : $p < 0,05$ différence statistiquement significative par rapport au groupe Dose 1

n.s. : non significatif

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

III.5.2. Open-field

Dans ce test, aucune différence significative n'a été observée en considérant l'exposition des animaux aux HAP comme facteur de comparaison (**Tableau 30**).

Par contre, l'analyse statistique montre une activité plus importante des femelles par rapport aux mâles, reflétée par un nombre plus élevé de cases totales traversées, ainsi que de cases parcourues dans les zones intermédiaire, ouverte et périphérique (**Tableau 30**). De plus, les femelles passent plus de temps dans la zone intermédiaire (**Tableau 30**).

Enfin, aucune interaction entre le traitement et le sexe n'a été révélée (**Tableau 30**).

Tableau 30 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante sur l'activité comportementale du rat adulte dans l'open field

Variable	Témoïn		Dose 1		Dose 2		groupe		sexe		groupe*sexe		
	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles	F (2, 71)	p	F (2, 71)	p	F (2, 71)	p	
Nombre de cases traversées	zc	8,17 ± 1,05	8,91 ± 0,87	7,42 ± 1,31	9,58 ± 1,65	8,17 ± 0,91	10,18 ± 1,29	0,192	n.s.	2,715	n.s.	0,205	n.s.
	zi	23,75 ± 2,53	29,33 ± 3,26	21,42 ± 2,84	33,00 ± 2,42	27,83 ± 3,40	37,08 ± 5,37	1,757	n.s.	9,632	<0.01	0,377	n.s.
	zo	31,92 ± 3,31	39,42 ± 4,37	28,83 ± 3,77	45,00 ± 4,10	36,00 ± 4,01	48,17 ± 6,56	1,156	n.s.	10,686	<0.01	0,470	n.s.
	zp	76,58 ± 9,05	107,67 ± 9,38	98,92 ± 7,50	121,75 ± 4,56	92,25 ± 5,64	104,00 ± 8,47	2,950	n.s.	12,310	<0.01	0,806	n.s.
	totale	108,50 ± 11,40	147,08 ± 11,08	127,75 ± 8,67	166,75 ± 5,22	128,25 ± 6,44	152,17 ± 11,44	2,209	n.s.	19,535	<0.01	0,42	n.s.
Temps (s)	zc	15,75 ± 1,80	12,12 ± 0,99	17,25 ± 2,91	17,79 ± 3,48	14,63 ± 1,68	16,46 ± 1,18	1,264	n.s.	0,051	n.s.	0,777	n.s.
	zi	41,31 ± 3,38	38,27 ± 5,05	28,00 ± 3,33	38,50 ± 3,10	35,62 ± 4,66 °	56,45 ± 8,43 °	3,262	<0.05	5,323	<0.05	2,856	n.s.
	zo	58,08 ± 4,35	52,63 ± 6,31	45,25 ± 5,43	56,29 ± 5,28	50,25 ± 5,55	74,73 ± 9,90	1,710	n.s.	3,695	n.s.	2,755	n.s.
	zp	241,92 ± 4,35	247,37 ± 6,31	254,76 ± 5,43	243,71 ± 5,28	249,75 ± 5,55	225,27 ± 9,90	1,710	n.s.	3,696	n.s.	2,755	n.s.
Redressements	26,75 ± 2,58	29,83 ± 3,49	32,75 ± 4,82	34,33 ± 4,94	36,08 ± 3,98	39,92 ± 4,09	2,864	n.s.	0,730	n.s.	0,040	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 de Bonferroni a été utilisé pour comparaisons multiples.

□: $p < 0,05$ différence statistiquement significative par rapport au groupe Dose 1

n.s. : non significatif

(Abréviations :zc, zone centrale ; zi, zone intermédiaire ; zo, zone ouverte ; zp, zone périphérique)

III.5.3. Labyrinthe en Y

L'analyse des données relevées à l'issue de ce test a montré d'une part que les animaux exposés aux HAP effectuent plus de redressements que les animaux témoins, mais seule l'augmentation observée à la dose 2 est significative. Par ailleurs, les animaux exposés à la dose 1 visitent un nombre de branches significativement plus élevé que les animaux témoins (**Tableau 31**).

Un effet du sexe sur le comportement des animaux a également été mis en évidence (**Tableau 31**). Ainsi, par rapport aux mâles, les femelles effectuent significativement plus de redressements, visitent plus de branches à la première minute et en 10 minutes, et ont un pourcentage de triplets justes plus faible (**Tableau 31**).

Enfin, aucune interaction entre les deux facteurs analysés n'a été observée (**Tableau 31**).

Tableau 31 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante sur l'activité comportementale du rat adulte dans le labyrinthe en Y

Variable	Témoïn		Dose 1		Dose 2		groupe		sexe		groupe*sexe	
	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles	F (2,79)	p	F (2,79)	p	F (2,79)	p
Nombre de redressements	59,58 ± 2,78	72,60 ± 2,65	69,33 ± 4,44^t	80,00 ± 2,95^t	72,75 ± 5,80^{**}	83,25 ± 4,37^{**}	4,418	<0,05	11,708	<0,01	0,058	n.s.
Nombre total de branches visitées	25,50 ± 1,25	28,36 ± 0,97	30,00 ± 1,81[*]	33,42 ± 1,86[*]	27,17 ± 2,12	30,75 ± 1,52	3,995	<0,05	5,770	<0,05	0,025	n.s.
% de triplets justes	63,06 ± 3,26	52,28 ± 2,84	59,94 ± 2,90	58,67 ± 2,29	59,80 ± 3,11	55,03 ± 4,37	0,218	n.s.	4,783	<0,05	1,249	n.s.
Nombre de branches visitées à la 1ère minute	3,75 ± 0,28	4,67 ± 0,22	4,67 ± 0,31	5,08 ± 0,26	4,08 ± 0,34	4,50 ± 0,47	2,536	n.s.	4,905	<0,05	0,400	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 de Bonferroni a été utilisé pour comparaisons multiples.

t : $p = 0,053$

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

n.s. : non significatif

III.5.4. Labyrinthe radial à 8 branches

L'analyse statistique réalisée sur les données relevées au cours de 10 jours de test consécutifs dans le labyrinthe radial à 8 branches n'a révélé aucun effet significatif de l'exposition aux HAP, quelque soit la variable étudiée (**Tableau 33**).

Un effet significatif du facteur sexe a été observé (**Tableau 33**). Ainsi, les femelles explorent les 8 branches du dispositif plus rapidement et visitent plus de branches par minute que les mâles (**Tableau 32**).

Au cours du temps, les animaux des trois groupes ont significativement amélioré leurs performances (**Tableau 33**), en exécutant le test plus rapidement, en diminuant le nombre de branches parcourues, en faisant moins d'erreurs et en augmentant le nombre de branches visitées par minute (**Tableau 32**).

Aucune interaction entre l'exposition aux HAP et le sexe, entre l'exposition et le jour de test, entre le sexe et le jour de test, ou entre ces trois facteurs n'a été observée (**Tableau 33**).

Tableau 32 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante sur l'activité comportementale du rat adulte dans le labyrinthe radial à 8 branches (1/2)

Variable	Jour 1		Jour 6		Jour 10	
	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles
Temps total (s)						
Témoins	144,83 ± 17,34	109,42 ± 13,43	70,67 ± 8,09	61,67 ± 4,77	59,08 ± 9,03	53,83 ± 4,98
Dose 1	153,25 ± 20,06	110,75 ± 12,21	66,75 ± 6,65	65,92 ± 5,05	61,25 ± 9,55	54,42 ± 5,84
Dose 2	129,83 ± 18,83	123,25 ± 9,86	65,17 ± 6,44	55,17 ± 6,06	44,92 ± 3,04	46,67 ± 2,62
Nombre total de branches visitées						
Témoins	11,92 ± 0,72	11,75 ± 0,86	9,67 ± 0,54	10,83 ± 0,97	9,33 ± 0,84	9,50 ± 0,50
Dose 1	12,67 ± 0,85	12,33 ± 0,83	9,08 ± 0,31	11,17 ± 0,68	9,25 ± 0,74	9,75 ± 0,59
Dose 2	11,92 ± 1,16	13,08 ± 0,88	9,92 ± 0,68	10,33 ± 0,93	8,75 ± 0,30	9,25 ± 0,35
Nombre de branches visitées avant la 1ère erreur						
Témoins	5,33 ± 0,36	5,67 ± 0,48	6,42 ± 0,54	6,08 ± 0,50	7,17 ± 0,51	6,50 ± 0,53
Dose 1	4,50 ± 0,42	4,42 ± 0,53	6,83 ± 0,42	6,09 ± 0,28	7,33 ± 0,33	6,75 ± 0,45
Dose 2	5,00 ± 0,49	5,42 ± 0,34	6,75 ± 0,33	6,25 ± 0,52	6,83 ± 0,47	6,75 ± 0,30
Nombre de branches visitées/min						
Témoins	5,51 ± 0,63	6,85 ± 0,45	9,18 ± 0,89	10,65 ± 0,55	10,70 ± 1,00	11,05 ± 0,54
Dose 1	5,47 ± 0,45	7,05 ± 0,38	8,72 ± 0,56	10,47 ± 0,55	10,03 ± 0,74	11,36 ± 0,62
Dose 2	5,81 ± 0,30	6,74 ± 0,60	9,53 ± 0,54	11,70 ± 0,67	12,10 ± 0,92	12,16 ± 0,57

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

Tableau 33 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante sur l'activité comportementale du rat adulte dans le labyrinthe radial à 8 branches (2/2)

Variable	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)	0,720	n.s.	5,263	<0.05	104,720	<0.01	0,493	n.s.	0,157	n.s.	2,868	n.s.	0,717	n.s.
Nombre total de branches visitées	0,116	n.s.	2,677	n.s.	27,031	<0.01	0,090	n.s.	0,363	n.s.	0,829	n.s.	0,624	n.s.
Nombre de branches visitées avant la 1ère erreur	0,491	n.s.	1,732	n.s.	25,418	<0.01	0,424	n.s.	1,366	n.s.	1,129	n.s.	0,102	n.s.
Nombre de branches visitées/min	1,605	n.s.	9,262	<0.01	199,173	<0.01	0,172	n.s.	1,487	n.s.	2,708	n.s.	0,524	n.s.

Les effets principaux et l'interaction étudiés par l'ANOVA à 3 facteurs, dont un répété sont présentés avec les valeurs de F obtenues et la probabilité correspondante.

n.s. : non significatif

III.6. Comportement social à l'âge adulte

Les données relevées pour étudier le comportement social des animaux seront décrites comme suit : tout d'abord le comportement des animaux dans les différents groupes sera présenté, puis l'influence de l'exposition prénatale aux HAP sera décrite.

III.6.1. Analyse de l'ensemble des groupes

III.6.1.1. Différenciation comportementale : Transporteurs et Non Transporteurs

Rappelons qu'au sein de chaque groupe expérimental, deux profils différents peuvent être adoptés par les animaux. Les rats peuvent ainsi être Transporteurs, c'est-à-dire aller chercher des croquettes à l'extrémité du dispositif et les ramener dans la boîte de départ ; ou Non Transporteurs, c'est-à-dire ne jamais plonger, et se nourrir des croquettes apportées par les animaux Transporteurs. Au terme de la mise en eau complète du dispositif, des rats du type Non Transporteurs sont apparus dans tous les groupes (**Tableau 34**), le phénomène de différenciation sociale s'est donc complètement manifesté. La répartition 2 Transporteurs/4 Non Transporteurs est majoritaire.

Tableau 34 : Répartition des animaux en Transporteurs et Non Transporteurs au sein de chaque groupe expérimental

	Groupe	Transporteurs	Non Transporteurs	Significativité
Témoins et Dose 1	Groupe 2	1	5	<0,05
	Groupe 6	2	4	
	Groupe 7	2	4	
	Groupe 8	1	5	
	Groupe 9	1	5	
	Groupe 10	5	1	
	Total	12	24	
Témoins et Dose 2	Groupe 1	3	3	n.s.
	Groupe 3	2	4	
	Groupe 4	2	4	
	Groupe 5	2	4	
	Groupe 11	4	2	
	Groupe 12	4	2	
	Total	17	19	

La répartition des animaux a été analysée par le Chi-Deux de Pearson.
n.s. : non significatif

La différenciation observée ici est comparable à celle que l'on rencontre généralement dans cette situation (Desor, 1994), et aucun groupe ne comporte 0 ou 6 Transporteurs. La proportion d'animaux de chaque profil classiquement observée est de 50%. Cette proportion est respectée dans le cas des groupes expérimentaux composés d'animaux témoins et d'animaux exposés à la dose 2 de HAP (test du Chi-deux non significatif). Néanmoins, le nombre de Transporteurs et de Non Transporteurs au sein des groupes comportant des animaux témoins et des animaux exposés à la dose 1 de HAP sont respectivement significativement inférieur et supérieur aux nombres attendus (Test du Chi-Deux significatif).

III.6.1.2. Nombre moyen de transports effectués

Le nombre de transports effectués au sein de chaque groupe expérimental, calculé en fonction du nombre d'animaux Transporteurs, est présenté au Tableau 35.

Tableau 35 : Nombre de transports effectués par les animaux Transporteurs au sein de chaque groupe expérimental

	Groupe	Nombre de transports	
Témoins et Dose 1	Groupe 2	8,00	(8,00-8,00)
	Groupe 6	7,00	(7,00-7,00)
	Groupe 7	2,00	(0,00-8,00)
	Groupe 8	2,00	(2,00-2,00)
	Groupe 9	12,00	(12,00-12,00)
	Groupe 10	3,00	(2,00-4,00)
Témoins et Dose 2	Groupe 1	7,00	(2,00-10,00)
	Groupe 3	6,50	(6,00-7,00)
	Groupe 4	6,00	(4,00-8,00)
	Groupe 5	5,00	(4,00-6,00)
	Groupe 11	3,50	(3,00-4,75)
	Groupe 12	5,50	(2,75-7,50)

Le nombre de transports est présenté sous forme de médianes et les rangs sont indiqués entre parenthèses.

III.6.1.3. Différenciation comportementale : Ravitailleurs et Autonomes

Parmi les rats Transporteurs, deux sous-catégories peuvent être identifiées. Les animaux dits Ravitailleurs vont chercher de la nourriture, la ramènent dans la cage de départ et se la

font voler. Les animaux dits Autonomes consomment eux-mêmes la nourriture qu'ils ont rapportée. Ainsi, l'analyse des données a permis de scinder le groupe des animaux Transporteurs en Transporteurs Ravitailleurs et en Transporteurs Autonomes (**Tableau 36**).

Tableau 36 : Répartition des animaux Transporteurs en Ravitailleurs et Autonomes au sein de chaque groupe expérimental

		Groupe	Ravitailleurs	Autonomes
Témoins et Dose 1		Groupe 2	1	0
		Groupe 6	2	0
		Groupe 7	2	0
		Groupe 8	1	0
		Groupe 9	1	0
		Groupe 10	1	4
		Total	8	4
Témoins et Dose 2		Groupe 1	1	2
		Groupe 3	2	0
		Groupe 4	2	0
		Groupe 5	1	1
		Groupe 11	1	3
		Groupe 12	1	3
		Total	8	9

III.6.1.4. Transferts de nourriture

De manière classique, pour les groupes expérimentaux composés de 3 animaux témoins et de 3 animaux exposés à la dose 1 de HAP, le transfert majoritaire de nourriture (84,05%) se fait des animaux Transporteurs vers les animaux Non Transporteurs (**Tableau 37**).

Tableau 37 : Transferts de nourriture au sein des groupes composés d'animaux témoins et d'animaux exposés à la Dose 1

		Destination	
		Transporteurs	Non Transporteurs
Origine	Transporteurs	4,23%	84,05%
	Non Transporteurs	0,74%	10,98%

La situation habituellement observée est également retrouvée pour les groupes expérimentaux composés de 3 animaux témoins et de 3 animaux exposés à la dose 2 de HAP, pour lesquels le transfert majoritaire de nourriture (82,64%) se fait également des animaux Transporteurs vers les animaux Non Transporteurs (**Tableau 38**).

Tableau 38 : Transferts de nourriture au sein des groupes composés d'animaux témoins et d'animaux exposés à la Dose 2

		Destination	
		Transporteurs	Non Transporteurs
Origine	Transporteurs	6,14%	82,64%
	Non Transporteurs	4,34%	6,87%

III.6.2. Influence de l'exposition prénatale à la dose 1 de HAP sur le comportement social

III.6.2.1. Différenciation comportementale : Transporteurs et Non Transporteurs

L'analyse statistique des données n'a pas montré d'influence significative de l'exposition prénatale aux HAP à la dose 1 sur la répartition des animaux en Transporteurs et Non Transporteurs (**Tableau 39**).

Tableau 39 : Répartition des animaux des groupes Témoin et Dose 1 en Transporteurs et Non Transporteurs

Groupe	Transporteurs	Non Transporteurs	Significativité
Témoin	6	12	n.s.
Dose 1	6	12	

La répartition des animaux a été analysée par le Chi-Deux de Pearson.

n.s. : non significatif

III.6.2.2. Nombre moyen de transports effectués

Le traitement statistique des résultats n'a pas mis en évidence d'influence significative de l'exposition prénatale aux HAP à la dose 1 sur le nombre de transports effectués (**Tableau 40**).

Tableau 40 : Nombre de transports effectués par les animaux Transporteurs des groupes Témoin et Dose 1

Groupe	Nombre de transports	Significativité
Témoin	4,00 (2,00-7,25)	n.s.
Dose 1	5,00 (2,50-9,00)	

Le nombre de transports est présenté sous forme de médianes et les rangs sont indiqués entre parenthèses. L'effet du traitement a été étudié par le test de Mann-Whitney.

n.s. : non significatif

III.6.2.3. Différenciation comportementale : Ravitailleurs et Autonomes

Le test de Fisher n'a pas montré de différence significative concernant le nombre de Ravitailleurs et le nombre d'Autonomes parmi les animaux témoins et les animaux exposés à la dose 1 (**Tableau 41**).

Tableau 41 : Répartition des animaux Transporteurs des groupes Témoin et Dose 1 en Ravitailleurs et Autonomes

Groupe	Ravitailleurs	Autonomes	Significativité
Témoin	5	1	n.s.
Dose 1	3	3	

La répartition des animaux a été analysée par le test de Fisher.

n.s. : non significatif

III.6.2.4. Transferts de nourriture

Deux transferts majoritaires différents et équivalents sont identifiés, d'une part à partir des animaux Transporteurs exposés à la dose 1 vers les animaux Non Transporteurs témoins (29,56%); et d'autre part des animaux Transporteurs témoins vers les animaux Non Transporteurs exposés à la dose 1 (29,38%) (**Tableau 42**).

Tableau 42 : Transferts de nourriture en fonction de l'exposition, au sein des groupes composés d'animaux témoins et d'animaux exposés à la Dose 1

		Destination			
		Témoin Transporteurs	Témoins Non Transporteurs	Dose 1 Transporteurs	Dose 1 Non Transporteurs
Origine	Témoin Transporteurs	0,48%	11,34%	1,14%	29,38%
	Témoins Non Transporteurs	0,00%	2,86%	0,00%	1,60%
	Dose 1 Transporteurs	0,00%	29,56%	0,00%	16,38%
	Dose 1 Non Transporteurs	0,00%	3,00%	0,74%	3,53%

III.6.3. Influence de l'exposition prénatale à la dose 2 de HAP sur le comportement social

III.6.3.1. Différenciation comportementale : Transporteurs et Non Transporteurs

L'analyse statistique des données n'a pas mis en évidence de modifications de la répartition des animaux en Transporteurs et Non Transporteurs entre les témoins et les animaux exposés à la dose 2 (**Tableau 43**).

Tableau 43 : Répartition des animaux des groupes Témoin et Dose 2 en Transporteurs et Non Transporteurs

Groupe	Transporteurs	Non Transporteurs	Significativité
Témoin	9	9	n.s.
Dose 2	8	10	

La répartition des animaux a été analysée par le Chi-Deux de Pearson.

n.s. : non significatif

III.6.3.2. Nombre de transports effectués

L'analyse statistique des données n'a montré aucune influence significative de l'exposition prénatale aux HAP à la dose 2 sur le nombre de transports effectués (**Tableau 44**).

Tableau 44 : Nombre de transports effectués par les animaux Transporteurs des groupes Témoin et Dose 2

Groupe	Nombre de transports	Significativité
Témoin	5,00 (3,50-7,00)	n.s.
Dose 2	5,00 (3,25-7,50)	

Le nombre de transports est présenté sous forme de médianes et les rangs sont indiqués entre parenthèses. L'effet du traitement a été étudié par le test de Mann-Whitney.

n.s. : non significatif

III.6.3.3. Différenciation comportementale : Ravitailleurs et Autonomes

A nouveau, le test de Fisher n'a pas montré de différence significative concernant le nombre de Ravitailleurs et le nombre d'Autonomes parmi les animaux témoins et les animaux exposés à la dose 1 (**Tableau 45**).

Tableau 45 : Répartition des animaux Transporteurs des groupes Témoin et Dose 2 en Ravitailleurs et Autonomes

Groupe	Ravitailleurs	Autonomes	Significativité
Témoin	5	4	n.s.
Dose 2	3	5	

La répartition des animaux a été analysée par le test de Fisher.

n.s. : non significatif

III.6.3.4. Transferts de nourriture

L'analyse des flux de nourriture montre que deux transferts majoritaires différents sont identifiés, d'une part à partir des animaux Transporteurs témoins vers les animaux Non Transporteurs exposés à la dose 2 (29,61%) ; et d'autre part des animaux Transporteurs exposés à la dose 2 vers les animaux Non Transporteurs témoins (18,40%) (**Tableau 46**). Ainsi, les Transporteurs témoins contribuent quantitativement de manière plus importante que les Transporteurs exposés aux HAP au ravitaillement des groupes. Les Non Transporteurs témoins ravitaillent majoritairement les Non Transporteurs exposés aux HAP par rapport aux Non Transporteurs témoins ; alors que la nourriture ramenée par les Transporteurs témoins est répartie de manière équivalente entre les animaux Non Transporteurs témoins ou exposés.

Tableau 46 : Transferts de nourriture en fonction de l'exposition, au sein des groupes composés d'animaux témoins et d'animaux exposés à la Dose 2

		Destination			
		Témoin Transporteurs	Témoins Non Transporteurs	Dose 2 Transporteurs	Dose 2 Non Transporteurs
Origine	Témoin Transporteurs	0,00%	13,51%	4,97%	29,61%
	Témoins Non Transporteurs	0,42%	0,00%	1,76%	2,57%
	Dose 2 Transporteurs	2,45%	18,40%	2,80%	13,01%
	Dose 2 Non Transporteurs	4,02%	1,97%	0,00%	4,48%

Ce schéma est en fait la résultante directe de l'absence d'influence de l'exposition prénatale aux HAP, quelle que soit la dose, sur la différenciation comportementale en animaux Transporteurs et Non Transporteurs. Comme la proportion d'animaux Transporteurs issue des animaux témoins ou des animaux exposés n'est pas significativement différente, les transferts de nourriture s'effectuent indifféremment des animaux Transporteurs Témoins ou exposés, vers les animaux Non Transporteurs témoins ou exposés.

III.7. Analyses histologiques

Le tableau 47 présente l'ensemble des modifications de l'activité enzymatique de la cytochrome oxydase, en termes de nombres de structures pour lesquelles des diminutions ou des augmentations d'activité ont été observées, par rapport aux témoins, aux deux doses administrées, et aux trois stades étudiés.

Tableau 47 : Nombre de structures cérébrales qui présentent des différences significatives d'activité de la cytochrome oxydase par rapport aux animaux témoins, à PND10, PND21 et PND60

		PND10	PND21	PND60
Dose 1	Nombre de structures cérébrales pour lesquelles une diminution de l'activité de la cytochrome oxydase est observée	1	5	1
	Nombre de structures cérébrales pour lesquelles une augmentation de l'activité de la cytochrome oxydase est observée	3	1	0
Dose 2	Nombre de structures cérébrales pour lesquelles une diminution de l'activité de la cytochrome oxydase est observée	1	1	1
	Nombre de structures cérébrales pour lesquelles une augmentation de l'activité de la cytochrome oxydase est observée	9	3	1

III.7.1. PND10

III.7.1.1. Système sensoriel

A ce stade, au niveau des systèmes sensoriels, l'ANOVA à 1 facteur a montré que l'activité de la cytochrome oxydase est significativement plus élevée pour les animaux exposés aux deux doses de HAP par rapport aux animaux témoins, et cela uniquement au

niveau du cortex auditif (**Tableau 48**). Elle est également plus élevée au niveau du colliculus supérieur et des noyaux vestibulaires, pour les animaux exposés à la dose 2 (**Tableau 48**).

Tableau 48 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante sur l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase à PND 10 (1/8)

Structure	Témoïn	Dose 1	Dose 2	ANOVA	
				F (2,14)	P
A) Systèmes sensoriels					
1. Système auditif					
1.1 Cortex auditif	20,67 ± 0,60	23,61 ± 0,86 *	23,48 ± 0,56 *	5,618	<0,01
1.2 Colliculus inférieur	26,90 ± 1,26	28,37 ± 0,74	28,49 ± 1,15	0,678	n.s.
1.3 Olive supérieure	34,59 ± 1,51	29,70 ± 0,75	35,95 ± 1,54 °	4,910	<0,05
1.4 Noyau cochléaire	42,69 ± 1,42	41,39 ± 1,93	44,86 ± 1,77	1,056	n.s.
2. Système visuel					
2.1 Cortex visuel	19,27 ± 0,70	21,07 ± 1,03	21,48 ± 0,75	1,961	n.s.
2.2 Colliculus supérieur	20,58 ± 0,61	22,52 ± 0,73	23,03 ± 0,62 *	3,810	<0,05
2.3 Olive inférieure	32,22 ± 1,22	38,65 ± 1,12	34,78 ± 1,68	2,084	n.s.
3. Système vestibulaire					
3.1 Noyaux vestibulaires	41,48 ± 0,85	40,84 ± 1,16	45,50 ± 1,03 *°°	6,213	<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 de Bonferroni a été utilisé pour comparaisons multiples.

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

°° : $p < 0,01$; ° : $p < 0,05$ différence statistiquement significative par rapport au groupe Dose 1

n.s. : non significatif

III.7.1.2. Système moteur

L'activité enzymatique de la cytochrome oxydase est significativement plus élevée au niveau du noyau caudé pour l'ensemble des animaux exposés par rapport aux animaux témoins (**Tableau 49**). De plus, pour les animaux exposés à la dose 2, elle est significativement plus élevée au niveau de la substance noire (**Tableau 49**).

Tableau 49 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante sur l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase à PND 10 (2/8)

Structure	Témoïn	Dose 1	Dose 2	ANOVA	
				F (2,14)	P
B) Système moteur					
1. Cortex moteur primaire	20,55 ± 0,95	20,44 ± 1,17	23,16 ± 1,22	1,915	n.s.
2. Cortex sensori-moteur	24,25 ± 0,98	26,69 ± 1,13	30,34 ± 0,90	9,948	<0,01
3. Noyau caudé	21,12 ± 0,69	23,38 ± 0,47 *	23,92 ± 0,50 **	6,873	<0,01
4. Globus pallidus	18,72 ± 0,62	19,08 ± 0,79	20,93 ± 0,56 *	3,442	<0,05
5. Noyaux subthalamiques	38,60 ± 1,08	38,72 ± 0,93	39,25 ± 0,82	0,137	n.s.
6. Substance noire	23,26 ± 0,34	24,49 ± 0,45	28,35 ± 1,50 ***°	7,627	<0,01
7. Noyau rouge	35,10 ± 1,21	37,88 ± 1,10	38,88 ± 1,32	2,569	n.s.
8. Noyaux cérébelleux					
- Noyau denté	34,99 ± 1,06	37,79 ± 1,63	38,10 ± 1,31	1,482	n.s.
- Noyau interpositus	41,01 ± 1,10	43,54 ± 1,51	40,98 ± 1,10	1,357	n.s.
- Noyau fastigial	37,18 ± 0,57	38,02 ± 0,76	34,35 ± 1,24 °	4,159	<0,05
9. Cellules cérébelleuses					
Couche granulaire	28,39 ± 2,68	30,33 ± 2,15	26,24 ± 1,65	1,132	n.s.
Couche de Purkinje		35,46 ± 2,13	34,50 ± 1,67	0,129	n.s.
Couche moléculaire	18,26 ± 2,59	20,60 ± 1,26	21,88 ± 1,39	0,918	n.s.
10. Nerf trijumeau	36,99 ± 0,72	39,38 ± 2,59	40,51 ± 1,07	1,061	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 de Bonferroni a été utilisé pour comparaisons multiples.

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

° : $p < 0,05$ différence statistiquement significative par rapport au groupe Dose 1

n.s. : non significatif

III.7.1.3. Tronc cérébral

L'analyse statistique a montré que l'activité de la cytochrome oxydase est significativement plus élevée au niveau de la formation réticulée mésencéphalique pour les animaux exposés à la dose 2, par rapport aux animaux témoins (Tableau 50).

Tableau 50 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante sur l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase à PND 10 (3/8)

Structure	Témoïn	Dose 1	Dose 2	ANOVA	
				F (2,14)	P
C) Tronc cérébral					
1. Noyau du raphé					
1.1 Dorsal	17,41 ± 1,59	19,63 ± 1,25	18,75 ± 1,38	0,624	n.s.
1.2 Médian	24,91 ± 0,32	22,35 ± 2,38	25,45 ± 0,77	1,549	n.s.
1.3 Locus coeruleus					
1.4 Noyaux gris pontiques	27,82 ± 1,02	26,89 ± 1,07	28,86 ± 0,51	0,887	n.s.
2. Tractus nerveux					
Formation réticulée mésencéphalique	17,42 ± 0,63	18,32 ± 0,50	19,69 ± 0,60 *	3,779	<0,05
3. Matière grise centrale					
3.1 Noyau interpédonculaire	37,92 ± 1,12	41,29 ± 3,07	37,15 ± 3,05	0,697	n.s.
3.2 Matière grise périaqueducatale					
antérieure ventrolatérale					
antérieure latérale					
postérieure dorsolatérale	17,35 ± 0,52	18,62 ± 0,69	18,42 ± 0,78	1,025	n.s.
postérieure latérale	15,62 ± 0,24	16,51 ± 0,73	17,46 ± 0,81	1,640	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 de Bonferroni a été utilisé pour comparaisons multiples.

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

n.s. : non significatif

III.7.1.4. Cortex cérébraux

Le traitement statistique des données a mis en évidence une augmentation significative de l'activité de la cytochrome oxydase par rapport aux animaux témoins, pour les animaux exposés à la dose 2 au niveau du cortex frontal et du cortex piriforme (**Tableau 51**).

Tableau 51 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante sur l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase à PND 10 (4/8)

Structure	Témoïn	Dose 1	Dose 2	ANOVA	
				F (2,14)	P
D) Cortex cérébraux					
1. Cortex frontal	22,15 ± 1,14	25,08 ± 0,96	25,83 ± 0,88 *	3,833	<0,05
2. Cortex cingulaire antérieur	23,15 ± 1,05	23,48 ± 1,25	26,77 ± 1,40	2,625	n.s.
3. Cortex piriforme	25,24 ± 1,17	26,23 ± 0,75	33,13 ± 1,03 **°°	17,635	<0,01
4. Cortex entorhinal	23,32 ± 0,93	22,89 ± 1,24	22,62 ± 0,37	0,131	n.s.
5. Cortex périrhinal	22,71 ± 0,74	22,43 ± 1,25	22,59 ± 0,61	0,024	n.s.
6. Cortex pariétal	23,33 ± 0,80	24,65 ± 1,36	25,24 ± 0,49	1,272	n.s.
7. Cortex temporal	18,06 ± 0,50	19,01 ± 1,10	19,31 ± 0,80	0,609	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 de Bonferroni a été utilisé pour comparaisons multiples.

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

°° : $p < 0,01$ différence statistiquement significative par rapport au groupe Dose 1

n.s. : non significatif

III.7.1.5. Noyaux thalamiques

Concernant l'activité de la cytochrome oxydase au niveau des noyaux thalamiques, l'ANOVA à 1 facteur a montré une augmentation significative au niveau des noyaux antérieurs par rapport aux animaux témoins, uniquement pour les animaux exposés à la dose 1 de HAP (Tableau 52).

Tableau 52 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante sur l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase à PND 10 (5/8)

Structure	Témoin	Dose 1	Dose 2	ANOVA	
				F (2,14)	P
E) Noyaux thalamiques					
1. Moteur					
1.1 Ventrolateral	28,13 ± 0,87	27,18 ± 1,07	28,42 ± 1,05	0,423	n.s.
1.2 Ventromédial	23,97 ± 1,01	24,42 ± 0,88	22,76 ± 1,53	0,535	n.s.
2. Associatif					
2.1 Médiodorsal	19,44 ± 1,22	16,75 ± 0,78	17,69 ± 0,78	2,098	n.s.
2.2 Noyaux antérieurs	25,03 ± 1,37	28,38 ± 0,58 *	24,82 ± 0,59 °	5,591	<0,01
3. Sensitif					
3.1 Noyaux postérieurs	18,11 ± 0,93	17,38 ± 0,80	19,61 ± 0,50	2,236	n.s.
3.2 Corps genouillé médian	24,23 ± 1,36	26,62 ± 1,85	25,69 ± 1,78	0,546	n.s.
3.3 Corps genouillé latéral	15,09 ± 0,66	13,58 ± 0,84	15,08 ± 0,90	1,162	n.s.
5. Zona incerta					
	10,47 ± 1,19	10,12 ± 1,11	10,48 ± 0,99	0,036	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 de Bonferroni a été utilisé pour comparaisons multiples.

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

° : $p < 0,05$ différence statistiquement significative par rapport au groupe Dose 1

n.s. : non significatif

III.7.1.6. Noyaux hypothalamiques

Au niveau des noyaux hypothalamiques, l'ANOVA à 1 facteur a montré une diminution significative de l'activité de la cytochrome oxydase au niveau du noyau postérieur par rapport aux animaux témoins, pour les animaux exposés à la dose 1 (Tableau 53). Par ailleurs, pour les animaux exposés à la dose 2, l'analyse des données a mis en évidence une diminution significative de l'activité de la cytochrome oxydase au niveau du noyau latéral, et une augmentation significative au niveau du noyau préoptique médial (Tableau 53).

Tableau 53 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante sur l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase à PND 10 (6/8)

Structure	Témoïn	Dose 1	Dose 2	ANOVA	
				F (2,14)	P
F) Noyaux hypothalamiques					
1. Noyau ventromédian	27,54 ± 1,41	28,41 ± 1,80	26,59 ± 0,47	0,574	n.s.
2. Noyau dorsomédian	22,59 ± 1,19	21,72 ± 0,82	23,17 ± 1,00	0,519	n.s.
3. Noyau latéral	18,50 ± 0,24	17,37 ± 0,66	16,21 ± 0,59 *	4,201	<0,05
4. Noyau postérieur	12,67 ± 0,79	8,96 ± 0,74 **	10,38 ± 0,64	6,803	<0,01
5. Noyau arqué					
6. Corps mamillaires					
7. Noyau préoptique médial	16,60 ± 0,62	18,04 ± 1,15	19,93 ± 0,71 **	5,751	<0,01
8. Noyau suprachiasmatique	20,79 ± 1,53	22,96 ± 1,81	22,75 ± 1,00	0,697	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 de Bonferroni a été utilisé pour comparaisons multiples.

** : $p < 0,01$; * : $p < 0,05$ différence statistiquement significative par rapport aux Témoins
n.s. : non significatif

III.7.1.7. Système limbique

L'ANOVA à 1 facteur a montré pour le système limbique, une augmentation significative de l'activité de la cytochrome oxydase pour les animaux exposés à la dose 2 au niveau du septum latéral (Tableau 54).

Tableau 54 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante sur l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase à PND 10 (7/8)

Structure	Témoïn	Dose 1	Dose 2	ANOVA	
				F (2,14)	P
G) Système limbique					
1. Système de récompense					
1.1 Aire tegmentale ventrale					
1.2 Noyau accumbens	26,99 ± 0,78	26,78 ± 0,68	25,79 ± 0,94	0,633	n.s.
1.3 Septum latéral	19,30 ± 0,56	20,72 ± 0,52	21,56 ± 0,76 *	3,415	<0,05
médian	20,23 ± 1,16	21,44 ± 1,49	21,83 ± 1,37	0,417	n.s.
2. Complexe amygdalien					
2.1 Noyau latéral	20,46 ± 1,03	18,00 ± 1,18	19,41 ± 0,99	1,323	n.s.
2.2 Noyau central	20,31 ± 1,04	19,68 ± 1,38	20,82 ± 0,78	0,285	n.s.
2.3 Noyau médial	23,27 ± 0,76	23,24 ± 0,82	22,15 ± 0,86	0,626	n.s.
2.4 Noyau basolatéral	24,79 ± 0,60	24,24 ± 1,49	24,47 ± 1,08	0,057	n.s.
2.5 Noyau basomédian	26,27 ± 0,99	23,02 ± 1,31	25,37 ± 1,18	2,081	n.s.
3. Aires hippocampiques					
3.1 CA1	40,68 ± 1,80	37,40 ± 1,78	39,03 ± 1,52	0,928	n.s.
3.2 CA3	37,61 ± 0,94	38,28 ± 1,92	38,68 ± 1,88	0,111	n.s.
3.3 Gyrus denté	32,56 ± 1,35	36,61 ± 1,39	36,30 ± 1,38	2,674	n.s.
3.4 Subiculum					
4. Noyaux de l'habenula					
4.1 Noyau latéral	19,69 ± 1,23	23,18 ± 1,21	20,99 ± 1,14	2,134	n.s.
4.2 Noyau médian	24,72 ± 1,25	27,86 ± 1,38	26,07 ± 1,48	1,297	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 de Bonferroni a été utilisé pour comparaisons multiples.

* : $p < 0,05$ différence statistiquement significative par rapport aux Témoins
n.s. : non significatif

III.7.1.8. Substance blanche

Aucune différence significative n'a été observée pour les zones de substance blanche (Tableau 55).

Tableau 55 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante sur l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase à PND 10 (8/8)

Structure	Témoïn	Dose 1	Dose 2	ANOVA	
				F (2,14)	P
H) Zone de substance blanche					
1. Capsule interne					
2. Corps calleux	0,07 ± 0,07	0,00 ± 0,00	0,26 ± 0,16	1,765	n.s.
3. Matière blanche du cervelet	1,93 ± 0,97	1,01 ± 0,50	1,31 ± 0,60	0,431	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 de Bonferroni a été utilisé pour comparaisons multiples.

n.s. : non significatif

III.7.2. PND21

III.7.2.1. Systèmes sensoriels

L'ANOVA à 1 facteur a montré que l'activité de la cytochrome oxydase est significativement plus faible au niveau du colliculus inférieur, pour l'ensemble des animaux exposés aux HAP par rapport aux témoins (**Tableau 56**).

Tableau 56 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante sur l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase à PND 21 (1/8)

Structure	Témoïn	Dose 1	Dose 2	ANOVA	
				F (2,14)	P
A) Systèmes sensoriels					
1. Système auditif					
1.1 Cortex auditif	62,87 ± 2,25	61,94 ± 0,84	65,57 ± 1,41	1,441	n.s.
1.2 Colliculus inférieur	87,27 ± 1,12	77,42 ± 1,75 **	81,19 ± 0,70 **	13,305	<0,01
1.3 Olive supérieure	92,03 ± 2,26	86,12 ± 2,19	86,89 ± 1,50	2,612	n.s.
1.4 Noyau cochléaire	83,75 ± 1,87	85,29 ± 2,10	84,53 ± 1,01	0,194	n.s.
2. Système visuel					
2.1 Cortex visuel	66,36 ± 1,86	64,15 ± 0,88	67,99 ± 1,62	1,622	n.s.
2.2 Colliculus supérieur	66,81 ± 1,78	65,06 ± 1,16	68,94 ± 1,29	1,768	n.s.
2.3 Olive inférieure	61,52 ± 1,58	64,34 ± 2,16	64,96 ± 1,81	0,933	n.s.
3. Système vestibulaire					
3.1 Noyaux vestibulaires	100,73 ± 2,57	96,97 ± 1,34	97,07 ± 2,00	1,113	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 de Bonferroni a été utilisé pour comparaisons multiples.

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

n.s. : non significatif

III.7.2.2. Système moteur

L'activité de la cytochrome oxydase est significativement plus faible par rapport aux animaux témoins au niveau de la couche moléculaire des cellules du cervelet, pour les animaux exposés à la dose 1 de HAP (Tableau 57). Par ailleurs, pour les animaux exposés à la dose 2, l'activité de la cytochrome oxydase est significativement plus élevée par rapport aux animaux témoins au niveau du noyau caudé (Tableau 57).

Tableau 57 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante sur l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase à PND 21 (2/8)

Structure	Témoin	Dose 1	Dose 2	ANOVA	
				F (2,14)	p
B) Système moteur					
1. Cortex moteur primaire	60,38 ± 1,28	59,04 ± 0,87	62,99 ± 1,03 °	3,647	<0,05
2. Cortex sensori-moteur	67,42 ± 1,57	66,14 ± 0,94	71,37 ± 0,68 °°	5,672	<0,01
3. Noyau caudé	57,83 ± 1,04	58,91 ± 0,97	62,91 ± 0,48 **°°	8,982	<0,01
4. Globus pallidus	47,66 ± 1,28	47,58 ± 0,78	47,42 ± 0,63	0,016	n.s.
5. Noyaux subthalamiques	75,11 ± 1,29	73,46 ± 0,88	80,05 ± 2,29 °	4,573	<0,05
6. Substance noire	54,93 ± 1,57	54,86 ± 0,98	56,80 ± 0,77	0,905	n.s.
7. Noyau rouge	63,80 ± 1,74	64,20 ± 1,15	63,62 ± 0,85	0,051	n.s.
8. Noyaux cérébelleux					
- Noyau denté	94,10 ± 2,36	89,41 ± 1,25	89,57 ± 1,30	2,374	n.s.
- Noyau interpositus	89,24 ± 1,76	89,46 ± 1,56	85,10 ± 1,23	2,624	n.s.
- Noyau fastigial	77,78 ± 1,32	80,70 ± 1,58	75,62 ± 1,02 °	3,738	<0,05
9. Cellules cérébelleuses					
Couche granulaire	59,28 ± 1,28	61,68 ± 1,38	62,55 ± 1,17	1,628	n.s.
Couche de Purkinje	73,61 ± 1,74	71,87 ± 1,96	74,15 ± 1,49	0,477	n.s.
Couche moléculaire	59,07 ± 1,48	53,57 ± 1,40 *	61,72 ± 1,35 °°	8,368	<0,01
10. Nerf trijumeau	67,86 ± 0,92	67,26 ± 1,42	72,16 ± 1,42 °	4,322	<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 de Bonferroni a été utilisé pour comparaisons multiples.

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

°° : $p < 0,01$ différence statistiquement significative par rapport au groupe Dose 1

n.s. : non significatif

III.7.2.3. Tronc cérébral

Au niveau du tronc cérébral, l'analyse statistique réalisée n'a montré aucune différence significative concernant l'activité enzymatique de la cytochrome oxydase (**Tableau 58**).

Tableau 58 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante sur l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase à PND 21 (3/8)

Structure	Témoin	Dose 1	Dose 2	ANOVA	
				F (2,14)	P
C) Tronc cérébral					
1. Noyau du raphé					
1.1 Dorsal	61,03 ± 1,22	59,87 ± 1,73	62,15 ± 1,92	0,470	n.s.
1.2 Médian	57,83 ± 2,13	58,54 ± 2,24	62,85 ± 3,44	0,990	n.s.
1.3 Locus coeruleus	87,10 ± 4,29	91,82 ± 1,75	86,24 ± 1,34	1,051	n.s.
1.4 Noyaux gris pontiques	65,02 ± 2,48	64,04 ± 1,39	65,38 ± 1,49	0,149	n.s.
2. Tractus nerveux					
Formation réticulée mésencéphalique	56,33 ± 1,55	54,96 ± 1,20	56,32 ± 1,51	0,303	n.s.
3. Matière grise centrale					
3.1 Noyau interpédonculaire	55,91 ± 0,87	55,96 ± 0,90	57,53 ± 1,87	0,458	n.s.
3.2 Matière grise périacqueductale					
antérieure ventrolatérale	53,04 ± 2,38	52,76 ± 0,76	54,96 ± 2,18	0,372	n.s.
antérieure latérale	58,81 ± 1,74	58,62 ± 0,72	60,87 ± 1,45	0,792	n.s.
postérieure dorsolatérale	61,49 ± 2,01	60,86 ± 1,27	63,56 ± 1,25	0,830	n.s.
postérieure latérale	59,21 ± 1,68	59,32 ± 0,71	62,00 ± 1,41	1,338	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 de Bonferroni a été utilisé pour comparaisons multiples.

n.s. : non significatif

III.7.2.4. Cortex cérébraux

Le traitement statistique des données a mis en évidence une diminution significative de l'activité de la cytochrome oxydase par rapport aux animaux témoins, pour les animaux exposés à la dose 1 au niveau du cortex entorhinal (**Tableau 59**).

Tableau 59 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante sur l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase à PND 21 (4/8)

Structure	Témoin	Dose 1	Dose 2	ANOVA	
				F (2,14)	P
D) Cortex cérébraux					
1. Cortex frontal	62,31 ± 1,19	65,58 ± 1,00	64,26 ± 0,89	2,499	n.s.
2. Cortex cingulaire antérieur	63,03 ± 1,52	61,36 ± 1,24	65,08 ± 0,67	2,429	n.s.
3. Cortex piriforme	55,44 ± 1,39	53,04 ± 1,23	55,96 ± 0,83	1,765	n.s.
4. Cortex entorhinal	62,25 ± 2,00	56,44 ± 0,85 *	63,19 ± 1,46 °°	6,027	<0,01
5. Cortex périrhinal	61,32 ± 2,33	57,05 ± 0,65	62,94 ± 1,44 °	4,758	<0,05
6. Cortex pariétal	63,32 ± 1,92	63,07 ± 1,09	65,97 ± 1,47	1,125	n.s.
7. Cortex temporal	65,22 ± 2,55	63,02 ± 0,83	67,21 ± 1,35	1,287	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 de Bonferroni a été utilisé pour comparaisons multiples.

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

°° : $p < 0,01$ différence statistiquement significative par rapport au groupe Dose 1

n.s. : non significatif

III.7.2.5. Noyaux thalamiques

L'ANOVA à 1 facteur n'a montré aucune différence significative de l'activité de la cytochrome oxydase mesurée, au niveau des noyaux thalamiques (Tableau 60).

Tableau 60 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante sur l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase à PND 21 (5/8)

Structure	Témoïn	Dose 1	Dose 2	ANOVA	
				F (2,14)	P
E) Noyaux thalamiques					
1. Moteur					
1.1 Ventrolateral	68,36 ± 2,21	68,02 ± 0,86	70,06 ± 1,65	0,389	n.s.
1.2 Ventromédial	62,76 ± 1,77	63,92 ± 0,64	61,81 ± 1,20	0,544	n.s.
2. Associatif					
2.1 Médiodorsal	60,48 ± 1,58	59,48 ± 0,91	60,91 ± 1,36	0,291	n.s.
2.2 Noyaux antérieurs	67,59 ± 1,33	65,96 ± 0,99	68,97 ± 1,55	1,218	n.s.
3. Sensitif					
3.1 Noyaux postérieurs	62,62 ± 1,47	62,31 ± 0,84	62,54 ± 1,19	0,019	n.s.
3.2 Corps genouillé médian	64,71 ± 2,74	59,22 ± 1,94	65,38 ± 1,24	2,568	n.s.
3.3 Corps genouillé latéral	63,69 ± 1,74	64,88 ± 1,29	63,95 ± 1,44	0,173	n.s.
5. Zona incerta					
	59,51 ± 1,52	62,18 ± 0,99	62,50 ± 1,33	1,573	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 de Bonferroni a été utilisé pour comparaisons multiples.

°° : $p < 0,01$ différence statistiquement significative par rapport au groupe Dose 1
n.s. : non significatif

III.7.2.6. Noyaux hypothalamiques

Au niveau des noyaux hypothalamiques, l'ANOVA à 1 facteur a montré une diminution significative de l'activité de la cytochrome oxydase au niveau du noyau latéral et du noyau suprachiasmatique par rapport aux animaux témoins, pour les animaux exposés à la dose 1 (**Tableau 61**). Par ailleurs, l'analyse des données a mis en évidence une diminution significative de l'activité de la cytochrome oxydase au niveau du noyau latéral, et une augmentation significative au niveau du noyau arqué pour ces mêmes animaux (**Tableau 61**).

Tableau 61 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante sur l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase à PND 21 (6/8)

Structure	Témoïn	Dose 1	Dose 2	ANOVA	
				F (2,14)	P
F) Noyaux hypothalamiques					
1. Noyau ventromédian	51,88 ± 1,32	54,04 ± 1,63	54,72 ± 1,08	1,169	n.s.
2. Noyau dorsomédian	52,93 ± 1,30	51,52 ± 1,07	55,66 ± 1,52	2,690	n.s.
3. Noyau latéral	53,98 ± 1,00	49,75 ± 0,70 *	56,36 ± 1,81 °°	7,787	<0,01
4. Noyau postérieur	50,31 ± 0,99	52,49 ± 1,10	52,19 ± 1,19	1,141	n.s.
5. Noyau arqué	48,68 ± 0,79	51,04 ± 2,16	59,13 ± 2,39 ***°	7,120	<0,01
6. Corps mamillaires	70,50 ± 2,78	75,46 ± 7,27	72,71 ± 0,68	0,374	n.s.
7. Noyau préoptique médial	56,86 ± 1,77	54,05 ± 1,14	54,35 ± 0,88	1,396	n.s.
8. Noyau suprachiasmatique	51,19 ± 0,70	47,36 ± 1,14 *	50,34 ± 0,71	4,883	<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 de Bonferroni a été utilisé pour comparaisons multiples.

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

°° : $p < 0,01$; ° : $p < 0,05$ différence statistiquement significative par rapport au groupe Dose 1

n.s. : non significatif

III.7.2.7. Système limbique

L'ANOVA à 1 facteur a montré pour le système limbique, une augmentation significative de l'activité de la cytochrome oxydase pour les animaux exposés à la dose 1 au niveau du noyau accumbens (Tableau 62). Par ailleurs, une augmentation significative de l'activité de la cytochrome oxydase est observée pour les animaux exposés à la dose 2 au niveau du septum latéral (Tableau 62).

Tableau 62 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante sur l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase à PND 21 (7/8)

Structure	Témoin	Dose 1	Dose 2	ANOVA	
				F (2,14)	P
G) Système limbique					
1. Système de récompense					
1.1 Aire tegmentale ventrale	50,49 ± 1,17	52,06 ± 1,05	48,53 ± 1,10	2,505	n.s.
1.2 Noyau accumbens	61,39 ± 1,13	65,12 ± 1,22 *	64,28 ± 0,69	3,480	<0,05
1.3 Septum					
latéral	56,58 ± 1,11	59,19 ± 1,00	62,82 ± 0,57 ***°	11,709	<0,01
médian	51,77 ± 1,91	50,40 ± 1,53	50,87 ± 1,56	0,172	n.s.
2. Complexe amygdalien					
2.1 Noyau latéral	60,05 ± 1,58	58,32 ± 1,07	61,05 ± 1,29	1,146	n.s.
2.2 Noyau central	53,82 ± 1,67	52,39 ± 1,24	56,76 ± 1,31	2,601	n.s.
2.3 Noyau médial	52,40 ± 1,65	50,18 ± 0,93	53,26 ± 1,27	1,453	n.s.
2.4 Noyau basolatéral	54,62 ± 1,88	51,70 ± 1,03	55,22 ± 1,21	1,759	n.s.
2.5 Noyau basomédian	55,22 ± 1,67	52,33 ± 1,43	55,25 ± 0,64	1,289	n.s.
3. Aires hippocampiques					
3.1 CA1	69,15 ± 2,22	67,04 ± 1,61	63,56 ± 0,92	2,867	n.s.
3.2 CA3	66,20 ± 1,98	64,81 ± 1,39	65,11 ± 1,47	0,201	n.s.
3.3 Gyrus denté	69,45 ± 2,06	68,23 ± 1,50	69,30 ± 1,09	0,170	n.s.
3.4 Subiculum	58,59 ± 1,60	58,84 ± 1,26	59,38 ± 1,65	0,072	n.s.
4. Noyaux de l'habenula					
4.1 Noyau latéral	64,09 ± 1,36	63,64 ± 1,05	64,85 ± 1,07	0,275	n.s.
4.2 Noyau médian	63,42 ± 1,54	63,24 ± 1,33	65,50 ± 1,78	0,645	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 de Bonferroni a été utilisé pour comparaisons multiples.

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

° : $p < 0,05$ différence statistiquement significative par rapport au groupe Dose 1

n.s. : non significatif

III.7.2.8. Substance blanche

Aucune différence significative n'a été observée pour les zones de substance blanche (Tableau 63).

Tableau 63 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante sur l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase à PND 21 (8/8)

Structure	Témoïn	Dose 1	Dose 2	ANOVA	
				F (2,14)	P
H) Zone de substance blanche					
1. Capsule interne	32,34 ± 0,51	34,12 ± 0,85	31,80 ± 0,66	3,064	n.s.
2. Corps calleux	27,98 ± 1,00	28,74 ± 0,64	28,98 ± 0,36	0,523	n.s.
3. Matière blanche du cervelet	20,73 ± 0,97	21,63 ± 0,77	19,27 ± 0,45	2,454	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 de Bonferroni a été utilisé pour comparaisons multiples.

n.s. : non significatif

III.7.3. PND60

III.7.3.1. Systèmes sensoriels

Le traitement statistique n'a révélé aucune différence significative sur l'activité enzymatique de la cytochrome oxydase aux niveaux des structures des systèmes sensoriels à PND60 (Tableau 64).

Tableau 64 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante sur l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase à PND 60 (1/8)

Structure	Témoïn	Dose 1	Dose 2	ANOVA	
				F (2,14)	P
A) Systèmes sensoriels					
1. Système auditif					
1.1 Cortex auditif	68,78 ± 1,81	72,72 ± 1,94	68,33 ± 1,28	1,994	n.s.
1.2 Colliculus inférieur	57,81 ± 1,36	62,86 ± 3,36	59,37 ± 1,58	1,220	n.s.
1.3 Olive supérieure	58,51 ± 1,31	61,04 ± 2,34	58,39 ± 2,64	0,481	n.s.
1.4 Noyau cochléaire	59,63 ± 2,03	59,02 ± 1,73	57,92 ± 1,57	0,217	n.s.
2. Système visuel					
2.1 Cortex visuel	58,03 ± 1,04	58,47 ± 1,65	54,90 ± 0,86	2,498	n.s.
2.2 Colliculus supérieur	51,50 ± 1,23	50,35 ± 1,32	49,19 ± 1,04	0,886	n.s.
2.3 Olive inférieure	69,89 ± 2,62	75,29 ± 3,34	68,27 ± 3,01	1,511	n.s.
3. Système vestibulaire					
3.1 Noyaux vestibulaires	74,10 ± 1,62	76,22 ± 2,54	70,69 ± 1,66	1,996	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 de Bonferroni a été utilisé pour comparaisons multiples.

n.s. : non significatif

III.7.3.2. Système moteur

L'analyse des données a montré une diminution significative de l'activité enzymatique de la cytochrome oxydase pour les animaux exposés à la dose 2 par rapport aux témoins, au niveau de la couche granulaire des cellules du cervelet (Tableau 65).

Tableau 65 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante sur l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase à PND 60 (2/8)

Structure	Témoin	Dose 1		Dose 2		ANOVA	
						F (2,14)	P
B) Système moteur							
1. Cortex moteur primaire	61,65 ± 2,08	56,82 ± 2,36	56,87 ± 1,85	1,757	n.s.		
2. Cortex sensori-moteur	64,60 ± 1,91	61,44 ± 2,30	64,04 ± 2,28	0,589	n.s.		
3. Noyau caudé	56,19 ± 2,67	53,26 ± 2,61	57,12 ± 2,61	0,593	n.s.		
4. Globus pallidus	35,93 ± 1,38	36,09 ± 1,77	36,96 ± 1,32	0,134	n.s.		
5. Noyaux subthalamiques	65,97 ± 2,03	68,33 ± 1,99	70,66 ± 1,74	1,485	n.s.		
6. Substance noire	64,02 ± 1,70	60,84 ± 1,36	61,23 ± 1,29	1,406	n.s.		
7. Noyau rouge	61,67 ± 1,57	59,15 ± 1,31	58,63 ± 1,13	1,476	n.s.		
8. Noyaux cérébelleux							
- Noyau denté	66,94 ± 1,95	68,24 ± 2,41	63,48 ± 1,49	1,571	n.s.		
- Noyau interpositus	57,83 ± 1,62	60,70 ± 1,77	55,29 ± 1,25	3,116	n.s.		
- Noyau fastigial	49,09 ± 0,94	50,76 ± 1,30	48,30 ± 1,29	1,124	n.s.		
9. Cellules cérébelleuses							
Couche granulaire	64,75 ± 2,77	64,47 ± 2,23	56,47 ± 1,49 *°	4,408	<0,05		
Couche de Purkinje	68,04 ± 2,90	72,50 ± 2,26	66,61 ± 0,63	1,800	n.s.		
Couche moléculaire	61,88 ± 1,94	64,73 ± 1,84	59,14 ± 1,29	2,276	n.s.		
10. Nerf trijumeau	60,35 ± 2,25	58,33 ± 1,61	60,41 ± 1,69	0,428	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 de Bonferroni a été utilisé pour comparaisons multiples.

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

° : $p < 0,05$ différence statistiquement significative par rapport au groupe Dose 1

n.s. : non significatif

III.7.3.3. Tronc cérébral

L'activité de la cytochrome oxydase est significativement plus faible que celle des animaux témoins, pour les animaux exposés à la dose 1 au niveau des noyaux gris pontiques (Tableau 66).

Tableau 66 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante sur l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase à PND 60 (3/8)

Structure	Témoin	Dose 1		Dose 2		ANOVA	
						F (2,14)	P
C) Tronc cérébral							
1. Noyau du raphé							
1.1 Dorsal	54,45 ± 2,24	52,77 ± 1,72	57,37 ± 2,06	1,361	n.s.		
1.2 Médian	44,04 ± 0,85	45,83 ± 1,85	44,30 ± 0,91	0,558	n.s.		
1.3 Locus coeruleus	71,27 ± 2,01	71,85 ± 2,12	71,32 ± 2,31	0,022	n.s.		
1.4 Noyaux gris pontiques	51,86 ± 0,75	48,18 ± 0,93 *	51,87 ± 0,93 °	5,254	<0,01		
2. Tractus nerveux							
Formation réticulée mésencéphalique	50,14 ± 1,61	49,15 ± 1,36	53,19 ± 1,37	2,099	n.s.		
3. Matière grise centrale							
3.1 Noyau interpedonculaire	70,97 ± 2,71	65,08 ± 2,23	70,49 ± 2,23	1,652	n.s.		
3.2 Matière grise périaqueductale							
antérieure ventrolatérale	57,22 ± 2,61	58,33 ± 2,56	60,67 ± 1,71	0,542	n.s.		
antérieure latérale	65,84 ± 1,94	63,43 ± 1,78	65,66 ± 1,77	0,546	n.s.		
postérieure dorsolatérale	53,95 ± 1,29	51,24 ± 1,33	51,07 ± 1,26	1,588	n.s.		
postérieure latérale	55,72 ± 1,62	54,07 ± 1,35	54,84 ± 1,09	0,359	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 de Bonferroni a été utilisé pour comparaisons multiples.

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

° : $p < 0,05$ différence statistiquement significative par rapport au groupe Dose 1

n.s. : non significatif

III.7.3.4. Cortex cérébraux

Aucune différence significative n'a été observée concernant l'activité de la cytochrome oxydase au niveau des cortex cérébraux (Tableau 67).

Tableau 67 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante sur l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase à PND 60 (4/8)

Structure	Témoin	Dose 1	Dose 2	ANOVA	
				F (2,14)	P
D) Cortex cérébraux					
1. Cortex frontal	48,68 ± 1,06	53,43 ± 2,41	54,36 ± 3,47	0,975	n.s.
2. Cortex cingulaire antérieur	63,01 ± 1,69	58,56 ± 1,81	60,45 ± 1,94	1,468	n.s.
3. Cortex piriforme	51,40 ± 1,54	47,82 ± 1,77	53,21 ± 2,44	1,799	n.s.
4. Cortex entorhinal	55,17 ± 1,98	54,10 ± 1,81	53,54 ± 1,20	0,231	n.s.
5. Cortex périrhinal	49,74 ± 1,28	53,85 ± 1,98	51,36 ± 1,42	1,620	n.s.
6. Cortex pariétal	70,50 ± 1,66	70,78 ± 1,86	67,89 ± 1,19	1,029	n.s.
7. Cortex temporal	56,91 ± 0,92	58,75 ± 1,45	58,56 ± 1,26	0,630	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 de Bonferroni a été utilisé pour comparaisons multiples.

n.s. : non significatif

III.7.3.5. Noyaux thalamiques

L'activité de la cytochrome oxydase est significativement plus élevée que celle des animaux témoins, pour les animaux exposés à la dose 2, au niveau de la *zona incerta* (Tableau 68).

Tableau 68 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante sur l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase à PND 60 (5/8)

Structure	Témoin	Dose 1	Dose 2	ANOVA	
				F (2,14)	P
E) Noyaux thalamiques					
1. Moteur					
1.1 Ventrolateral	68,41 ± 2,19	66,58 ± 1,07	68,92 ± 1,61	0,533	n.s.
1.2 Ventromédial	65,78 ± 1,86	68,51 ± 1,49	68,78 ± 1,96	0,855	n.s.
2. Associatif					
2.1 Médiadorsal	64,94 ± 1,64	63,75 ± 1,11	65,17 ± 1,51	0,243	n.s.
2.2 Noyaux antérieurs	64,97 ± 1,71	65,56 ± 1,31	63,74 ± 1,52	0,370	n.s.
3. Sensitif					
3.1 Noyaux postérieurs	61,34 ± 1,82	62,94 ± 1,75	61,97 ± 1,74	0,200	n.s.
3.2 Corps genouillé médian	66,31 ± 2,52	62,46 ± 1,31	66,98 ± 1,63	1,483	n.s.
3.3 Corps genouillé latéral	56,51 ± 1,69	59,11 ± 2,53	56,21 ± 2,20	0,541	n.s.
5. Zona incerta	56,62 ± 1,43	57,66 ± 1,82	62,11 ± 1,36 *	3,438	<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 de Bonferroni a été utilisé pour comparaisons multiples.

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

n.s. : non significatif

III.7.3.6. Noyaux hypothalamiques

L'analyse statistique des données n'a montré aucune différence significative par rapport aux animaux témoins, concernant l'activité de la cytochrome oxydase au niveau des noyaux hypothalamiques (Tableau 69).

Tableau 69 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante sur l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase à PND 60 (6/8)

Structure	Témoin	Dose 1		Dose 2		ANOVA	
						F (2,14)	P
F) Noyaux hypothalamiques							
1. Noyau ventromédian	62,05 ± 1,78	63,16 ± 0,64	65,18 ± 1,78	0,992	n.s.		
2. Noyau dorsomédian	66,05 ± 1,87	66,03 ± 1,38	66,04 ± 1,93	0,000	n.s.		
3. Noyau latéral	52,54 ± 1,51	55,19 ± 1,49	55,97 ± 1,65	1,341	n.s.		
4. Noyau postérieur	58,78 ± 1,49	56,58 ± 1,12	62,67 ± 1,47 °	4,811	<0,05		
5. Noyau arqué	65,47 ± 4,39	54,26 ± 4,68	62,87 ± 4,00	1,648	n.s.		
6. Corps mamillaires	73,37 ± 5,84	69,55 ± 4,46	76,69 ± 3,72	0,480	n.s.		
7. Noyau préoptique médial	57,03 ± 1,22	55,61 ± 2,03	57,39 ± 1,97	0,272	n.s.		
8. Noyau suprachiasmatique	48,15 ± 2,20	48,31 ± 1,17	51,16 ± 2,19	0,771	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 de Bonferroni a été utilisé pour comparaisons multiples.

° : $p < 0,05$ différence statistiquement significative par rapport au groupe Dose 1
n.s. : non significatif

III.7.3.7. Système limbique

L'ANOVA réalisée n'a montré aucune différence significative par rapport aux animaux témoins, concernant l'activité de la cytochrome oxydase au niveau des structures composant le système limbique (Tableau 70).

Tableau 70 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante sur l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase à PND 60 (7/8)

Structure	Témoin	Dose 1		Dose 2		ANOVA	
						F (2,14)	P
G) Système limbique							
1. Système de récompense							
1.1 Aire tegmentale ventrale	46,74 ± 1,10	42,50 ± 1,21	49,11 ± 1,97^{oo}	5,887	<0,01		
1.2 Noyau accumbens	61,76 ± 2,39	65,64 ± 1,32	67,95 ± 2,12	2,408	n.s.		
1.3 Septum latéral	50,50 ± 2,14	45,71 ± 1,49	51,54 ± 2,27	2,243	n.s.		
médian	56,99 ± 3,31	50,72 ± 2,95	55,11 ± 3,42	0,947	n.s.		
2. Complexe amygdalien							
2.1 Noyau latéral	63,02 ± 1,50	63,36 ± 1,47	63,67 ± 2,14	0,033	n.s.		
2.2 Noyau central	65,92 ± 2,20	66,50 ± 1,22	66,76 ± 1,35	0,063	n.s.		
2.3 Noyau médial	59,62 ± 1,55	60,19 ± 1,35	61,96 ± 1,85	0,589	n.s.		
2.4 Noyau basolatéral	72,43 ± 1,13	70,62 ± 1,58	72,77 ± 2,32	0,384	n.s.		
2.5 Noyau basomédian	64,74 ± 1,53	63,63 ± 1,15	65,05 ± 2,15	0,173	n.s.		
3. Aires hippocampiques							
3.1 CA1	58,97 ± 1,97	55,84 ± 1,81	58,92 ± 2,09	0,769	n.s.		
3.2 CA3	60,02 ± 2,21	59,91 ± 2,60	59,69 ± 1,52	0,007	n.s.		
3.3 Gyrus denté	74,26 ± 2,59	74,02 ± 3,29	70,93 ± 2,31	0,452	n.s.		
3.4 Subiculum	65,89 ± 2,48	66,52 ± 2,01	69,45 ± 1,84	0,700	n.s.		
4. Noyaux de l'habenula							
4.1 Noyau latéral	64,42 ± 1,68	62,77 ± 1,33	61,13 ± 1,42	1,255	n.s.		
4.2 Noyau médian	59,19 ± 2,24	55,06 ± 2,06	54,32 ± 2,08	1,523	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 de Bonferroni a été utilisé pour comparaisons multiples.

^{oo} : $p < 0,01$ différence statistiquement significative par rapport au groupe Dose 1
n.s. : non significatif

III.7.3.8. Substance blanche

Aucune différence significative par rapport aux animaux témoins, concernant l'activité de la cytochrome oxydase au niveau des zones de substance blanche n'a été observée (Tableau 71).

Tableau 71 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante sur l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase à PND 60 (8/8)

Structure	Témoin	Dose 1	Dose 2	ANOVA	
				F (2,14)	P
H) Zone de substance blanche					
1. Capsule interne	11,87 ± 0,76	11,67 ± 0,87	13,36 ± 0,84	1,254	n.s.
2. Corps calleux	12,8 ± 0,5	12,25 ± 0,92	13,17 ± 0,63	0,429	n.s.
3. Matière blanche du cervelet	8,37 ± 0,41	11,20 ± 0,41	9,91 ± 0,41	12,001	<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 de Bonferroni a été utilisé pour comparaisons multiples.

n.s. : non significatif

III.7.4. Récapitulatif

➤ A **PND10**, les animaux exposés aux HAP pendant la gestation à la **dose de 2 µg/kg/jour** présentent une activité enzymatique de la cytochrome oxydase significativement plus **faible** par rapport aux animaux témoins au niveau du noyau hypothalamique postérieur ; et significativement plus **élevée** au niveau du cortex auditif, du noyau caudé et des noyaux thalamiques antérieurs.

Par ailleurs, à ce stade, les animaux exposés pendant la gestation à **200 µg/kg/jour** de HAP présentent une activité enzymatique de la cytochrome oxydase plus **faible** par rapport aux animaux témoins au niveau du noyau hypothalamique latéral ; et significativement plus **élevée** au niveau du cortex auditif, du colliculus supérieur, du noyau caudé, de la substance noire, de la formation réticulée mésencéphalique, du cortex frontal, du cortex piriforme, du noyau préoptique médial et du septum latéral

➤ A **PND21**, les animaux exposés pendant la gestation à la **dose 1** de HAP présentent une activité enzymatique de la cytochrome oxydase significativement plus **faible** par rapport aux animaux témoins au niveau du colliculus inférieur, de la couche moléculaire des cellules du cervelet, du cortex entorhinal, du noyau hypothalamique latéral et du noyau suprachiasmatique ; et significativement plus **élevée** au niveau du noyau accumbens.

Par ailleurs, à ce stade, les animaux exposés pendant la gestation à la **dose 2** de HAP présentent une activité enzymatique de la cytochrome oxydase plus **faible** par rapport aux animaux témoins au niveau du colliculus inférieur; et significativement plus **élevée** au niveau du noyau caudé, du noyau arqué et du septum latéral

➤ Enfin, à **PND60**, soit 2 mois après l'exposition aux HAP, les animaux exposés à la dose la plus faible présentent une **baisse significative** de l'activité enzymatique de la cytochrome oxydase par rapport aux animaux témoins au niveau des noyaux gris pontiques.

Par ailleurs, à ce stade, les animaux exposés pendant la gestation à la **dose 2** de HAP présentent une activité enzymatique de la cytochrome oxydase plus **faible** par rapport aux animaux témoins au niveau de la couche granulaire des cellules du cervelet ; et significativement plus **élevée** au niveau de la *zona incerta*.

III.8. Dosages cérébraux des HAP et métabolites

III.8.1. PND0

Le tableau 72 présente les concentrations cérébrales de HAP et de métabolites monohydroxylés à PND0.

A ce stade, même si l'analyse statistique n'a pas montré de différence significative entre les concentrations mesurées chez les animaux témoins et celles mesurées chez les animaux exposés pendant la gestation au mélange de HAP, il peut être noté que les concentrations de fluorène, naphthalène, phénanthrène et acénaphène mesurées à PND0 sont plus importantes chez les animaux exposés que chez les animaux témoins, alors que les concentrations de pyrène et fluoranthène restent du même ordre de grandeur entre les 3 groupes.

Tableau 72 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante sur les concentrations cérébrales de HAP et de métabolites mono-hydroxylés chez les rats à PND0 (ng/g de tissu)

Molécule	Témoïn		Dose 1		Dose 2		ANOVA	
							F (2,2)	P
Naphtalène	3037,00	± 281,31	4599,33	± 1573,62	3503,67	± 911,39	0,570	n.s.
1-OH-naph	0,64	± 0,08	1,00	± 0,43	0,69	± 0,01	0,341	n.s.
2-OH-naph	1,08	± 0,37	1,98	± 0,86	1,90	± 0,25	0,475	n.s.
Acénaphtylène	12,67	± 5,24 ♦	28,00	± 4,04	29,00	± 10,00	0,012	n.s.
Acénaphthène	41,67	± 3,71	65,00	± 7,09	63,33	± 13,53	2,056	n.s.
Fluorène	13826,50	± 699,50	22419,33	± 1209,02	35754,33	± 8364,98	3,585	n.s.
9-OH-Fluo	0,18	± 0,02	0,28	± 0,03	0,30	± 0,06	2,967	n.s.
Phénanthrène	439,00	± 61,58	520,67	± 52,16	627,00	± 131,80	1,116	n.s.
9-OH-Phe	0,33	± 0,09	0,40	± 0,12	0,40	± 0,17	0,125	n.s.
3-OH-Phe	0,13	± 0,04 ♦	0,13	± 0,02 ♦	0,13	± 0,04 ♦		
2-OH-Phe	0,18	± 0,06 ♦	0,24	± 0,02	0,22	± 0,01	1,960	n.s.
Anthracène	14,00	± 0,00	3,67	± 0,88 ♦	14,00	± 3,00	0,000	n.s.
Fluoranthène	77,00	± 9,64	80,00	± 8,54	84,00	± 13,87	0,103	n.s.
Pyrène	230,33	± 25,89	250,00	± 32,65	245,33	± 33,95	0,110	n.s.
1-OH-Pyr	0,47	± 0,03	0,73	± 0,18	0,55	± 0,15	0,745	n.s.
B(a)A	0,60	± 0,09	0,73	± 0,06	1,21	± 0,43	1,574	n.s.
Chrysène	1,65	± 0,29	1,99	± 0,08	1,87	± 0,27	0,544	n.s.
B(b)F	0,53	± 0,11 ♦	0,82	± 0,28 ♦	0,61	± 0,18 ♦		
B(k)F	0,44	± 0,14 ♦	0,12	± 0,02 ♦	0,44	± 0,27 ♦		
B(a)P	0,75	± 0,14 ♦	1,50	± 0,09 ♦	0,74	± 0,35 ♦		
IP	0,45	± 0,21 ♦	0,24	± 0,06 ♦	0,36	± 0,14 ♦		
B(ghi)P	1,90	± 0,34 ♦	1,98	± 0,39 ♦	1,21	± 0,36 ♦		
DB(a,h)A	0,32	± 0,12 ♦	0,05	± 0,01 ♦	0,20	± 0,08 ♦		

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 de Bonferroni a été utilisé pour comparaisons multiples.

n.s. : non significatif

♦ : valeurs supérieures à la LdD, et inférieures à la LdQ

III.8.2. PND21

Le tableau 73 présente les concentrations cérébrales de HAP et de métabolites mono-hydroxylés à PND21. L'analyse statistique a montré des concentrations significativement plus élevées pour les animaux exposés pendant la gestation au mélange de HAP à la dose 1, par rapport aux animaux témoins, pour l'acénaphthène, le phénanthrène, le fluoranthène, le pyrène et le chrysène.

Tableau 73 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante sur les concentrations cérébrales de HAP et de métabolites mono-hydroxylés chez les rats à PND21 (ng/g de tissu)

Molécule	Témoïn	Dose 1	Dose 2	ANOVA	
				F (2,2)	P
Naphthalène	6121,00 ± 4132,88	1077,00 ± 416,73	9583,00 ± 2908,40	2,135	n.s.
1-OH-naph	0,47 ± 0,18 ♦	0,40 ± 0,08 ♦	0,36 ± 0,16 ♦	0,292	n.s.
2-OH-naph	0,20 ± 0,06 ♦	0,51 ± 0,18	0,70 ± 0,31		
Acénaphthylène	64,00 ± 58,00 ♦	12,00 ± 1,53	8,00 ± 1,00 ♦	29,791	< 0,01
Acénaphthène	34,33 ± 2,33	63,00 ± 1,00 **	48,00 ± 4,00		
Fluorène	27084,67 ± 16213,18	10395,33 ± 3066,60	21848,67 ± 12809,49	0,501	n.s.
9-OH-Fluo	0,21 ± 0,04	0,16 ± 0,01	0,23 ± 0,05	0,866	n.s.
Phénanthrène	423,67 ± 13,28	635,00 ± 48,17 *	470,67 ± 28,98 °	11,070	< 0,05
9-OH-Phe	0,64 ± 0,14	0,83 ± 0,26	0,68 ± 0,03	0,293	n.s.
3-OH-Phe	0,06 ± 0,00 ♦	0,07 ± 0,03 ♦	0,05 ± 0,00 ♦		
2-OH-Phe	0,16 ± 0,01 ♦	0,16 ± 0,05 ♦	0,17 ± 0,01 ♦		
Anthracène	10,67 ± 0,67	14,67 ± 2,67	11,67 ± 0,67	1,625	n.s.
Fluoranthène	76,00 ± 3,06	119,00 ± 9,61 **	83,00 ± 2,00 °	15,114	< 0,01
Pyrène	229,67 ± 5,17	367,00 ± 31,34 **	254,00 ± 7,00 °	15,226	< 0,01
1-OH-Pyr	0,49 ± 0,02	0,84 ± 0,04	0,77 ± 0,18	1,816	n.s.
B(a)A	1,29 ± 0,02	1,45 ± 0,44	1,37 ± 0,06	0,095	n.s.
Chrysène	1,34 ± 0,02	2,03 ± 0,16 **	1,30 ± 0,06 °°	17,689	< 0,01
B(b)F	0,36 ± 0,02 ♦	0,58 ± 0,05 ♦	0,40 ± 0,00 ♦		
B(k)F	0,22 ± 0,02 ♦	0,40 ± 0,12 ♦	0,25 ± 0,01 ♦		
B(a)P	0,66 ± 0,03 ♦	1,00 ± 0,10 ♦	0,78 ± 0,05 ♦		
IP	0,52 ± 0,03 ♦	0,82 ± 0,16 ♦	0,52 ± 0,08 ♦		
B(ghi)P	1,72 ± 0,08 ♦	2,16 ± 0,29 ♦	1,84 ± 0,13 ♦		
DB(a,h)A	0,25 ± 0,02 ♦	0,45 ± 0,05 ♦	0,25 ± 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 de Bonferroni a été utilisé pour comparaisons multiples.

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

° : $p < 0,05$, °° : $p < 0,01$ différence statistiquement significative par rapport au groupe Dose 1

n.s. : non significatif

♦ : valeurs supérieures à la LdD, et inférieures à la LdQ

III.9. Conclusion des résultats

III.9.1. Effets d'une exposition prénatale aux HAP sur le poids corporel

La mesure du poids corporel réalisée entre le 3^{ème} jour de vie postnatale et l'âge adulte a montré que l'exposition aux HAP pendant la gestation n'a pas eu d'effet sur le développement pondéral général de l'animal.

III.9.2. Effets d'une exposition prénatale aux HAP sur le développement moteur et sensoriel

A l'exception de quelques modifications détectées précocement, l'ensemble des résultats suggère une maturation normale des fonctions neuromotrices pour les jeunes nés de mère exposées pendant la gestation au mélange de HAP à 2 ou 200 µg/kg/jour par rapport aux animaux témoins.

Les résultats des tests évaluant le comportement maternel a permis d'écarter tout effet des HAP sur la capacité de la mère à s'occuper des jeunes, puisqu'aucune différence significative n'a été relevée entre les groupes, quelque soit la variable étudiée.

Enfin, les données issues de l'open-field réalisé à PND25 ont montré que les rats exposés à la dose 2 sont plus actifs que les rats témoins, puisqu'ils traversent plus de cases et effectuent plus de redressements.

III.9.3. Effets d'une exposition prénatale aux HAP sur le comportement individuel à l'âge adulte

Les résultats aux tests réalisés à l'âge adulte ont montré un effet à long terme d'une exposition prénatale aux HAP sur le comportement des animaux, plus particulièrement sur leur niveau d'activité.

En effet, les résultats ont mis en évidence une augmentation du nombre de passages dans le LCS pour les animaux exposés à la dose 1, une augmentation du nombre de redressements pour l'ensemble des animaux exposés et du nombre total de branches traversées pour les animaux exposés à la dose 1 dans le LY. Ces résultats suggèrent une augmentation du niveau d'activité pour les animaux exposés aux HAP, plus particulièrement pour les animaux exposés à la plus faible dose. Cependant, aucune différence strictement significative sur les variables mesurées dans l'OF n'a été observée.

Concernant le niveau d'anxiété des animaux, aucune différence significative n'a été mise en évidence dans les tests réalisés, ce qui montre que l'exposition prénatale aux HAP, n'a pas induit de modifications de ce registre comportemental, quelle que soit la dose administrée.

Enfin, en ce qui concerne les performances cognitives (mémoire et capacités d'apprentissage) des animaux testés, mesurées dans le LY et le labyrinthe radial à 8 branches, aucun effet d'une exposition prénatale aux HAP n'a été observé, aux deux doses administrées.

Par ailleurs, l'ensemble des résultats a mis en évidence une plus grande activité et des capacités de mémorisation moindres des femelles par rapport aux mâles. En effet, les femelles des trois groupes ont effectué un plus grand nombre de passages et de redressements dans le LCS, ont traversé un plus grand nombre de cases dans l'OF, ont visité un plus grand nombre de branches et ont effectué plus de redressements dans le LY, et ont visité un plus grand nombre de branches par minute dans le labyrinthe radial à 8 branches. De plus, les femelles ont réalisé un pourcentage d'alternance plus faible dans le LY, mais ont mis moins de temps pour visiter la totalité des branches dans le labyrinthe radial à 8 branches, ce qui suggère de moins bonnes capacités de mémorisation à court terme et spatiale, pouvant être compensées par une forte activité.

Ainsi, les données issues des tests évaluant le comportement individuel des animaux à l'âge adulte ont permis de montrer qu'un seul registre comportemental a été affecté par l'exposition prénatale au mélange de HAP, à savoir le niveau d'activité. Enfin, si l'ensemble des animaux exposés a été plus actif que les animaux témoins, cette modification comportementale est plus importante pour les animaux exposés à la dose 1.

III.9.4. Effets d'une exposition prénatale aux HAP sur le comportement social à l'âge adulte

Dans cette étude, les résultats obtenus n'ont pas montré d'effet de l'exposition prénatale au mélange de 16 HAP, aux deux doses testées, sur les rôles sociaux pris par les animaux dans la situation de difficulté d'accès à la nourriture.

En effet, le traitement n'a pas interféré avec le phénomène de différenciation sociale, puisque des rats de type Non Transporteurs sont apparus dans tous les groupes, dans les mêmes proportions entre témoins et animaux exposés aux deux doses de HAP. De même, l'exposition n'a pas eu d'influence sur la spécialisation des Transporteurs dans le rôle de Ravitailleurs ou dans celui d'Autonomes.

Enfin, l'étude des flux de nourriture dans les groupes a indiqué que le flux majoritaire s'écoule bien des Transporteurs vers les Non Transporteurs, qu'il s'agisse des Transporteurs témoins ou de ceux exposés aux HAP.

III.9.5. Effets d'une exposition prénatale aux HAP sur le métabolisme cérébral

Les résultats montrent qu'un nombre restreint de structures présentent des modifications de l'activité enzymatique de la cytochrome oxydase par rapport aux témoins, à PND10, PND21 et PND60, quelle que soit la dose de HAP.

Les aires cérébrales présentant des modifications d'activité enzymatique sont impliquées dans des fonctions diverses, telles que les fonctions sensorielles et motrices, la mémoire spatiale, la thermorégulation, le système de récompense et le comportement alimentaire.

D'une manière générale, le métabolisme énergétique cérébral semble peu affecté par une exposition prénatale aux HAP, à la dose 1 comme à la dose 2. Des augmentations de l'activité neuronale sont majoritairement observées, particulièrement à PND10.

Au cours du temps, un nombre plus faible de structures a présenté des différences significatives concernant l'activité enzymatique de la cytochrome oxydase, par rapport aux

animaux témoins, ce qui montre que les modifications précoces observées s'atténuent et ne persistent pas dans le temps.

III.9.6. Effets d'une exposition prénatale aux HAP sur la concentration cérébrale de molécules mères et de métabolites mono-hydroxylés chez les ratons

Les résultats des études analytiques réalisées ont permis de mettre en évidence la présence de HAP et de certains métabolites mono-hydroxylés dans le compartiment cérébral des ratons aux deux stades analysés, soit juste après la naissance (PND0) à la fin d'allaitement (PND21), et cela pour les trois groupes d'animaux considérés. L'ensemble des 16 molécules administrées à la mère ainsi que 7 métabolites hydroxylés ont été détectés, mais avec des concentrations inférieures à la limite de quantification en ce qui concerne les HAP de haut poids moléculaire.

Les composés détectés en majorité sont le fluorène, le naphthalène, le phénanthrène, le pyrène, le fluoranthène, et l'acénaphène. Ce profil a été observé autant chez les témoins que chez les animaux exposés aux 2 doses de HAP (2 et 200 µg/kg/jour), et aux 2 stades étudiés (PND0 et PND21).

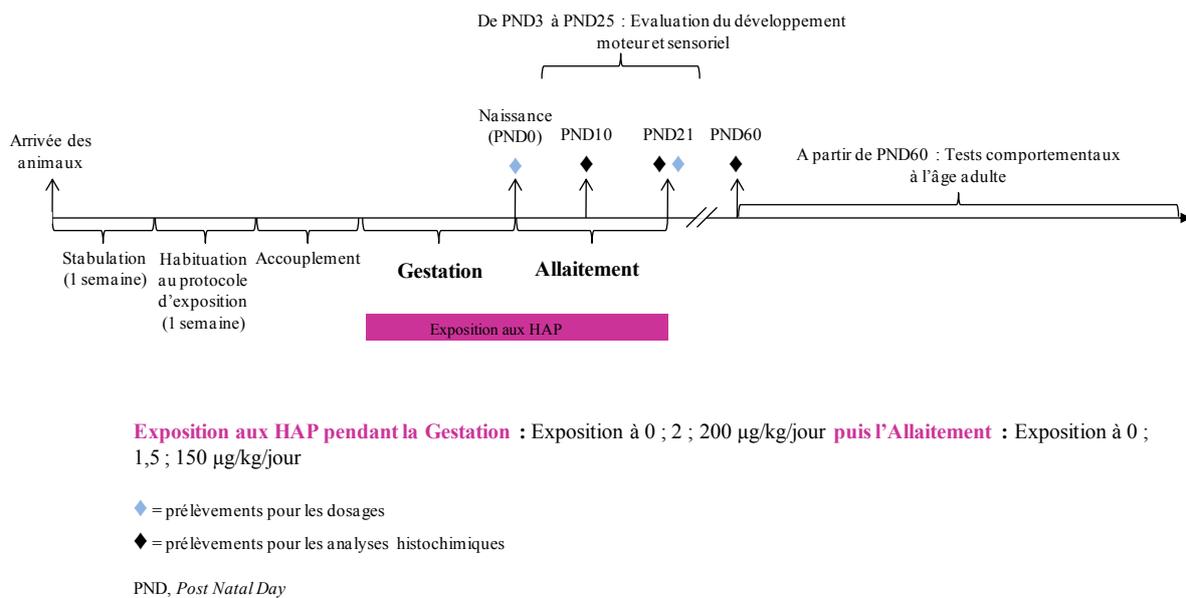
Plusieurs métabolites mono-hydroxylés sont également détectés de façon majoritaire, le 9-OH-phénanthrène, le 1-OH ou le 2-OH-naphthalène et le 9-OH-fluorène. Enfin, il est à noter que les niveaux de métabolites (9-OH fluorène et 1-OH ou 2-OH-naphthalène) sont plus élevés à PND0 qu'à PND21 dans les 2 groupes exposés aux HAP, soulignant probablement une activation métabolique lors de l'exposition *in utero*, qui s'atténuerait avec l'absence d'exposition lors de l'allaitement.

Chapitre 2 : Etude des effets d'une exposition répétée par voie alimentaire à un mélange de 16 HAP chez la rate gestante puis allaitante. Effets neurocomportementaux à court et à long terme.

I. Protocole

Les données relatives à l'élevage, aux accouplements et à l'exposition des animaux ont été précédemment décrites (Section méthodologique : I. et II.3.).

La figure 28 illustre sur une échelle de temps le déroulement de cette expérimentation.



Exposition aux HAP pendant la Gestation : Exposition à 0 ; 2 ; 200 µg/kg/jour **puis l'Allaitement** : Exposition à 0 ; 1,5 ; 150 µg/kg/jour

Figure 28 : Représentation du déroulement de l'expérimentation

L'ensemble des protocoles des tests et des analyses histologiques a été décrit dans la section méthodologique.

II. Effectifs

Pour cette expérimentation, un total de 44 femelles ont été accouplées (**Tableau ?**), et 499 ratons sont nés. Le groupe témoin a été composé de 13 femelles (154 ratons), 16 femelles ont été exposées à la dose de 2 µg/kg/jour de GD1 à PND0 puis 1,5 µg/kg/jour de PND1 à PND21 (**Dose 1**) (185 ratons), et 15 femelles ont été exposées à la dose de 200 µg/kg/jour de GD1 à PND0 puis 150 µg/kg/jour de PND1 à PND21 (**Dose 2**) (160 ratons).

Pour les tests de développement sensorimoteur, 53 ratons témoins (25 mâles et 28 femelles), 62 ratons exposés à la dose 1 (33 mâles et 29 femelles), 66 ratons exposés à la dose 2 (37 mâles et 29 femelles) ont été testés.

Le comportement maternel a été observé sur 6 femelles témoins, 7 femelles exposées à la dose 1 et 7 femelles exposées à la dose 2.

A l'âge adulte, le comportement individuel de 24 rats témoins (12 mâles et 12 femelles), 28 rats exposés à la dose 1 (14 mâles et 14 femelles), 28 rats exposés à la dose 2 (14 mâles et 14 femelles) a été évalué.

Le comportement social des rats a été évalué sur 24 animaux témoins, 12 animaux exposés à la dose la plus faible, et 12 animaux exposés à la dose la plus forte. L'ensemble des animaux a été réparti en 8 groupes de 6 individus, composé à chaque fois de 3 animaux témoins et 3 animaux exposés.

Les analyses histologiques ont été réalisées sur 15 mâles (5/groupe) à chacun des 3 stades.

Les dosages de HAP ont été réalisés sur les cerveaux de 12 jeunes (4/groupe) aux deux stades.

III. Effets de l'exposition précoce aux HAP

III.1. Reproduction

L'analyse statistique n'a mis en évidence aucune différence significative concernant la durée de gestation des femelles, la taille des portées et le *sex ratio* entre les 3 groupes (Tableau 74). Ces résultats montrent ainsi que l'exposition aux HAP dès le premier jour de la gestation n'a pas eu d'influence sur son déroulement.

Tableau 74 : Données relatives à la reproduction

	Témoins	Dose 1	Dose 2	Significativité
Nombre de femelles accouplées	13	16	15	
Nombre de rats nés	154	185	160	
Nombre de rats par portée	12,00 (10,00 - 14,00)	11,50 (10,00 - 13,00)	10,00 (9,00- 13,00)	n.s.
Sex ratio (%)	45,00	51,00	58,00	n.s.
Durée de gestation (j)	23,00 (22,50 - 23,00)	23,00 (22,00- 23,00)	23,00 (22,00- 23,00)	n.s.

Le Chi-Deux de Pearson et le test de Kruskal-Wallis ont été utilisés pour comparer les animaux des trois groupes. La durée de la gestation et le nombre de rats sont présentées sous forme de médianes et les rangs sont indiqués entre parenthèses.

n.s. : non significatif

III.2. Poids corporel

L'ANOVA à 2 facteurs réalisée pour déterminer l'effet d'une exposition prénatale aux HAP sur le poids corporel des rats entre PND3 et PND60 a mis en évidence des différences significatives entre les trois groupes entre PND3 et PND7, à PND11 et à PND35 (**Tableau 75**). L'ensemble des animaux exposés aux HAP a ainsi un poids corporel plus faible que celui des animaux témoins entre PND3 et PND7, et un poids plus élevé à PND35 (**Tableau 75**). De plus, les animaux exposés à la dose 1 ont un poids plus faible que celui des témoins à PND11 (**Tableau 75**).

Par ailleurs, un effet du facteur « sexe » a été observé à partir de PND35 (**Tableau 75**), les femelles montrant une croissance plus faible que les mâles (**Tableau 75**).

Enfin, une interaction entre les deux facteurs étudiés a été observée à PND13 (**Tableau 75**).

Tableau 75 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante puis allaitante sur le poids corporel du jeune rat

Poids (g)	Témoin		Dose 1		Dose 2		groupe		sexe		groupe*sexe	
	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles	F _(2,71)	p	F _(2,71)	p	F _(2,71)	p
PND3	8,61 ± 0,16	8,62 ± 0,11	8,13 ± 0,13 *	8,18 ± 0,11 *	8,10 ± 0,18 **	7,81 ± 0,19 **	8,602	<0,01	0,327	n.s.	0,786	n.s.
PND4	9,90 ± 0,14	9,68 ± 0,11	9,18 ± 0,12 **	9,25 ± 0,10 **	9,17 ± 0,17 **	8,92 ± 0,21 **	12,055	<0,01	1,130	n.s.	0,779	n.s.
PND5	11,26 ± 0,20	11,18 ± 0,17	10,64 ± 0,17	10,74 ± 0,14	10,41 ± 0,29 **	10,42 ± 0,25 **	6,424	<0,01	0,002	n.s.	0,078	n.s.
PND6	12,56 ± 0,26	12,57 ± 0,17	12,09 ± 0,19	12,23 ± 0,16	12,16 ± 0,25 *	11,76 ± 0,25 *	3,692	<0,05	0,219	n.s.	0,831	n.s.
PND7	14,34 ± 0,26	14,23 ± 0,19	13,35 ± 0,20 *	13,59 ± 0,21 *	13,66 ± 0,33 *	13,54 ± 0,34 *	4,689	<0,05	0,001	n.s.	0,287	n.s.
PND8	15,82 ± 0,27	15,75 ± 0,20	14,88 ± 0,22	15,30 ± 0,24	15,16 ± 0,36	15,16 ± 0,40	3,053	n.s.	0,228	n.s.	0,402	n.s.
PND9	17,56 ± 0,32	17,42 ± 0,31	16,93 ± 0,25	17,25 ± 0,21	17,12 ± 0,47	16,92 ± 0,45	0,979	n.s.	0,000	n.s.	0,349	n.s.
PND10	19,13 ± 0,37	19,24 ± 0,36	18,56 ± 0,35	19,47 ± 0,36	20,18 ± 0,55	19,28 ± 0,47	1,593	n.s.	0,013	n.s.	2,349	n.s.
PND11	21,42 ± 0,40	21,33 ± 0,29	20,28 ± 0,29 *	20,85 ± 0,28 *	21,35 ± 0,37	20,91 ± 0,39	3,123	<0,05	0,002	n.s.	1,214	n.s.
PND12	23,30 ± 0,44	22,65 ± 0,35	22,62 ± 0,39	23,35 ± 0,39	23,41 ± 0,49	23,50 ± 0,52	0,775	n.s.	0,026	n.s.	1,212	n.s.
PND13	25,14 ± 0,25	24,64 ± 0,25	24,20 ± 0,36	25,14 ± 0,28	25,34 ± 0,45	24,34 ± 0,43	0,204	n.s.	0,415	n.s.	4,046	<0,05
PND14	26,34 ± 0,44	26,34 ± 0,35	26,01 ± 0,36	26,92 ± 0,34	26,78 ± 0,49	26,08 ± 0,45	0,046	n.s.	0,041	n.s.	1,952	n.s.
PND15	28,06 ± 0,47	27,99 ± 0,38	27,73 ± 0,44	28,72 ± 0,41	28,95 ± 0,51	27,93 ± 0,44	0,394	n.s.	0,008	n.s.	2,574	n.s.
PND16	29,70 ± 0,47	29,59 ± 0,42	29,51 ± 0,44	30,16 ± 0,44	30,84 ± 0,52	29,85 ± 0,43	1,222	n.s.	0,155	n.s.	1,641	n.s.
PND17	31,33 ± 0,54	31,28 ± 0,41	31,22 ± 0,50	32,36 ± 0,48	32,73 ± 0,53	31,62 ± 0,45	1,463	n.s.	0,000	n.s.	2,690	n.s.
PND18	33,52 ± 0,53	33,21 ± 0,49	33,47 ± 0,48	34,18 ± 0,45	34,50 ± 0,54	33,38 ± 0,51	0,681	n.s.	0,335	n.s.	1,713	n.s.
PND19	35,53 ± 0,65	35,49 ± 0,54	35,65 ± 0,52	36,75 ± 0,46	36,92 ± 0,62	35,95 ± 0,54	1,379	n.s.	0,004	n.s.	1,734	n.s.
PND20	37,83 ± 0,65	38,10 ± 0,64	38,05 ± 0,59	39,79 ± 0,52	39,69 ± 0,70	38,82 ± 0,55	2,205	n.s.	0,553	n.s.	2,334	n.s.
PND21	41,03 ± 0,76	41,50 ± 0,64	41,65 ± 0,55	43,04 ± 0,53	42,75 ± 0,71	41,88 ± 0,59	1,764	n.s.	0,388	n.s.	1,672	n.s.
PND22	43,17 ± 0,95	43,38 ± 0,76	43,75 ± 0,60	45,31 ± 0,60	45,31 ± 0,74	44,42 ± 0,65	2,586	n.s.	0,247	n.s.	1,505	n.s.
PND23	46,49 ± 0,96	46,16 ± 0,85	46,41 ± 0,61	47,86 ± 0,61	47,75 ± 0,79	46,71 ± 0,71	0,822	n.s.	0,002	n.s.	1,496	n.s.
PND24	49,62 ± 1,15	49,17 ± 0,98	49,30 ± 0,71	50,29 ± 0,72	50,83 ± 0,92	49,42 ± 0,79	0,333	n.s.	0,157	n.s.	0,986	n.s.
PND25	53,41 ± 1,20	52,67 ± 1,06	53,46 ± 0,69	54,45 ± 0,66	55,14 ± 1,03	53,29 ± 0,87	0,829	n.s.	0,488	n.s.	1,229	n.s.
PND30	76,29 ± 1,38	75,65 ± 1,41	78,85 ± 0,97	78,07 ± 0,87	77,20 ± 1,53	76,40 ± 0,95	2,160	n.s.	0,552	n.s.	0,002	n.s.
PND35	101,90 ± 2,16	96,66 ± 1,59	106,16 ± 1,59 *	99,77 ± 1,17 *	108,81 ± 1,74 **	101,00 ± 1,48 **	5,828	<0,01	23,516	<0,01	0,297	n.s.
PND40	133,37 ± 2,58	118,47 ± 2,49	135,63 ± 2,75	121,20 ± 1,66	134,48 ± 3,86	120,94 ± 2,26	0,440	n.s.	42,361	<0,01	0,033	n.s.
PND45	159,00 ± 3,27	132,32 ± 2,63	161,89 ± 3,31	136,95 ± 1,75	156,47 ± 3,84	134,97 ± 2,15	1,133	n.s.	104,675	<0,01	0,402	n.s.
PND50	184,33 ± 3,93	145,78 ± 2,92	187,72 ± 4,01	150,48 ± 1,92	186,52 ± 3,98	149,63 ± 3,26	0,718	n.s.	178,874	<0,01	0,031	n.s.
PND55	210,47 ± 3,82	159,81 ± 3,16	213,51 ± 4,74	162,28 ± 2,24	214,72 ± 4,32	163,58 ± 3,71	0,553	n.s.	269,401	<0,01	0,003	n.s.
PND60	228,85 ± 4,26	169,33 ± 3,02	231,30 ± 5,44	172,07 ± 2,20	233,26 ± 4,26	169,15 ± 3,69	0,223	n.s.	340,587	<0,01	0,234	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 de Bonferroni a été utilisé pour comparaisons multiples.

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

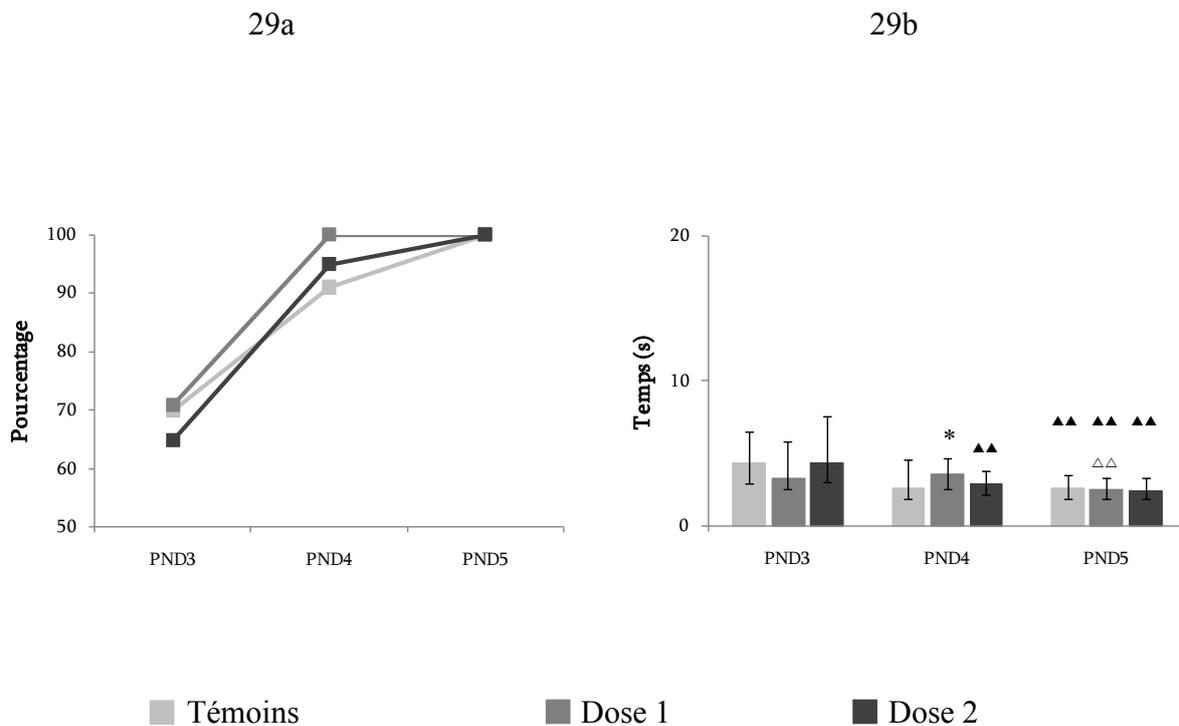
n.s. : non significatif

(Abréviations : PND, Post Natal Day)

III.3. Tests neurodéveloppementaux

III.3.1. Test de retournement

Le traitement statistique des données n'a montré aucune différence entre les groupes concernant le pourcentage de réussite à PND3, PND4 et PND5 (**Figure 29a**). Néanmoins, à PND4, les animaux exposés à la dose 1 ont mis significativement plus de temps pour se retourner que les animaux témoins (**Figure 29b**). Enfin, les animaux exposés à la dose 2 ont amélioré leurs performances entre PND3 et PND4, et l'ensemble des animaux est devenu plus performant à PND5 (**Figure 29b**).



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

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

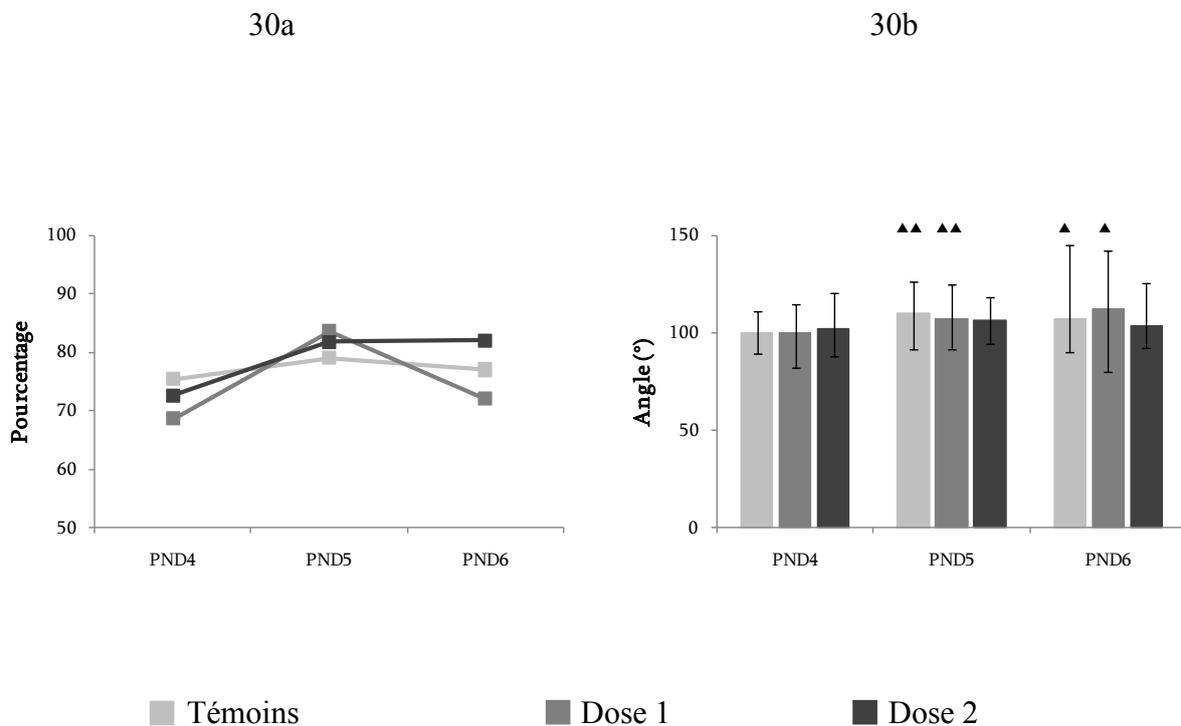
▲▲ : $p < 0,01$ différence statistiquement significative par rapport au 1er jour de test

▲▲▲ : $p < 0,01$ différence statistiquement significative par rapport au 2ème jour de test

Figures 29 a et b : Pourcentage de réussite au test de retournement (29a) et temps mis par les animaux des trois groupes pour se retourner (médianes et quartiles) (29b)

III.3.2. Test d'agrippement

L'analyse des données relevées dans ce test n'a pas montré de différence significative concernant le pourcentage de réussite (Figure 30a). De plus, aucune différence statistique concernant l'angle de chute n'a été mise en évidence entre les groupes (Figure 30b). Par ailleurs, les animaux témoins et les animaux exposés à la dose 1 améliorent leurs performances à PND5 et PND6 par rapport à PND4, au contraire de ceux exposés à la dose 2 (Figure 30b).



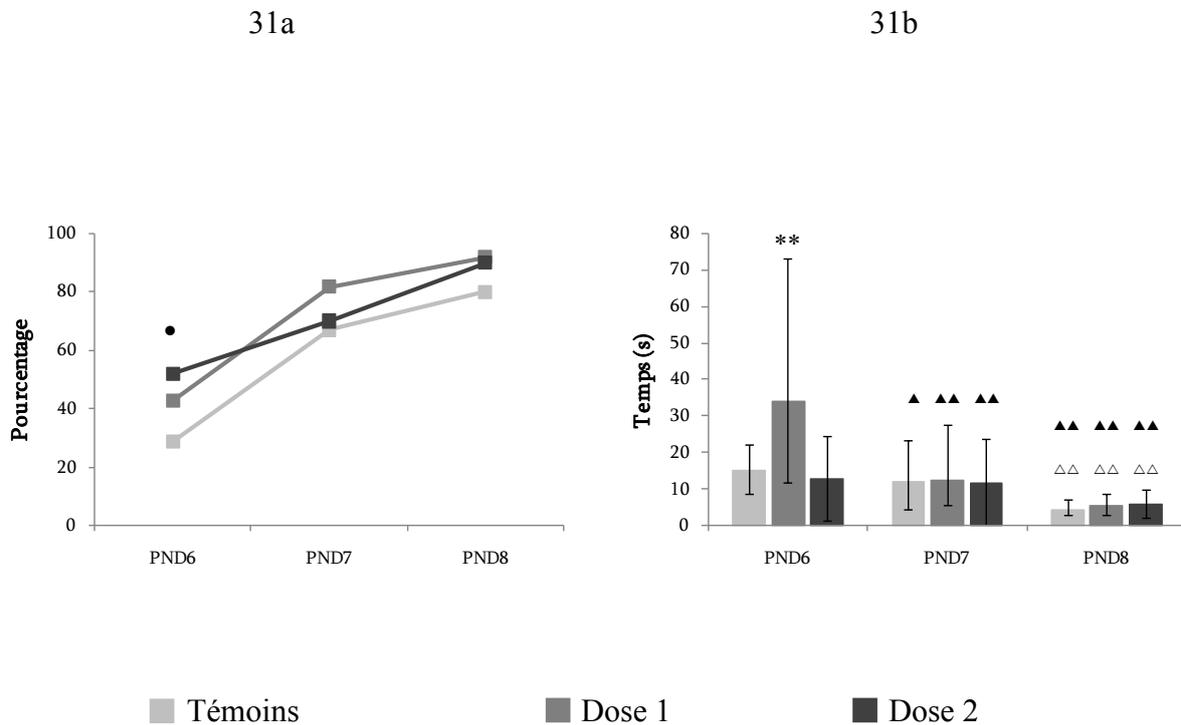
Le chi-deux de Pearson, le test de Kruskal-Wallis et le test de Friedman ont été réalisés pour comparer les animaux des trois groupes. Le test de Wilcoxon a été utilisé pour les comparaisons multiples.

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

Figures 30 a et b : Pourcentage de réussite au test d'agrippement (30a) et angle atteint par les animaux des trois groupes pour se retourner (médianes et quartiles) (30b)

III.3.3. Cliff Avoidance

Le Chi-Deux de Pearson a montré une variation significative du pourcentage de réussite entre les trois groupes à PND6 (**Figure 31a**), les animaux exposés à la dose 1 mettant significativement plus de temps pour reculer sur la plate-forme que les animaux témoins (**Figure ?b**). Par ailleurs, l'ensemble des animaux améliorent leurs performances au cours des trois jours de test, et ce de manière équivalente dans les trois groupes (**Figure 31b**).



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

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

• : $p < 0,05$ différence statistiquement significative entre les 3 groupes

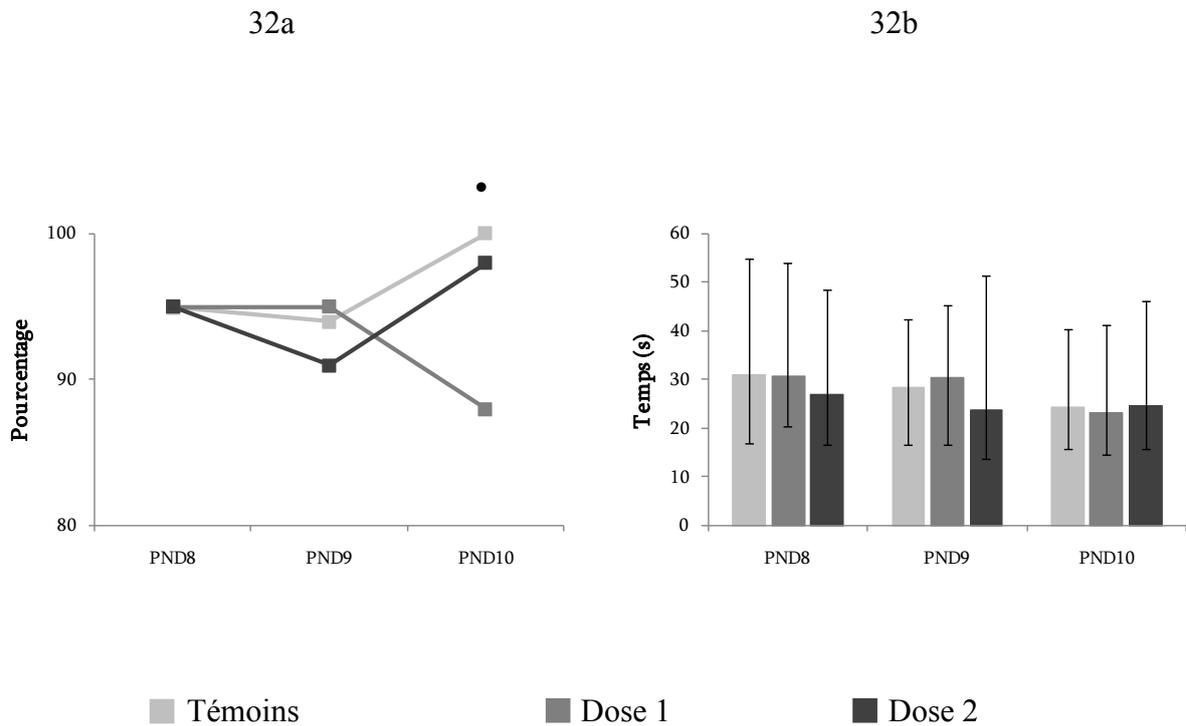
▲▲ : $p < 0,01$; ▲ : $p < 0,05$ différence statistiquement significative par rapport au 1er jour de test

▲▲ : $p < 0,01$ différence statistiquement significative par rapport au 2ème jour de test

Figures 31 a et b : Pourcentage de réussite au test du *cliff avoidance* (31a) et temps mis par les animaux des trois groupes pour reculer sur la plate-forme (médianes et quartiles) (31b)

III.3.4. Test de réaction anti-gravitaire

L'analyse du pourcentage de réussite a révélé une différence significative entre les trois groupes à PND10 (Figure 32a). Pour autant, aucune différence significative concernant le temps mis pour effectuer une rotation de 180°C n'a été observée entre les groupes (Figure 32b). De même, aucune différence significative sur l'évolution des performances au cours du temps n'a été mise en évidence (Figure 32b).



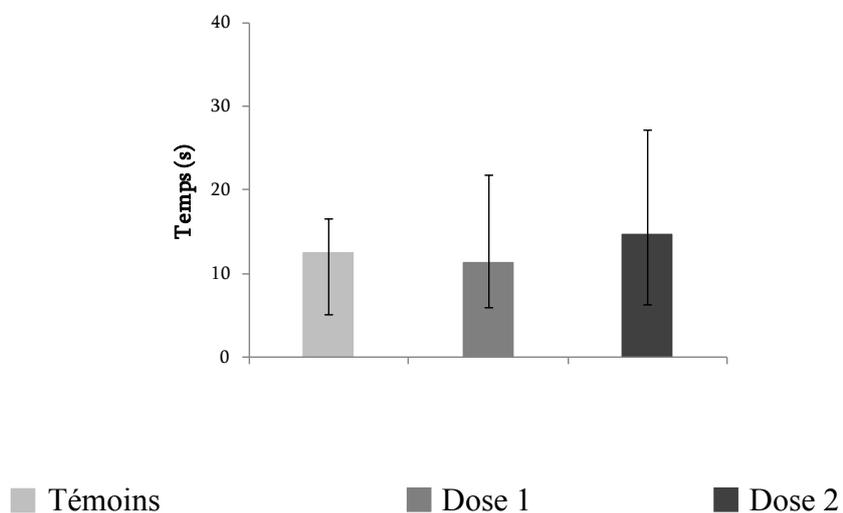
Le chi-deux de Pearson, le test de Kruskal-Wallis et le test de Friedman ont été réalisés pour comparer les animaux des trois groupes.

• : $p < 0,05$ différence statistiquement significative entre les 3 groupes

Figures 32 a et b : Pourcentage de réussite au test de la réaction anti-gravitaire (32a) et temps mis par les animaux des trois groupes pour effectuer une rotation de 180° (médianes et quartiles) (32b)

III.3.5. Test de suspension

Aucune différence significative n'a été révélée par l'analyse des temps obtenus à ce test (Figure 33).



Le test de Kruskal-Wallis et le test de Friedman ont été réalisés pour comparer les animaux des trois groupes.

Figure 33 : Temps de suspension des animaux des trois groupes avant la chute (médianes et quartiles)

III.3.6. Test de coordination locomotrice

L'ensemble des résultats obtenus à ce test sont présentés dans le tableau 76.

Tableau 76 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante sur la coordination locomotrice du jeune rat à PND19, 20 et 21

	Témoins			Dose 1			Dose 2		
	PND19	PND20	PND21	PND19	PND20	PND21	PND19	PND20	PND21
temps de nage (s)	27,00 (20,00 - 36,00)	7,00 ▲▲ (4,00 - 12,00)	4,00 ▲▲△△ (2,00 - 7,00)	27,00 (17,00 - 38,00)	8,00 ▲▲ (4,00 - 14,00)	4,00 ▲▲△△ (3,00 - 6,00)	28,00 (18,00 - 43,00)	7,00 ▲▲ (4,00 - 12,00)	3,00 ▲▲△△ (3,00 - 6,00)
temps de grimpe (s)	16,00 (13,00 - 43,00)	14,00 ▲▲ (9,00 - 27,00)	9,00 ▲▲△ (5,00 - 16,75)	34,00 (14,00 - 61,00)	10,00 ▲▲ (6,75 - 18,50)	7,00 ▲▲△△ (5,00 - 10,00)	32,00 (18,50 - 79,50)	12,00 ▲▲ (8,50 - 19,50)	8,00 ▲▲△△ (5,00 - 12,00)
temps de rétablissement	13,00 (7,00 - 16,00)	5,00 ▲▲ (4,00 - 9,00)	4,00 ▲▲△△ (2,00 - 4,00)	10,00 (5,00 - 17,00)	6,00 ▲▲ (4,00 - 9,00)	4,00 ▲▲△△ (3,00 - 5,25)	11,00 (7,00 - 19,50)	6,00 ▲▲ (4,00 - 8,50)	4,00 ▲▲△△ (3,00 - 5,00)
temps total (s)	66,00 (49,00 - 93,00)	29,00 ▲▲ (24,00 - 46,00)	17,00 ▲▲△△ (14,00 - 26,00)	77,00 (48,00 - 113,00)	27,00 ▲▲ (18,00 - 44,25)	16,00 ▲▲△△ (13,00 - 22,00)	91,00 (57,00 - 129,00)	28,00 ▲▲ (20,50 - 43,00)	17,00 ▲▲△△ (13,00 - 24,00)
réussite (%)	71,00	96,00 ●	96,00	76,00	100,00	100,00	69,00	90,00	98,00

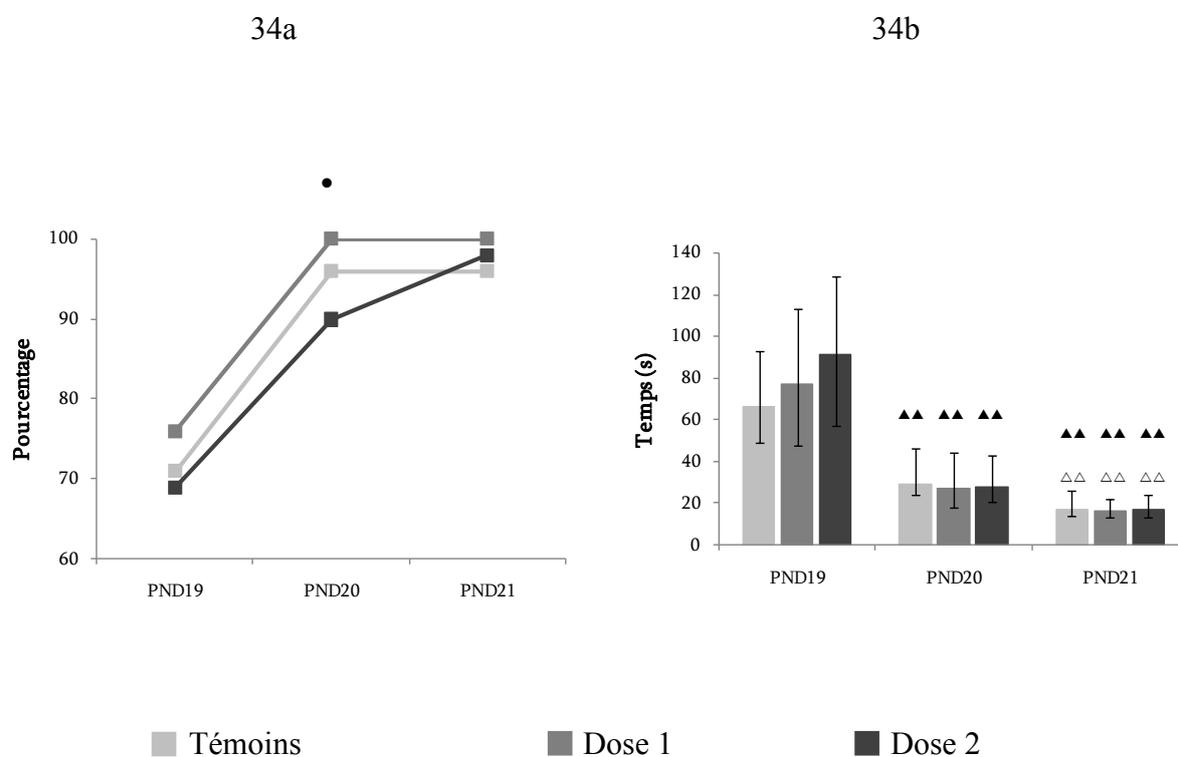
Les résultats sont présentés sous forme de médianes et les rangs sont indiqués entre parenthèses. Le chi-deux de Pearson, le test de Kruskal-Wallis et le test de Friedman ont été réalisés pour comparer les animaux des trois groupes. Les tests de Mann-Whitney et Wilcoxon ont été utilisés pour comparaisons multiples.

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

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

● : $p < 0,05$ différence statistiquement significative entre les 3 groupes

Les résultats ont montré une différence significative entre les groupes concernant le pourcentage de réussite à PND20 (**Figure 34a**). Par ailleurs, aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les trois groupes concernant le temps mis pour atteindre la plateforme, quel que soit le jour de test (**Figure 34b**). Enfin, tous les animaux ont amélioré leurs performances entre PND19 et 21, en mettant moins de temps pour réussir ce test (**Figure 34b**).



Le chi-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 les comparaisons multiples.

- : $p < 0,05$ différence statistiquement significative entre les 3 groupes
- ▲▲ : $p < 0,01$ différence statistiquement significative par rapport au 1er jour de test
- △△ : $p < 0,01$ différence statistiquement significative par rapport au 2ème jour de test

Figures 34 a et b : Pourcentage de réussite au test de la coordination locomotrice (34a) et temps mis par les animaux des trois groupes pour atteindre la plate-forme (médianes et quartiles) (34b)

III.3.7. Open-field

L'analyse statistique des différentes variables mesurées dans ce test n'a mis en évidence aucune différence significative entre les groupes, en ce qui concerne le nombre de cases traversées et le nombre de redressements (**Tableau 77**).

Tableau 77 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante puis allaitante sur l'activité comportementale du jeune rat dans l'open-field à PND25

	Témoins		Dose 1		Dose 2		ANOVA	
							F _(2, 113)	P
Nombre total de cases traversées	102,83	± 3,51	109,10	± 4,06	110,98	± 3,84	1,193	n.s.
Nombre total de redressements	26,20	± 1,73	25,79	± 1,74	26,32	± 1,43	0,030	n.s.

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

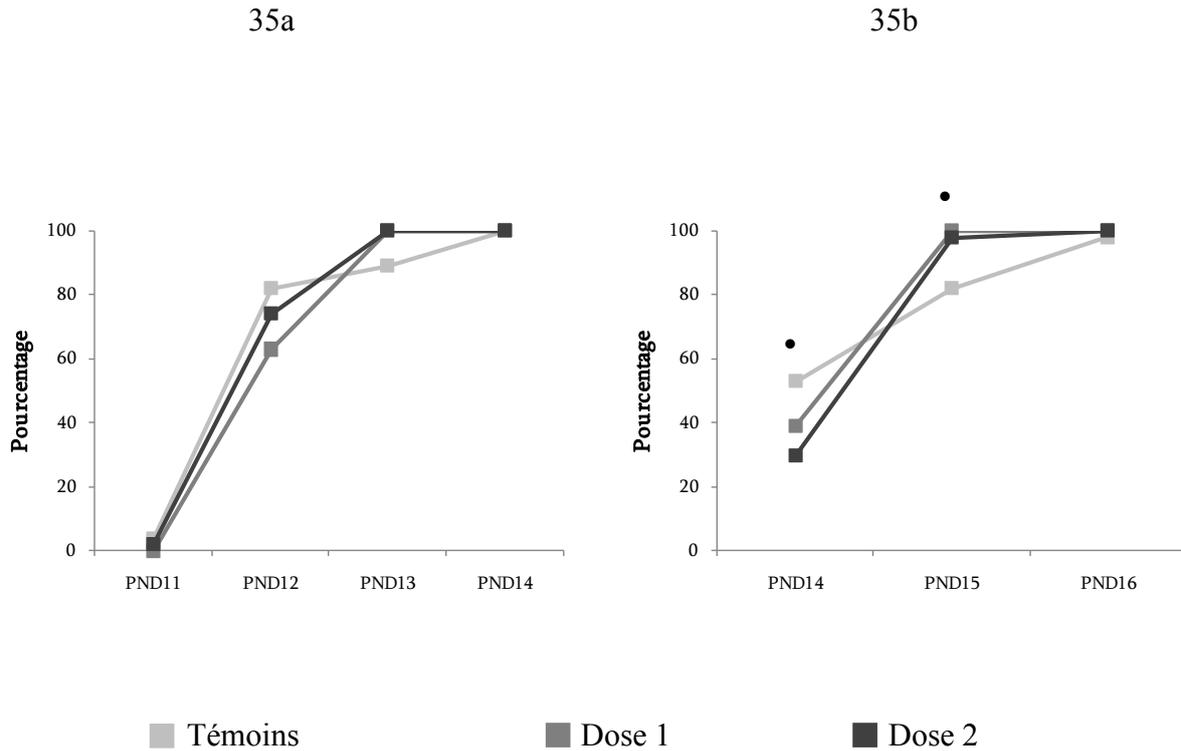
n.s. : non significatif

III.3.8. Test du sursaut au bruit

L'analyse statistique des résultats n'a montré aucune différence significative du pourcentage d'animaux présentant une réactivité au bruit entre les trois groupes (**Figure 35a**).

III.3.9. Ouverture des yeux

Le traitement statistique des données a montré une différence significative entre les trois groupes concernant le pourcentage d'animaux ayant les yeux ouverts, à PND14 et PND15 (**Figure 35b**).



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

• : $p < 0,05$ différence statistiquement significative entre les 3 groupes

Figures 35 a et b : Pourcentage d'animaux des trois groupes présentant une réactivité au bruit entre PND11 et PND14 (35a) et ayant les yeux ouverts entre PND14 et PND16 (35b)

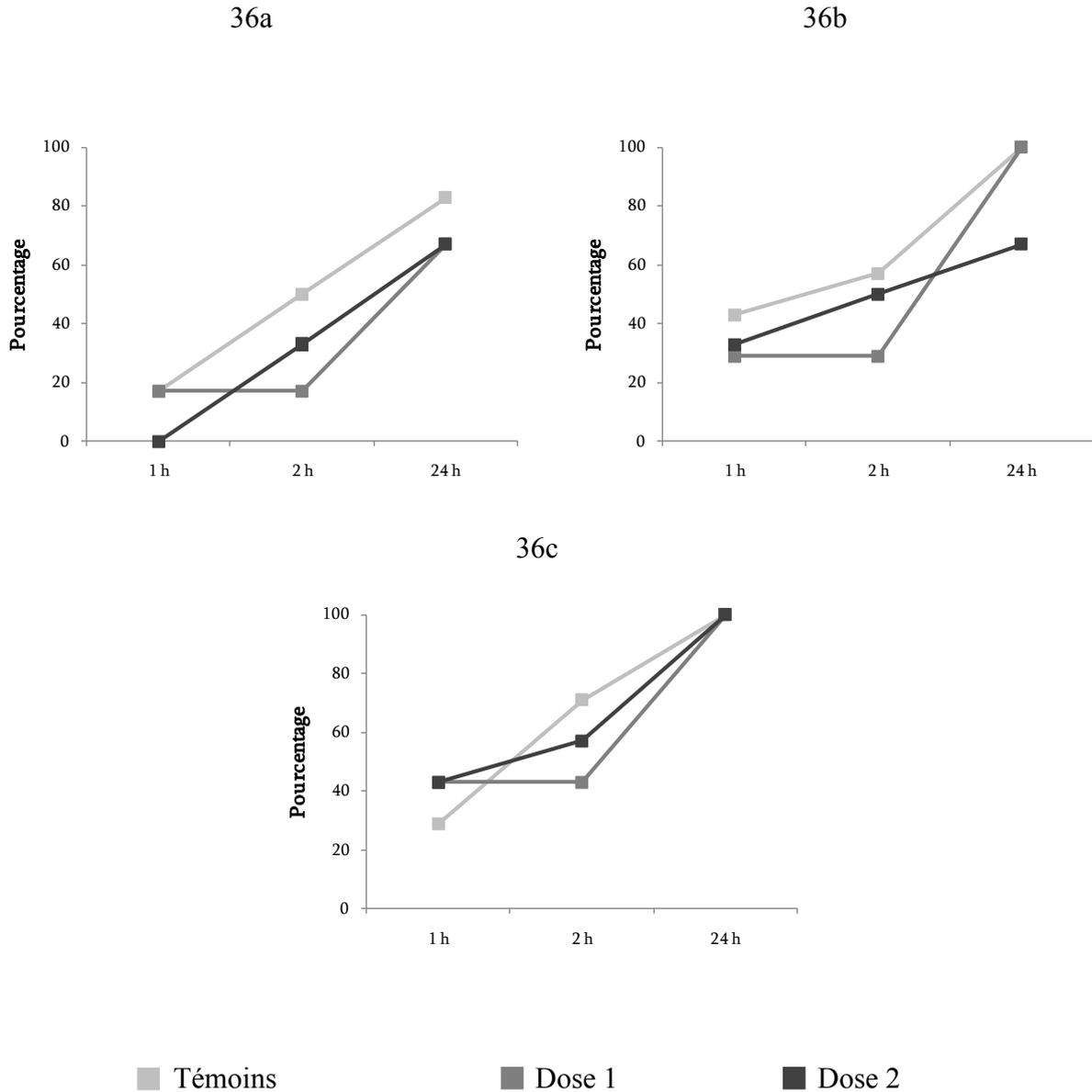
III.4. Comportement maternel

III.4.1. Construction du nid

Les résultats mesurés dans ce test n'ont montré aucune variation significative du pourcentage de femelles ayant construit un nid, quelque soit le moment de la mesure ou le jour de test (PND3, 6 et 8) (Figure 36a, 36b et 36c).

III.4.2. Ramassage des jeunes

L'analyse statistique n'a permis de révéler aucune différence significative, quelque soit la variable étudiée, dans ce test (**Tableau 78**).



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

Figures 36 a, b et c : Pourcentage de mères des trois groupes ayant construit un nid à PND3 (36a), PND6 (36b) et PND8 (36c)

Tableau 78 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante puis allaitante sur le comportement maternel de ramassage des jeunes

	1 ^{er} jour	2 ^{ème} jour	3 ^{ème} jour	groupe		jour de test		groupe*jour	
				F _(2,19)	p	F _(2,19)	p	F _(2,19)	p
Ramassage des jeunes (PND4, 7, 10)									
Temps de premier contact (s)									
Témoins	153,75 ± 134,56	305,25 ± 149,22	156,00 ± 91,54	0,487	n.s.	0,407	n.s.	0,793	n.s.
Dose 1	97,14 ± 49,78	68,57 ± 33,79	199,00 ± 98,72						
Dose 2	38,25 ± 30,64	225,86 ± 112,21	223,29 ± 98,68						
Temps de ramassage total (s)									
Témoins	308,75 ± 103,97	571,25 ± 243,05	346,00 ± 161,65	1,159	n.s.	3,036	n.s.	0,721	n.s.
Dose 1	203,67 ± 53,53	203,00 ± 66,13	481,00 ± 130,07						
Dose 2	127,75 ± 48,24	301,17 ± 124,63	349,71 ± 80,47						
Temps passé auprès des jeunes (s)									
Témoins	544,00 ± 172,13	462,40 ± 166,44	566,80 ± 136,18	0,029	n.s.	4,509	n.s.	0,592	n.s.
Dose 1	354,00 ± 126,26	553,57 ± 128,52	641,00 ± 52,37						
Dose 2	408,33 ± 102,75	304,86 ± 83,05	756,86 ± 100,87						
Reconstruction d'un nid (%)									
Témoins	80	60	60	n.s.					
Dose 1	71	86	80						
Dose 2	67	86	83						

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± E.S.M. Les variables de temps ont été étudiées par l'ANOVA à 2 facteurs, dont un répété. Le pourcentage d'animaux ayant reconstruit un nid a été analysé par le Chi-Deux de Pearson.

(Abréviations : PND, Post Natal Day)

III.5. Comportement individuel à l'âge adulte

III.5.1. Labyrinthe en croix surélevé

Aucune variation significative concernant le nombre de passages dans les différentes zones n'a été observée entre les trois groupes (**Tableau 79**). Les animaux exposés à la dose 1 passent significativement moins de temps dans les BO et plus de temps dans les BF que les animaux témoins, la même tendance étant observée pour les animaux exposés à la dose 2 (**Tableau 77**). De plus, les animaux exposés à la dose 2 effectuent significativement moins de *head dipping* que les animaux témoins (**Tableau 79**).

L'ANOVA à 2 facteurs a également permis de mettre en évidence un effet du sexe dans le comportement des animaux ; les femelles effectuent significativement plus de passages dans chacune des trois zones (zc, BO, BF, ce qui souligne une activité plus importante des femelles par rapport aux mâles, quelle que soit la dose d'exposition (**Tableau 79**). De plus, elles passent plus de temps en BO et moins de temps en BF (**Tableau 79**).

Enfin, une interaction entre le traitement et le sexe n'a été observée que pour le pourcentage de *head dipping* effectué en zone centrale (**Tableau 79**).

Tableau 79 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante puis allaitante sur l'activité comportementale du rat adulte dans le labyrinthe en croix surélevé

Variable	Témoïn		Dose 1		Dose 2		groupe		sexe		groupe*sexe		
	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles	F (2,79)	p	F (2,79)	p	F (2,79)	p	
Nombre de passages	zone centrale	11,17 ± 1,18	14,08 ± 0,86	10,57 ± 1,24	13,80 ± 1,13	11,77 ± 0,59	14,85 ± 0,97	0,618	n.s.	13,189	<0,01	0,011	n.s.
	zone ouverte	5,83 ± 0,56	8,00 ± 0,79	4,79 ± 0,67	7,07 ± 0,63	5,46 ± 0,55	7,77 ± 0,61	1,285	n.s.	18,413	<0,01	0,006	n.s.
	zone fermée	5,08 ± 0,68	6,17 ± 0,47	5,43 ± 0,81	6,60 ± 0,65	5,92 ± 0,40	7,08 ± 0,62	0,912	n.s.	4,798	<0,05	0,003	n.s.
	Totaux	22,08 ± 2,27	28,25 ± 1,75	20,79 ± 2,41	27,47 ± 2,28	23,15 ± 1,18	29,69 ± 2,01	0,648	n.s.	14,687	<0,01	0,008	n.s.
	BO+BF	10,92 ± 1,10	14,17 ± 0,89	10,21 ± 1,17	13,67 ± 1,15	11,38 ± 0,59	14,85 ± 1,05	0,677	n.s.	16,105	<0,01	0,006	n.s.
	% entrées BO	54,21 ± 2,86	55,80 ± 3,30	47,64 ± 4,02	52,08 ± 2,28	46,79 ± 3,81	52,74 ± 2,31	1,701	n.s.	2,369	n.s.	0,229	n.s.
	% entrées BF	45,80 ± 2,86	44,20 ± 3,30	52,36 ± 4,02	47,92 ± 2,28	53,21 ± 3,81	47,26 ± 2,31	1,701	n.s.	2,369	n.s.	0,229	n.s.
Temps (s)	% zone protégée	73,13 ± 1,43	72,02 ± 1,68	76,57 ± 1,98	74,12 ± 1,16	76,98 ± 1,92	73,70 ± 1,14	1,938	n.s.	3,09	n.s.	0,227	n.s.
	zone centrale	61,89 ± 7,06	56,30 ± 6,53	55,59 ± 8,79	61,62 ± 4,24	68,96 ± 6,05	58,63 ± 3,99	0,178	n.s.	3,696	n.s.	0,258	n.s.
	BO	149,29 ± 10,90	159,13 ± 11,62	103,23 ± 11,91 *	142,01 ± 10,54 *	108,24 ± 15,59	149,06 ± 7,83	3,614	<0,05	8,371	<0,01	0,846	n.s.
Head dipping	BF	84,88 ± 9,13	84,57 ± 6,68	122,58 ± 7,97 *	101,47 ± 6,71 *	122,80 ± 15,12 †	92,31 ± 7,84 †	4,620	<0,05	4,431	<0,05	1,080	n.s.
	Totaux	8,92 ± 0,93	9,33 ± 0,79	5,85 ± 1,01	7,80 ± 0,90	5,64 ± 0,66 *	7,38 ± 0,85 *	3,782	<0,05	1,876	n.s.	0,179	n.s.
Redressements	% hd en zc	0,19 ± 0,05	0,26 ± 0,05	0,31 ± 0,08	0,27 ± 0,04	0,29 ± 0,08	0,10 ± 0,03	1,316	n.s.	4,820	<0,05	4,222	<0,05
	Totaux	10,33 ± 1,12	9,92 ± 1,43	12,21 ± 1,60	10,87 ± 1,02	14,08 ± 1,38	11,38 ± 1,39	1,796	n.s.	1,834	n.s.	0,348	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 de Bonferroni a été utilisé pour comparaisons multiples.

t : $p = 0,053$

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

n.s. : non significatif

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

III.5.2. Open-field

Dans ce test, les animaux exposés à la dose 1 ont traversé significativement moins de cases dans la zi que les animaux témoins (**Tableau 80**). Les animaux exposés aux deux doses de HAP ont traversé significativement plus de cases dans la zone périphérique, ainsi qu'un plus grand nombre de cases que les animaux témoins (**Tableau 80**). De plus, tous les animaux exposés ont passé significativement moins de temps dans la zone intermédiaire, au profit de la zone périphérique (**Tableau 80**). Enfin, les animaux exposés à la dose 2 ont effectué significativement plus de redressements que les animaux témoins (**Tableau 80**).

Par ailleurs, aucune différence significative liée au sexe des animaux testés n'a été observée (**Tableau 80**).

Enfin, l'analyse statistique n'a mis en évidence aucune interaction entre les deux facteurs étudiés (**Tableau 80**).

Tableau 80 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante puis allaitante sur l'activité comportementale du rat adulte dans l'open-field

Variable	Témoin		Dose 1		Dose 2		groupe		sexe		groupe*sexe		
	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles	F (2, 79)	p	F (2, 79)	p	F (2, 79)	p	
Nombre de cases traversées	zc	8,17 ± 1,12	7,55 ± 1,09	6,36 ± 1,15	7,53 ± 0,84	7,43 ± 1,04	11,08 ± 1,41	2,298	n.s.	2,349	n.s.	1,767	n.s.
	zi	27,00 ± 3,59	29,58 ± 2,35	20,36 ± 2,26 *	21,71 ± 1,95 *	22,07 ± 2,57	29,38 ± 3,45	3,657	<0.05	2,839	n.s.	0,687	n.s.
	zo	35,17 ± 3,78	38,17 ± 3,21	26,71 ± 3,03	30,80 ± 2,96	29,50 ± 3,11	38,17 ± 4,25	2,880	n.s.	3,617	n.s.	0,387	n.s.
	zp	81,25 ± 9,05	81,92 ± 5,97	114,69 ± 7,90 **	110,47 ± 7,13 **	105,38 ± 5,06 **	102,50 ± 5,83 **	10,338	<0.01	0,141	n.s.	0,065	n.s.
	totale	116,42 ± 11,53	120,08 ± 7,07	142,77 ± 8,43 *	141,27 ± 7,85 *	136,92 ± 6,28 *	142,25 ± 7,91 *	4,835	<0.05	0,135	n.s.	0,096	n.s.
Temps (s)	zc	18,00 ± 3,06	15,55 ± 2,03	14,73 ± 2,79	13,20 ± 1,21	17,02 ± 1,92	14,90 ± 1,35	0,940	n.s.	1,354	n.s.	0,024	n.s.
	zi	54,18 ± 8,48	50,66 ± 5,78	30,75 ± 3,97 **	30,61 ± 3,01 **	31,30 ± 4,07 **	34,36 ± 3,72 **	11,260	<0.01	0,002	n.s.	0,214	n.s.
	zo	72,18 ± 10,54	67,95 ± 6,73	47,18 ± 5,95	43,81 ± 3,53	50,61 ± 4,94	49,26 ± 4,60	8,469	<0.01	0,348	n.s.	0,028	n.s.
	zp	227,82 ± 10,54	232,05 ± 6,73	252,82 ± 5,95 **	256,19 ± 3,53 **	252,63 ± 4,03 **	250,74 ± 4,60 **	8,469	<0.01	0,348	n.s.	0,028	n.s.
Redressements	19,58 ± 2,85	21,42 ± 3,44	23,73 ± 1,51	21,46 ± 1,86	28,69 ± 2,46 **°	28,85 ± 1,96 **°	6,381	<0.01	0,002	n.s.	0,348	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 de Bonferroni a été utilisé pour comparaisons multiples.

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

° : $p < 0,05$ différence statistiquement significative par rapport au groupe Dose 1

n.s. : non significatif

(Abréviations :zc, zone centrale ; zi, zone intermédiaire ; zo, zone ouverte ; zp, zone périphérique)

III.5.3. Labyrinthe en Y

L'analyse des données relevées à l'issue de ce test a montré que les animaux exposés à la dose 2 visitent significativement plus de branches lors de la première minute du test que les animaux témoins (**Tableau 81**).

Par ailleurs, l'ANOVA à 2 facteurs a permis de mettre en évidence un effet du sexe sur le comportement des animaux (**Tableau 81**). Ainsi, les femelles ont visité significativement plus de branches que les mâles lors de la première minute et lors de la totalité du test (**Tableau 81**). De plus, les femelles ont réalisé significativement moins de triplets justes que les mâles (**Tableau 81**).

Enfin, aucune interaction entre le traitement et le sexe n'a été observée (**Tableau 81**).

Tableau 81 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante puis allaitante sur l'activité comportementale du rat adulte dans le labyrinthe en Y

Variable	Témoïn		Dose 1		Dose 2		groupe		sexe		groupe*sexe	
	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles	F (2,79)	p	F (2,79)	p	F (2,79)	p
Nombre de redressements	72,50 ± 3,57	80,33 ± 4,89	77,85 ± 3,75	81,71 ± 4,98	82,00 ± 3,47	80,00 ± 3,72	0,641	n.s.	0,922	n.s.	0,719	n.s.
Nombre total de branches visitées	33,75 ± 1,92	35,17 ± 1,37	31,00 ± 0,93	36,15 ± 2,38	34,71 ± 1,40	38,71 ± 1,39	2,036	n.s.	6,923	<0.01	0,652	n.s.
% de triplets justes	67,75 ± 2,09	60,58 ± 2,39	66,33 ± 2,02	60,15 ± 2,01	64,57 ± 2,32	56,36 ± 3,44	1,016	n.s.	11,352	<0.01	0,117	n.s.
Nombre de branches visitées à la 1ère minute	5,09 ± 0,28	5,73 ± 0,27	4,92 ± 0,29	5,86 ± 0,27	5,86 ± 0,35 *°	6,50 ± 0,25 *°	5,041	<0.01	9,600	<0.01	0,18	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 de Bonferroni a été utilisé pour comparaisons multiples.

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

° : $p < 0,05$ différence statistiquement significative par rapport au groupe Dose 1

n.s. : non significatif

III.5.4. Labyrinthe radial à 8 branches

L'analyse à 3 facteurs des différentes variables relevées au cours des 10 jours de test dans le labyrinthe radial à 8 branches n'a révélé aucun effet significatif de l'exposition aux HAP, quelle que soit la dose étudiée (**Tableau 83**).

Un effet du facteur sexe a été observé pour l'une des variables étudiées (**Tableau 83**). Ainsi les femelles ont visité moins de branches avant la première erreur que les mâles (**Tableau 82**).

Par ailleurs, le traitement statistique des données a permis de mettre en évidence un effet du jour de test, pour toutes les variables analysées (**Tableau 83**). Ainsi, les animaux des trois groupes ont significativement amélioré leurs performances au cours du temps, en mettant moins de temps pour accomplir le test, en visitant un nombre total de branches et un nombre de branches avant la première erreur moins importants, et en visitant plus de branches par minute (**Tableau 82**).

Aucune interaction entre l'exposition aux HAP et le sexe, entre l'exposition et le jour de test, entre le sexe et le jour de test, ou entre ces trois facteurs n'a été observée (**Tableau 83**).

Tableau 82 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante puis allaitante sur l'activité comportementale du rat adulte dans le labyrinthe radial à 8 branches (1/2)

Variable	Jour 1		Jour 6		Jour 10	
	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles
Temps total (s)						
Témoins	105,25 ± 10,32	109,00 ± 7,96	50,83 ± 4,44	52,50 ± 5,34	47,08 ± 4,94	52,42 ± 5,12
Dose 1	113,57 ± 8,66	108,87 ± 9,83	63,86 ± 8,49	55,79 ± 8,15	58,86 ± 10,36	47,67 ± 5,20
Dose 2	112,93 ± 9,48	99,67 ± 15,04	68,86 ± 6,86	75,67 ± 12,24	49,79 ± 4,75	49,00 ± 4,08
Nombre total de branches visitées						
Témoins	11,75 ± 0,64	11,83 ± 0,63	10,33 ± 0,48	10,33 ± 0,59	9,50 ± 0,45	9,75 ± 0,39
Dose 1	11,36 ± 0,84	12,53 ± 0,73	10,79 ± 1,09	10,71 ± 0,89	9,86 ± 0,71	9,73 ± 0,55
Dose 2	12,36 ± 1,08	11,17 ± 0,86	11,93 ± 1,06	13,50 ± 1,68	10,07 ± 0,86	10,58 ± 0,69
Nombre de branches visitées avant la 1ère erreur						
Témoins	5,33 ± 0,41	4,50 ± 0,51	6,17 ± 0,46	6,17 ± 0,47	6,25 ± 0,46	5,50 ± 0,57
Dose 1	5,93 ± 0,50	5,27 ± 0,44	7,00 ± 0,31	5,79 ± 0,47	6,64 ± 0,45	6,20 ± 0,39
Dose 2	5,00 ± 0,38	5,08 ± 0,61	5,93 ± 0,43	4,92 ± 0,40	7,07 ± 0,38	5,67 ± 0,58
Nombre de branches visitées/min						
Témoins	7,18 ± 0,54	6,77 ± 0,43	12,88 ± 0,83	12,64 ± 0,92	13,13 ± 0,97	12,44 ± 1,44
Dose 1	6,18 ± 0,38	7,55 ± 0,61	10,83 ± 0,69	12,81 ± 0,99	12,30 ± 1,30	13,46 ± 0,99
Dose 2	6,63 ± 0,25	7,48 ± 0,59	10,74 ± 0,53	11,56 ± 0,68	12,65 ± 0,73	13,52 ± 0,89

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

Tableau 83 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante puis allaitante sur l'activité comportementale du rat adulte dans le labyrinthe radial à 8 branches (2/2)

Variable	Groupe		Sexe		Jour de test		Groupe*sexe		Groupe*jour		Sexe*jour		Groupe*sexe*jour	
	F (2,79)	p	F (2,79)	p	F (2,79)	p	F (2,79)	p	F (2,79)	p	F (2,71)	p	F (2,71)	p
Temps total (s)	0,837	n.s.	0,319	n.s.	82,049	<0.01	0,666	n.s.	1,203	n.s.	0,157	n.s.	0,337	n.s.
Nombre total de branches visitées	1,785	n.s.	0,297	n.s.	9,107	<0.01	0,022	n.s.	1,417	n.s.	0,128	n.s.	0,947	n.s.
Nombre de branches visitées avant la 1ère erreur	2,575	n.s.	11,568	<0.01	8,310	<0.01	0,179	n.s.	0,954	n.s.	0,211	n.s.	0,962	n.s.
Nombre de branches visitées/min	0,195	n.s.	1,443	n.s.	160,100	<0.01	1,160	n.s.	1,397	n.s.	0,176	n.s.	0,073	n.s.

Les effets principaux et l'interaction étudiés par l'ANOVA à 3 facteurs, dont un répété sont présentés avec les valeurs de F obtenues et la probabilité correspondante.

n.s. : non significatif

III.6. Comportement social à l'âge adulte

Les données relevées pour étudier le comportement social des animaux seront décrites comme suit : tout d'abord le comportement des animaux dans les différents groupes sera présenté, puis l'influence de l'exposition prénatale aux HAP sera décrite.

III.6.1. Analyse de l'ensemble des groupes

III.6.1.1. Différenciation comportementale : Transporteurs et Non Transporteurs

Au terme de la mise en eau complète du dispositif, des rats du type Non Transporteurs sont apparus dans tous les groupes (**Tableau 84**), le phénomène de différenciation sociale s'est donc complètement manifesté. La répartition 2 Transporteurs/4 Non Transporteurs est majoritaire.

Tableau 84 : Répartition des animaux en Transporteurs et Non Transporteurs au sein de chaque groupe expérimental

	Groupe	Transporteurs	Non Transporteurs	Significativité
Témoins et Dose 1	Groupe 2	2	4	n.s.
	Groupe 4	2	4	
	Groupe 6	4	2	
	Groupe 8	2	4	
	Total	10	14	
Témoins et Dose 2	Groupe 1	2	4	n.s.
	Groupe 3	3	3	
	Groupe 5	5	1	
	Groupe 7	2	4	
	Total	12	12	

La répartition des animaux a été analysée par le Chi-Deux de Pearson.

n.s. : non significatif

La différenciation observée ici est comparable à celle que l'on rencontre généralement dans cette situation (Desor, 1994), et aucun groupe ne comporte 0 ou 6 Transporteurs. De

plus, la répartition classiquement observée, de type 50% de Transporteurs et 50% de Non Transporteurs, est ici retrouvée (Tests du Chi-deux non significatifs).

III.6.1.2. Nombre moyen de transports effectués

Le nombre de transports effectués au sein de chaque groupe expérimental, calculé pour chaque animal Transporteur, est présenté au Tableau 85.

Tableau 85 : Nombre de transports effectués par les animaux Transporteurs au sein de chaque groupe expérimental

	Groupe	Nombre de transports	
Témoins et Dose 1	Groupe 2	13,00	(11,00-15,00)
	Groupe 4	8,00	(7,00-9,00)
	Groupe 6	6,50	(5,25-7,00)
	Groupe 8	5,00	(1,00-10,00)
Témoins et Dose 2	Groupe 1	13,00	(6,00-20,00)
	Groupe 3	8,00	(3,00-10,00)
	Groupe 5	4,00	(3,50-6,50)
	Groupe 7	12,00	(8,00-16,00)

Le nombre de transports est présenté sous forme de médianes et les rangs sont indiqués entre parenthèses.

III.6.1.3. Différenciation comportementale : Ravitailleurs et Autonomes

Rappelons que parmi les animaux Transporteurs, certains se font voler la nourriture par les animaux Non Transporteurs et sont dits Ravitailleurs ; et d'autres consomment la nourriture qu'ils sont allés chercher et sont dits Autonomes. L'analyse statistique des données a ainsi permis de scinder le groupe des animaux Transporteurs en Transporteurs Ravitailleurs et en Transporteurs Autonomes (Tableau 86).

Tableau 86 : Répartition des animaux Transporteurs en Ravitailleurs et Autonomes au sein de chaque groupe expérimental

	Groupe	Ravitailleurs	Autonomes
Témoins et Dose 1	Groupe 2	2	0
	Groupe 4	2	0
	Groupe 6	2	2
	Groupe 8	1	1
	Total	7	3
Témoins et Dose 2	Groupe 1	1	1
	Groupe 3	2	1
	Groupe 5	3	2
	Groupe 7	2	0
	Total	8	4

III.6.1.4. Transferts de nourriture

L'origine et la destination des flux de nourriture sont étudiées pour chaque type d'animaux (Transporteurs et Non Transporteurs).

De manière très classique, pour les groupes expérimentaux composés de 3 animaux témoins et de 3 animaux exposés à la dose 1 de HAP, le transfert majoritaire de nourriture (77,88%) se fait des animaux Transporteurs vers les animaux Non Transporteurs (**Tableau 87**).

Tableau 87 : Transferts de nourriture au sein des groupes composés d'animaux témoins et d'animaux exposés à la Dose 1

Origine		Destination	
		Transporteurs	Non Transporteurs
Transporteurs	Transporteurs	16,08%	77,88%
	Non Transporteurs	2,44%	3,60%

De même, très classiquement, pour les groupes expérimentaux composés de 3 animaux témoins et de 3 animaux exposés à la dose 2 de HAP, le transfert majoritaire de nourriture (78,84%) se fait également des animaux Transporteurs vers les animaux Non Transporteurs (**Tableau 88**).

Tableau 88 : Transferts de nourriture au sein des groupes composés d'animaux témoins et d'animaux exposés à la Dose 2

Origine		Destination	
		Transporteurs	Non Transporteurs
	Transporteurs	9,99%	78,84%
	Non Transporteurs	0,73%	10,44%

III.6.2. Influence de l'exposition périnatale à la dose 1 de HAP sur le comportement social

III.6.2.1. Différenciation comportementale : Transporteurs et Non Transporteurs

L'analyse statistique des données n'a pas mis en évidence une influence de l'exposition périnatale aux HAP à la dose 1 sur la répartition des animaux entre les profils Transporteurs et Non Transporteurs (**Tableau 89**).

Tableau 89 : Répartition des animaux des groupes Témoin et Dose 1 en Transporteurs et Non Transporteurs

Groupe	Transporteurs	Non Transporteurs	Significativité
Témoin	6	6	n.s.
Dose 1	4	8	

La répartition des animaux a été analysée par le Chi-Deux de Pearson.

n.s. : non significatif

III.6.2.2. Nombre de transports effectués

Le traitement statistique des résultats n'a pas mis en évidence de modification du nombre de transports effectués pour les animaux exposés aux HAP à la dose 1 par rapport aux témoins (**Tableau 90**).

Tableau 90 : Nombre de transports effectués par les animaux Transporteurs des groupes Témoin et Dose 1

Groupe	Nombre de transports	Significativité
Témoin	6,00 (3,50-8,00)	n.s.
Dose 1	9,00 (5,50-14,00)	

Le nombre de transports est présenté sous forme de médianes et les rangs sont indiqués entre parenthèses. L'effet du traitement a été étudié par le test de Mann-Whitney.

n.s. : non significatif

III.6.2.3. Différenciation comportementale : Ravitailleurs et Autonomes

Le test de Fisher n'a pas montré de différence significative concernant le nombre de Ravitailleurs et le nombre d'Autonomes parmi les animaux témoins et les animaux exposés à la dose 1 (**Tableau 91**).

Tableau 91 : Répartition des animaux Transporteurs des groupes Témoin et Dose 1 en Ravitailleurs et Autonomes

Groupe	Ravitailleurs	Autonomes	Significativité
Témoin	4	2	n.s.
Dose 1	3	1	

La répartition des animaux a été analysée par le test de Fisher.

n.s. : non significatif

III.6.2.4. Transferts de nourriture

Le transfert majoritaire de nourriture (29,22%) s'est fait à partir des animaux Transporteurs exposés aux HAP à la dose 1 vers les animaux Non Transporteurs témoins (**Tableau 92**). Il est également à noter que des quantités de nourriture ont été transférées à partir des animaux Transporteurs témoins, d'une part vers les animaux Non Transporteurs exposés

aux HAP à la dose 1 (19,16%) ; et d'autre part vers les animaux Non Transporteurs témoins (18,30%).

Tableau 92 : Transferts de nourriture en fonction de l'exposition, au sein des groupes composés d'animaux témoins et d'animaux exposés à la Dose 1

		Destination			
		Témoin Transporteurs	Témoins Non Transporteurs	Dose 1 Transporteurs	Dose 1 Non Transporteurs
Origine	Témoin Transporteurs	11,63%	18,30%	3,31%	19,16%
	Témoins Non Transporteurs	2,05%	0,33%	0,00%	1,09%
	Dose 1 Transporteurs	2,19%	29,22%	0,00%	10,55%
	Dose 1 Non Transporteurs	0,00%	2,18%	0,00%	0,00%

III.6.3. Influence de l'exposition périnatale à la dose 2 de HAP sur le comportement social

III.6.3.1. Différenciation comportementale : Transporteurs et Non Transporteurs

L'analyse statistique des données a montré que la proportion d'animaux du type Transporteurs est significativement moins élevée parmi les rats exposés à la dose 2 de HAP, que parmi les animaux témoins (**Tableau 93**).

Tableau 93 : Répartition des animaux des groupes Témoin et Dose 2 en Transporteurs et Non Transporteurs

Groupe	Transporteurs	Non Transporteurs	Significativité
Témoin	9	3	<0,05
Dose 2	3	9	

La répartition des animaux a été analysée par le Chi-Deux de Pearson.

III.6.3.2. Nombre de transports effectués

L'analyse statistique des données n'a mis en évidence aucune modification du nombre de transports effectués entre les deux groupes d'animaux (**Tableau 94**).

Tableau 94 : Nombre de transports effectués par les animaux Transporteurs des groupes Témoin et Dose 2

Groupe	Nombre de transports	Significativité
Témoin	7,00 (4,00-10,00)	n.s.
Dose 2	5,00 (3,00-6,50)	

Le nombre de transports est présenté sous forme de médianes et les rangs sont indiqués entre parenthèses. L'effet du traitement a été étudié par le test de Mann-Whitney.

n.s. : non significatif

III.6.3.3. Différenciation comportementale : Ravitailleurs et Autonomes

Le traitement statistique des données a mis en évidence une proportion d'animaux Ravitailleurs significativement plus faible parmi les animaux exposés à la dose 2 de HAP par rapport aux animaux témoins, la proportion d'animaux Autonomes étant comparable entre les deux groupes (**Tableau 95**).

Tableau 95 : Répartition des animaux Transporteurs des groupes Témoin et Dose 2 en Ravitailleurs et Autonomes

Groupe	Ravitailleurs	Autonomes	Significativité
Témoin	8	1	-<0,05
Dose 2	0	3	

La répartition des animaux a été analysée par le test de Fisher.

III.6.3.4. Transferts de nourriture

Les transferts de nourriture au sein des groupes ont pour seule origine les Transporteurs témoins (**Tableau 96**), puisqu'aucun Transporteur Ravitailleur n'est apparu parmi les animaux exposés aux HAP à la dose 2. Le flux de nourriture le plus important est celui observé entre les Transporteurs témoins et les Non Transporteurs exposés (50,55%), ces derniers étant plus nombreux que les Non Transporteurs témoins (**Tableau 93**). Pour autant, des Transporteurs témoins sont aussi à l'origine d'un flux de nourriture vers les Non Transporteurs témoins (**Tableau 96**), mais qui est moins important (22,30%) du fait d'un nombre plus restreint de témoins Non Transporteurs à ravitailler (**Tableau 93**).

Tableau 96 : Transferts de nourriture en fonction de l'exposition, au sein des groupes composés d'animaux témoins et d'animaux exposés à la Dose 2

		Destination			
		Témoin Transporteurs	Témoins Non Transporteurs	Dose 2 Transporteurs	Dose 2 Non Transporteurs
Origine	Témoin Transporteurs	8,69%	22,30%	1,06%	50,55%
	Témoins Non Transporteurs	0,07%	2,69%	0,08%	2,75%
	Dose 2 Transporteurs	0,00%	2,71%	0,00%	3,78%
	Dose 2 Non Transporteurs	0,53%	3,41%	0,03%	1,35%

III.7. Analyses histologiques

Le tableau 97 présente l'ensemble des modifications de l'activité enzymatique de la cytochrome oxydase, en termes de nombres de structures pour lesquelles des diminutions ou des augmentations d'activité ont été observées, par rapport aux témoins, aux deux doses administrées, et aux trois stades étudiés.

Tableau 97 : Nombre de structures cérébrales qui présentent des différences significatives d'activité de la cytochrome oxydase par rapport aux animaux témoins, à PND10, PND21 et PND60

		PND10	PND21	PND60
Dose 1	Nombre de structures cérébrales pour lesquelles une diminution de l'activité de la cytochrome oxydase est observée	6	10	23
	Nombre de structures cérébrales pour lesquelles une augmentation de l'activité de la cytochrome oxydase est observée	1	2	2
Dose 2	Nombre de structures cérébrales pour lesquelles une diminution de l'activité de la cytochrome oxydase est observée	1	7	6
	Nombre de structures cérébrales pour lesquelles une augmentation de l'activité de la cytochrome oxydase est observée	20	0	5

III.7.1. PND10

III.7.1.1. Systèmes sensoriels

L'analyse statistique des données a montré que l'activité de la cytochrome oxydase est significativement plus élevée par rapport aux témoins pour les animaux exposés à la dose 2 au niveau du cortex auditif, de l'olive supérieure et du noyau cochléaire (**Tableau 98**). L'activité

de la cytochrome oxydase est également significativement plus élevée par rapport aux témoins pour l'ensemble des animaux exposés au niveau de l'olive inférieure (**Tableau 98**).

Tableau 98 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante puis allaitante sur l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase à PND10 (1/8)

Structure	Témoin	Dose 1	Dose 2	ANOVA	
				F (2,14)	P
A) Systèmes sensoriels					
1. Système auditif					
1.1 Cortex auditif	18,63 ± 0,73	18,48 ± 1,72	22,55 ± 0,74 **°	7,449	<0,01
1.2 Colliculus inférieur	29,01 ± 1,29	29,55 ± 0,87	30,28 ± 0,86	0,421	n.s.
1.3 Olive supérieure	28,01 ± 0,73	30,23 ± 1,03	32,09 ± 0,92 *	3,479	<0,05
1.4 Noyau cochléaire	25,26 ± 0,47	27,30 ± 0,97	31,34 ± 1,22 **°	8,064	<0,01
2. Système visuel					
2.1 Cortex visuel	23,10 ± 0,72	21,78 ± 0,89	24,78 ± 0,79 °	3,567	<0,05
2.2 Colliculus supérieur	20,90 ± 0,80	22,51 ± 1,11	22,06 ± 0,89	0,569	n.s.
2.3 Olive inférieure	24,13 ± 1,16	28,42 ± 0,68 *	29,19 ± 0,92 **	8,012	<0,01
3. Système vestibulaire					
3.1 Noyaux vestibulaires	36,11 ± 0,63	34,07 ± 0,86	36,37 ± 0,78	2,685	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 de Bonferroni a été utilisé pour comparaisons multiples.

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

° : $p < 0,05$ différence statistiquement significative par rapport au groupe Dose 1

n.s. : non significatif

III.7.1.2. Système moteur

L'activité de la cytochrome oxydase est significativement moins élevée par rapport aux témoins pour les animaux exposés à la dose 1 de HAP au niveau du cortex moteur primaire, du cortex sensori-moteur et des noyaux subthalamiques (**Tableau 99**). Par ailleurs l'activité de la cytochrome oxydase est significativement plus élevée par rapport aux témoins pour les animaux exposés à la dose 2 au niveau du noyau caudé, du globus pallidus et du noyau fastigial (**Tableau 99**).

Tableau 99 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante puis allaitante sur l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase à PND10 (2/8)

Structure	Témoïn	Dose 1		Dose 2		ANOVA	
						F (2,14)	P
B) Système moteur							
1. Cortex moteur primaire	17,43 ± 0,55	15,08 ± 0,25 **	18,48 ± 0,43 °°	17,620	<0,01		
2. Cortex sensori-moteur	21,11 ± 0,27	19,33 ± 0,36 *	22,28 ± 0,64 °°	11,568	<0,01		
3. Noyau caudé	15,89 ± 0,34	15,27 ± 0,21	17,49 ± 0,39 **°°	12,809	<0,01		
4. Globus pallidus	13,77 ± 0,46	13,92 ± 0,46	15,68 ± 0,42 *°	5,183	<0,01		
5. Noyaux subthalamiques	13,36 ± 0,51	11,67 ± 0,39 *	12,92 ± 0,29	4,303	<0,05		
6. Substance noire	28,22 ± 1,13	26,12 ± 0,56	29,26 ± 1,17	2,704	n.s.		
7. Noyau rouge	35,26 ± 0,61	38,03 ± 1,07	34,87 ± 0,76	2,724	n.s.		
8. Noyaux cérébelleux							
- Noyau denté	30,10 ± 0,88	31,05 ± 0,75	31,55 ± 0,79	0,847	n.s.		
- Noyau interpositus	34,87 ± 0,59	34,73 ± 0,78	35,22 ± 0,77	0,127	n.s.		
- Noyau fastigial	30,11 ± 1,08	31,37 ± 0,60	33,28 ± 0,73 *	3,950	<0,05		
9. Cellules cérébelleuses							
Couche granulaire							
Couche de Purkinje							
Couche moléculaire							
10. Nerf trijumeau	30,01 ± 0,47	30,72 ± 0,91	31,61 ± 0,94	0,834	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 de Bonferroni a été utilisé pour comparaisons multiples.

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

°° : $p < 0,01$; ° : $p < 0,05$ différence statistiquement significative par rapport au groupe Dose 1

n.s. : non significatif

III.7.1.3. Tronc cérébral

Le traitement des données a permis de mettre en évidence que l'activité de la cytochrome oxydase est significativement plus élevée par rapport aux témoins pour les animaux exposés à la dose 2 au niveau du noyau du raphé médian et des noyaux gris pontiques (**Tableau 100**). Par ailleurs l'activité de la cytochrome oxydase est significativement moins élevée par rapport aux témoins pour les mêmes animaux au niveau du locus coeruleus (**Tableau 100**).

Tableau 100 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante puis allaitante sur l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase à PND10 (3/8)

Structure	Témoïn	Dose 1	Dose 2	ANOVA	
				F (2,14)	P
C) Tronc cérébral					
1. Noyau du raphé					
1.1 Dorsal	21,51 ± 1,07	21,55 ± 0,98	21,61 ± 1,01	0,002	n.s.
1.2 Médian	20,02 ± 0,89	21,74 ± 0,26	25,03 ± 1,22 *	5,034	<0,05
1.3 Locus coeruleus	30,20 ± 1,84	30,64 ± 1,17	24,30 ± 1,07 **°°	6,124	<0,01
1.4 Noyaux gris pontiques	18,72 ± 1,51	23,10 ± 1,38	30,66 ± 1,78 **°°	13,193	<0,01
2. Tractus nerveux					
Formation réticulée mésencéphalique	22,29 ± 0,51	21,07 ± 1,24	22,08 ± 0,61	0,417	n.s.
3. Matière grise centrale					
3.1 Noyau interpédonculaire	36,31 ± 1,22	36,68 ± 2,86	36,34 ± 1,13	0,013	n.s.
3.2 Matière grise périaqueducatale					
antérieure ventrolatérale	17,65 ± 1,27		18,88 ± 0,94	0,564	n.s.
antérieure latérale	16,22 ± 0,51	16,30 ± 2,52	17,86 ± 0,47	1,507	n.s.
postérieure dorsolatérale	17,16 ± 0,47	17,29 ± 0,71	16,71 ± 0,77	0,142	n.s.
postérieure latérale	17,65 ± 1,08	18,85 ± 1,34	18,21 ± 0,72	0,268	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 de Bonferroni a été utilisé pour comparaisons multiples.

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

°° : $p < 0,01$ différence statistiquement significative par rapport au groupe Dose 1

n.s. : non significatif

III.7.1.4. Cortex cérébraux

Au niveau des cortex cérébraux, l'activité de la cytochrome oxydase est significativement plus faible par rapport aux témoins pour les animaux exposés à la dose 1 au niveau du cortex pariétal et du cortex temporal (**Tableau 101**). Par ailleurs l'activité de la cytochrome oxydase est significativement plus élevée par rapport aux animaux témoins pour les animaux exposés à la dose 2 au niveau du cortex frontal et du cortex cingulaire antérieur (**Tableau 101**).

Tableau 101 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante puis allaitante sur l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase à PND10 (4/8)

Structure	Témoïn	Dose 1		Dose 2		ANOVA	
						F (2,14)	P
D) Cortex cérébraux							
1. Cortex frontal	18,04 ± 0,66	17,38 ± 0,58	21,16 ± 0,93 *^{oo}	6,944	<0,01		
2. Cortex cingulaire antérieur	20,33 ± 0,24	19,52 ± 0,44	21,84 ± 0,48 *^{oo}	8,157	<0,01		
3. Cortex piriforme	21,58 ± 0,66	20,21 ± 0,78	24,42 ± 0,83 ^{oo}	7,946	<0,01		
4. Cortex entorhinal	23,88 ± 0,87	22,28 ± 0,65	26,75 ± 0,97 ^{oo}	5,776	<0,01		
5. Cortex périrhinal	24,33 ± 0,83	23,00 ± 0,91	27,95 ± 1,15 ^{oo}	6,117	<0,01		
6. Cortex pariétal	16,75 ± 0,72	13,09 ± 0,37 **	16,50 ± 0,86 ^{oo}	8,697	<0,01		
7. Cortex temporal	26,44 ± 0,88	21,06 ± 0,66 **	28,51 ± 1,13 ^{oo}	12,926	<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 de Bonferroni a été utilisé pour comparaisons multiples.

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

^{oo} : $p < 0,01$ différence statistiquement significative par rapport au groupe Dose 1

n.s. : non significatif

III.7.1.5. Noyaux thalamiques

L'activité de la cytochrome oxydase est significativement plus élevée par rapport aux témoins pour les animaux exposés à la dose 2 au niveau des noyaux thalamiques ventrolatéral, ventromédial et médiodorsal (**Tableau 102**).

Tableau 102 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante puis allaitante sur l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase à PND10 (5/8)

Structure	Témoin	Dose 1	Dose 2	ANOVA	
				F (2,14)	P
E) Noyaux thalamiques					
1. Moteur					
1.1 Ventrolatéral	21,37 ± 0,76	22,14 ± 0,69	26,14 ± 0,50 **°°	15,082	<0,01
1.2 Ventromédial	14,99 ± 0,40	14,51 ± 0,55	17,30 ± 0,89 **°°	5,461	<0,01
2. Associatif					
2.1 Médiodorsal	17,83 ± 0,39	16,94 ± 0,58	19,88 ± 0,49 **°°	8,994	<0,01
2.2 Noyaux antérieurs	17,30 ± 0,97	14,44 ± 0,82	17,59 ± 0,72 °	3,539	<0,05
3. Sensitif					
3.1 Noyaux postérieurs	23,70 ± 0,58	22,94 ± 0,58	25,74 ± 0,64 °°	5,824	<0,01
3.2 Corps genouillé médian	16,20 ± 0,59	18,89 ± 1,38	18,45 ± 0,55	3,631	<0,05
3.3 Corps genouillé latéral	21,59 ± 0,87	19,25 ± 0,61	23,43 ± 0,74 °°	7,440	<0,01
5. Zona incerta					
	16,02 ± 0,66	14,94 ± 0,45	17,62 ± 0,67 °°	4,813	<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 de Bonferroni a été utilisé pour comparaisons multiples.

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

°° : $p < 0,01$; ° : $p < 0,05$ différence statistiquement significative par rapport au groupe Dose 1

n.s. : non significatif

III.7.1.6. Noyaux hypothalamiques

L'analyse des données n'a montré aucune différence concernant l'activité de la cytochrome oxydase au niveau des noyaux hypothalamiques entre les animaux témoins et les animaux exposés (Tableau 103).

Tableau 103 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante puis allaitante sur l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase à PND10 (6/8)

Structure	Témoin	Dose 1	Dose 2	ANOVA	
				F (2,14)	P
F) Noyaux hypothalamiques					
1. Noyau ventromédian	20,59 ± 0,50	20,09 ± 0,65	22,53 ± 0,72 °	4,167	<0,05
2. Noyau dorsomédian	15,32 ± 0,49	14,67 ± 0,62	15,74 ± 0,90	0,612	n.s.
3. Noyau latéral	12,02 ± 0,44	12,24 ± 0,35	12,56 ± 0,27	0,518	n.s.
4. Noyau postérieur	17,09 ± 0,61	15,81 ± 0,72	17,69 ± 0,56	2,268	n.s.
5. Noyau arqué					
6. Corps mamillaires	18,36 ± 2,00	17,09 ± 0,31	13,94 ± 1,85	2,066	n.s.
7. Noyau préoptique médial					
8. Noyau suprachiasmatique					

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 de Bonferroni a été utilisé pour comparaisons multiples.

n.s. : non significatif

III.7.1.7. Système limbique

Les résultats ont mis en évidence une diminution significative de l'activité de la cytochrome oxydase au niveau du noyau accumbens pour les animaux exposés à la dose 1 par rapport aux animaux témoins (**Tableau 104**). Par ailleurs, l'activité de la cytochrome oxydase est significativement plus élevée pour les animaux exposés à la dose 2 par rapport aux animaux témoins au niveau du noyau accumbens, du septum médian, du noyau amygdalien médial, du gyrus denté et du subiculum (**Tableau 104**).

Tableau 104 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante puis allaitante sur l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase à PND10 (7/8)

Structure	Témoïn	Dose 1	Dose 2	ANOVA	
				F (2,14)	P
G) Système limbique					
1. Système de récompense					
1.1 Aire tegmentale ventrale					
1.2 Noyau accumbens	19,10 ± 0,33	17,20 ± 0,31 *	20,93 ± 0,64 **°	17,337	<0,01
1.3 Septum					
latéral	16,98 ± 0,72	15,82 ± 0,33	17,72 ± 0,60	2,698	n.s.
médian	11,88 ± 1,41	13,63 ± 1,43	18,18 ± 0,87 **	6,531	<0,01
2. Complexe amygdalien					
2.1 Noyau latéral	11,63 ± 0,58	11,10 ± 0,55	13,00 ± 0,31 °	3,581	<0,05
2.2 Noyau central	13,98 ± 0,58	13,80 ± 0,58	14,38 ± 0,43	0,296	n.s.
2.3 Noyau médial	14,32 ± 0,65	14,18 ± 0,56	17,81 ± 0,46 **°	15,782	<0,01
2.4 Noyau basolatéral	17,09 ± 0,57	15,85 ± 0,64	18,75 ± 0,72 °	5,172	<0,01
2.5 Noyau basomédian	14,02 ± 0,62	13,67 ± 0,43	15,54 ± 0,69	2,918	n.s.
3. Aires hippocampiques					
3.1 CA1	29,75 ± 0,77	30,79 ± 0,76	31,35 ± 1,16	0,811	n.s.
3.2 CA3	27,84 ± 1,00	28,29 ± 0,95	29,72 ± 0,81	1,126	n.s.
3.3 Gyrus denté	24,32 ± 0,84	24,53 ± 0,89	28,46 ± 0,94 **°	6,956	<0,01
3.4 Subiculum	16,00 ± 0,52	17,68 ± 1,67	19,45 ± 0,40 *	4,889	<0,05
4. Noyaux de l'habenula					
4.1 Noyau latéral	20,23 ± 0,65	19,03 ± 0,43	19,70 ± 0,76	0,889	n.s.
4.2 Noyau médian	23,84 ± 0,64	21,97 ± 0,43	23,87 ± 0,73	2,861	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 de Bonferroni a été utilisé pour comparaisons multiples.

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

°° : $p < 0,01$; ° : $p < 0,05$ différence statistiquement significative par rapport au groupe Dose 1

n.s. : non significatif

III.7.1.8. Substance blanche

Aucune différence significative n'a été observée concernant l'activité de la cytochrome oxydase entre les animaux témoins et les animaux exposés au niveau des zones de substance blanche (**Tableau 105**).

Tableau 105 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante puis allaitante sur l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase à PND10 (8/8)

Structure	Témoin	Dose 1	Dose 2	ANOVA	
				F (2,14)	P
H) Zone de substance blanche					
1. Capsule interne					
2. Corps calleux	1,32 ± 0,26	0,33 ± 0,12	2,19 ± 0,64 °°	5,064	<0,01
3. Matière blanche du cervelet					

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 de Bonferroni a été utilisé pour comparaisons multiples.

°° : $p < 0,01$ différence statistiquement significative par rapport au groupe Dose 1

n.s. : non significatif

III.7.2. PND21

III.7.2.1. Systèmes sensoriels

Aucune différence significative de l'activité de la cytochrome oxydase n'a été observée entre les animaux témoins et les animaux exposés au niveau des structures des systèmes sensoriels (**Tableau 106**).

Tableau 106 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante puis allaitante sur l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase à PND 21 (1/8)

Structure	Témoïn	Dose 1	Dose 2	ANOVA	
				F (2,14)	P
A) Systèmes sensoriels					
1. Système auditif					
1.1 Cortex auditif	39,78 ± 0,75	41,06 ± 0,82	38,54 ± 1,05	2,030	n.s.
1.2 Colliculus inférieur	47,02 ± 1,37	46,93 ± 1,34	49,59 ± 0,77	1,600	n.s.
1.3 Olive supérieure	54,39 ± 1,23	53,87 ± 1,25	57,10 ± 1,23	1,971	n.s.
1.4 Noyau cochléaire	54,08 ± 1,02	53,9 ± 1,12	55,51 ± 0,91	0,748	n.s.
2. Système visuel					
2.1 Cortex visuel	36,90 ± 0,43	38,07 ± 1,16	39,32 ± 1,21	1,356	n.s.
2.2 Colliculus supérieur	43,29 ± 0,35	44,41 ± 0,97	44,22 ± 0,78	0,671	n.s.
2.3 Olive inférieure	59,20 ± 1,02	59,05 ± 1,86	60,43 ± 1,56	0,240	n.s.
3. Système vestibulaire					
3.1 Noyaux vestibulaires	62,72 ± 0,75	64,07 ± 1,52	63,52 ± 1,04	0,349	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 de Bonferroni a été utilisé pour comparaisons multiples.

n.s. : non significatif

III.7.2.2. Système moteur

Le traitement des données a montré que l'activité de la cytochrome oxydase est significativement moins élevée pour les animaux exposés à la dose 1 par rapport aux animaux témoins, au niveau du cortex moteur primaire, du cortex sensori-moteur et du noyau caudé (Tableau 107). Par ailleurs, elle est significativement plus élevée au niveau de la couche granulaire des cellules du cervelet (Tableau 107). Enfin, l'activité de la cytochrome oxydase est significativement moins élevée pour les animaux exposés à la dose 2 par rapport aux animaux témoins au niveau du noyau rouge et de la couche de Purkinje des cellules du cervelet (Tableau 107).

Tableau 107 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante puis allaitante sur l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase à PND 21 (2/8)

Structure	Témoïn	Dose 1	Dose 2	ANOVA	
				F (2,14)	P
B) Système moteur					
1. Cortex moteur primaire	37,37 ± 0,92	33,62 ± 0,91 *	35,47 ± 0,94	4,124	<0,05
2. Cortex sensori-moteur	44,28 ± 0,68	40,69 ± 1,05 *	42,20 ± 1,03	3,587	<0,05
3. Noyau caudé	37,74 ± 0,75	34,33 ± 1,02 *	38,04 ± 0,79 °°	5,768	<0,01
4. Globus pallidus	27,72 ± 0,82	27,34 ± 1,09	27,66 ± 0,99	0,043	n.s.
5. Noyaux subthalamiques	58,62 ± 0,87	56,86 ± 0,86	57,32 ± 1,51	0,659	n.s.
6. Substance noire	33,35 ± 0,95	32,71 ± 1,21	36,37 ± 1,15	3,108	n.s.
7. Noyau rouge	50,21 ± 0,53	50,19 ± 0,66	46,15 ± 1,18 **°°	7,731	<0,01
8. Noyaux cérébelleux					
- Noyau denté	59,63 ± 0,78	60,09 ± 1,61	60,62 ± 1,29	0,153	n.s.
- Noyau interpositus	58,06 ± 0,72	55,77 ± 0,94	57,30 ± 1,02	1,641	n.s.
- Noyau fastigial	48,85 ± 0,63	48,36 ± 0,75	49,77 ± 0,88	0,875	n.s.
9. Cellules cérébelleuses					
Couche granulaire	39,00 ± 1,13	43,92 ± 1,36 *	41,21 ± 1,05	4,315	<0,05
Couche de Purkinje	55,01 ± 1,30	53,77 ± 1,28	50,22 ± 0,96 *	4,251	<0,05
Couche moléculaire	38,22 ± 1,37	39,49 ± 1,27	37,56 ± 1,12	0,627	n.s.
10. Nerf trijumeau	56,56 ± 0,67	56,81 ± 1,74	55,75 ± 0,95	0,209	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 de Bonferroni a été utilisé pour comparaisons multiples.

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

°° : $p < 0,01$ différence statistiquement significative par rapport au groupe Dose 1

n.s. : non significatif

III.7.2.3. Tronc cérébral

L'activité de la cytochrome oxydase est significativement moins élevée pour les animaux exposés à la dose 2 par rapport aux animaux témoins au niveau de la formation réticulée mésencéphalique et de la partie antérieure latérale de la matière grise périacqueductale (**Tableau 108**).

Tableau 108 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante puis allaitante sur l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase à PND 21 (3/8)

Structure	Témoin	Dose 1	Dose 2	ANOVA	
				F (2,14)	P
C) Tronc cérébral					
1. Noyau du raphé					
1.1 Dorsal	43,18 ± 1,04	41,14 ± 1,97	41,96 ± 1,45	0,447	n.s.
1.2 Médian	45,69 ± 1,28	45,99 ± 1,50	45,62 ± 0,73	0,027	n.s.
1.3 Locus coeruleus	52,33 ± 1,23	55,91 ± 1,46	52,55 ± 1,59	1,956	n.s.
1.4 Noyaux gris pontiques	52,07 ± 1,32	49,97 ± 1,54	50,03 ± 0,75	0,922	n.s.
2. Tractus nerveux					
Formation réticulée mésencéphalique	44,10 ± 0,64	42,48 ± 1,20	40,35 ± 0,96 *	3,826	<0,05
3. Matière grise centrale					
3.1 Noyau interpedonculaire	66,43 ± 3,13	71,75 ± 2,85	66,45 ± 3,44	1,025	n.s.
3.2 Matière grise périacqueductale					
antérieure ventrolatérale	39,46 ± 0,69	38,03 ± 1,52	36,63 ± 1,32	1,323	n.s.
antérieure latérale	46,96 ± 0,45	43,76 ± 1,13	41,86 ± 1,20 **	6,801	<0,01
postérieure dorsolatérale	38,38 ± 0,74	35,97 ± 1,18	37,53 ± 0,74	1,809	n.s.
postérieure latérale	40,81 ± 0,64	40,27 ± 1,30	41,46 ± 1,20	0,304	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 de Bonferroni a été utilisé pour comparaisons multiples.

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

n.s. : non significatif

III.7.2.4. Cortex cérébraux

L'ANOVA à 1 facteur a montré que l'activité de la cytochrome oxydase est significativement moins élevée pour les animaux exposés à la dose 1 par rapport aux animaux témoins au niveau du cortex cingulaire antérieur (**Tableau 109**).

Tableau 109 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante puis allaitante sur l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase à PND 21 (4/8)

Structure	Témoin	Dose 1		Dose 2		ANOVA	
						F (2,14)	P
D) Cortex cérébraux							
1. Cortex frontal	41,62 ± 0,88	38,20 ± 0,76	42,91 ± 1,74 °	3,746	<0,05		
2. Cortex cingulaire antérieur	40,80 ± 0,86	36,98 ± 1,12 *	38,34 ± 1,08	3,574	<0,05		
3. Cortex piriforme	34,23 ± 0,77	33,54 ± 0,81	32,52 ± 1,15	0,887	n.s.		
4. Cortex entorhinal	37,71 ± 0,75	37,69 ± 0,99	38,45 ± 0,91	0,235	n.s.		
5. Cortex périrhinal	37,21 ± 0,81	37,11 ± 1,11	38,71 ± 0,82	0,946	n.s.		
6. Cortex pariétal	42,72 ± 1,34	42,84 ± 1,44	40,11 ± 1,17	1,360	n.s.		
7. Cortex temporal	35,19 ± 0,75	36,45 ± 1,09	37,98 ± 0,73	2,566	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 de Bonferroni a été utilisé pour comparaisons multiples.

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

° : $p < 0,05$ différence statistiquement significative par rapport au groupe Dose 1

n.s. : non significatif

III.7.2.5. Noyaux thalamiques

L'activité de la cytochrome oxydase est significativement moins élevée pour les animaux exposés à la dose 1 par rapport aux animaux témoins au niveau du noyau thalamique ventromédial (Tableau 110).

Tableau 110 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante puis allaitante sur l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase à PND 21 (5/8)

Structure	Témoin	Dose 1	Dose 2	ANOVA	
				F (2,14)	P
E) Noyaux thalamiques					
1. Moteur					
1.1 Ventrolateral	42,95 ± 0,73	41,21 ± 0,79	40,76 ± 1,18	1,593	n.s.
1.2 Ventromédial	40,52 ± 0,69	37,42 ± 0,71 *	39,49 ± 0,80	4,615	<0,05
2. Associatif					
2.1 Médiadorsal	36,60 ± 0,62	35,23 ± 0,52	36,74 ± 0,92	1,394	n.s.
2.2 Noyaux antérieurs	54,68 ± 0,65	51,24 ± 1,27	53,68 ± 1,30	2,530	n.s.
3. Sensitif					
3.1 Noyaux postérieurs	45,98 ± 0,69	43,79 ± 0,52	44,59 ± 1,10	1,881	n.s.
3.2 Corps genouillé médian	47,12 ± 1,46	50,96 ± 1,01	47,91 ± 0,91	3,105	n.s.
3.3 Corps genouillé latéral	42,32 ± 0,65	40,29 ± 0,55	42,08 ± 1,09	1,951	n.s.
5. Zona incerta					
	41,8 ± 0,75	42,31 ± 0,54	41,38 ± 1,09	0,315	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 de Bonferroni a été utilisé pour comparaisons multiples.

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

n.s. : non significatif

III.7.2.6. Noyaux hypothalamiques

L'activité de la cytochrome oxydase est significativement moins élevée pour les animaux exposés à la dose 2 par rapport aux animaux témoins au niveau du noyau hypothalamique latéral (Tableau 111).

Tableau 111 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante puis allaitante sur l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase à PND 21 (6/8)

Structure	Témoin	Dose 1	Dose 2	ANOVA	
				F (2,14)	P
F) Noyaux hypothalamiques					
1. Noyau ventromédian	34,82 ± 0,85	33,85 ± 0,86	35,67 ± 0,74	1,280	n.s.
2. Noyau dorsomédian	32,25 ± 0,56	30,55 ± 0,86	31,80 ± 0,83	1,315	n.s.
3. Noyau latéral	36,95 ± 0,70	34,42 ± 0,83	33,35 ± 1,09 *	4,319	<0,05
4. Noyau postérieur	33,24 ± 0,48	31,57 ± 0,53	33,46 ± 0,86	2,554	n.s.
5. Noyau arqué	24,26 ± 0,87	29,32 ± 1,31	30,81 ± 3,34	1,517	n.s.
6. Corps mamillaires	51,75 ± 2,51	42,82 ± 9,98	51,60 ± 4,81	0,491	n.s.
7. Noyau préoptique médial	30,90 ± 0,65	31,21 ± 0,87	30,75 ± 0,96	0,076	n.s.
8. Noyau suprachiasmatique	36,30 ± 0,76	35,12 ± 1,08	39,45 ± 1,20 °	4,694	<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 de Bonferroni a été utilisé pour comparaisons multiples.

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

° : $p < 0,05$ différence statistiquement significative par rapport au groupe Dose 1

n.s. : non significatif

III.7.2.7. Système limbique

Le traitement statistique des données a montré que l'activité de la cytochrome oxydase est significativement moins élevée pour les animaux exposés à la dose 1 par rapport aux animaux témoins au niveau du septum médian, des noyaux amygdaliens central et basolatéral, et du noyau médian de l'habenula (**Tableau 112**). Par ailleurs, l'activité de la cytochrome oxydase est significativement moins élevée pour les animaux exposés à la dose 2 par rapport aux animaux témoins au niveau du noyau amygdalien médial et des cornes d'Ammon 1 et 3 (CA1 et CA3) (**Tableau 112**).

Tableau 112 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante puis allaitante sur l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase à PND 21 (7/8)

Structure	Témoin	Dose 1	Dose 2	ANOVA	
				F (2,14)	P
G) Système limbique					
1. Système de récompense					
1.1 Aire tegmentale ventrale	41,93 ± 1,19	41,2 ± 1,05	41,75 ± 1,40	0,107	n.s.
1.2 Noyau accumbens	42,76 ± 0,96	39,71 ± 1,00	41,95 ± 1,59	1,657	n.s.
1.3 Septum					
latéral	31,73 ± 1,01	28,39 ± 1,07	31,97 ± 1,09	3,621	<0,05
médian	46,21 ± 1,13	41,45 ± 1,40 *	44,29 ± 1,36	3,398	<0,05
2. Complexe amygdalien					
2.1 Noyau latéral	42,46 ± 0,65	40,59 ± 0,70	41,55 ± 0,91	1,542	n.s.
2.2 Noyau central	45,65 ± 0,46	41,88 ± 1,12 *	42,46 ± 1,02	4,694	<0,05
2.3 Noyau médial	41,06 ± 0,70	39,68 ± 0,58	38,49 ± 0,78 *	3,549	<0,05
2.4 Noyau basolatéral	49,26 ± 0,70	45,41 ± 1,43 *	46,45 ± 0,90	3,556	<0,05
2.5 Noyau basomédian	43,78 ± 0,51	43,46 ± 0,52	42,38 ± 0,99	1,025	n.s.
3. Aires hippocampiques					
3.1 CA1	35,69 ± 0,8	34,71 ± 0,95	32,54 ± 0,66 *	3,745	<0,05
3.2 CA3	40,28 ± 0,64	39,69 ± 0,94	37,55 ± 0,67 *	3,373	<0,05
3.3 Gyrus denté	42,19 ± 0,71	40,12 ± 0,89	40,95 ± 0,96	1,471	n.s.
3.4 Subiculum	38,98 ± 0,98	39,64 ± 1,63	35,85 ± 0,99	2,513	n.s.
4. Noyaux de l'habenula					
4.1 Noyau latéral	42,28 ± 0,99	42,37 ± 0,80	43,49 ± 1,04	0,508	n.s.
4.2 Noyau médian	48,20 ± 0,54	44,94 ± 0,84 *	45,58 ± 1,24	3,672	<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 de Bonferroni a été utilisé pour comparaisons multiples.

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

n.s. : non significatif

III.7.2.8. Substance blanche

L'ANOVA à 1 facteur réalisée a permis de mettre en évidence que l'activité de la cytochrome oxydase est significativement moins élevée pour l'ensemble des animaux exposés aux HAP par rapport aux animaux témoins au niveau de la capsule interne (**Tableau 113**). De plus, elle est plus élevée pour les animaux exposés à la dose 1 par rapport aux animaux témoins au niveau de la matière blanche du cervelet (**Tableau 113**).

Tableau 113 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante puis allaitante sur l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase à PND 21 (8/8)

Structure	Témoin	Dose 1	Dose 2	ANOVA	
				F (2,14)	P
H) Zone de substance blanche					
1. Capsule interne	13,73 ± 0,93	11,11 ± 0,40 *	10,76 ± 0,67 *	5,169	<0,01
2. Corps calleux	7,78 ± 0,43	7,28 ± 0,72	6,15 ± 0,81	1,459	n.s.
3. Matière blanche du cervelet	4,29 ± 0,77	8,31 ± 1,10 *	2,99 ± 0,71 °°	8,036	<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 de Bonferroni a été utilisé pour comparaisons multiples.

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

°° : $p < 0,01$ différence statistiquement significative par rapport au groupe Dose 1

n.s. : non significatif

III.7.3. PND60

III.7.3.1. Systèmes sensoriels

L'analyse des données a montré que l'activité de la cytochrome oxydase est significativement plus élevée pour les animaux exposés à la dose 1 par rapport aux animaux témoins au niveau de l'olive supérieure, du noyau cochléaire, du cortex visuel et du colliculus supérieur (Tableau 114). Par ailleurs, elle est significativement moins élevée au niveau du cortex auditif, du colliculus inférieur, de l'olive inférieure et des noyaux vestibulaires (Tableau 114). Enfin, l'activité de la cytochrome oxydase est significativement plus élevée pour les animaux exposés à la dose 2 par rapport aux animaux témoins au niveau de l'olive supérieure, du noyau cochléaire et du colliculus supérieur (Tableau 114).

Tableau 114 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante puis allaitante sur l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase à PND 60 (1/8)

Structure	Témoïn	Dose 1	Dose 2	ANOVA	
				F (2,14)	P
A) Systèmes sensoriels					
1. Système auditif					
1.1 Cortex auditif	49,39 ± 0,95	45,55 ± 0,85 *	49,32 ± 1,30		3,974 <0,05
1.2 Colliculus inférieur	45,47 ± 1,74	40,19 ± 0,85 *	45,36 ± 0,92 °		5,461 <0,01
1.3 Olive supérieure	46,63 ± 1,85	55,15 ± 2,08 **	59,28 ± 0,83 **		13,499 <0,01
1.4 Noyau cochléaire	44,33 ± 2,09	51,38 ± 0,97 *	55,63 ± 1,73 **		11,622 <0,01
2. Système visuel					
2.1 Cortex visuel	40,95 ± 0,68	45,96 ± 1,45 *	45,01 ± 1,35		4,427 <0,05
2.2 Colliculus supérieur	36,48 ± 0,54	42,65 ± 1,04 **	42,50 ± 1,45 **		9,794 <0,01
2.3 Olive inférieure	53,30 ± 2,66	42,34 ± 2,04 **	51,46 ± 2,35 °		6,160 <0,01
3. Système vestibulaire					
3.1 Noyaux vestibulaires	55,89 ± 1,51	51,21 ± 1,18 *	55,17 ± 1,03		4,033 <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 de Bonferroni a été utilisé pour comparaisons multiples.

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

° : $p < 0,05$ différence statistiquement significative par rapport au groupe Dose 1

n.s. : non significatif

III.7.3.2. Système moteur

L'activité de la cytochrome oxydase est significativement moins élevée pour les animaux exposés à la dose 1 par rapport aux animaux témoins au niveau du noyau caudé, du noyau rouge et du noyau interpositus (**Tableau 115**). Par ailleurs, l'activité de la cytochrome oxydase est significativement plus élevée pour les animaux exposés à la dose 2 par rapport aux animaux témoins au niveau élevée au niveau du noyau rouge (**Tableau 115**).

Tableau 115 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante puis allaitante sur l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase à PND 60 (2/8)

Structure	Témoïn	Dose 1	Dose 2	ANOVA	
				F (2,14)	P
B) Système moteur					
1. Cortex moteur primaire	40,77 ± 1,17	38,05 ± 1,30	38,53 ± 1,04	1,520	n.s.
2. Cortex sensori-moteur	41,97 ± 1,10	40,74 ± 1,28	41,08 ± 0,98	0,319	n.s.
3. Noyau caudé	40,42 ± 0,95	35,79 ± 0,94 *	38,55 ± 1,552	3,790	<0,05
4. Globus pallidus	15,11 ± 1,79	10,56 ± 0,98	15,49 ± 1,94	2,863	n.s.
5. Noyaux subthalamiques	57,67 ± 2,48	51,95 ± 1,15	58,60 ± 1,26 °	3,981	<0,05
6. Substance noire	35,68 ± 0,62	36,37 ± 1,46	36,22 ± 1,17	0,099	n.s.
7. Noyau rouge	40,32 ± 1,20	34,33 ± 0,59 **	45,11 ± 1,02 **°°	26,582	<0,01
8. Noyaux cérébelleux					
- Noyau denté	51,60 ± 1,48	48,81 ± 1,59	51,47 ± 1,08	1,290	n.s.
- Noyau interpositus	41,81 ± 1,05	37,98 ± 1,00 *	44,43 ± 0,80 °°	11,606	<0,01
- Noyau fastigial	30,72 ± 1,67	27,63 ± 0,92	33,82 ± 0,89 °°	6,506	<0,01
9. Cellules cérébelleuses					
Couche granulaire	45,09 ± 1,56	44,63 ± 1,46	47,25 ± 0,89	1,020	n.s.
Couche de Purkinje	59,89 ± 1,74	59,68 ± 1,69	63,56 ± 0,96	2,093	n.s.
Couche moléculaire	43,40 ± 1,47	45,40 ± 1,56	44,73 ± 1,60	0,434	n.s.
10. Nerf trijumeau	35,07 ± 1,86	29,46 ± 1,05	39,82 ± 1,33	12,587	<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 de Bonferroni a été utilisé pour comparaisons multiples.

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

°° : $p < 0,01$; ° : $p < 0,05$ différence statistiquement significative par rapport au groupe Dose 1

n.s. : non significatif

III.7.3.3. Tronc cérébral

L'activité de la cytochrome oxydase est significativement moins élevée pour les animaux exposés à la dose 1 par rapport aux animaux témoins au niveau de la formation réticulée mésencéphalique, du noyau interpédonculaire et de la partie antérieure latérale de la matière grise périaqueducatale (Tableau 116). Par ailleurs, l'activité de la cytochrome est significativement plus élevée pour les animaux exposés à la dose 2 par rapport aux animaux témoins au niveau de la partie postérieure dorsolatérale de la matière grise périaqueducatale (Tableau 116).

Tableau 116 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante puis allaitante sur l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase à PND 60 (3/8)

Structure	Témoin	Dose 1	Dose 2	ANOVA	
				F (2,14)	P
C) Tronc cérébral					
1. Noyau du raphé					
1.1 Dorsal	42,03 ± 2,57	41,25 ± 1,47	43,28 ± 1,54	0,282	n.s.
1.2 Médian	38,47 ± 3,49	39,47 ± 2,12	41,83 ± 2,27	0,408	n.s.
1.3 Locus coeruleus	50,89 ± 2,31	48,69 ± 2,75	54,85 ± 2,87	1,367	n.s.
1.4 Noyaux gris pontiques	45,74 ± 2,12	45,49 ± 1,20	45,84 ± 0,58	0,014	n.s.
2. Tractus nerveux					
Formation réticulée mésencéphalique	21,91 ± 0,96	13,96 ± 0,91 **	26,72 ± 2,01 °°	21,457	<0,01
3. Matière grise centrale					
3.1 Noyau interpédonculaire	73,62 ± 2,06	55,29 ± 3,34 **	75,00 ± 2,71 °°	15,431	<0,01
3.2 Matière grise périaqueducatale					
antérieure ventrolatérale	33,08 ± 2,78	29,05 ± 0,32	34,97 ± 1,91	1,812	n.s.
antérieure latérale	41,86 ± 1,47	37,56 ± 0,28 *	40,25 ± 1,00	3,288	<0,05
postérieure dorsolatérale	37,28 ± 1,43	40,99 ± 0,59	41,65 ± 1,52 *	3,505	<0,05
postérieure latérale	40,73 ± 1,52	44,37 ± 0,98	45,06 ± 1,78	2,517	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 de Bonferroni a été utilisé pour comparaisons multiples.

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

°° : $p < 0,01$ différence statistiquement significative par rapport au groupe Dose 1

n.s. : non significatif

III.7.3.4. Cortex cérébraux

L'activité de la cytochrome oxydase est significativement moins élevée pour les animaux exposés à la dose 2 par rapport aux animaux témoins au niveau du cortex frontal (Tableau 117).

Tableau 117 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante puis allaitante sur l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase à PND 60 (4/8)

Structure	Témoin	Dose 1	Dose 2	ANOVA	
				F (2,14)	P
D) Cortex cérébraux					
1. Cortex frontal	43,84 ± 1,26	39,20 ± 1,44	37,97 ± 1,71 *	3,878	<0,05
2. Cortex cingulaire antérieur	45,33 ± 1,23	43,18 ± 1,42	44,25 ± 1,13	0,715	n.s.
3. Cortex piriforme	31,99 ± 1,60	30,03 ± 1,33	32,58 ± 1,27	0,897	n.s.
4. Cortex entorhinal	43,10 ± 1,91	42,15 ± 1,12	42,79 ± 0,99	0,117	n.s.
5. Cortex périrhinal	41,77 ± 1,83	42,05 ± 1,46	41,24 ± 1,32	0,071	n.s.
6. Cortex pariétal	48,18 ± 1,19	47,58 ± 1,56	49,58 ± 1,61	0,489	n.s.
7. Cortex temporal	42,07 ± 1,61	43,37 ± 1,57	42,97 ± 1,47	0,182	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 de Bonferroni a été utilisé pour comparaisons multiples.

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

n.s. : non significatif

III.7.3.5. Noyaux thalamiques

L'ANOVA à 1 facteur réalisée sur les données a montré que l'activité de la cytochrome oxydase est significativement moins élevée pour les animaux exposés à la dose 1 par rapport aux animaux témoins au niveau des noyaux thalamiques postérieurs, du corps genouillé médian et de la *zona incerta* (Tableau 118). Par ailleurs, l'activité de la cytochrome oxydase est significativement moins élevée pour les animaux exposés à la dose 2 par rapport aux animaux témoins au niveau des noyaux thalamiques médiodorsal et postérieurs (Tableau 118).

Tableau 118 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante puis allaitante sur l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase à PND 60 (5/8)

Structure	Témoïn	Dose 1	Dose 2	ANOVA	
				F (2,14)	P
E) Noyaux thalamiques					
1. Moteur					
1.1 Ventrolatéral	42,77 ± 1,73	38,16 ± 1,80	42,01 ± 1,52	1,624	n.s.
1.2 Ventromédial	33,12 ± 1,36	30,44 ± 1,71	34,77 ± 1,86	1,631	n.s.
2. Associatif					
2.1 Médiodorsal	41,90 ± 0,96	39,06 ± 0,66	34,42 ± 0,85 ***°°	20,373	<0,01
2.2 Noyaux antérieurs	51,09 ± 1,36	49,32 ± 0,83	49,24 ± 0,86	0,990	n.s.
3. Sensitif					
3.1 Noyaux postérieurs	45,11 ± 0,98	38,88 ± 1,16 **	41,20 ± 0,96 *	9,260	<0,01
3.2 Corps genouillé médian	42,03 ± 0,83	36,65 ± 0,7 **	43,83 ± 1,05 °°	18,043	<0,01
3.3 Corps genouillé latéral	46,37 ± 1,58	40,94 ± 2,41	41,97 ± 1,25	2,679	n.s.
5. Zona incerta					
	36,44 ± 1,26	31,20 ± 1,46 *	38,62 ± 0,99 °°	9,702	<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 de Bonferroni a été utilisé pour comparaisons multiples.

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

°° : $p < 0,01$ différence statistiquement significative par rapport au groupe Dose 1

n.s. : non significatif

III.7.3.6. Noyaux hypothalamiques

Le traitement statistique réalisé sur les données a montré que l'activité de la cytochrome oxydase est significativement moins élevée pour les animaux exposés à la dose 1 par rapport aux animaux témoins au niveau des noyaux hypothalamiques ventromédian, postérieur et arqué (**Tableau 119**).

Tableau 119 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante puis allaitante sur l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase à PND 60 (6/8)

Structure	Témoïn	Dose 1	Dose 2	ANOVA	
				F (2,14)	P
F) Noyaux hypothalamiques					
1. Noyau ventromédian	45,53 ± 1,82	38,21 ± 1,28 *	42,81 ± 2,01	4,561	<0,05
2. Noyau dorsomédian	38,80 ± 1,28	38,07 ± 0,92	39,89 ± 1,40	0,529	n.s.
3. Noyau latéral	23,35 ± 1,96	19,69 ± 0,92	23,56 ± 0,88	2,587	n.s.
4. Noyau postérieur	43,34 ± 1,29	35,48 ± 1,43 **	40,64 ± 1,31 °	8,623	<0,01
5. Noyau arqué	47,66 ± 1,67	42,35 ± 0,83 *	46,48 ± 1,53	4,196	<0,05
6. Corps mamillaires	54,97 ± 3,50	65,22 ± 3,78	62,62 ± 2,00	2,883	n.s.
7. Noyau préoptique médial	35,38 ± 1,71	32,00 ± 1,15	34,43 ± 1,30	1,576	n.s.
8. Noyau suprachiasmatique	30,57 ± 1,36	34,57 ± 1,36	30,02 ± 1,72	2,432	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 de Bonferroni a été utilisé pour comparaisons multiples.

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

° : $p < 0,05$ différence statistiquement significative par rapport au groupe Dose 1

n.s. : non significatif

III.7.3.7. Système limbique

Au niveau du système limbique, l'activité de la cytochrome oxydase est significativement moins élevée pour les animaux exposés à la dose 1 par rapport aux animaux témoins au niveau du septum latéral, des noyaux amygdaliens central, médial et basolatéral, des cornes d'Ammon 1 et 3, du gyrus denté, et des noyaux latéral et médian de l'habenula (Tableau 120). Par ailleurs, l'activité de la cytochrome oxydase est significativement moins élevée pour les animaux exposés à la dose 2 par rapport aux animaux témoins au niveau du noyau amygdalien central, du gyrus denté et du noyau latéral de l'habenula (Tableau 120).

Tableau 120 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante puis allaitante sur l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase à PND 60 (7/8)

Structure	Témoin	Dose 1	Dose 2	ANOVA	
				F (2,14)	P
G) Système limbique					
1. Système de récompense					
1.1 Aire tegmentale ventrale	25,17 ± 1,80	21,87 ± 1,28	28,18 ± 2,32	1,856	n.s.
1.2 Noyau accumbens	47,99 ± 2,03	47,46 ± 1,86	47,21 ± 1,65	0,047	n.s.
1.3 Septum					
latéral	34,97 ± 1,23	27,31 ± 1,74 **	31,07 ± 1,86	5,390	<0,01
médian	32,07 ± 1,43	26,77 ± 2,26	31,18 ± 2,51	1,800	n.s.
2. Complexe amygdalien					
2.1 Noyau latéral	36,01 ± 1,40	34,42 ± 1,11	34,51 ± 1,54	0,414	n.s.
2.2 Noyau central	41,41 ± 1,08	36,33 ± 0,92 **	35,96 ± 1,09 **	8,679	<0,01
2.3 Noyau médial	39,09 ± 1,52	34,58 ± 1,01 *	35,87 ± 1,28	3,336	<0,05
2.4 Noyau basolatéral	45,15 ± 1,45	39,56 ± 0,79 **	41,83 ± 1,15	5,742	<0,01
2.5 Noyau basomédian	40,24 ± 1,63	36,30 ± 0,89	36,91 ± 1,29	2,694	n.s.
3. Aires hippocampiques					
3.1 CA1	44,90 ± 1,43	37,81 ± 1,34 **	41,74 ± 1,26	7,061	<0,01
3.2 CA3	46,84 ± 0,79	40,26 ± 1,45 **	42,94 ± 1,05	8,467	<0,01
3.3 Gyrus denté	55,02 ± 1,23	50,25 ± 1,05 *	50,25 ± 1,45 *	4,809	<0,05
3.4 Subiculum	47,25 ± 1,03	46,17 ± 1,59	45,48 ± 1,46	0,396	n.s.
4. Noyaux de l'habenula					
4.1 Noyau latéral	49,86 ± 1,00	42,39 ± 0,83 **	45,73 ± 1,16 *	12,637	<0,01
4.2 Noyau médian	45,08 ± 1,28	39,04 ± 1,55 *	41,75 ± 1,39	4,613	<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 de Bonferroni a été utilisé pour comparaisons multiples.

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

n.s. : non significatif

III.7.3.8. Substance blanche

Aucune différence significative n'a été montrée concernant l'activité de la cytochrome oxydase au niveau des zones de substance blanche (**Tableau 121**).

Tableau 121 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante puis allaitante sur l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase à PND 60 (8/8)

Structure	Témoïn	Dose 1	Dose 2	ANOVA	
				F (2,14)	P
H) Zone de substance blanche					
1. Capsule interne	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0		
2. Corps calleux	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0		
3. Matière blanche du cervelet	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0		

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm 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 de Bonferroni a été utilisé pour comparaisons multiples.

III.7.4. Récapitulatif

➤ A **PND10**, les animaux exposés pendant la gestation puis l'allaitement à la **dose 1** de HAP présentent une activité enzymatique de la cytochrome oxydase significativement plus **faible** par rapport aux animaux témoins au niveau du cortex moteur primaire, du cortex sensori-moteur, des noyaux subthalamiques, du cortex pariétal, du cortex temporal et du noyau accumbens ; et significativement plus **élevée** au niveau de l'olive inférieure.

Par ailleurs, à ce stade, les animaux exposés pendant la gestation puis l'allaitement à la **dose 2** de HAP présentent une activité enzymatique de la cytochrome oxydase plus **faible** par rapport aux animaux témoins au niveau du locus coeruleus ; et significativement plus **élevée** au niveau du cortex auditif, de l'olive supérieure, du noyau cochléaire, de l'olive inférieure, du noyau caudé, du globus pallidus, du noyau fastigial, du noyau du raphé médian, des noyaux gris pontiques, du cortex frontal, du cortex cingulaire antérieur, des noyaux thalamiques ventrolatéral, ventromédial, médiodorsal et antérieurs, du noyau accumbens, du septum médian, du noyau amygdalien médial, du gyrus denté et du subiculum.

➤ A **PND21**, les animaux exposés pendant la gestation puis l'allaitement à la **dose 1** de HAP présentent une activité enzymatique de la cytochrome oxydase significativement plus **faible** par rapport aux animaux témoins au niveau du cortex moteur primaire, du cortex sensori-moteur, du noyau caudé, du cortex cingulaire antérieur, du noyau thalamique ventromédial, du septum médian, des noyaux amygdaliens central et basolatéral, du noyau médian de l'habenula et de la capsule interne ; et significativement plus **élevée** au niveau de la couche granulaire des cellules du cervelet et de la matière blanche du cervelet.

Par ailleurs, à ce stade, les animaux exposés pendant la gestation puis l'allaitement à la **dose 2** de HAP présentent une activité enzymatique de la cytochrome oxydase plus **faible** par rapport aux animaux témoins au niveau du noyau rouge, de la couche de Purkinje des cellules du cervelet, de la formation réticulée mésencéphalique, de la partie antérieure latérale de la matière grise périacqueductale, du noyau hypothalamique latéral, du noyau amygdalien médial et de la capsule interne.

➤ Enfin, à **PND60**, les animaux exposés pendant la gestation puis l'allaitement à la **dose 1** de HAP présentent une activité enzymatique de la cytochrome oxydase significativement plus **faible** par rapport aux animaux témoins au niveau du cortex auditif, du colliculus inférieur, du noyau caudé, du noyau rouge, du noyau interpositus, de la formation réticulée mésencéphalique, du noyau interpédonculaire, de la partie antérieure latérale de la matière grise périacqueductale, des noyaux thalamiques postérieurs, du corps genouillé médian, de la *zona incerta*, des noyaux hypothalamiques ventromédian, postérieur et arqué, du septum latéral, des noyaux amygdaliens central, médial et basolatéral, des cornes d'Ammon 1 et 3, du gyrus denté et des noyaux de l'habenula latéral et médian ; et significativement plus **élevée** au niveau de l'olive supérieure et du noyau cochléaire.

Par ailleurs, à ce stade, les animaux exposés pendant la gestation puis l'allaitement à la **dose 2** de HAP présentent une activité enzymatique de la cytochrome oxydase plus **faible** par rapport aux animaux témoins au niveau du cortex frontal, des noyaux thalamiques médiodorsal et postérieurs, du noyau amygdalien central, du gyrus denté et du noyau latéral de l'habenula ; et significativement plus **élevée** au niveau de l'olive supérieure, du noyau cochléaire, du colliculus supérieur, du noyau rouge et de la partie postérieure dorsolatérale de la matière grise périacqueductale.

III.8. Dosages des HAP et métabolites

III.8.1. PND0

Le tableau 122 présente les concentrations cérébrales de HAP et de métabolites monohydroxylés à PND0. L'analyse statistique n'a montré aucune différence significative entre les concentrations mesurées chez les animaux témoins et celles mesurées chez les animaux exposés pendant la gestation et l'allaitement aux deux doses du mélange de HAP. Néanmoins, parmi les HAP majoritaires détectés à PND0, les concentrations de phénanthrène, pyrène et fluoranthène sont plus élevées chez les animaux exposés à la dose la plus forte de HAP, par rapport aux animaux témoins.

Tableau 122 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante puis allaitante sur les concentrations cérébrales de HAP et de métabolites mono-hydroxylés chez les rats à PND0 (ng/g de tissu)

Molécule	Témoïn		Dose 1		Dose 2		ANOVA	
							F (2,3)	p
Naphtalène	2277,00	± 675,47	4028,67	± 2143,37	707,00	± 349,27	1,717	n.s.
1-OH-naph	0,47	± 0,14 ♦	0,25	± 0,11 ♦	0,34	± 0,04 ♦		
2-OH-naph	1,01	± 0,30	0,62	± 0,28	0,34	± 0,01	1,059	n.s.
Acénaphthylène	20,00	± 0,91	18,67	± 2,67	23,33	± 0,88	2,141	n.s.
Acénaphthène	47,50	± 2,06	46,00	± 9,61	44,33	± 4,06	0,086	n.s.
Fluorène	15356,50	± 2316,03	15309,00	± 2220,68	7266,00	± 1599,73	4,379	n.s.
9-OH-Fluo	0,20	± 0,03	0,20	± 0,05	0,16	± 0,01	0,265	n.s.
Phénanthrène	406,75	± 17,06	391,33	± 46,31	455,00	± 25,32	1,165	n.s.
9-OH-Phe	0,72	± 0,28	0,69	± 0,10	0,75	± 0,06	0,008	n.s.
3-OH-Phe	0,11	± 0,02 ♦	0,08	± 0,01 ♦	0,10	± 0,02 ♦		
2-OH-Phe	0,19	± 0,03 ♦	0,17	± 0,02 ♦	0,18	± 0,03 ♦		
Anthracène	9,50	± 0,50	9,00	± 1,00	14,67	± 2,03	3,721	n.s.
Fluoranthène	70,50	± 6,44	69,33	± 9,21	87,00	± 7,77	1,559	n.s.
Pyrène	221,00	± 16,72	213,33	± 28,71	258,33	± 20,10	1,164	n.s.
1-OH-Pyr	0,49	± 0,06	0,51	± 0,07	0,75	± 0,06	3,125	n.s.
B(a)A	0,55	± 0,05	0,57	± 0,08	0,96	± 0,47	0,410	n.s.
Chrysène	1,26	± 0,08	1,34	± 0,03	1,87	± 0,50	1,612	n.s.
B(b)F	0,53	± 0,13 ♦	0,59	± 0,18 ♦	0,88	± 0,40 ♦		
B(k)F	0,18	± 0,07 ♦	0,49	± 0,26 ♦	0,68	± 0,41 ♦		
B(a)P	0,84	± 0,07 ♦	0,80	± 0,14 ♦	1,11	± 0,28 ♦		
IP	0,45	± 0,19 ♦	0,42	± 0,11 ♦	0,84	± 0,26 ♦		
B(ghi)P	1,63	± 0,25 ♦	1,60	± 0,50 ♦	2,21	± 0,40 ♦		
DB(a,h)A	0,25	± 0,08 ♦	0,18	± 0,07 ♦	0,52	± 0,26 ♦		

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 de Bonferroni a été utilisé pour comparaisons multiples.

n.s. : non significatif

♦ : valeurs supérieures à la LdD, et inférieures à la LdQ

III.8.2. PND21

Le tableau 123 présente les concentrations cérébrales de HAP et de métabolites mono-hydroxylés à PND21. Aucune différence significative entre les concentrations mesurées chez les animaux témoins et celles mesurées chez les animaux exposés pendant la gestation et l'allaitement au mélange de HAP n'a été mise en évidence.

Tableau 123 : Effets de l'ingestion répétée d'un mélange de 16 HAP par la rate gestante puis allaitante sur les concentrations cérébrales de HAP et de métabolites mono-hydroxylés chez les rats à PND21 (ng/g de tissu)

Molécule	Témoïn		Dose 1		Dose 2		ANOVA	
							F (2,3)	p
Naphtalène	2775,25	± 1238,83	1846,00	± 156,03	2614,25	± 850,05	0,324	n.s.
1-OH-naph	0,71	± 0,13	0,56	± 0,30 ♦	0,39	± 0,11	2,905	n.s.
2-OH-naph	0,90	± 0,22	1,08	± 0,72	0,60	± 0,27	0,276	n.s.
Acénaphtylène	16,50	± 2,06	18,50	± 2,60	17,00	± 2,68	0,179	n.s.
Acénaphthène	42,50	± 7,68	44,50	± 6,40	36,50	± 3,93	0,451	n.s.
Fluorène	12015,25	± 680,48	10871,25	± 2904,51	20933,50	± 10115,61	0,819	n.s.
9-OH-Fluo	0,18	± 0,02	0,21	± 0,05	0,17	± 0,03	0,281	n.s.
Phénanthrène	386,75	± 48,71	369,75	± 25,27	324,50	± 23,86	0,867	n.s.
9-OH-Phe	0,65	± 0,17	1,07	± 0,32	0,71	± 0,20	0,873	n.s.
3-OH-Phe	0,11	± 0,01 ♦	0,09	± 0,03 ♦	0,10	± 0,02 ♦		
2-OH-Phe	0,21	± 0,02 ♦	0,15	± 0,03 ♦	0,17	± 0,03 ♦		
Anthracène	9,00	± 2,55	11,00	± 1,00	11,00	± 1,15	0,365	n.s.
Fluoranthène	73,00	± 10,65	72,75	± 7,47	65,50	± 6,29	0,261	n.s.
Pyrène	222,50	± 29,06	222,50	± 18,91	206,50	± 18,98	0,164	n.s.
1-OH-Pyr	0,64	± 0,21	0,67	± 0,10	0,44	± 0,10	0,781	n.s.
B(a)A	0,42	± 0,05 ♦	0,47	± 0,06 ♦	0,35	± 0,05 ♦		
Chrysène	1,34	± 0,19	1,23	± 0,08	1,07	± 0,04	1,659	n.s.
B(b)F	0,49	± 0,06 ♦	0,44	± 0,07 ♦	0,37	± 0,03 ♦		
B(k)F	0,22	± 0,06 ♦	0,43	± 0,16 ♦	0,23	± 0,03 ♦		
B(a)P	0,83	± 0,12 ♦	0,57	± 0,15 ♦	0,68	± 0,10 ♦		
IP	0,49	± 0,12 ♦	0,38	± 0,10 ♦	0,46	± 0,06 ♦		
B(ghi)P	1,59	± 0,35 ♦	1,74	± 0,18 ♦	1,54	± 0,25 ♦		
DB(a,h)A	0,20	± 0,02 ♦	0,15	± 0,04 ♦	0,14	± 0,03 ♦		

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 de Bonferroni a été utilisé pour comparaisons multiples.

n.s. : non significatif

♦ : valeurs supérieures à la LdD, et inférieures à la LdQ

III.9. Conclusion des résultats

III.9.1. Effets d'une exposition périnatale aux HAP sur le poids corporel

La mesure du poids corporel réalisée entre le 3^{ème} jour de vie postnatale et l'âge adulte a montré que l'exposition précoce au mélange de HAP a eu un effet sur la croissance pondérale générale des animaux. En effet, les rats nés des mères exposées à la dose 1 ont un poids plus faible que les animaux témoins à PND3, PND4 et PND7, et ceux nés des mères exposées à la dose 2 ont un poids plus faible que les animaux témoins entre PND3 et PND7. L'ensemble des animaux exposés a ensuite présenté une évolution pondérale comparable à celle des animaux témoins.

III.9.2. Effets d'une exposition périnatale aux HAP sur le développement moteur et sensoriel

Le retard trophique consécutif à l'exposition périnatale au mélange de HAP, observé aux deux doses, ne s'est pas accompagné de conséquences délétères en termes de développement moteur et sensoriel.

La comparaison des performances des animaux des deux groupes exposés par rapport à celles du groupe témoin, dans chacun des tests mis en œuvre pendant les trois premières semaines de vie post-natale, a en effet mis en évidence une bonne maturation des fonctions sensorielles et motrices malgré quelques modifications détectées pendant les premiers jours de tests.

En revanche, il peut être noté que l'ensemble des animaux exposés au mélange de HAP montre un retard d'ouverture des yeux à PND14, mais rattrape largement ce retard dès PND15. Dès lors, il semble plus juste d'attribuer cette différence à PND14 à une grande variation des résultats au cours d'une même journée, plutôt qu'à un réel retard de maturation des structures visuelles pour les animaux exposés.

Par ailleurs, l'étude du comportement maternel n'a mis en évidence aucune différence entre les groupes, suggérant que l'exposition aux HAP n'a pas eu d'effet sur la capacité des mères à s'occuper de leurs jeunes.

Enfin, dans l'OF réalisé à PND25, aucune différence significative n'a été observée. Ainsi, l'exposition pré et postnatale aux HAP ne semble pas avoir affecté le niveau d'activité locomotrice des animaux exposés à ce stade.

III.9.3. Effets d'une exposition périnatale aux HAP sur le comportement individuel à l'âge adulte

Les données issues des tests comportementaux réalisés à partir de PND60 ont mis en évidence des effets de l'exposition précoce au mélange de 16 HAP, plus particulièrement sur les niveaux d'activité et d'anxiété des animaux.

En ce qui concerne le niveau d'activité, les résultats de l'OF ont montré que les animaux exposés aux HAP en période périnatale, quelle que soit la dose, sont plus actifs que les animaux témoins, puisqu'ils traversent plus de cases dans le dispositif. De plus, les animaux exposés à la dose 2 visitent plus de branches pendant la première minute dans le LY, confirmant cette augmentation du niveau d'activité locomotrice.

Concernant le niveau d'anxiété, les animaux exposés aux doses 1 et 2 passent plus de temps dans la zone protégée dans le LCS (branches fermées) ; ce qui traduit une augmentation du niveau d'anxiété de ces animaux. De plus, dans l'OF, les mêmes animaux passent plus de temps en zone périphérique, au détriment de la zone centrale, ce qui va dans le même sens que les résultats obtenus dans le LCS, et confirme l'augmentation de l'anxiété suite à une exposition périnatale aux HAP, aux deux doses testées.

En ce qui concerne la mémoire et les capacités d'apprentissage, les données obtenues dans les labyrinthes en Y et à 8 branches n'ont pas montré d'effets de l'exposition périnatale aux HAP, aux deux doses choisies, sur cet aspect du comportement.

Enfin, des différences entre le comportement des femelles et celui des mâles ont été mises en évidence. Ainsi, les femelles ont été plus actives et moins anxieuses que les mâles dans le LCS ; résultats confirmés au plan de l'activité par l'augmentation du nombre de branches visitées dans le LY, et au plan de l'anxiété par une diminution du temps passé en branches fermées dans le LCS. Enfin, les femelles ont effectué un pourcentage d'alternance plus faible dans le LY et se sont trompées plus rapidement dans le labyrinthe radial à 8 branches, suggérant de moins bonnes capacités de mémorisation et d'apprentissage que les mâles.

Finalement, les résultats obtenus dans cette étude ont montré que l'exposition périnatale au mélange de 16 HAP a affecté deux registres comportementaux à l'âge adulte, le niveau d'activité locomotrice et le niveau d'anxiété de l'ensemble des animaux nés de mères exposées ont en effet augmenté.

III.9.4. Effets d'une exposition périnatale aux HAP sur le comportement social à l'âge adulte

Dans cette étude, les résultats ont montré un effet de l'exposition périnatale, uniquement à la dose 2 de HAP, sur le comportement des rats placés dans la situation de difficulté d'accès à la nourriture.

Sur un plan qualitatif, l'exposition aux HAP aux deux doses n'a pas interféré avec le phénomène de différenciation sociale, puisque des rats de type Transporteurs et Non Transporteurs sont apparus dans tous les groupes expérimentaux.

Néanmoins, sur un plan quantitatif, l'exposition périnatale à la dose la plus élevée de HAP a modifié ces proportions. En effet, ces animaux ont adopté préférentiellement un profil Non Transporteur, ce qui est compensé par l'augmentation du nombre de Transporteurs chez les témoins. L'adoption de ce profil plutôt que du profil Transporteur peut être liée au niveau d'anxiété de l'animal. En effet, un animal Non Transporteur est plus anxieux qu'un animal Transporteur. Dès lors, les animaux exposés à la dose 2 de HAP, parce qu'ils sont plus anxieux au plan individuel que les témoins, s'orientent préférentiellement vers un profil Non Transporteur.

Enfin, le profil des animaux exposés à la dose 1 de HAP n'est pas statistiquement différent de celui des animaux témoins, ce qui pourrait laisser penser qu'ils ne présentent pas de différence d'anxiété par rapport aux animaux témoins.

Par ailleurs, les animaux Transporteurs exposés à la dose 2, se sont spécialisés exclusivement dans le rôle d'Autonomes, ce qui peut venir du fait que le nombre d'animaux Transporteurs étant supérieur chez les animaux témoins, il y a plus de chance qu'un animal Non Transporteur vole de la nourriture à un animal témoin, et ainsi les Transporteurs issus du groupe exposé à la dose 2 de HAP deviennent Autonomes « par défaut ». Cette hypothèse pourrait être vérifiée en évaluant le nombre d'attaques subies par les animaux Autonomes exposés à la dose 2.

Enfin, l'étude des flux de nourriture dans les groupes a indiqué que le flux majoritaire s'écoule bien des animaux Transporteurs vers les animaux Non Transporteurs, mais qu'il provient presque exclusivement des Transporteurs témoins.

III.9.5. Effets d'une exposition périnatale aux HAP sur le métabolisme cérébral

Le métabolisme énergétique d'un nombre relativement élevé de structures cérébrales est affecté par une exposition périnatale aux HAP, à la dose 1 comme à la dose 2. Par ailleurs, des augmentations de l'activité neuronale ont majoritairement été observées à PND10, alors que ce sont des diminutions de l'activité énergétique neuronale qui ont majoritairement été constatées à PND21 et PND60.

Globalement, les structures présentant des modifications d'activité enzymatique, chez les animaux exposés précocement au mélange de HAP, par rapport aux animaux témoins, aux différents stades sont impliquées dans des fonctions très diverses, telles que les fonctions sensorielles, motrices et cognitives, le système de récompense et le système limbique, la thermorégulation, le comportement alimentaire, la mémoire, l'apprentissage et les comportements anxieux.

Les animaux nés de mères exposées aux HAP à la dose la plus faible (2 µg/kg/jour pendant la gestation et 1,5 µg/kg/jour pendant la période d'allaitement), ont présenté des

modifications de l'activité de la cytochrome oxydase au niveau de 7 structures cérébrales à PND10, 12 structures à PND21, et 25 structures à PND60.

Par ailleurs, les animaux nés de mères exposées à la dose la plus forte de HAP, soit 200 µg/kg/jour pendant la gestation et 150 µg/kg/jour pendant la période d'allaitement, ont quand à eux présenté des modifications de l'activité de la cytochrome oxydase au niveau de 21 aires cérébrales à PND10, 7 aires à PND21, et 11 à PND60.

Ainsi, au cours du temps, un nombre plus important de structures a présenté des différences significatives concernant l'activité enzymatique de la cytochrome oxydase, par rapport aux animaux témoins. Ainsi, il semble que les atteintes observées précocement s'accroissent avec le temps, traduisant une toxicité retardée suite à une exposition précoce aux HAP, en lien avec les modifications comportementales observées par ailleurs.

III.9.6. Effets d'une exposition périnatale aux HAP sur la concentration cérébrale de molécules mères et de métabolites mono-hydroxylés chez les ratons

Comme cela a été montré pour les animaux exposés uniquement au cours de la gestation, toutes les molécules mères présentes dans le mélange administré, et certains de leurs métabolites ont été détectés au niveau du cerveau des jeunes à PND0 et à PND21, tant chez les animaux exposés que chez les animaux témoins. Comme dans le cas précédent, les HAP de haut poids moléculaire ont présentés des valeurs inférieures à la limite de quantification.

Les 6 composés mesurés en majorité dans le cerveau sont également les mêmes, et un profil similaire a été observé chez les témoins et chez les animaux exposés aux 2 doses et aux 2 stades étudiés (PND0 et PND21).

Il est intéressant de noter qu'à PND21, et alors que l'exposition aux HAP a été poursuivie pendant les trois premières semaines de vie post-natale, les concentrations cérébrales des molécules mères sont du même ordre de grandeur que celles mesurées chez les témoins, ce qui suggère une adaptation des capacités métaboliques des animaux sans doute liée à la maturation des systèmes enzymatiques au cours des premières semaines de vie postnatale chez le raton.

DISCUSSION GENERALE

« In our every deliberation, we must consider the impact of our decisions on the next seven generations »

Proverbe Iroquois

I. Rappels des objectifs

Les objectifs des expérimentations effectuées au cours de ce travail de thèse étaient d'évaluer chez le rat la neurotoxicité induite par une exposition précoce, *via* l'organisme maternel, à un mélange de 16 HAP, et cela à des doses comparables à celles observées chez l'Homme *via* l'ingestion d'aliments contaminés.

Pour cela, le poids des animaux a été suivi quotidiennement à partir du 3^{ème} jour de vie, et des tests visant à évaluer le développement moteur et sensoriel des ratons ont été réalisés pendant les trois premières semaines de vie post-natale.

A partir de l'âge de deux mois, le comportement individuel des animaux a été observé, sur le plan de l'activité locomotrice, de l'anxiété, et des capacités cognitives (mémorisation et apprentissage) ; puis le comportement social des rats mâles a été évalué à l'âge de six mois.

En parallèle, des analyses histologiques de l'activité cérébrale de la cytochrome oxydase ont été réalisées à trois âges différents, dans le but de déterminer les régions les plus sensibles à l'action des HAP.

Enfin, des dosages des HAP et de leurs métabolites ont été effectuées au niveau cérébral chez le raton, à deux âges différents, afin de déterminer le niveau de contamination en HAP et métabolites chez le jeune, et de corrélérer la présence éventuelle de molécules mères ou de métabolites aux effets observés sur un plan comportemental et histologique.

L'exposition de la mère par voie alimentaire au mélange de 16 HAP aux deux doses choisies initialement, a été réalisée d'une part pendant toute la durée de la gestation aux doses de 2 et 200 µg/kg/jour, et d'autre part pendant les durées consécutives de la gestation (2 et 200 µg/kg/jour) et de l'allaitement des jeunes (1,5 et 150 µg/kg/jour). Cela a été fait afin de déterminer la contribution relative de ces deux périodes critiques dans la neurotoxicité des HAP.

II. Originalité du modèle d'étude

Les études présentées dans ce manuscrit s'inscrivent à plusieurs niveaux dans des problématiques actuelles en santé publique et en toxicologie alimentaire et environnementale, puisqu'elles visent à évaluer la neurotoxicité de polluants ubiquitaires de l'environnement, présents notamment dans des denrées alimentaires, auxquels l'ensemble de la population est exposé, et cela également à des stades précoces du développement de l'individu.

De plus, le protocole expérimental mis au point est original, et cela pour plusieurs raisons :

➤ Dans la plupart des études menées sur un modèle animal en toxicologie, l'administration par voie orale des molécules étudiées est faite par gavage. Dans le travail présenté ici, l'administration du mélange de HAP a été faite *via* un **aliment contaminé**, ce qui a permis à la fois de contrôler de manière précise les quantités de HAP ingérées quotidiennement par chaque animal, tout en évitant d'imposer un stress aux femelles à des périodes pendant lesquelles celui-ci peut avoir des conséquences importantes sur le développement du jeune.

➤ Les études portant sur la neurotoxicité de polluants environnementaux en général, et sur celle des HAP plus particulièrement, évaluent majoritairement les effets de niveaux élevés de contamination, qui sont peu représentatifs de l'exposition de l'Homme dans son environnement. Ainsi, les deux doses qui ont été choisies peuvent être qualifiées de **faibles doses**, par rapport à ce qui est classiquement décrit dans la littérature. La plus faible des deux doses (de l'ordre de 2 µg/kg/jour) a quand à elle été définie de manière à **modéliser** fidèlement les niveaux **d'ingestion quotidienne** de HAP par une femme, pendant les périodes de grossesse et/ou d'allaitement.

➤ En ce qui concerne la neurotoxicité des HAP, peu de données sont disponibles dans la littérature, et ne concernent en général que l'étude d'un seul composé à la fois. En effet, les articles publiés jusqu'à présent décrivent exclusivement les effets du B(a)P ou du fluoranthène seuls sur le système nerveux central mature ou en développement. Dans le travail présenté ici, les effets neurotoxiques d'un **mélange de 16 HAP** ont été étudiés pour la première fois.

➤ Par ailleurs, un faible nombre d'études s'intéressent aux effets neurotoxiques d'une **exposition précoce** aux HAP. De plus, la comparaison de **deux périodes d'exposition**, la gestation et l'allaitement, représentant des fenêtres de vulnérabilité différentes pour le système nerveux, s'ajoute à l'originalité de ce travail.

➤ Enfin, la **complémentarité des approches** mises en œuvre, à savoir l'évaluation de la **neurotoxicité développementale et comportementale**, l'établissement d'une **cartographie** des zones cérébrales plus ou moins sensibles à l'action des HAP, et la **quantification** des HAP et de leurs métabolites au niveau du cerveau des jeunes rats nés de mères exposées (méthode analytique publiée récemment), représente un point fort de ce travail de thèse.

III. Effets d'une exposition répétée par voie alimentaire à un mélange de 16 HAP chez la rate gestante et/ou allaitante.

III.1. Effets d'une exposition périnatale à un mélange de HAP sur la reproduction et le poids des animaux

Dans les deux études décrites précédemment, l'exposition des femelles à un mélange de HAP soit au cours de la gestation, aux doses de 2 et 200 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{jour}$; soit pendant la gestation et l'allaitement, aux doses de 2 et 200 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{jour}$ puis 1,5 et 150 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{jour}$, n'a pas induit d'effet sur les capacités de reproduction des animaux. En effet, ni la durée de la gestation, ni la taille des portées n'ont été influencées par l'exposition des mères aux HAP. Cependant, le nombre de fœtus n'a pas été déterminé au cours de la gestation dans ces études, ce qui aurait permis d'évaluer le nombre d'avortements spontanés.

Il est très probable que les doses de HAP administrées aux femelles aient été trop faibles pour induire des effets délétères sur le déroulement de la gestation ou sur le nombre de ratons.

Par ailleurs, l'exposition aux HAP à ces doses n'a pas influencé le poids des ratons exposés uniquement pendant la gestation, alors qu'elle a eu un effet sur les ratons exposés pendant la gestation puis l'allaitement, et cela aux deux doses testées. En effet, ces derniers ont présenté un poids plus faible que les ratons témoins, mais uniquement pendant la première semaine de vie post-natale.

Là encore, le niveau d'exposition des femelles aux HAP pendant la gestation a sans doute été trop faible pour induire un effet détectable après la fin de l'exposition sur le poids des ratons. Par contre, en ce qui concerne les ratons exposés pendant la gestation et la période d'allaitement, le fait de cumuler une exposition plus longue a pu renforcer d'éventuels effets sur le poids, au moins pendant quelques jours. Néanmoins, il peut être noté que la différence d'exposition des ratons dans les premiers jours de vie entre chacune des deux expérimentations menées, est faible. Dès lors, on peut penser que le fait de continuer à exposer les animaux après la naissance a pu contribuer à amplifier un effet déjà présent, mais pas visible. Il semble ainsi que l'impact des HAP sur le poids des jeunes nés de mères exposées soit directement lié à la période d'exposition plus ou moins longue, et que le fait

d'arrêter l'exposition à la naissance suffise à limiter les effets délétères des HAP sur la prise de poids des jeunes.

Dans la littérature, l'impact négatif des HAP sur le déroulement normal de la gestation ou sur le nouveau né a été décrit à plusieurs reprises, chez l'Homme ou l'animal. D'une part, de nombreuses études épidémiologiques récentes ont montré qu'une exposition prénatale aux HAP contenus dans l'atmosphère ou dans les aliments, est associée avec des effets négatifs sur le déroulement de la grossesse, tels que des accouchements avant terme, et sur différentes caractéristiques du nouveau né, comme le poids, la taille, et le périmètre crânien à la naissance (Perera et al., 1998, 2003 ; Dejmek et al., 2000 ; Perera et al., 2005a et 2005b ; Choi et al., 2006, 2008 ; Jedrychowski et al., 2011b).

D'autre part, des études réalisées chez l'animal confirment le fait qu'une exposition prénatale au B(a)P, à des doses plus fortes que celles administrées ici (de l'ordre de 50 mg/kg ou comprises entre 25 et 100 µg/m³ pour le B(a)P inhalé), induit des effets négatifs sur la croissance et la survie fœtales (ATSDR, 1995 ; Cervello et al., 1992 ; Wu et al., 2003).

Par ailleurs, il a été démontré que les HAP sont capables de passer la barrière placentaire, et peuvent alors affecter le développement du fœtus (Autrup & Vestergaard, 1996; Perera et al., 1999 ; Sanyal et al., 2007). Néanmoins, les mécanismes d'action précis des HAP sur le développement fœtal ne sont pas clairement connus, même si plusieurs hypothèses sont avancées. Ainsi, les HAP pourraient avoir des effets anti-œstrogéniques (Bui et al., 1986) ; moduler la prolifération précoce des trophoblastes (Wu et al., 2003) ; ou agir directement sur la croissance du placenta en se liant à des récepteurs de facteurs de croissance placentaires, avec pour conséquence une réduction des échanges d'oxygène et de nutriments entre l'organisme maternel et le fœtus (Dejmek et al., 2000).

Dans le travail présenté ici, les données analytiques montrent que des HAP et des métabolites sont retrouvés dans le cerveau des ratons à la naissance, y compris chez les animaux témoins, ce qui met en évidence une forte contamination environnementale, en dehors de l'exposition mise en place dans le protocole expérimental.

III.2. Effets d'une exposition périnatale à un mélange de HAP sur le développement moteur et sensoriel

Le tableau 124 résume les effets observés sur le développement moteur et sensoriel des animaux au cours des quatre premières semaines de vie postnatale, suite à une exposition exclusivement prénatale, ou périnatale aux HAP.

Tableau 124 : Effets précoces induits après exposition de la femelle gestante et/ou allaitante à un mélange de 16 HAP

Test	Variable	Exposition de la rate gestante		Exposition de la rate gestante puis allaitante	
		Dose 1	Dose 2	Dose 1	Dose 2
Reproduction	Durée	-	-	-	-
	Taille des portées	-	-	-	-
Poids		-	-	PND3/4/7/11 ↘	PND3 à 7 ↘
Retournement	Temps	PND3 ↘	PND3 ↗	PND4 ↗	-
	Réussite	-	-	-	-
Agrippement	Angle	PND4 ↗	PND4 ↘	-	-
	Réussite	-	PND4 & 6 ↘	-	-
Cliff avoidance	Temps	PND7 ↗	PND7 ↗	PND6 ↗	-
	Réussite	PND7 ↗	PND7 ↗	-	PND6 ↗
Réaction AG	Temps	-	-	-	-
	Réussite	-	-	PND10 ↘	-
Suspension	Temps	-	-	-	-
Coordination Locomotrice	Temps	-	PND21 ↗	-	-
	Réussite	PND19 ↘	-	-	-
Bruit	Sursaut	PND12 ↗	-	-	-
Yeux	Ouverture	-	-	PND14 ↘ & PND15 ↗	
OF PND25	Activité	-	↗	-	-

- ↗ : augmentation significative par rapport aux animaux témoins
 ↘ : diminution significative par rapport aux animaux témoins
 — : pas de différence significative par rapport aux animaux témoins

(Abréviations : PND, Post Natal Day ; AG, Anti Gravitaire ; OF, Open Field)

D'une manière générale, l'exposition prénatale ou périnatale au mélange de HAP n'a eu qu'une influence limitée sur le développement moteur et sensoriel des rats. En effet, même si quelques modifications transitoires ont été observées, l'ensemble des rats testés, qu'ils aient été exposés ou non au mélange de HAP *via* l'organisme maternel, a globalement réussi les mêmes performances aux différents tests mis en place au cours des premières semaines de vie.

Par ailleurs, peu de différences ont été observées entre les performances des animaux exposés à la dose 1 et à la dose 2, ce qui montre l'absence d'un effet dose-dépendant de l'exposition aux HAP sur le bon développement moteur et sensoriel des animaux exposés.

Il faut cependant noter que les rats exposés aux HAP à la dose 2 de HAP uniquement pendant la gestation, ont été plus actifs dans l'open-field à PND25 que les rats témoins, résultat qui sera observé plus tardivement à l'âge adulte.

Plusieurs études épidémiologiques menées aux Etats-Unis, en République Tchèque, en Pologne ou en Chine, ont récemment suggéré qu'une exposition prénatale aux HAP, par voie atmosphérique ou alimentaire, peut être associée à une diminution des scores obtenus à des tests de développement et d'intelligence réalisés chez l'enfant au cours des premières années de la vie (Jedrychowski et al., 2003 ; Perera et al., 2006, 2009, 2012a et 2012b ; Tang et al., 2008 ; Edwards et al., 2010). De plus, la diminution du périmètre crânien constaté chez ces enfants à la naissance et corrélée à une exposition prénatale aux HAP environnementaux, a été associée il y a plusieurs années par certains auteurs à un retard de développement mental et psychomoteur dans la petite enfance (Chasnoff et al., 1992 ; Azuma & Chasnoff, 1993).

Chez l'animal, des effets sur le développement des jeunes d'une exposition prénatale au B(a)P ont également été mis en évidence dans plusieurs études. Ainsi, une exposition prénatale à ce seul HAP, que ce soit par inhalation ou par gavage, a eu des effets à court terme chez les jeunes exposés, tels que la sous-expression, au niveau cortical, du gène codant pour le facteur de transcription sp1, exprimé dans les zones du cerveau en développement (Hood et al., 2000) ; la sous-expression des sous-unités NR2A et NR2B du récepteur au glutamate NMDA chez le rat au niveau de l'hippocampe (Brown et al., 2007) ; ainsi que du gène Met

codant pour un récepteur tyrosine kinase chez la souris, observée au niveau cortical (Sheng et al., 2010).

De plus, des performances dégradées aux tests de retournement et de réaction antigravitaire suite à une exposition postnatale au B(a)P chez le rat (20 mg/kg) ou la souris (2 et 20 mg/kg) ont été montrées (Boussel et al., 2006) et Bouayed et al., 2009a).

Les résultats obtenus dans ce travail de thèse, qui ne paraissent pas toujours en accord avec d'autres études, peuvent être expliqués de deux manières :

(1) En effet, il est probable que les doses testées lors de ces travaux soient trop faibles, même si elles représentent une exposition réelle, pour induire à court terme une altération de la maturation cérébrale, d'où les performances similaires observées dans les différents tests mis en place lors des trois premières semaines de vie des animaux. Dans les précédentes études menées chez le rongeur, les doses administrées induisant des effets à court terme sont en général plus fortes, jusqu'à 20 mg/kg/jour de B(a)P. Les doses administrées dans le cadre de ce travail sont plus faibles que celles habituellement relevées dans la littérature ; elles ont été calculées de manière à modéliser l'exposition quotidienne aux HAP, par l'ingestion d'aliments contaminés, par une femme adulte, telle qu'elle est décrite dans plusieurs études.

(2) Il est possible que le système nerveux central en développement, de par son fort degré de plasticité, soit capable de compenser à court terme l'action de molécules potentiellement neurotoxiques, surtout lorsque l'exposition a lieu à des doses faibles. Cependant, cette absence de troubles visibles à court terme ne permet pas d'écarter tout danger pour ce type de composés. Ainsi, un grand nombre de substances neurotoxiques, telles que le méthyl-mercure ou le triéthylétain, pourrait induire des altérations au niveau cérébral pendant le développement, mais cela conduirait à des troubles uniquement à long terme, grâce à l'existence de ces mécanismes compensatoires précoces (Rice & Barone, 2000).

Il semble alors important d'évaluer la toxicité d'un composé ou d'un mélange de composé suite à l'exposition, mais également plusieurs semaines ou plusieurs mois après la fin de l'exposition.

III.3. Effets d'une exposition périnatale à un mélange de HAP sur le comportement individuel et social à l'âge adulte

Le tableau 125 résume les effets observés sur le comportement des animaux à l'âge adulte, suite à une exposition prénatale, ou périnatale au mélange de HAP, à la dose 1 et à la dose 2.

Tableau 125 : Effets comportementaux induits à l'âge adulte, suite à une exposition de la femelle gestante ou gestante puis allaitante à un mélange de 16 HAP

Test	Comportement	Exposition de la rate gestante		Exposition de la rate gestante puis allaitante	
		Dose 1	Dose 2	Dose 1	Dose 2
LCS	Activité	↗	-	-	-
	Anxiété	-	-	↗	↗(t)
OF	Activité	-	-	↗	↗
	Anxiété	-	-	↗	↗
LY	Activité	↗	↗	-	↗
	MCT	-	-	-	-
L radial à 8 branches	Activité	-	-	-	-
	MCT	-	-	-	-
	MLT	-	-	-	-
Rats plongeurs	Anxiété	-	-	-	↗

- ↗ : augmentation significative par rapport aux animaux témoins
 ↘ : diminution significative par rapport aux animaux témoins
 — : pas de différence significative par rapport aux animaux témoins

(Abréviations : LCS, Labyrinthe en croix surélevé ; OF, Open Field ; LY, Labyrinthe en Y ; MCT, Mémoire à Court Terme, MLT, Mémoire à Long Terme ; t : tendance)

III.3.1. Effet sexe

A partir de PND60, des modifications concernant deux des trois registres comportementaux étudiés ont été observées chez les animaux exposés précocement au mélange de HAP, incluant une augmentation du niveau d'activité locomotrice et du niveau d'anxiété, sans modification des capacités d'apprentissage et de mémorisation.

Par ailleurs, et contrairement à d'autres études réalisées chez le rat adulte exposé directement à du B(a)P ou du fluoranthène (Saunders et al., 2001, 2003), qui ont montré une plus grande sensibilité des mâles, il ne semble pas y avoir ici de différence d'effets des HAP selon le sexe des animaux. Par contre, les résultats obtenus ont montrés des différences de comportement entre les individus mâles et les individus femelles, et cela quel que soit le groupe considéré. D'une manière générale, les mâles ont été moins actifs et moins anxieux que les femelles, quel que soit le test et le groupe de traitement considéré. Néanmoins, il faut noter qu'aucune évaluation des effets d'une exposition précoce aux HAP sur le système endocrinien n'a été menée, et qu'ainsi les propriétés de perturbateurs endocriniens pour les HAP ne peuvent pas être confirmées ou infirmées.

III.3. 2. Niveau d'activité

A l'âge adulte, l'ensemble des animaux exposés au mélange de HAP pendant la **gestation uniquement**, ou pendant la **gestation puis l'allaitement**, ont été **plus actifs** que les animaux témoins, et ce dans les différents tests utilisés.

Des études précédentes menées chez le rongeur ont montré que le niveau d'activité d'un animal adulte peut être modifié par une exposition directe aux HAP. Ainsi, une diminution d'activité a été décrite chez le rat adulte suite à une administration de B(a)P ou de fluoranthène, à des doses comprises entre 25 et 400 mg/kg (Saunders et al., 2001, 2003, 2006), alors qu'une hyperactivité a été observée chez la souris adulte exposée à 200 mg/kg de B(a)P (Grova et al., 2007). Il apparait ainsi que l'exposition à des composés de la famille des HAP puisse modifier le niveau d'activité des animaux, mais que des variations dans les doses administrées, dans la durée d'exposition, et dans l'utilisation d'un composé seul ou d'un mélange, soient à même de moduler le niveau d'activité locomotrice, pouvant soit l'accroître, soit le diminuer.

III.3.3. Capacités d'apprentissage et de mémorisation

Aucune modification des capacités d'apprentissage et de mémorisation n'a été mise en évidence, dans l'une ou l'autre des deux expérimentations menées.

En revanche, des études récentes ont montré des effets délétères du B(a)P sur les capacités d'apprentissage (Grova et al., 2007 ; Zhang et al., 2008 ; Li et al., 2011 ; Xia et al., 2011), corrélés à des modifications de l'expression des gènes codant pour les sous-unités du récepteur au glutamate NMDA (respectivement une sous-expression des gènes des sous-unités 2A et 2B au niveau de l'hippocampe chez le jeune rat ; et une sur-expression du gène de la sous-unité 1 accompagnée d'une sous-expression du gène des sous-unités 2A et 2B au niveau de l'hippocampe, de l'hypothalamus et du cervelet chez la souris adulte) (Brown et al., 2007 ; Grova et al., 2007, 2008), et de la potentialisation à long terme, phénomène électrophysiologique qui sous-tend d'apprentissage (Wormley et al., 2004a).

Dans le cas présent, les doses de HAP administrées sont plus faibles et peuvent ne pas induire le même type d'effets que dans d'autres études publiées. Les capacités de mémorisation ne semblent pas affectées à l'âge de 60 jours, mais il aurait pu être intéressant d'évaluer le même type de comportement plus tard, sur des animaux plus âgés, afin de mettre en évidence un éventuel effet d'une exposition précoce à des contaminants environnementaux de type HAP sur la survenue d'altérations cognitives en lien avec des processus neurodégénératifs. En effet, il est admis que des substances environnementales présentes à des stades précoces de développement peuvent influencer la survenue de certaines pathologies comme les maladies d'Alzheimer ou de Parkinson, sans que les mécanismes d'action ne soient clairement identifiés (Landrigan et al., 2005 ; Barlow et al., 2007).

III.3.4. Niveau d'anxiété

Concernant cet aspect du comportement, aucune modification n'a été observée pour les rats exposés uniquement pendant la **gestation**. En revanche, les animaux exposés pendant un temps plus long (**gestation puis allaitement**), ont été **plus anxieux** que les animaux témoins, et cela aux deux doses testées.

Chez ces animaux, l'augmentation d'anxiété a été observée aussi bien par l'étude du comportement individuel, qu'au travers du comportement social des individus. En effet, il est apparu de manière nette que les animaux exposés à la dose 2, ont adopté majoritairement un profil Non Transporteurs, profil dont il a été montré qu'il correspond à des rats ayant un niveau d'anxiété plus élevé (Maitre, 1991). En ce qui concerne les animaux exposés à la dose 1, il est plus difficile de conclure à une absence d'effets, et il convient de pondérer les

résultats obtenus compte tenu du faible effectif testé. En effet, soit l'augmentation du niveau d'anxiété observée dans les tests individuels a été atténué avec le temps pour ces animaux là, et peut alors être considérée comme réversible, soit l'effet est toujours présent, mais n'est pas clairement mis en évidence dans l'expérimentation dite des « rats plongeurs ». Néanmoins, l'étude des variables individuelles (données non montrées) a permis de mettre en évidence que les animaux exposés aux HAP à la dose 1 ont plus de difficulté à voler la nourriture aux animaux Transporteurs, ce qui peut traduire un niveau d'anxiété plus élevé.

L'observation d'une augmentation de l'anxiété confirme les résultats rapportés dans de précédentes études, qui ont montré la capacité des HAP à modifier le niveau d'anxiété des animaux exposés. En effet, Grova et al. (2007 & 2008) ont mis en évidence qu'une injection de B(a)P pendant 10 jours chez la souris adulte a induit une diminution de l'anxiété des animaux dans le LCS, à la dose la plus forte (200 mg/kg/jour). Le même type de résultats a été décrit par Bouayed et al. (2009a), montrant une diminution du niveau d'anxiété chez des souris nées de mères exposées à 2 et 20 mg/kg/jour de B(a)P par voie orale pendant la période d'allaitement.

Par ailleurs, au sein de la cohorte d'enfants exposés en période prénatale à des HAP atmosphériques à New-York et suivie régulièrement par l'équipe de Perera, une augmentation du niveau d'anxiété des enfants exposés aux niveaux de pollution les plus élevés par rapport à ceux exposés à des niveaux plus faibles a été observée à l'âge de 5 ans, et des troubles attentionnels ont été mis en évidence à l'âge de 4 et 7 ans (Perera et al., 2011).

L'ensemble de ces résultats suggère donc que le niveau d'anxiété peut être modulé par une exposition à du B(a)P ou à un mélange de HAP, mais pas nécessairement de la même manière. Plusieurs différences dans les protocoles mis en œuvre peuvent être notées, parmi lesquelles l'utilisation d'un mélange et non d'un composé seul, des doses souvent plus fortes, des voies d'administration et des modèles animaux différents. Ces variations expérimentales pourraient expliquer le fait qu'une exposition aux HAP induit soit une augmentation, soit une diminution du niveau d'anxiété chez les animaux testés, mais souligne la sensibilité particulière de ce registre comportemental suite à une exposition à des HAP.

III.3.5. Effets selon les doses

En ce qui concerne un éventuel effet des doses testées dans ces études, il semble que le niveau d'exposition n'ait pas influencé la sévérité des effets observés. En effet, les résultats observés dans chacune des deux expérimentations ne sont pas différents pour l'une ou l'autre des doses.

III.3.6. Effets selon la période d'exposition

En revanche, il apparaît très clairement que la période pendant laquelle le mélange de HAP est administré à la mère est un facteur de modulation important des effets de ce type d'exposition sur les réponses comportementales des animaux. En effet, si l'ensemble des animaux exposés au mélange de HAP, que ce soit lors de la période pré ou périnatale, est plus actif que les animaux témoins, il n'en est pas de même pour le niveau d'anxiété. Ainsi, aucune modification du niveau d'anxiété n'a été observée pour les animaux exposés exclusivement pendant la gestation, alors que celui-ci augmente nettement pour l'ensemble des animaux exposés pendant la gestation puis l'allaitement. Dès lors, il est très intéressant de considérer non plus la dose, mais la période d'exposition dans la toxicité induite par l'exposition des mères au mélange de HAP. Différentes hypothèses peuvent être émises pour expliquer la différence d'effets obtenus dans l'une ou l'autre des deux expérimentations.

(1) Il est évident que la durée d'exposition est plus longue dans le cas des animaux exposés pendant la gestation puis l'allaitement, ce qui pourrait expliquer l'observation d'effets sur le comportement de ces animaux. Ces effets sont absents pour les animaux exposés uniquement pendant la gestation, durée d'exposition plus courte. Cependant, si l'on calcule les doses cumulées administrées à chaque mère, à l'issue de 21 jours de gestation et/ou 21 d'allaitement, il est clair que les animaux exposés à la dose 2 pendant la gestation uniquement ont reçu presque 57 fois plus de HAP que les animaux exposés à la dose 1 pendant la gestation puis l'allaitement.

Exposition cumulée pendant 21 jours de gestation :

Dose 1 (2 µg/kg/jour) : 42 µg/kg

Dose 2 (200 µg/kg/jour) : 4200 µg/kg

Exposition cumulée pendant 21 jours de gestation puis 21 jours d'allaitement :

Dose 1 (2 µg/kg/jour puis 1,5 µg/kg/jour) : 73,5 µg/kg

Dose 2 (200 µg/kg/jour puis 150 µg/kg/jour) : 7350 µg/kg

Ainsi, les animaux exposés plus longtemps n'ont pas systématiquement reçu plus de HAP que les animaux exposés pendant un temps plus court. L'hypothèse selon laquelle les effets observés sont différents car l'exposition est plus longue apparaît alors peu probable.

(2) Une autre hypothèse peut alors être émise, pour expliquer que le comportement des jeunes exposés pendant la gestation puis l'allaitement soit modifié de manière différente par rapport aux jeunes exposés uniquement pendant la gestation. En effet, les deux types de transfert impliqués lors d'une exposition prénatale ou périnatale, à savoir les transferts placentaires et lactationnel, ne sont pas identiques, et peuvent donc conduire, pour une même exposition de la mère, à des doses disponibles différentes chez le jeune (Barton, 2005). Le transfert des HAP et/ou de leurs métabolites peut alors être plus faible *via* le placenta *versus via* le lait maternel. Le placenta constitue ainsi une barrière qui laisse passer moins de composés vers le fœtus, par rapport au lait maternel, qui lui est considéré comme un bon vecteur de molécules exogènes, de l'organisme de la mère vers celui du jeune. Par ailleurs, les capacités de métabolisation du placenta, associées à une forte activité CYP1A1 tant chez la femme que chez le rat, représentent un moyen efficace pour limiter le transfert de composés tels que les HAP au cours de la gestation (Stejskalova et al., 2011).

Finalement, la plus grande sévérité des effets observés chez les jeunes allaités par des mères encore exposées aux HAP, peut être expliquée par le fait que le fœtus semble mieux protégé que le nouveau né allaité vis-à-vis de molécules toxiques ingérées par la mère.

(3) Enfin, la différence d'effets observées selon la période d'exposition peut aussi être liée au fait que les événements cellulaires qui caractérisent le développement du système nerveux central pendant la gestation ou l'allaitement ne sont pas les mêmes. Il peut alors raisonnablement être envisagé que certains de ces processus soient plus ou moins sensibles à

l'action de molécules neurotoxiques. Ainsi, la différence d'effets observés en terme de comportement anxieux à long terme pourrait résulter du fait que l'exposition pendant l'allaitement a permis de cibler des mécanismes de développement particuliers, tels que la synaptogénèse, qui a lieu exclusivement au cours de la période post natale chez le rat.

La mise en place d'une troisième expérimentation, pendant laquelle les femelles auraient été exposées uniquement pendant l'allaitement aurait permis de valider cette hypothèse. Cependant, l'exposition de femmes allaitantes à des polluants ubiquitaires, à des doses environnementales, en dehors de toute exposition pendant la grossesse, ne semble correspondre à aucune situation réelle, et n'a pas été réalisée.

Dès lors, et au vu des résultats observés dans chacune des deux expérimentations mises en œuvre dans ce travail de thèse, il apparaît que la période d'exposition de l'individu en développement joue un rôle essentiel dans la toxicité de substances environnementales. Néanmoins, il semble que le fait d'exposer pendant la gestation uniquement a amorcé des effets comportementaux, qui se révèlent plus prononcés lorsque l'exposition est prolongée pendant la période d'allaitement. Il s'agit alors très vraisemblablement de la combinaison des trois hypothèses exposées précédemment, à savoir une exposition plus forte et un ciblage de mécanismes développementaux cérébraux précis, comme la synaptogénèse, mais amplifié par le fait que l'exposition a commencé plusieurs semaines auparavant. Il semble alors que l'exposition pendant l'allaitement uniquement n'aurait pas conduit exactement aux mêmes effets que ceux obtenus après une exposition au mélange de HAP pendant la gestation puis l'allaitement.

III.4. Effets d'une exposition périnatale à un mélange de HAP sur le métabolisme cérébral

Les tableaux 126 à 133 résument les résultats obtenus après analyse de l'activité enzymatique de la cytochrome oxydase au niveau de 78 structures cérébrales différentes, sur des cerveaux prélevés à PND10, PND21 et PND60, pour chacune des deux périodes d'exposition au mélange de HAP.

Tableau 126 : Résumé des analyses de l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase au niveau des systèmes sensoriels (1/8)

Structure	Gestation PND10		Gestation PND21		Gestation PND60		Gestation + Allaitement PND10		Gestation + Allaitement PND21		Gestation + Allaitement PND60	
	Dose 1	Dose 2	Dose 1	Dose 2	Dose 1	Dose 2	Dose 1	Dose 2	Dose 1	Dose 2	Dose 1	Dose 2
A) Systèmes sensoriels												
1. Système auditif												
1.1 Cortex auditif	↗ ↗		↘ ↘				↗ ↗		↘ ↘		↗ ↗	
1.2 Colliculus inférieur			↘ ↘						↘ ↘		↗ ↗	
1.3 Olive supérieure							↗ ↗		↗ ↗		↗ ↗	
1.4 Noyau cochléaire							↗ ↗		↗ ↗		↗ ↗	
2. Système visuel												
2.1 Cortex visuel											↗ ↗	
2.2 Colliculus supérieur	↗ ↗						↗ ↗		↗ ↗		↗ ↗	
2.3 Olive inférieure							↗ ↗		↘ ↘		↗ ↗	
3. Système vestibulaire												
3.1 Noyaux vestibulaires	↗ ↗								↘ ↘			

- ↗ : augmentation par rapport aux animaux témoins
 ↘ : diminution par rapport aux animaux témoins

(Abréviations : PND, Post Natal Day)

Tableau 127 : Résumé des analyses de l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase au niveau du système moteur (2/8)

Structure	Gestation PND10		Gestation PND21		Gestation PND60		Gestation + Allaitement PND10		Gestation + Allaitement PND21		Gestation + Allaitement PND60	
	Dose 1	Dose 2	Dose 1	Dose 2	Dose 1	Dose 2	Dose 1	Dose 2	Dose 1	Dose 2	Dose 1	Dose 2
B) Système moteur												
1. Cortex moteur primaire							↘	↘	↘	↘		
2. Cortex sensori-moteur												
3. Noyau caudé	↗	↗			↗			↗				
4. Globus pallidus		↗						↗				↘
5. Noyaux subthalamiques												
6. Substance noire		↗										
7. Noyau rouge									↘	↘	↗	
8. Noyaux cérébelleux												
- Noyau denté												
- Noyau interpositus											↘	
- Noyau fastigial												
9. Cellules cérébelleuses												
Couche granulaire						↘			↗			
Couche de Purkinje										↘		
Couche moléculaire				↘								
10. Nerf trijumeau												

↗ : augmentation par rapport aux animaux témoins
 ↘ : diminution par rapport aux animaux témoins

(Abréviations : PND, Post Natal Day)

Tableau 128 : Résumé des analyses de l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase au niveau du tronc cérébral (3/8)

Structure	Gestation PND10		Gestation PND21		Gestation PND60		Gestation + Allaitement PND10		Gestation + Allaitement PND21		Gestation + Allaitement PND60	
	Dose 1	Dose 2	Dose 1	Dose 2	Dose 1	Dose 2	Dose 1	Dose 2	Dose 1	Dose 2	Dose 1	Dose 2
C) Tronc cérébral												
1. Noyau du raphé												
1.1 Dorsal												
1.2 Médian												
1.3 Locus coeruleus												
1.4 Noyaux gris pontiques												
2. Tractus nerveux												
Formation réticulée mésencéphalique												
3. Matière grise centrale												
3.1 Noyau interpedonculaire												
3.2 Matière grise périaqueductale												
antérieure ventrolatérale												
antérieure latérale												
postérieure dorsolatérale												
postérieure latérale												

↗ : augmentation par rapport aux animaux témoins
 ↘ : diminution par rapport aux animaux témoins

(Abréviations : PND, Post Natal Day)

Tableau 129 : Résumé des analyses de l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase au niveau des cortex cérébraux (4/8)

Structure	Gestation PND10		Gestation PND21		Gestation PND60		Gestation + Allaitement PND10		Gestation + Allaitement PND21		Gestation + Allaitement PND60	
	Dose 1	Dose 2	Dose 1	Dose 2	Dose 1	Dose 2	Dose 1	Dose 2	Dose 1	Dose 2	Dose 1	Dose 2
D) Cortex cérébraux												
1. Cortex frontal												
2. Cortex cingulaire antérieur												
3. Cortex piriforme												
4. Cortex entorhinal												
5. Cortex périorhinal												
6. Cortex pariétal												
7. Cortex temporal												

↗ : augmentation par rapport aux animaux témoins
 ↘ : diminution par rapport aux animaux témoins

(Abréviations : PND, Post Natal Day)

Tableau 130 : Résumé des analyses de l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase au niveau des noyaux thalamiques (5/8)

Structure	Gestation PND10		Gestation PND21		Gestation PND60		Gestation + Allaitement PND10		Gestation + Allaitement PND21		Gestation + Allaitement PND60	
	Dose 1	Dose 2	Dose 1	Dose 2	Dose 1	Dose 2	Dose 1	Dose 2	Dose 1	Dose 2	Dose 1	Dose 2
E) Noyaux thalamiques												
1. Moteur												
1.1 Ventrolateral												
1.2 Ventromédial												
2. Associatif												
2.1 Médiadorsal												
2.2 Noyaux antérieurs												
3. Sensitif												
3.1 Noyaux postérieurs												
3.2 Corps genouillé médian												
3.3 Corps genouillé latéral												
5. Zona incerta												

↗ : augmentation par rapport aux animaux témoins
 ↘ : diminution par rapport aux animaux témoins

(Abréviations : PND, Post Natal Day)

Tableau 131 : Résumé des analyses de l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase au niveau des noyaux hypothalamiques (6/8)

Structure	Gestation PND10		Gestation PND21		Gestation PND60		Gestation + Allaitement PND10		Gestation + Allaitement PND21		Gestation + Allaitement PND60	
	Dose 1	Dose 2	Dose 1	Dose 2	Dose 1	Dose 2	Dose 1	Dose 2	Dose 1	Dose 2	Dose 1	Dose 2
F) Noyaux hypothalamiques												
1. Noyau ventromédian												
2. Noyau dorsomédian												
3. Noyau latéral												
4. Noyau postérieur												
5. Noyau arqué												
6. Corps mamillaires												
7. Noyau préoptique médial												
8. Noyau suprachiasmatique												

↗ : augmentation par rapport aux animaux témoins
 ↘ : diminution par rapport aux animaux témoins

(Abréviations : PND, Post Natal Day)

Tableau 132 : Résumé des analyses de l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase au niveau du système limbique (7/8)

Structure	Gestation PND10		Gestation PND21		Gestation PND60		Gestation + Allaitement PND10		Gestation + Allaitement PND21		Gestation + Allaitement PND60	
	Dose 1	Dose 2	Dose 1	Dose 2	Dose 1	Dose 2	Dose 1	Dose 2	Dose 1	Dose 2	Dose 1	Dose 2
G) Système limbique												
1. Système de récompense												
1.1 Aire tegmentale ventrale												
1.2 Noyau accumbens				↗				↘	↗			
1.3 Septum latéral												↘
1.3 Septum médian												↘
2. Complexe amygdalien												
2.1 Noyau latéral												
2.2 Noyau central												
2.3 Noyau médial												
2.4 Noyau basolatéral												
2.5 Noyau basomédian												
3. Aires hippocampiques												
3.1 CA1												
3.2 CA3												
3.3 Gyrus denté												
3.4 Subiculum												
4. Noyaux de l'habenula												
4.1 Noyau latéral												
4.2 Noyau médian												

↗ : augmentation par rapport aux animaux témoins
 ↘ : diminution par rapport aux animaux témoins

(Abréviations : PND, Post Natal Day)

Tableau 133 : Résumé des analyses de l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase au niveau des zones de substance blanche (8/8)

Structure	Gestation PND10		Gestation PND21		Gestation PND60		Gestation + Allaitement PND10		Gestation + Allaitement PND21		Gestation + Allaitement PND60	
	Dose 1	Dose 2	Dose 1	Dose 2	Dose 1	Dose 2	Dose 1	Dose 2	Dose 1	Dose 2	Dose 1	Dose 2
H) Zone de substance blanche												
1. Capsule interne												
2. Corps calleux												
3. Matière blanche du cervelet												

↗ : augmentation par rapport aux animaux témoins
 ↘ : diminution par rapport aux animaux témoins

(Abréviations : PND, Post Natal Day)

III.4.1. Utilisation de la cytochrome oxydase comme marqueur de l'activité neuronale

Au niveau cérébral, la principale voie énergétique est la phosphorylation oxydative, par la chaîne respiratoire mitochondriale (Maurer et al., 2000), ce qui permet de considérer l'activité régionale de la cytochrome oxydase, une enzyme mitochondriale impliquée dans la synthèse d'ATP via cette chaîne respiratoire, comme un marqueur pertinent du métabolisme énergétique des cellules neuronales (Strazielle et al., 2009). De plus, l'analyse de l'activité de la cytochrome oxydase permet également d'évaluer la sensibilité relative des différents noyaux cérébraux analysés, suite à une exposition précoce au mélange de HAP.

Par ailleurs, il a été démontré que des perturbations de l'activité enzymatique de la cytochrome oxydase peuvent induire des effets fonctionnels importants, à cause de la forte dépendance des neurones pour la phosphorylation oxydative, particulièrement au niveau synaptique, là où l'activité métabolique est forte (Mancuso et al., 2003).

III.4.2. Evolution des perturbations au cours du temps

Dans les études réalisées durant cette thèse, dans le but de déterminer l'impact d'une exposition précoce à un mélange de HAP, *via* l'organisme maternel, sur le métabolisme énergétique des cellules nerveuses, les résultats montrent globalement que peu de structures sont affectées lorsque l'exposition a lieu uniquement pendant la **gestation**, et que leur nombre diminue au fur et à mesure du temps (14 structures affectées à PND10, 9 à PND21 et 3 à PND60).

Par ailleurs, au stade le plus précoce (PND10), des augmentations d'activité enzymatique de cytochrome oxydase sont majoritairement observées. Puis à PND21 et PND60, un nombre sensiblement identique de diminutions ou d'augmentations d'activité enzymatique sont relevées.

En ce qui concerne les animaux exposés pendant la **gestation puis l'allaitement**, un nombre plus élevé de structures est affecté à PND60 par rapport à PND10 (24 zones affectées à PND10, 20 à PND21 et 32 à PND60).

De plus, à PND10, des augmentations d'activité enzymatique sont majoritairement observées, alors qu'aux deux stades ultérieurs, des diminutions d'activité enzymatique sont plus souvent relevées.

Ainsi, comme ce qui a été observé précédemment en terme de développement sensoriel et moteur, puis de comportement à l'âge adulte, il semble d'une part que les effets induits par l'exposition périnatale au mélange de HAP sur le métabolisme énergétique soient limités à court terme, mais plus importants à long terme ; et d'autre part que les effets soient beaucoup plus marqués lorsque l'exposition a eu lieu pendant la gestation puis l'allaitement par rapport à une exposition pendant la gestation uniquement. Cela renforce l'observation déjà faite, concernant l'importance de la période d'exposition dans la toxicité du mélange de HAP testé.

III.4.3. Effets selon les doses

En ce qui concerne les deux doses testées dans chacune des deux expérimentations, tous stades confondus, les animaux exposés uniquement pendant la **gestation**, à la **dose 1**, présentent une variation d'activité enzymatique au niveau de **11 structures**, et au niveau de **20 structures** pour les animaux exposés à la même période à la **dose 2**.

Des variations d'activité enzymatique sont observées, tous stades confondus, au niveau de **48 structures** pour les animaux exposés pendant la **gestation puis l'allaitement** à la **dose 1**, et au niveau de **39 structures** pour les animaux exposés pendant ces mêmes périodes, à la **dose 2**.

Cela montre une fois de plus, que les effets ne sont pas forcément plus prononcés pour les individus exposés à la dose 2, pourtant 100 fois supérieure à la dose 1. Comme ce qui a été décrit précédemment, en termes de développement moteur et sensoriel, puis de comportement à l'âge adulte, l'exposition à l'une ou l'autre des deux doses induit sensiblement le même type de réponses pour les analyses histologiques. Néanmoins, un plus grand nombre de structures présentent des modifications d'activité enzymatique de la cytochrome oxydase pour les animaux exposés pendant la gestation puis l'allaitement, ce qui montre que des niveaux plus faibles de contamination peuvent potentiellement induire plus d'effets sur les individus exposés, et confirme l'intérêt d'étudier à l'heure actuelle la toxicité liée à des doses relativement faibles, représentatives de niveaux de contamination environnementaux.

III.4.4. Structures atteintes

D'une manière générale, les régions présentant des modifications de leur activité métabolique sont intégrés notamment dans les systèmes sensoriels, le système moteur, le système limbique, les noyaux thalamiques et hypothalamiques. Ainsi, une grande diversité de fonctions est potentiellement influencée par l'exposition précoce aux HAP, et les modifications comportementales observées (augmentation des niveaux d'activité et d'anxiété) peuvent alors être corrélées aux atteintes métaboliques.

Les perturbations de l'activité de la cytochrome oxydase semblent limitées à certaines zones cérébrales spécifiques, ce qui suggère une spécificité anatomique. Cela est potentiellement expliqué par une différence intra-régionale de la distribution de cytochromes P450, donc une différence des capacités de métabolisation des HAP selon les structures cérébrales (Nicholson & Renton, 1999), ce qui pourrait avoir comme conséquence une atteinte différente selon la zone considérée. En effet, la vulnérabilité du tissu nerveux à la toxicité induite par une exposition aux HAP dépend des capacités de métabolisation liées aux cytochromes P450 (Shimada et al., 2001).

L'exposition aux HAP pendant la gestation puis l'allaitement a induit à PND60 des modifications du métabolisme de structures cérébrales clés, directement impliquées ou hautement liées à d'autres zones jouant un rôle dans les fonctions cognitives, l'anxiété, la peur, l'identification des émotions et le système de récompense. Cela peut clairement être lié à l'augmentation du niveau d'anxiété observée lors des tests comportementaux à ce stade là. En effet, parmi les structures anatomiques impliquées dans les comportements anxieux, se trouvent notamment les noyaux amygdaliens, le noyau accumbens, l'hippocampe, le noyau hypothalamique ventromédian, la matière grise périacqueductale, les noyaux thalamiques, le cortex préfrontal, et plusieurs noyaux du tronc cérébral (Shin & Liberzon, 2010). Ainsi, à long terme, il semble que l'exposition précoce au mélange de HAP a clairement eu une influence sur le métabolisme énergétique des cellules nerveuses au niveau du système limbique notamment, ce qui se traduit d'un point de vue comportemental par une augmentation d'anxiété dans le LCS, l'Open-field et le test de comportement social.

En revanche, peu de modifications de l'activité enzymatique de la cytochrome oxydase au niveau des structures cérébrales impliquées dans des fonctions telles que l'anxiété, sont relevées pour les animaux exposés uniquement pendant la gestation, animaux qui ne présentaient pas d'augmentation ou de diminution de leur niveau d'anxiété à ce stade, par rapport aux animaux témoins.

III.4.5. Diminutions de l'activité enzymatique de la cytochrome oxydase

Selon la littérature, une **diminution** de l'activité enzymatique de la cytochrome oxydase est associée à un hypométabolisme cellulaire, et peut être considérée comme une phase antérieure à la mort de la cellule (Strazielle et al., 1998). De plus, une diminution de l'activité enzymatique de la cytochrome oxydase peut aussi être liée à un dysfonctionnement mitochondrial, mécanisme impliqué dans la plupart des pathologies neurodégénératives (Sas et al., 2007).

Dans l'organisme, les HAP sont fortement métabolisés en intermédiaires électrophiles réactifs (Knuckles et al., 2001), ce qui induit une surproduction d'espèces réactives de l'oxygène, responsables de l'apparition d'un stress oxydant (Jeng, 2010). Le stress oxydant est défini comme un déséquilibre entre les composés pro-oxydants et les composés anti-oxydants au sein d'une cellule, ce qui peut engendrer des dommages au niveau de l'ADN, des lipides et des protéines (Bae et al., 2010). Le stress oxydant est notamment susceptible d'être un facteur commun à certaines pathologies causant des perturbations au niveau du système nerveux central (Ng et al., 2008).

La génération de métabolites réactifs suite à une exposition aux HAP est un événement important à prendre en compte si l'on considère que les cellules neuronales sont très sensibles au stress oxydant, à cause notamment de leur grande dépendance en la phosphorylation oxydative en tant que source d'énergie, de leurs faibles capacités de défenses anti-oxydantes, et de leur forte composition en lipides (Halliwell, 2006 ; Facecchia et al., 2011).

Par ailleurs, des études précédentes ont permis d'établir de manière claire qu'une exposition aux HAP est positivement corrélée avec de forts niveaux de stress oxydant, et cela

à la fois pour les HAP lourds et pour les HAP légers (Pan et al., 2008 ; Bae et al., 2010 ; Liu et al., 2010 ; Giannapas et al., 2011).

D'autre part, il est bien établi qu'un défaut mitochondrial (montré ici par des diminutions de l'activité enzymatique de la cytochrome oxydase) est la conséquence de l'augmentation du stress oxydant, ce qui conduit ensuite à une production accrue d'espèces réactives de l'oxygène (Facecchia et al., 2011). Les mitochondries produisent des ROS, comme sous-produits involontaires de la réaction permettant la synthèse d'ATP (Zhu et al., 2006), et ont de ce fait déjà un haut niveau de stress oxydant. Les mitochondries sont même le principal site de production de radicaux libres (Raha & Robinson, 2001). La moindre augmentation interne ou externe de ROS cause alors un dysfonctionnement mitochondrial. L'altération de la chaîne de transporteurs d'électron limite alors la production d'ATP, ce qui en retour conduit à une surproduction de ROS, générant un cercle vicieux délétère (Facecchia et al., 2011).

Dès lors, en utilisant une diminution de l'activité de la cytochrome oxydase comme un marqueur de dysfonctionnement des mitochondries, et en considérant ce défaut comme la conséquence de l'augmentation du stress oxydant suite à l'exposition aux HAP, il est alors possible de lier des perturbations du métabolisme cérébral avec certains effets comportementaux, tels qu'une augmentation du niveau d'anxiété des animaux exposés pendant la gestation puis l'allaitement.

En effet, la relation entre le stress oxydant et le comportement anxieux chez le rongeur a déjà été identifiée (Bouayed et al., 2009c). Plusieurs études ont ainsi mis en évidence le rôle potentiel du stress oxydant dans l'induction de forts niveaux d'anxiété chez la souris et le rat (Gingrich, 2005 ; de Oliveira et al., 2007 ; Salim et al., 2011 ; Vollert et al., 2011).

III.4.6. Augmentations de l'activité enzymatique de la cytochrome oxydase

A l'inverse, une **augmentation** de l'activité enzymatique de la cytochrome oxydase peut caractériser un hypermétabolisme énergétique, ce qui serait en fait une compensation des cellules restantes en réponse à une souffrance neuronale dans des régions interconnectées (Wong-Riley, 1989).

Une augmentation de l'activité enzymatique de la cytochrome oxydase peut également être expliquée par l'existence de réponses adaptatives précoces des neurones exposés de manière chronique à de faibles niveaux de stress oxydant (Strazielle et al., 2009). L'activité élevée de la cytochrome oxydase peut alors représenter un signe d'activation cellulaire, précurseur d'un hypométabolisme (Strazielle et al., 2009). Par ailleurs, une forte activité enzymatique de la cytochrome oxydase a déjà été décrite comme étant le résultat d'une altération mitochondriale antérieure, liée à des dommages moléculaires induit par un stress oxydant (Hirai et al., 2001 ; Reddy et al., 2004 ; Zhu et al., 2006).

Les résultats obtenus dans les études présentées ici, concernant les analyses de l'activité de la cytochrome oxydase dans différentes structures cérébrales à différents stades, sont alors cohérents avec l'hypothèse du stress oxydant, déjà décrit comme élément clé dans la toxicité des HAP. Récemment, une exposition prénatale à du B(a)P chez la souris a été corrélée avec une accumulation de métabolites réactifs potentiellement responsables de l'augmentation du stress oxydant au niveau cérébral chez le jeune, et cela en période postnatale, moment clé de la synaptogénèse (Sheng et al., 2010).

De plus, les résultats comportementaux observés à l'âge adulte (i.e. augmentation du niveau d'anxiété) permettent encore de confirmer qu'une augmentation du stress oxydant est impliquée dans les mécanismes de toxicité des HAP.

Plus précisément, l'hypothèse ici est qu'à court terme le stress oxydant consécutif à l'exposition aux HAP tend à induire des augmentations de l'activité enzymatique de la cytochrome oxydase à court terme (PND0 et PND10), de manière à permettre à la cellule de répondre à l'exposition aux HAP et à mettre en place les réactions de métabolisme pour éliminer les molécules toxiques. Finalement le métabolisme des HAP conduit à une augmentation du stress oxydant, qui n'est plus contrôlée, ce qui provoque un défaut des mitochondries, et ainsi une diminution de l'activité enzymatique de la cytochrome oxydase à plus long terme. En fait, l'exposition des HAP place à court terme les neurones en stress fonctionnel, qui induit à son tour des radicaux libres et des dommages oxydatifs. Ceux-ci, dans un cercle vicieux, affectent le métabolisme énergétique, en le diminuant finalement (Blass, 2000).

Dans le cas d'une exposition uniquement pendant la gestation, l'hypothèse peut être émise que l'exposition aux HAP pendant une période plus courte induit un stress oxydant moins important, qui peut rester contrôlé, ce qui explique le faible nombre de structures présentant à long terme des perturbations de l'activité enzymatique de la cytochrome oxydase.

Par ailleurs, l'activité régionale de la cytochrome oxydase est considérée comme un marqueur du fonctionnement cellulaire, dépendant non seulement des capacités intrinsèques de la cellule à lutter contre le stress oxydant, mais également de l'influence forte de réseaux neuronaux, *via* les afférences venant de beaucoup d'autres zones cérébrales (Strazielle et al., 2009). Ainsi les perturbations de l'activité de la cytochrome oxydase à différents stades ne sont pas exclusivement observées dans certaines zones, mais dans un grand nombre de structures interconnectées.

D'une manière générale, même si elle ne permet pas de différencier les neurones et les cellules gliales, l'activité enzymatique de la cytochrome oxydase est utilisée comme marqueur du métabolisme énergétique des neurones dans les structures cérébrales étudiées. Cependant, la question peut être posée quand à la contribution réelle du métabolisme des cellules gliales dans la mesure de l'activité de la cytochrome oxydase. En effet, les études publiées sur l'intérêt de l'utilisation histologique de cette enzyme ne sont pas récentes, et pourraient souffrir, dans ces années là, d'un manque de connaissances relatives à l'importance du rôle joué par les cellules gliales dans le fonctionnement cérébral en général, et dans l'initiation de mécanismes de réaction consécutifs à une exposition à des polluants environnementaux neurotoxiques. Il faudrait, dans des études futures, explorer l'intégrité et le bon fonctionnement des cellules gliales, afin de confirmer ou d'infirmer pour ces cellules le rôle potentiel de cibles de polluants tels que les HAP.

III.5. Effets d'une exposition périnatale à un mélange de HAP sur la présence de HAP et de leurs métabolites au niveau du cerveau des jeunes

III.5.1. Dosage des HAP et de leurs métabolites

Les concentrations cérébrales des 16 HAP composant le mélange, ainsi que de 53 métabolites mono-hydroxylés ont été dosées chez des rats à PND0 et à PND21, c'est-à-dire à la naissance et au sevrage des animaux, dans les deux expérimentations réalisées.

Les 16 molécules mères et 7 métabolites mono-hydroxylés (1-OH-Naphtalène, 2-OH-Naphtalène, 9-OH-Fluorène, 2-OH-Phénanthrène, 3-OH-Phénanthrène, 9-OH-Phénanthrène et 1-OH-Pyrène) ont été détectés dans le cerveau des rats issus des trois groupes expérimentaux aussi bien dans le groupe témoin que dans les groupes exposés aux deux doses de HAP. Il est toutefois à noter que les HAP de haut poids moléculaire (> 4 cycles) ont quand à eux été détectés mais avec des valeurs inférieures à la limite de quantification.

Les résultats obtenus dans ces études montrent qu'il existe bien un transfert de ce type de composés par le placenta à partir de l'organisme maternel (présence des HAP à PND0). La présence de HAP au niveau cérébral à PND21 suggère l'existence d'un transfert de la mère vers le jeune *via* le lait, et/ou une contamination directe du jeune individu par son environnement.

Ainsi, le système nerveux a bien été exposé à des composés de type HAP, et cela à des stades très précoces de développement.

De manière inattendue, l'ensemble des molécules dosées, ainsi que plusieurs métabolites, ont été retrouvés dans le cerveau des animaux témoins, ce qui suggère une contamination environnementale non contrôlée et non négligeable, au regard des faibles doses administrées dans ces études.

La présence de HAP et de métabolites au niveau cérébral a récemment été montrée chez des animaux témoins adultes en dehors de tout protocole expérimental visant à les exposer à des HAP (Grova et al., 2011). Dans cette étude, il est apparu que les concentrations cérébrales de naphtalène, phénanthrène, fluorène, 1-OH-Naphtalène, 2-OH-Naphtalène, 2-OH-Fluorène,

9-OH-Fluorène et 1-OH-Phénanthrène dosés dans le cerveau de rats adultes témoins ne sont pas significativement différents de celles dosées chez des animaux exposés par administration intra-péritonéale d'un mélange équimolaire des 16 mêmes HAP, 3 fois par semaine pendant 4 semaines, aux doses de 0,01, 0.1 et 1 mg/kg de chaque composé, soit une dose totale de HAP administrée de 0.16, 1.6 et 16 mg/kg.

Par ailleurs, Tozuka et al. (2004) ont montré la présence de fluorène, d'anthracène, de fluoranthène, de pyrène, de chrysène et de benzo(a)anthracène au niveau cérébral, chez des rats âgés de 14 jours nés de mères qui avaient été exposées à des fractions de diesel par inhalation, de GD7 à GD20 ; et cela dans des proportions significativement non différentes de celles relevées chez les rats témoins.

Néanmoins, c'est la première fois, en l'état de nos connaissances, que les 16 HAP qui composent le mélange administré aux femelles dans ces expérimentations sont dosés dans une matrice biologique complexe comme le cerveau, et cela à des stades aussi précoces que le jour de la naissance, permettant ainsi de caractériser la contamination des fœtus *in utero*. Cela montre clairement l'importance de l'exposition environnementale y compris pour des animaux de laboratoire, et la difficulté à travailler avec des faibles doses pour les mesures analytiques.

Le profil des molécules observé au niveau cérébral correspond à celui du mélange administré (**Tableau 134**), c'est-à-dire la présence majoritaire des composés suivants : phénanthrène, naphthalène, fluoranthène, acénaphthène, pyrène (72% des HAP totaux au sein du mélange). En revanche, une différence peut être observée en ce qui concerne le fluorène. En effet, ce composé est le plus abondant au niveau cérébral, alors qu'il est en proportion moindre au sein du mélange (2,5%). Le fluorène étant l'un des HAP les plus abondants dans l'air (IARC 2010 ; Li et al., 2010), la pollution atmosphérique pourrait être à l'origine de tout ou partie de cette contamination.

Tableau 134 : Proportions (en %) des 16 HAP au sein du mélange administré aux femelles gestantes et/ou allaitantes, et au niveau des cerveaux des rats témoins et exposés, à PND0 et PND21

Molécule	Proportion au sein du mélange	Gestation PND0			Gestation PND21			Gestation + Allaitement PND0			Gestation + Allaitement PND21		
		Témoin	Dose 1	Dose 2	Témoin	Dose 1	Dose 2	Témoin	Dose 1	Dose 2	Témoin	Dose 1	Dose 2
Phénanthrène	25,0%	2,48	1,86	1,55	1,24	5,00	1,46	2,21	1,95	5,13	2,49	2,75	1,34
Naphthalène	17,0%	17,17	16,44	8,69	17,98	8,49	29,66	12,37	20,05	7,98	17,85	13,71	10,80
Fluoranthène	11,5%	0,44	0,29	0,21	0,22	0,94	0,26	0,38	0,35	0,98	0,47	0,54	0,27
Acénaphthène	10,0%	0,24	0,23	0,16	0,10	0,50	0,15	0,26	0,23	0,50	0,27	0,33	0,15
Pyrène	8,5%	1,30	0,89	0,61	0,67	2,89	0,79	1,20	1,06	2,91	1,43	1,65	0,85
IP	6,0%	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00
Chrysène	4,0%	0,01	0,01	0,00	0,00	0,02	0,00	0,01	0,01	0,02	0,01	0,01	0,00
Anthracène	3,5%	0,08	0,01	0,03	0,03	0,12	0,04	0,05	0,04	0,17	0,06	0,08	0,05
B(a)P	2,5%	0,00	0,01	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,00	0,00
B(b)F	2,5%	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00
Fluorène	2,5%	78,18	80,15	88,66	79,54	81,91	67,61	83,39	76,20	81,97	77,29	80,76	86,45
B(a)A	2,0%	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00
B(k)F	2,0%	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00
Acénaphthylène	1,5%	0,07	0,10	0,07	0,19	0,09	0,02	0,11	0,09	0,26	0,11	0,14	0,07
B(ghi)P	1,0%	0,01	0,01	0,00	0,01	0,02	0,01	0,01	0,01	0,02	0,01	0,01	0,01
DB(a,h)A	0,5%	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00

Par ailleurs, l'analyse par le LABERCA, de la nourriture donnée aux animaux (ingrédients utilisés pour la fabrication de la matrice contaminée et alimentation standard des animaux) a montré la présence de certains composés (**Tableau 135**) tels que le pyrène, le phénanthrène et le fluoranthène, suggérant aussi une source de contamination potentielle.

Tableau 135 : Concentrations en HAP dans le sirop de grenadine, l'huile Isio 4 et l'alimentation des rats utilisés pour administrer le mélange de HAP aux animaux (concentrations en $\mu\text{g}/\text{kg}$ ou $\mu\text{g}/\text{l}$)

HAP	Sirop de Grenadine Carrefour	Huile ISIO 4 LESIEUR	Alimentation rats Harlan
Benzo(a)pyrène	< 0,01	< 0,10	0,11
Benzo(a)anthracène	< 0,01	< 0,10	0,18
Chrysène	< 0,01	0,19	0,46
Benzo(b)fluoranthène	< 0,01	< 0,10	0,16
Dibenzo(a,h)anthracène	< 0,01	< 0,10	< 0,10
Indéno(1,2,3,c-d)pyrène	< 0,01	< 0,10	0,11
Benzo(k)fluoranthène	< 0,01	< 0,10	< 0,10
Benzo(g,h,i)pérylène	< 0,01	< 0,05	0,24
Fluoranthène	< 0,04	< 0,49	1,79
Anthracène	< 0,08	< 0,97	< 0,95
Pyrène	< 0,06	< 0,78	0,96
Phénanthrène	< 0,24	< 2,91	5,78
Benzo(j)fluoranthène	< 0,01	< 0,10	< 0,10
Cyclopenta(c,d)pyrène	< 0,01	< 0,05	< 0,10
Dibenzo(a,l)pyrène	< 0,01	< 0,15	< 0,14
Dibenzo(a,e)pyrène	< 0,01	< 0,15	< 0,14
Dibenzo(a,i)pyrène	< 0,01	< 0,15	< 0,14
Dibenzo(a,h)pyrène	< 0,01	< 0,15	< 0,14
5-Méthylchrysène	< 0,02	< 0,19	< 0,10
Benzo(c)fluorène	< 0,04	< 0,49	0,57

Ces résultats montrent donc clairement l'existence des contaminants de type HAP dans l'environnement, ce qui crée un bruit de fond environnemental chez les animaux témoins. Une telle situation souligne ainsi la difficulté de réaliser des modèles expérimentaux pour lesquels les niveaux d'exposition modélisent des niveaux d'exposition réalistes pour l'Homme, et sont ainsi faibles, à la limite du bruit de fond environnemental observé.

Néanmoins, malgré les difficultés et les questions soulevées par la présence d'un bruit de fond environnemental chez les animaux témoins, il semble tout à fait pertinent d'étudier les effets neurotoxiques induits par une exposition précoce à des faibles doses de polluants ; et

cela au regard des résultats obtenus lors des études comportementales et histologiques, qui ont mis en évidence à l'âge adulte des modifications significatives de l'activité, de l'anxiété et de l'activité enzymatique de la cytochrome oxydase au niveau de différentes structures cérébrales, pour les animaux exposés au mélange de HAP par rapport aux animaux témoins.

La présence de molécules mères dans l'organisme d'animaux témoins, y compris dès la naissance, dans ces études, n'est sans doute pas un cas isolé, et constitue dès lors une réflexion importante à mener, dans le cadre plus large d'études relevant du domaine de la toxicologie environnementale.

Par ailleurs, les résultats concernant les taux de HAP présents à PND21 par rapport à PND0 montrent qu'il n'y a pas davantage de molécules mères au niveau du cerveau des rats lorsque l'exposition est prolongée pendant les 21 jours d'allaitement. Cette observation peut être expliquée de plusieurs manières :

- le transfert de molécules mères *via* le lait maternel est minime,
- la métabolisation des HAP administrés par l'organisme maternel est importante,
- le métabolisme du jeune devenant de plus en plus mature, les molécules mères transférées sont rapidement biotransformées.

Peu de données existent sur la biodisponibilité des HAP chez le rongeur, notamment dans le cas particulier d'un transfert entre la mère et le jeune. D'après Ramesh et al. (2001), l'élimination du B(a)P est rapide lorsqu'il est administré à faibles doses. Dans cette étude, il est reporté que 70% d'une dose de 100 mg/kg administré par voie orale (gavage) à des rats adultes sont retrouvés dans le plasma 8h après l'administration, puis que ce pourcentage diminue et devient proche de 0 après 72h. Par ailleurs, les éventuels effets neurotoxiques observés chez l'animal exposé à ce composé semblent liés au type de métabolites dosés (diols *versus* phénols), le ratio diol/phénols étant modifié au cours du temps après l'exposition. En effet, la quantité de phénols tend à augmenter au cours du temps suite à une exposition unique à du B(a)P chez le rongeur, alors que la quantité de diols, métabolites prédominants dans les premiers moments, diminue et est corrélée avec les effets observés, chez l'animal directement exposé (Saunders et al., 2002, 2006), ainsi que chez l'animal exposé *via* l'organisme maternel en période prénatale (Wu et al., 2003 ; Brown et al., 2007 ; McCallister et al., 2008 ; Sheng et al., 2010).

III.5.2. Présence des molécules dosées et effets neurotoxiques observés

A PND0 et PND21, les 16 molécules mères et 7 de leurs métabolites sont retrouvés au niveau cérébral, tant chez les rats témoins que chez les rats exposés aux deux doses du mélange de HAP pendant la gestation et/ou l'allaitement.

Par ailleurs, pendant les trois premières semaines de vie postnatale des animaux, aucune perturbation du développement neuromoteur ou sensoriel en lien avec l'exposition de la mère aux HAP n'a été mise en évidence.

Néanmoins, à l'âge adulte des animaux, des modifications du comportement, relatives à leur niveau d'activité et d'anxiété, ainsi que des modifications de l'activité de la cytochrome oxydase, ont été relevées pour les animaux exposés de GD1 à PND21, montrant que l'exposition pré et postnatale au mélange de HAP a été à même d'induire une neurotoxicité à long terme, y compris à la plus faible dose étudiée et ce plus de 40 jours après la fin de l'exposition.

L'ensemble des données tend alors à montrer que ce n'est pas uniquement la présence de molécules mères à court terme au niveau du cerveau des jeunes qui serait directement responsable de la toxicité observée à long terme.

Dès lors, il convient de se demander comment l'exposition à de faibles doses de HAP, qui conduit à des concentrations cérébrales chez le raton proches de celles observées chez les témoins en dehors de tout protocole de contamination à PND0 et PND21, est à même d'induire à long terme des effets neurotoxiques prononcés.

Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour répondre à cette question, mais il faut noter qu'il n'existe pas à l'heure actuelle de publications concernant la toxicocinétique d'un mélange de HAP, qui plus est chez l'animal en développement. De plus, il est également important de considérer que la voie de métabolisation de chaque molécule au sein de l'organisme maternel et/ou de celui du jeune, peut être impactée par celle des autres composés, et que les métabolites des différentes molécules mères peuvent interagir les uns avec les autres, ce qui tend à conférer à un mélange de substances au sein de l'organisme une dynamique tout à fait particulière, dont les mécanismes ne sont pas encore clairement décrits dans la littérature.

Les résultats disponibles dans la littérature ont été obtenus suite à l'administration de B(a)P seul, ce qui constitue une limite importante à l'utilisation de ces éléments en tant que références pour ce travail.

1) Les doses faibles de HAP administrées à la mère sont rapidement métabolisées par l'organisme maternel, et le transfert vers l'organisme du jeune concerne essentiellement des métabolites. On aurait ainsi un rôle de modulation de la toxicité par l'organisme maternel. Cette hypothèse semble difficile à confirmer ou infirmer en l'absence de données comparant des taux de HAP chez le jeune suite à une exposition directe *versus* une exposition par la mère.

2) La toxicité n'est pas liée directement aux composés parents, mais à la présence de certains métabolites, types époxydes et dihydrodiols époxydes, qui ne sont pas tous dosés dans ces études. En effet, il semble que le type de métabolites considéré joue un rôle important dans les effets neurotoxiques observés, plus important que la concentration même des métabolites (Saunders et al., 2002). Chez le rongeur exposé en période prénatale à du B(a)P seul, à des doses comprises entre 25 et 600 µg/kg, la prédominance des métabolites de type diols chez le jeune est observée pendant les cinq ou dix premiers jours de vie postnatale, puis la concentration de ces composés diminue, au profit des composés de type monohydroxylés (Brown et al., 2007 ; McCallister et al., 2008 ; Sheng et al., 2010).

La formation des métabolites de type diols en période postnatale précoce, notamment pendant la synaptogénèse, est intéressante dans ces études, car ces derniers peuvent être convertis en dihydrodiols époxydes très réactifs. En revanche, la présence de composés monohydroxylés à partir de PND10 indique que des mécanismes de détoxification sont actifs à des stades plus tardifs.

3) Le placenta possède lui-même des capacités de métabolisation, notamment par la présence et l'activité des enzymes CYP1A1, ce qui diminue le transfert des molécules mères vers le jeune, au profit de celui des métabolites (Stejskalova et al., 2011 ; Saghir et al., 2012).

4) Les capacités de métabolisation du jeune sont immatures pendant la gestation, mais se développent rapidement dans les premiers jours et premières semaines après la naissance.

Certains auteurs évoquent néanmoins l'idée d'un métabolisme hépatique fœtal actif, capable de catalyser précocement des réactions de biotransformation de composés tels que le B(a)P, suite à une exposition de la femelle gestante (Pelkonen, 1980a ; Dorman et al., 2001 ; Wu et al., 2003). Par ailleurs, chez le rongeur, même si les enzymes CYP1A1 extra-hépatiques sont exprimées tôt dans le développement au niveau de l'intestin, des reins, des poumons, à partir de GD15, la plupart des enzymes du métabolisme des xénobiotiques (CYP2B, 2C, 3A, ...) sont exprimés au moment de la naissance, avec des pics d'activité vers PND15 ou PND21 (Rich & Boobis, 1997 ; de Zwart et al., 2008 ; Saghir et al., 2012).

Dès lors, la plus grande toxicité observée à long terme suite à une exposition pré et post-natale au mélange de HAP serait la conséquence de la plus forte métabolisation des composés parents par l'organisme du jeune lui-même dans les tous premiers jours après la naissance, en métabolites réactifs tels que les diols, ce qui, en favorisant un environnement pro-oxydant, induirait ainsi à long terme des effets toxiques plus marqués.

IV. Facteurs de modulation de la toxicité observée

IV.1. Effets doses-réponses

« *Alle Ding sind Gift, und nichts ohn Gift ; allein die Dosis macht, da sein Ding Kein Gift ist.* »

« Toutes les choses sont poison, et rien n'est sans poison ; seule la dose fait qu'une chose n'est pas un poison. »

Ce concept est attribué au médecin et alchimiste suisse Paracelse dès le 16^{ème} siècle et est aujourd'hui encore l'un des éléments clés de l'approche toxicologique. Il apparaît ainsi depuis plusieurs siècles que la toxicité d'une substance dépend avant tout de la dose à laquelle elle est administrée à un individu.

D'une manière générale, en toxicologie, les composés dont la toxicité est étudiée chez l'animal sont souvent administrés en quantités importantes, correspondant à des doses fortes, non représentatives d'une exposition environnementale, sauf dans le cas particulier d'accidents industriels par exemple. La relation logique entre une dose plus forte et un effet plus important a longtemps été la règle, et les effets des faibles doses ne sont que peu pris en compte.

Depuis quelques années pourtant, certains toxicologues s'intéressent aux effets d'exposition de l'organisme à de faibles doses, comparables à des niveaux d'exposition environnementale, sur des périodes plus longues ou plus sensibles du développement de l'individu. Étonnamment, les effets aux faibles doses ne sont pas systématiquement moins sévères que les effets de fortes doses, et la détermination d'une valeur de NOAEL (*Non Observable Adverse Effect Level*) ne préjuge en rien des effets pouvant être induits à des doses inférieures à ce dernier. L'évaluation de la toxicité des substances et de leurs risques pour la santé des individus est ainsi compliquée par des relations dose-réponse non monotones, en particulier dans la zone des faibles doses. Il devient alors nécessaire de s'intéresser entre autre aux effets des substances à des niveaux d'exposition qui correspondent aux niveaux de contamination mesurés (Belzunces & Rousselle, 2011).

Depuis 10 ou 15 ans, le concept d'**Hormésis** a été défini en toxicologie et pharmacologie. Il décrit le fait que des faibles doses et des fortes doses d'une même molécule

peuvent induire des effets très différents, voire opposés, sur les mêmes variables (Calabrese & Blain, 2011). Les observations de ce type de résultats dans des études de toxicologie sont croissantes ; pour l'année 2010 uniquement, plus de 3269 articles traitent ainsi de ce sujet, alors que pour la décennie des années 1980, une dizaine de citations seulement par an y font référence (Calabrese & Blain, 2011). L'hormésis est un phénomène indépendant du modèle biologique, du type de variables mesurées, de la famille ou du type d'agent testé, des variations interindividuelles, et de l'espèce, et est également valable pour l'étude des mélanges de composés (Calabrese, 2010). Il nécessite néanmoins l'utilisation d'un nombre important de doses différentes. D'un point de vue mécanistique ce concept peut être expliqué entre autre par une différence d'affinité d'une molécule pour deux types de récepteurs distincts (Cook & Calabrese, 2007). L'hormésis peut impliquer la mise en place de mécanismes d'adaptations de l'organisme, et peut alors n'être observé qu'à certains moments pendant ou après l'exposition (Calabrese & Blain, 2011).

Dans les études présentées ici, pour chacune des deux expérimentations, les effets comportementaux observés à l'âge adulte notamment sont très similaires pour les animaux exposés à la dose 1 ou à la dose 2 de HAP. Les analyses histologiques montrent quand à elles que les effets observés à la dose 1 sont significatifs pour un plus grand nombre de structures que les effets observés à la dose 2, pour les animaux nés de mères exposées pendant la gestation et l'allaitement ; ce qui met en évidence le fait que les effets peuvent être plus marqués alors même que la dose administrée est plus faible.

L'absence d'effet de type « dose-réponse » est tout d'abord assez surprenante, puisqu'il y a un facteur 100 entre les deux doses. Néanmoins, les données analytiques disponibles dans ces études ne montrent pas de différence de concentrations de HAP entre les animaux exposés aux deux doses.

Par ailleurs, il a été montré qu'une exposition à du B(a)P chez la souris gestante pendant trois jours consécutifs, ne résulte pas en une concentration plus élevée de molécule mère ou de métabolites chez le jeune par rapport à des animaux nés de mères exposées un seul jour, ce qui est probablement dû à un taux d'élimination de l'organisme maternel plus rapide lorsque l'administration est répétée (Neubert & Tapken, 1988). Le métabolisme de la mère peut en effet jouer un rôle important, et moduler la dose finalement reçue par le jeune, à partir de la dose administrée à la mère, *via* son alimentation. Ainsi, les effets délétères ne sont pas forcément plus importants pour les jeunes nés de mères exposées à des doses plus fortes de

HAP, par rapport à des doses plus faibles. Cela renforce bien l'idée qu'il est important d'étudier la toxicité de doses plus faibles, et de modéliser des niveaux d'exposition environnementale, en particulier dans le cas d'expositions précoces, pendant le développement du jeune.

Dans le cas de la neurotoxicité des HAP, plusieurs études montrent qu'il y a soit une **relation linéaire** entre la dose administrée, les concentrations de molécules mères ou de métabolites dosées, et les effets induits ; ou au contraire des modifications de différents registres comportementaux selon la dose administrée, attestant de **relations non linéaires**, plus qualitatives que quantitatives.

➤ Ainsi, en 2001, Saunders et al. ont observé que les plus fortes doses de B(a)P administrées à des rats adultes (200 mg/kg) induisent un pic d'effets comportementaux plus tôt, qui persistent plus longtemps que dans le cas de faibles doses, car le taux d'élimination du B(a)P est plus lent à ces doses là. Par ailleurs, selon Saunders et al. (2006), le niveau d'espèces réactives de l'oxygène produites, en lien avec le métabolisme des HAP, est dépendant de la dose d'exposition.

Enfin, en 2009, Bouayed et al. ont mis en évidence que l'agressivité de mâles exposés à du B(a)P augmente de manière dose-dépendante (Bouayed et al., 2009b).

➤ En revanche, les résultats d'une étude réalisée chez la souris, suite à une exposition de la mère à du B(a)P pendant la période d'allaitement, montrent qu'il y a une modification du niveau d'anxiété pour les animaux nés de mères exposées à 2 et 20 mg/kg, et un effet sur le pourcentage d'alternance spontanée à 2 mg/kg (Bouayed et al., 2009a).

Par ailleurs, les résultats d'une autre étude également réalisée sur la souris montrent une toxicité bimodale du B(a)P et de ses métabolites. En effet, aux doses les plus faibles (0,02 et 0,2 mg/kg) une augmentation du poids et des effets délétères sur la mémoire sont observés, alors qu'à 200 mg/kg, le poids diminue et les animaux exposés sont moins anxieux que les animaux témoins (Grova et al., 2008).

Les résultats de ces deux études mettent en évidence le fait que la sensibilité des rongeurs au B(a)P, marquée par des différences de modifications du comportement, dépend notamment de la dose choisie, de la durée d'exposition, et de la voie d'administration (Grova et al., 2007 ; Bouayed et al., 2009a).

IV.2. Effets des mélanges

IV.2.1. Généralités sur l'évaluation des mélanges

Un grand nombre de substances chimiques est synthétisé par l'Homme puis libéré dans l'environnement. L'évaluation de la toxicité des substances destinées à être commercialisées, si elle représente une étape nécessaire et obligatoire d'un point de vue réglementaire, n'est réalisée que sur des composés isolés, généralement à forte dose. Or, dans la réalité, les organismes vivants sont exposés simultanément à un grand nombre de substances différentes en mélanges, provenant de sources multiples, et le plus souvent à faibles doses (Carpenter et al., 2002).

Selon la définition de l'US EPA (1987), un **mélange** est défini comme toute combinaison d'au moins 2 substances chimiques, quelle que soit leur source d'émissions. Le mélange utilisé dans les études de ce travail de thèse correspond à la définition d'un **mélange simple** (US-EPA, 1987). En effet, un nombre restreint de composés est présent au sein du mélange, tous les composés sont connus et font partie de la même famille, et la concentration de chacun est définie de manière précise.

A l'heure actuelle, les effets des associations d'agents potentiellement toxiques ne sont que très peu étudiés, en dépit d'une demande croissante de données sur la toxicité des mélanges de substances chimiques (appelée « effet cocktail »). Le manque d'études sur la toxicité de mélanges de composés provient notamment du fait qu'il est souvent plus simple d'étudier un seul composé à la fois, et d'obtenir des effets de type dose-réponse ; qu'il existe une infinité de combinaisons possibles entre molécules de la même famille ou de plusieurs familles chimiques différentes, ainsi qu'une très grande variété de possibilités de doses, de périodes et de durées et de voies d'exposition (Carpenter et al., 2002).

Quand l'évaluation des risques relatifs à un mélange de composés est requise, les données connues sur la toxicité d'un seul de ces composés peuvent être utilisées pour extrapoler la toxicité du mélange. Les effets potentiels des co-contaminants au sein du mélange sont alors ignorés, et l'évaluation des risques basée sur cette méthode semble

inadéquate (Singh et al., 2008b). En effet, les mélanges peuvent avoir des effets très complexes qui dépendent principalement de leur composition (Adam et al., 2009), et la toxicité d'un mélange peut être plus faible, équivalente, ou plus forte que la somme de la toxicité de chaque composé ; elle est alors difficilement prévisible (Carpenter et al., 2002 ; Mumtaz et al., 2007).

Six types d'interactions différentes entre les composés d'un mélange ont été identifiés (ATSDR, 2004 ; Duffus et al., 2009 ; US EPA, 2000) :

La *synergie* : les effets combinés des différentes molécules sont plus forts que la somme de la toxicité de chaque composé.

La *potentialisation* : une substance n'a pas d'effet quand elle est seule, mais rend un mélange plus toxique quand elle y est ajoutée.

L'*antagonisme* : les effets combinés des différentes molécules sont moins forts que les effets de chaque molécule isolée.

L'*inhibition* : une substance n'a pas d'effet quand elle est seule, mais rend un mélange moins toxique quand elle y est ajoutée.

Le *masquage* : les composés d'un mélange produisent les mêmes effets sur le même site, donc les effets du mélange sont moins forts que les effets de chaque composé.

L'*absence d'influence* : une substance n'a pas d'effet quand elle est seule, et ne modifie pas la toxicité d'un mélange quand elle y est ajoutée.

En outre, dans le domaine des faibles doses, certaines expositions peuvent se produire à des niveaux bien inférieurs à la dose sans effet, et des associations de substances peuvent induire des effets délétères avec des agents non toxiques. Les cas de potentialisation notamment peuvent être considérés comme préoccupants car ils ne sont absolument pas prévisibles, du fait qu'ils sont induits avec des molécules non toxiques lorsqu'elles sont administrées de manière isolée ou à des niveaux d'exposition non toxiques (Belzunces & Rousselle, 2011).

Malgré les efforts entrepris, il semble qu'il ne sera jamais possible de réunir toutes les données toxicologiques sur tous les mélanges auxquels l'Homme est exposé. Les efforts doivent alors se concentrer sur les évaluations précises de l'exposition.

IV.2.2. Connaissances sur les mélanges de HAP

En ce qui concerne plus particulièrement les HAP, il y a dans la littérature un réel manque de données concernant la toxicité de mélanges de HAP (Ramesh et al., 2004). La détermination de TEF (*Toxic Equivalent Factors*), pour lesquels la toxicité de chaque composé est évalué par rapport à celle du B(a)P, présente certaines limites, notamment celles d'être définis en termes d'effets cancérigènes, pour une espèce animale donnée, de ne pas prendre en compte les interactions entre les composés au sein du mélange, et de considérer que les HAP agissent exclusivement *via* le récepteur Ah (Ramesh et al., 2004).

Par ailleurs, il a été montré que certains HAP se comportent différemment s'ils sont administrés seuls ou en combinaisons avec d'autres (Singh et al., 2008a). Ainsi, des HAP non cancérigènes ou faiblement cancérigènes sont capables de modifier l'activation métabolique et l'induction d'effets biologiques de mélanges complexes de HAP. Par exemple, le fluoranthène, composé qui n'est pas classé comme cancérigène, amplifie les effets cancérigènes du B(a)P, lorsqu'ils sont administrés ensemble chez l'animal (Singh et al., 2008a).

De plus, des études réalisées *in vitro* sur des cellules neuronales en cultures, montrent que la concentration minimale requise pour induire une cytotoxicité diminue quand un mélange chrysène/B(a)P est testé *versus* du B(a)P seul (Tang et al., 2003).

La principale différence entre le travail présenté ici, qui décrit entre autre une augmentation du niveau d'anxiété des animaux exposés au mélange de 16 HAP aux deux doses choisies, et des études antérieures est l'utilisation d'un mélange de HAP, administré à faibles doses, pendant une durée longue, à la place de doses relativement fortes, administrées parfois en une seule fois. Les études menées chez l'animal jusqu'à présent ont en effet montré une modulation de l'activité locomotrice et des capacités d'apprentissage, et une diminution de l'anxiété, suite à une exposition directe de l'individu, ou suite à une exposition précoce *via* l'organisme maternel, mais n'ont permis d'évaluer la toxicité que d'un seul composé à la fois, généralement le B(a)P ou le fluoranthène (Saunders et al., 2003 ; Grova et al., 2007, 2008).

IV.3. Périodes d'exposition

IV.3.1. Hypothèse d'origines développementales de troubles observés chez l'adulte

Depuis plus de 20 ans, des scientifiques ont mis en évidence le fait que des pathologies de l'adulte, telles que certains cancers, des maladies cardio-vasculaires, ou des troubles comportementaux, peuvent avoir des origines développementales (Grandjean, 2008 ; Vaiserman, 2011). Cette hypothèse a été émise au début des années 1990 par David Barker, professeur à l'université de Southampton, sous le nom de *Developmental Origins of Health And Diseases* (DOHAD).

Parmi les désordres neurologiques d'origine développementale dans lesquels le rôle de molécules chimiques présentes tôt dans l'environnement de l'individu est mis en évidence, sont cités l'hyperactivité et les troubles attentionnels, l'autisme, la schizophrénie, les troubles bipolaires, le syndrome de Tourette, les troubles obsessionnels-compulsifs, et les troubles anxieux (Gross & Hen, 2004 ; Braun et al., 2006 ; Connors et al., 2008). De plus, il est suggéré que des maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer ou de Parkinson résultent de la combinaison de facteurs génétiques et de facteurs environnementaux présents durant des phases de développement précoces (Calne et al., 1986 ; Landrigan et al., 2005).

D'une manière générale, quatre possibilités existent quand à la toxicité suite à une exposition survenant au cours des phases précoces de développement :

- le premier cas est celui pour lequel aucune toxicité n'est observée, ni à court terme, ni à long terme.
- Le deuxième cas est celui pour lequel des effets sont observés à court terme uniquement, ce qui correspond à une atteinte précoce mais qui semble réversible.
- Le troisième cas est celui pour lequel des effets de l'exposition sont observés uniquement à long terme, ce qui correspond à une toxicité dite retardée.
- Le quatrième et dernier cas est celui pour lequel des effets neurotoxiques sont observés à court et à long terme, ce qui permet de considérer que l'atteinte est précoce, et qu'elle perdure.

Dans le cas des résultats obtenus ici, il semble que la toxicité à court terme soit restreinte, mais qu'elle soit en revanche plus prononcée à long terme ; suggérant donc un cas de toxicité retardée.

L'existence de mécanismes compensatoires précoces, liés à la plasticité remarquable du cerveau en développement par rapport au cerveau adulte, peut expliquer l'absence de toxicité observée dans les premières semaines de vie post-natale. En effet, la très grande plasticité du système nerveux central en développement, absolument nécessaire à la maturation cérébrale, peut permettre de contourner les effets d'un environnement prénatal potentiellement toxique. Cependant, cette grande plasticité représente aussi une fragilité du système nerveux immature. En effet, les réseaux neuronaux sont tellement plastiques, qu'ils en deviennent extrêmement sensibles à l'action de substances neurotoxiques (Connors et al., 2008).

IV.3.2. Anxiété

L'anxiété est une réaction normale, qui permet l'adaptation de l'individu à son environnement (Gross & Hen, 2004), et complexe, car elle implique de vastes réseaux neuronaux (Furmark, 2009). Elle s'accompagne de réponses comportementales et physiologiques caractérisées, et devient pathologique lorsqu'elle est excessive ou inappropriée (Gross & Hen, 2004).

Le contrôle neuronal de l'anxiété est modulé par différentes voies, anatomiquement distinctes, qui influencent des réactions de défense spécifiques (Treit & Menard, 1997).

Les structures cérébrales responsables de la modulation de l'anxiété forment un réseau complexe, dans lequel chaque zone est spécialisée dans un aspect précis de l'anxiété (Treit & Menard, 1997). Le rôle de chaque zone est bien conservé entre les différentes espèces (Shin & Liberzon, 2010).

Les troubles de l'anxiété chez l'Homme sont diverses : attaques de panique, agoraphobie, troubles obsessionnels-compulsifs, anxiété généralisée, phobie spécifique, phobie sociale, stress post-traumatique. Les troubles anxieux constituent les troubles psychiatriques les plus fréquents, ils touchaient 28,8% de la population en 2005 (Kessler et al., 2005).

IV.3.3. Origines développementale de l'anxiété

Il a été montré dans plusieurs études réalisées chez l'Homme, le singe et le rongeur, que l'anxiété observée à l'âge adulte peut résulter de la combinaison de facteurs génétiques et de facteurs environnementaux présents très précocement dans la vie de l'individu. Un nombre croissant de données existe sur les mécanismes moléculaires par lesquels l'environnement du jeune peut remodeler de manière durable les circuits cérébraux impliqués dans l'anxiété, et il semble que la présence de facteurs environnementaux à des stades très précoces du développement du système nerveux central puisse ainsi influencer les mécanismes de régulation du niveau d'anxiété à l'âge adulte (Gross & Hen, 2004).

Par ailleurs, des études réalisées chez la souris montrent que les trois premières semaines de vie (période de développement des synapses), représentent une période cruciale pour l'ajustement des circuits de l'anxiété en réponse à des stimuli extérieurs. En effet, les circuits neuronaux impliqués dans les comportements liés à l'anxiété sont particulièrement vulnérables pendant le développement, et plus encore au moment où les connexions synaptiques sont élaborées et affinées, et que le cerveau présente un haut degré de plasticité (Gross & Hen, 2004).

IV.3.4. Conséquences à long terme d'une exposition précoce à un mélange de 16 HAP

Dans les études présentées dans ce manuscrit de thèse, l'exposition des femelles au mélange de HAP a induit, chez les jeunes nés de mères exposées, des modifications à l'âge adulte dans deux registres comportementaux spécifiques. Ces changements ne se manifestent qu'à long terme, plusieurs semaines ou mois après la fin de l'exposition. La modification la plus importante, qui semble très dépendante de la période d'exposition, est l'augmentation du niveau d'anxiété pour les animaux exposés pendant la gestation puis l'allaitement. Cette augmentation du niveau d'anxiété est corrélée avec des diminutions de l'activité enzymatique de la cytochrome oxydase, marqueur du métabolisme énergétique neuronal, en particulier au niveau des structures composant le système limbique, pour ces mêmes animaux. Ces modifications comportementales et métaboliques ne sont en revanche pas observées pour les animaux nés de mères exposées uniquement pendant la gestation.

Ainsi, les effets observés sont différents selon la période d'exposition, malgré le fait que les animaux aient été exposés au même mélange de HAP, dans les mêmes proportions et aux mêmes doses. Les effets obtenus paraissent donc varier particulièrement en fonction des événements neuronaux se déroulant au moment de l'exposition. La période d'exposition, est donc un facteur déterminant pour la sévérité des effets observés à long terme chez les animaux exposés précocement (Frieder et al., 1984 ; Bjerke and Peterson, 1994).

IV.3.5. Contribution relative de chacune des deux périodes dans les effets observés

Les résultats obtenus montrent très clairement que le fait d'avoir exposé les animaux au mélange de HAP pendant la période d'allaitement, *via* l'alimentation des femelles allaitantes, a modifié à l'âge adulte le niveau d'anxiété des jeunes, de manière corrélée avec les modifications d'activité de la cytochrome oxydase, observées au niveau du système limbique en particulier.

La sévérité des effets observés lorsque l'exposition aux HAP est poursuivie pendant la période d'allaitement, par rapport à une exposition réalisée uniquement pendant la gestation, peut provenir d'une différence qualitative et/ou quantitative du taux de transfert de ces molécules et de leurs métabolites entre les deux périodes. En effet, il est raisonnable de penser que le transfert de HAP est plus important *via* le lait maternel que par voie placentaire. Les jeunes exposés uniquement pendant la gestation seraient alors moins exposés aux HAP, par rapport aux animaux exposés en plus *via* le lait maternel.

Ainsi, l'alimentation de la mère, qu'elle soit contaminée ou non, pendant la période d'allaitement a un impact fort sur le niveau de molécules toxiques dans le lait, impact plus fort que l'exposition antérieure, *in utero*. L'absence d'exposition de la mère pendant l'allaitement peut alors significativement réduire l'exposition du nouveau né, et les éventuels effets toxiques des substances (Hallén et al., 1995).

Par ailleurs, les capacités de métabolisation sont différentes chez le fœtus et chez le nouveau-né, bien qu'elles soient relativement faibles dans les deux cas. Néanmoins, de telles différences pourraient expliquer en partie les changements dans les effets observés. La naissance provoque en effet beaucoup de changements physiologiques chez le jeune, souvent similaires entre différentes espèces, parmi lesquels le développement des enzymes impliquées

dans le métabolisme des xénobiotiques, dont les cytochromes P450 2E1 (Barton, 2005). Une induction du métabolisme plus importante après la naissance pourrait ainsi conduire à une toxicité plus forte pour les jeunes.

Par ailleurs, les mécanismes de développement du système nerveux central ne sont pas les mêmes en périodes postnatale ou prénatale. Ainsi, chez le rat, l'organogénèse et l'histogénèse du cerveau sont terminées en période prénatale, et la neurogénèse et la migration neuronale sont achevées vers PND10. En revanche, la synaptogénèse, la gliogénèse et la myélinisation continuent en période post-natale, et ne sont finies qu'à la maturité de l'animal, vers PND35-45 (Rice & Barone, 2000 ; Dubovický et al., 2008).

Chez le rongeur, la naissance intervient à un stade de maturation cérébrale qui équivaut à la fin du second trimestre de grossesse chez l'Homme. Les événements développementaux se déroulant en période post-natale chez le rongeur, et observables par l'expérimentateur, correspondent donc à des événements ayant lieu *in utero* pour le fœtus humain, pendant le 3^{ème} trimestre de grossesse (Barton, 2005). Par exemple, le cerveau du rat connaît une période de croissance et de maturation rapide vers PND10-12, qui est atteinte chez l'Homme en période prénatale, vers la naissance (Dubovický et al., 2008). La synaptogénèse chez le rat a lieu presque exclusivement pendant les trois premières semaines de vie, alors que chez l'Homme elle atteint un pic à l'âge de deux ans (Rodier, 2004) et se poursuit jusqu'à l'adolescence (Uylings & van Eden, 1990 ; Rice & Barone, 2000).

Les effets observés quand l'exposition aux HAP est prolongée jusqu'au sevrage peuvent être liés au fait que l'exposition a lieu pendant la synaptogénèse, et avec la possible interférence avec le développement normal des systèmes de neurotransmission impliqués dans les fonctions cognitives évaluées (Frieder et al., 1984).

Ainsi, la différence d'effets observés lorsque l'exposition des mères au mélange de HAP se prolonge pendant la période d'allaitement, est très certainement due au fait que cette expérimentation a ciblé en particulier la synaptogénèse, dont les perturbations peuvent être impliquées dans la survenue de troubles anxieux à l'âge adulte (Gross & Hen, 2004).

Néanmoins, il ne s'agit évidemment pas d'établir un lien direct entre les périodes d'allaitement chez le rongeur ou chez l'Homme, et d'affirmer que l'allaitement maternel constitue un facteur de risque pour le développement cérébral de l'enfant. En effet, les

différences temporelles entre le développement du système nerveux central du rat et celui de l'Homme s'opposent à une telle conclusion, puisqu'en termes de développement cérébral la période d'allaitement du rat correspond plutôt à la fin du troisième trimestre de grossesse chez l'humain, et que chez l'Homme, la période de synaptogénèse est plus étendue dans le temps. D'autre part, la durée de la période d'allaitement exclusif est définie précisément chez le rongeur, ce qui n'est pas le cas pour le nouveau-né humain, pour laquelle elle peut fortement varier d'un enfant à l'autre.

Par ailleurs, une étude récente a montré que concernant les effets d'une exposition prénatale aux HAP chez l'Homme, sur la taille, le poids et la circonférence de la tête de l'enfant à la naissance, la période la plus sensible est le premier trimestre de la grossesse (Choi et al., 2012).

Si chez l'animal le fait d'avoir exposé les mères au mélange de HAP pendant la gestation puis la période d'allaitement a amplifié des effets déjà amorcés quand l'exposition est limitée à la gestation seule (potentielle additivité des effets induits par chaque période), il n'est pas possible d'extrapoler directement ces conclusions à l'Homme et de penser que c'est l'allaitement maternel en lui-même qui représente un risque à long terme pour le développement du système nerveux du jeune. Les mécanismes développementaux ayant lieu pendant les premières semaines de vie chez le rat ont été perturbés par l'action des HAP, ce qui montre que le système nerveux central présente une large fenêtre de vulnérabilité face aux substances neurotoxiques présentes dans l'environnement.

Néanmoins, deux éléments principaux permettent de penser que l'exposition aux HAP pendant l'allaitement peut avoir des effets délétères sur le développement des enfants. D'une part, plusieurs études ont montré la présence de HAP dans le lait maternel humain (Somogyi & Beck, 1993 ; Kishikawa et al., 2003 ; Del Bubba et al., 2005 ; Zanieri et al., 2007 ; Kim et al., 2008), ce qui représente un facteur de risque non négligeable ; et d'autre part les études épidémiologiques menées sur des cohortes d'enfants notamment aux Etats-Unis (Perera et al., 2006, 2009, 2011), mettent en évidence que l'exposition de la mère aux HAP pendant la grossesse est à même d'influencer le comportement et les capacités cognitives des enfants, suivis pour l'instant jusqu'à l'âge de 12 ans. Cependant il est important de souligner que ces études ne précisent pas si les enfants ont été allaités, donc exposés *via* le lait maternel après la

naissance, et ne permettent ainsi pas d'évaluer les conséquences d'une exposition aux HAP en période post-natale.

Enfin, malgré la présence de nombreux polluants dans le lait maternel, dont les HAP, l'allaitement au sein reste fortement recommandé pour des raisons d'ordre physiologique, nutritionnel, psychologique, ou affectif, et cela notamment par des instances internationales telles que l'OMS. De plus, les effets bénéfiques de l'allaitement au sein sur le développement cognitif de l'enfant ont encore récemment été démontrés. En effet, il semble que la durée de l'allaitement maternel exclusif puisse être corrélée avec une augmentation des points de QI, dans une étude réalisée sur 468 enfants en Pologne (Jedrychowski et al., 2011a). Les résultats de cette étude montrent, qu'en comparaison avec des enfants non allaités au sein, les enfants allaités pendant 3, 4 à 6, et plus de 6 mois ont un QI moyen supérieur de respectivement 2,1 ; 2,6 et 3,8 points à l'âge de 7 ans.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

I. Conclusion générale

Un nombre très restreint de substances chimiques est actuellement étudié dans le but d'évaluer leur potentiel toxique pour le système nerveux en développement, alors que l'identification, la caractérisation et la maîtrise des conséquences de l'exposition précoce à des substances chimiques environnementales susceptibles d'affecter le développement normal de l'individu, en particulier à faibles doses, sont des points clés en santé public.

Les effets d'une exposition à des polluants chimiques potentiellement neurotoxiques, et leurs mécanismes de toxicité pendant des stades précoces de développement sont particulièrement importants à définir compte tenu de la grande sensibilité du système nerveux en développement et du fait que des perturbations dans son développement peuvent avoir des conséquences sur le devenir de l'individu.

De plus, les différents processus de maturation ont lieu à des temps différents pour chaque région cérébrale, ce qui rend le cerveau particulièrement hétérogène en termes de réponses aux agents qui interfèrent avec l'une ou l'autre des étapes de développement (Faustman et al., 2000). Ainsi les effets observés dépendent fortement des doses et des périodes d'exposition à ces molécules neurotoxiques.

La sécurité sanitaire des aliments est elle aussi une problématique importante actuellement. Parmi les contaminants alimentaires, certaines molécules comme les HAP ne sont que peu réglementées. L'exposition aux HAP par voie alimentaire est une réalité, car ces composés peuvent être retrouvés dans presque tous les types d'aliments, à cause de dépôts environnementaux dans l'eau ou les sols, des processus industriels de fabrication, ou de modes de cuisson ménagers (aliments déshydratés, fumés, grillés, rôtis, frits).

Si le potentiel carcinogène des HAP a déjà fait l'objet de nombreuses études, un nombre plus faible de travaux ont montré la capacité de ces polluants à induire des effets délétères pour le système nerveux central mature ou en développement, chez l'Homme ou chez l'animal.

Néanmoins, peu de données sont connues concernant la neurotoxicité des HAP, administrés à faibles doses et en mélanges, qui plus est lorsque l'individu est exposé *via* sa mère au cours des stades les plus précoces de son développement.

Dans ce contexte, le travail de thèse présenté dans ce manuscrit avait pour objectif principal d'évaluer, sur un modèle animal, les effets toxiques à court et à long terme d'un mélange de 16 HAP administré à de faibles doses, sur le système nerveux en développement. Pour cela, le développement moteur et sensoriel, le comportement individuel et social, et l'activité métabolique de différentes structures cérébrales ont été étudiés. Par ailleurs, le choix de deux périodes d'exposition différentes, *i.e.* la gestation et/ou l'allaitement, a permis de comparer la sensibilité relative du système nerveux immature selon la période à laquelle il est exposé à ces composés.

D'une manière générale, les résultats ont permis de montrer que ce mélange de 16 HAP est capable d'induire des modifications comportementales et métaboliques à long terme essentiellement, suite à une exposition précoce *via* l'organisme maternel. En effet, l'exposition aux HAP n'a pas induit de trouble majeur à court terme sur le développement moteur et sensoriel des animaux. En revanche, plusieurs semaines après la fin de l'exposition, l'ensemble des animaux a présenté une augmentation du niveau d'activité. Les animaux exposés au cours de la gestation et de l'allaitement ont présenté de plus une augmentation du niveau d'anxiété. Concernant les analyses histologiques, les résultats ont montré que peu de structures sont atteintes à court terme, et que ce nombre décroît aux stades plus avancés pour les animaux exposés uniquement pendant la gestation, mais augmente pour les animaux exposés plus longtemps. Par ailleurs, des augmentations du métabolisme énergétique sont généralement observées à court terme, puis des diminutions du métabolisme énergétique sont majoritairement observées à long terme.

Ainsi, il semble que des effets neurotoxiques des HAP soient amorcés quand l'exposition a lieu uniquement pendant la gestation, mais l'existence de mécanismes compensatoires précoces est dans ce cas suffisante pour les limiter.

En revanche, quand l'exposition est réalisée pendant la gestation puis l'allaitement, les effets comportementaux et métaboliques, notamment au niveau du système limbique, sont plus sévères, ce qui est peut être lié au fait d'avoir cumulé les périodes d'exposition et d'avoir ciblé des processus développementaux particuliers, tels que la synaptogénèse. Ces résultats permettent ainsi d'une part de souligner l'influence de la période d'exposition et du type de transfert (placentaire ou lactationnel) sur les registres comportementaux perturbés et sur l'intensité des troubles observés à l'âge adulte ; et d'autre part de suggérer un rôle modulateur

de l'organisme maternel dans la toxicité de ces molécules pour le système nerveux en développement.

Dans les deux cas, peu d'effets ont été mesurés à court terme, alors que des atteintes plus marquées ont été observées à long terme, témoignant d'une toxicité que l'on peut qualifier de toxicité retardée.

Par ailleurs, une relation dose-effets non linéaire a été observée dans l'ensemble des études réalisées. En effet, les deux doses testées dans chacune des deux expérimentations, distante d'un facteur 100, n'induisent pas d'effets différents l'une par rapport à l'autre.

Aucune interaction du traitement avec le sexe des animaux n'a été mise en évidence, ce qui ne permet pas de conclure quand à une éventuelle perturbation endocrinienne des HAP.

Au final, l'ensemble de ces résultats permettent de conclure au potentiel neurotoxique des HAP, administrés à faibles doses et en mélange, et montrent ainsi l'importance de l'évaluation du risque lié à une exposition précoce à ces composés à des niveaux représentatifs de la réalité humaine, pour la santé de l'individu à long terme.

Néanmoins, les résultats de cette étude, qui montrent une différence de sensibilité entre deux périodes d'exposition pendant le développement du système nerveux central, atteignent les limites imposées par l'utilisation d'un modèle animal, pour l'extrapolation des données à l'Homme. En effet, même s'il paraît évident que l'absence d'exposition pendant la période d'allaitement a permis de réduire les effets toxiques pour le jeune, il n'est pas possible d'affirmer que l'allaitement représente un quelconque risque pour le nouveau-né humain.

II. Perspectives

Les résultats de ces études soulèvent naturellement plusieurs interrogations, ce qui ouvre de nouvelles perspectives de travail.

➤ La première expérimentation qu'il faudrait mener à la suite de ce travail, afin de cerner davantage le rôle de la période d'exposition dans la toxicité induite par les HAP sur le système nerveux central en développement serait probablement celle pour laquelle l'**exposition** des femelles au mélange de HAP se limite à la **période d'allaitement**, soit du jour de la naissance au jour du sevrage.

➤ Par ailleurs, en termes d'exposition de l'individu adulte, trois pistes sont à envisager.

D'une part, par rapport à d'autres POP tels que les PCB, les HAP sont considérées comme des molécules rapidement métabolisées et donc peu accumulées dans l'organisme. Nous avons donc considéré que ne plus exposer les femelles à partir de la naissance des jeunes suffit à rendre l'exposition aux HAP nulle pour les jeunes en période d'allaitement. Néanmoins, la mise en place d'**adoptions** à la naissance, dans les protocoles expérimentaux, permettrait de modéliser plus fidèlement le cas humain d'un allaitement du nouveau-né par une formule commerciale, sans aucune exposition à des molécules éventuellement encore présentes dans l'organisme maternel.

D'autre part, la question du rôle de l'**imprégnation** de l'organisme maternel avant même la conception pourrait être envisagée. En effet, chez l'Homme l'exposition du fœtus peut aussi provenir de l'accumulation de polluants chez la mère pendant plusieurs années et dépend alors de l'imprégnation antérieure de la mère (Faustman et al., 2000).

Enfin, la contribution de l'**exposition du père**, avant la conception, à la toxicité des HAP n'est mise en évidence que dans un nombre très réduit de travaux (Cordier et al., 1997 ; Brevik et al., 2012), mais pourrait aussi faire l'objet d'études approfondies.

➤ Par ailleurs, l'exposition aux HAP chez l'Homme commence à des stades très précoces du développement, et se poursuit tout au long de sa vie, par différentes sources (alimentation et pollution atmosphérique essentiellement). Ainsi, il pourrait être pertinent

d'exposer les animaux pendant un temps encore plus long, par exemple au moins **jusqu'à l'âge adulte**, voire d'étudier les effets éventuellement induit à la **génération suivante**.

➤ Les résultats de ces études ont montré des effets plus marqués à l'âge adulte, et il pourrait être intéressant de tester à nouveau les animaux nés de mères exposées à **plus long terme**, tout d'abord pour évaluer une éventuelle réversibilité des effets, puis pour évaluer le rôle potentiel d'une exposition précoce aux HAP dans la survenue de **maladies neurodégénératives** telles que la maladie d'Alzheimer.

➤ Les résultats des analyses histologiques sont cohérents avec le rôle joué par le **stress oxydant** dans la toxicité des HAP. Cependant, aucune approche mécanistique n'a réellement été mise en œuvre, et il serait très pertinent de confirmer tout d'abord l'implication du stress oxydant, par des marqueurs spécifiques, puis de cibler d'autres marqueurs, notamment concernant les différents systèmes de neurotransmetteurs, afin de mieux comprendre les **mécanismes de neurotoxicité** des HAP. Un grand nombre de coupes de cerveaux des jeunes, et de cerveaux non coupés à différents stades sont disponibles, et pourrait être utilisé à cet effet.

➤ L'hypothèse principale issue de ce travail est le fait que l'exposition pendant la synaptogénèse a fortement impacté le devenir des animaux. Il serait dès lors intéressant de mettre en évidence d'éventuelles perturbations sur des **marqueurs synaptiques** comme la synaptophysine, afin de confirmer cette idée.

➤ Par ailleurs, d'autres échantillons sont disponibles, notamment des foies des mères, et pourraient être analysés, afin de déterminer le **transfert et la métabolisation** des HAP au sein de l'organisme maternel entre autre. En effet, peu de données cinétiques par exemple sont connues en ce qui concerne les 16 molécules utilisées dans ces études.

➤ Le rôle du **métabolisme** des HAP dans leur toxicité pourrait être exploré de manière plus approfondie, notamment en évaluant l'induction des enzymes du métabolisme (activité EROD) au niveau du foie ou du cerveau des animaux exposés (mères et jeunes).

➤ Enfin, des perturbations à long terme au niveau du **métabolisme énergétique des noyaux amygdaliens**, une **augmentation** des niveaux d'**activité** et d'**anxiété**, et des modifications dans le **comportement social** des individus exposés pendant la gestation puis l'allaitement au mélange de HAP, peuvent laisser penser à une éventuelle implication des HAP comme facteurs environnementaux susceptibles d'induire des **troubles autistiques**. En effet, même si d'autres registres comportementaux ou sensoriels seraient à explorer, ces observations là sont cohérentes avec celles relevées sur des modèles rongeurs de troubles autistiques (Markram et al., 2007). De plus, l'implication d'une exposition précoce au B(a)P a déjà été suggérée dans une étude récente (Sheng et al., 2010). En effet, les auteurs de cette étude ont montré qu'une exposition prénatale chez la souris, à du B(a)P, induisait une sous-expression du gène *Met*, normalement fortement exprimé chez le rongeur pendant le pic de formation des synapses dans le néocortex, au cours des deux premières semaines de vie post-natale. Or ce gène fait partie des gènes identifiés comme impliqué dans la survenue de troubles autistiques (Sousa et al., 2009).

Décrit pour la première fois en 1943 (Kanner, 1943), l'autisme est un désordre complexe, qui touche un nombre croissant d'enfants, estimé actuellement à 6 à 7 enfants sur 1000 aux Etats-Unis (Fombonne, 2003). Les troubles autistiques sont caractérisés entre autre par des troubles du comportement social, de la communication, de l'identification des émotions, par un manque d'intérêt pour les jeux, par des comportements répétitifs, par une augmentation de l'anxiété et par des difficultés à supporter des changements dans la planification des tâches (Markram et al., 2007 ; Landrigan, 2010). Les premiers symptômes sont en général mis en évidence vers l'âge de trois ans (Rodier et al., 1997).

L'hypothèse de **causes environnementales précoces**, parmi lesquelles la prise de thalidomide par la mère, en combinaison avec des facteurs génétiques, dans la survenue de troubles autistiques, est de plus en plus émise par les spécialistes (Rodier, 2000 ; Landrigan, 2010). En effet, chez l'Homme, l'environnement pendant les premières années de vie peut avoir des effets profonds sur les structures et les fonctions du système limbique, connu pour être indispensable au comportement social et aux émotions (Joseph, 1999 ; LeDoux, 2007) et (Sah et al., 2003). Les **HAP** font d'ailleurs partie d'une liste de 10 substances ou mélanges susceptibles d'être à l'origine de la survenue de troubles autistiques, et sont des facteurs à étudier dans ce contexte (Landrigan et al., 2012).

Par ailleurs, le rôle des noyaux amygdaliens dans le comportement social et les émotions a clairement été mis en évidence par le syndrome de Kluver-Bucy, considéré comme l'un des modèles animaux de l'autisme. Chez le singe, il a été montré que des altérations de l'amygdale chez le jeune perturbe le comportement des animaux à l'âge adulte, notamment dans des situations sociales, dans lesquelles l'animal n'est plus capable d'initier des interactions sociales (Baron-Cohen et al., 2000 ; Phelps & LeDoux, 2005). Ces données sont en accord avec des études montrant l'importance de perturbations au niveau de l'amygdale chez des patients autistes (Phelps & LeDoux, 2005).

De plus, le complexe amygdalien présente une **grande plasticité**, ce qui pourrait le rendre particulièrement vulnérable à la présence d'agents toxiques à des stades précoces de son développement. Chez l'Homme, il commence à se développer entre 30 et 50 jours de gestation mais la différenciation des noyaux a lieu seulement en période post-natale (Baron-Cohen et al., 2000).

Ainsi, la littérature et les résultats obtenus à l'issue de cette thèse peuvent soulever la question du rôle d'une exposition précoce à des contaminants alimentaires tels que les HAP, dans la survenue de troubles du comportement complexes, comme l'autisme. Des études futures pourraient être envisagées pour explorer cette hypothèse de manière plus précise.

BIBLIOGRAPHIE

- Adam, O., Badot, P.-M., Degiorgi, F., Crini, G., 2009. Mixture toxicity assessment of wood preservative pesticides in the freshwater amphipod *Gammarus pulex* (L.). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 441–449.
- Afssa – Saisine n° 2000-SA-0005, 2003. Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à une demande d'avis sur l'évaluation des risques présentés par le benzo(a)pyrène (B(a)P) et par d'autres hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), présents dans diverses denrées ou dans certaines huiles végétales, ainsi que sur les niveaux de concentration en HAP dans les denrées au-delà desquels des problèmes de santé risquent de se poser.
- Afsset, Substances chimiques, janvier 2006. El Yamani M et Barrillon A, http://www.afsset.fr/upload/bibliotheque/383231914475058007588090344687/13_substances_chimiques.pdf
- Akita, H., Takagi, N., Ishihara, N., Takagi, K., Murotomi, K., Funakoshi, H., Matsumoto, K., Nakamura, T., Takeo, S., 2008. Hepatocyte growth factor improves synaptic localization of the NMDA receptor and intracellular signaling after excitotoxic injury in cultured hippocampal neurons. *Exp. Neurol.* 210, 83–94.
- Altman, J., Sudarshan, K., 1975. Postnatal development of locomotion in the laboratory rat. *Anim Behav* 23, 896–920.
- Andersen, H.R., Nielsen, J.B., Grandjean, P., 2000. Toxicologic evidence of developmental neurotoxicity of environmental chemicals. *Toxicology* 144, 121–127.
- Andersson, H., Lindqvist, E., Westerholm, R., Grägg, K., Almén, J., Olson, L., 1998. Neurotoxic effects of fractionated diesel exhausts following microinjections in rat hippocampus and striatum. *Environ. Res* 76, 41–51.
- Atcha, Z., Rourke, C., Neo, A.H., Goh, C.W., Lim, J.S., Aw, C.-C., Browne, E.R., Pemberton, D.J., 2010. Alternative method of oral dosing for rats. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 49, 335–343.
- ATSDR. 1995. 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
- ATSDR, 2004. Guidance manual for the assessment of joint toxic action of chemical mixtures. US Department of Health and Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Atlanta
- ATSDR, 2005. Toxicology profile for polyaromatic hydrocarbons. ATSDR's Toxicological Profiles on CD-ROM, CRC Press, Boca Raton, FL.
- Autrup, H., Vestergaard, A.B., 1996. Transplacental transfer of environmental genotoxins--polycyclic aromatic hydrocarbon-albumin in nonsmoking women. *Environ. Health Perspect* 104 Suppl 3, 625–627.
- Azuma, S.D., Chasnoff, I.J., 1993. Outcome of children prenatally exposed to cocaine and other drugs: a path analysis of three-year data. *Pediatrics* 92, 396–402.
- Bae, S., Pan, X.-C., Kim, S.-Y., Park, K., Kim, Y.-H., Kim, H., Hong, Y.-C., 2010. Exposures to particulate matter and polycyclic aromatic hydrocarbons and oxidative stress in schoolchildren. *Environ. Health Perspect.* 118, 579–583.
- Baek, S.O., Field, R.A., Goldstone, M.E., Kirk, P.W., Lester, J.N., Perry, R., 1991. A review of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: Sources, fate and behavior. *Water, Air, & Soil Pollution* 60, 279–300.
- Barlow, B.K., Cory-Slechta, D.A., Richfield, E.K., Thiruchelvam, M., 2007. The gestational environment and Parkinson's disease: evidence for neurodevelopmental origins of a neurodegenerative disorder. *Reprod. Toxicol.* 23, 457–470.
- Baron-Cohen, S., Ring, H.A., Bullmore, E.T., Wheelwright, S., Ashwin, C., Williams, S.C., 2000. The amygdala theory of autism. *Neurosci Biobehav Rev* 24, 355–364.
- Barone, S., Das, K.P., Lassiter, T.L., White, L.D., 2000. Vulnerable processes of nervous system development: a review of markers and methods. *Neurotoxicology* 21, 15–36.
- Barton, H.A., 2005. Computational pharmacokinetics during developmental windows of susceptibility. *J. Toxicol. Environ. Health Part A* 68, 889–900.

- Bear, F.B., Connors, B.W., Paradiso, M.A., 2010. Neurosciences, à la découverte du cerveau. 3ème édition, traduit de *Neuroscience: Exploring the Brain, third Edition* par Nieoullon A. Editions Pradel.
- Belzunces, L., Rousselle, C., 2011. Etude de l'interaction des toxiques d'un mélange : exemple des pesticides. Colloque Aret, Juin 2011.
- Bignall, K.E., 1974. Ontogeny of levels of neural organization: the righting reflex as a model. *Exp. Neurol* 42, 566–573.
- Bjerke, D.L., Peterson, R.E., 1994. Reproductive toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in male rats: different effects of in utero versus lactational exposure. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 127, 241–249.
- Blass, J.P., 2000. The mitochondrial spiral. An adequate cause of dementia in the Alzheimer's syndrome. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 924, 170–183.
- Bloom, B., Cohen, R.A., Freeman, G., 2009. Summary health statistics for U.S. children: National Health Interview Survey, 2008. *Vital Health Stat* 10 1–81.
- Bolles, R.C., Woods P.J., 1964. The ontogeny of behaviour in the albino rat. *Animal Behaviour* 12(4), 427-441.
- Bonnichsen, M., Dragsted, M., Hansen, A.K., 2005. The welfare impact of gavaging laboratory rates. *Animal Welfare* 14, 223-227.
- Bouayed, J., Desor, F., Rammal, H., Kiemer, A.K., Tybl, E., Schroeder, H., Rychen, G., Soulimani, R., 2009a. Effects of lactational exposure to benzo[alpha]pyrene (B[alpha]P) on postnatal neurodevelopment, neuronal receptor gene expression and behaviour in mice. *Toxicology* 259, 97–106.
- Bouayed, J., Desor, F., Soulimani, R., 2009b. Subacute oral exposure to benzo[alpha]pyrene (B[alpha]P) increases aggressiveness and affects consummatory aspects of sexual behaviour in male mice. *J. Hazard. Mater* 169, 581–585.
- Bouayed, J., Rammal, H., Soulimani, R., 2009c. Oxidative stress and anxiety: relationship and cellular pathways. *Oxid Med Cell Longev* 2, 63–67.
- Boulet, S.L., Boyle, C.A., Schieve, L.A., 2009. Health care use and health and functional impact of developmental disabilities among US children, 1997-2005. *Arch Pediatr Adolesc Med* 163, 19–26.
- Boussel, J., Grova, N., Cyril Feidt, C., Desor, D., Rychen, G., Schroeder, H., 2006. Short- and long-term effects of a neonatal exposure to benzo(a)pyrene (BaP) or 3,3-4,4-5-pentachlorobiphenyl (PCB126) on behaviour of rat pups. *Toxicology Letters* 06-166.
- Branchi, I., Capone, F., Vitalone, A., Madia, F., Santucci, D., Alleva, E., Costa, L.G., 2005. Early developmental exposure to BDE 99 or Aroclor 1254 affects neurobehavioural profile: interference from the administration route. *Neurotoxicology* 26, 183–192.
- Braun, J.M., Kahn, R.S., Froehlich, T., Auinger, P., Lanphear, B.P., 2006. Exposures to environmental toxicants and attention deficit hyperactivity disorder in U.S. children. *Environ. Health Perspect* 114, 1904–1909.
- Brevik, A., Lindeman, B., Rusnakova, V., Olsen, A.-K., Brunborg, G., Duale, N., 2012. Paternal benzo[a]pyrene exposure affects gene expression in the early developing mouse embryo. *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology*.
- Brookes, P., Osborne, M.R., 1977. Mutation in mammalian cells by stereoisomers of anti-benzo(a)pyrene-diolepoxide in relation to the extent and nature of the DNA reaction products. *Carcinogenesis* 3, 1223-1226.
- Brown, A.P., Dinger, N., Levine, B.S., 2000. Stress produced by gavage administration in the rat. *Contemp Top Lab Anim Sci* 39, 17–21.
- Brown, L.A., Khousbouei, H., Goodwin, J.S., Irvin-Wilson, C.V., Ramesh, A., Sheng, L., McCallister, M.M., Jiang, G.C.T., Aschner, M., Hood, D.B., 2007. Down-regulation of early ionotropic glutamate receptor subunit developmental expression as a mechanism for observed plasticity deficits following gestational exposure to benzo(a)pyrene. *Neurotoxicology* 28, 965–978.
- Bui, Q.Q., Tran, M.B., West, W.L., 1986. A comparative study of the reproductive effects of methadone and benzo[a]pyrene in the pregnant and pseudopregnant rat. *Toxicology* 42, 195–204.

- Buzanska, L., Sypecka, J., Nerini-Molteni, S., Compagnoni, A., Hogberg, H.T., del Torchio, R., Domanska-Janik, K., Zimmer, J., Coecke, S., 2009. A human stem cell-based model for identifying adverse effects of organic and inorganic chemicals on the developing nervous system. *Stem Cells* 27, 2591–2601.
- Byers, R.L., Lord E.E., 1943. Late effects of lead poisoning on mental development. *Am J Dis Child* 66, 471–83.
- Calabrese, E.J., 2010. Hormesis is central to toxicology, pharmacology and risk assessment. *Hum Exp Toxicol* 29, 249–261.
- Calabrese, E.J., Blain, R.B., 2011. The hormesis database: The occurrence of hormetic dose responses in the toxicological literature. *Regul Toxicol Pharmacol*.
- Calne, D.B., Eisen, A., McGeer, E., Spencer, P., 1986. Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and motoneurone disease: abiotrophic interaction between ageing and environment? *Lancet* 2, 1067–1070.
- Carola, V., D'Olimpio, F., Brunamonti, E., Mangia, F., Renzi, P., 2002. Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behaviour in inbred mice. *Behav. Brain Res* 134, 49–57.
- Carpenter, D.O., Arcaro, K., Spink, D.C., 2002. Understanding the human health effects of chemical mixtures. *Environ. Health Perspect* 110 Suppl 1, 25–42.
- Castellano, C., Oliverio, A., 1976. Early malnutrition and postnatal changes in brain and behavior in the mouse. *Brain Res.* 101, 317–325.
- Cavret, S., Feidt, C., Le Roux, Y., Laurent, F., 2005. Study of mammary epithelial role in polycyclic aromatic hydrocarbons transfer to milk. *J. Dairy Sci* 88, 67–70.
- Cervello, I., Lafuente, A., Giralt, M., Mallol, J., 1992. Enhanced glutathione S-transferase (GST) activity in pregnant rats treated with benzo(a)pyrene. *Placenta* 13, 273–280.
- Chasnoff, I.J., Griffith, D.R., Freier, C., Murray, J., 1992. Cocaine/polydrug use in pregnancy: two-year follow-up. *Pediatrics* 89, 284–289.
- Choi, H., Jedrychowski, W., Spengler, J., Camann, D.E., Whyatt, R.M., Rauh, V., Tsai, W.-Y., Perera, F.P., 2006. International studies of prenatal exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and fetal growth. *Environ. Health Perspect* 114, 1744–1750.
- Choi, H., Rauh, V., Garfinkel, R., Tu, Y., Perera, F.P., 2008. Prenatal exposure to airborne polycyclic aromatic hydrocarbons and risk of intrauterine growth restriction. *Environ. Health Perspect* 116, 658–665.
- Choi, H., Wang, L., Lin, X., Spengler, J.D., Perera, F.P., 2012. Fetal Window of Vulnerability to Airborne Polycyclic Aromatic Hydrocarbons on Proportional Intrauterine Growth Restriction. *PloS One* 7, e35464.
- Clancy, B., Darlington, R.B., Finlay, B.L., 2001. Translating developmental time across mammalian species. *Neuroscience* 105, 7–17.
- Connors, S.L., Levitt, P., Matthews, S.G., Slotkin, T.A., Johnston, M.V., Kinney, H.C., Johnson, W.G., Dailey, R.M., Zimmerman, A.W., 2008. Fetal mechanisms in neurodevelopmental disorders. *Pediatr. Neurol* 38, 163–176.
- Cook, R., Calabrese, E.J., 2007. The importance of hormesis to public health. *Cien Saude Colet* 12, 955–963.
- Cordier, S., Lefeuvre, B., Filippini, G., Peris-Bonet, R., Farinotti, M., Lovicu, G., Mandereau, L., 1997. Parental occupation, occupational exposure to solvents and polycyclic aromatic hydrocarbons and risk of childhood brain tumors (Italy, France, Spain). *Cancer Causes Control* 8, 688–697.
- Cory-Slechta, D.A., Crofton, K.M., Foran, J.A., Ross, J.F., Sheets, L.P., Weiss, B., Mileson, B., 2001. Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment. I: behavioral effects. *Environ. Health Perspect* 109 Suppl 1, 79–91.
- Crozier, W.J., Pincus, G., 1926. THE GEOTROPIC CONDUCT OF YOUNG RATS. *J. Gen. Physiol.* 10, 257–269.

- Dahlgren, J., Warshaw, R., Thornton, J., Anderson-Mahoney, C.P., Takhar, H., 2003. Health effects on nearby residents of a wood treatment plant. *Environ. Res* 92, 92–98.
- Dakeishi, M., Murata, K., Grandjean, P., 2006. Long-term consequences of arsenic poisoning during infancy due to contaminated milk powder. *Environ Health* 5, 31.
- Daniel, P.M., Pratt, O.E., Prichard, M.M., 1967. Metabolism of labelled carcinogenic hydrocarbons in rats. *Nature* 215, 1142–1146.
- Das, M., Seth, P.K., Mukhtar, H., 1985. Distribution of benzo(a)pyrene in discrete regions of rat brain. *Bull Environ Contam Toxicol* 35, 500–504.
- Dayal, H., Gupta, S., Trieff, N., Maierson, D., Reich, D., 1995. Symptom clusters in a community with chronic exposure to chemicals in two superfund sites. *Arch. Environ. Health* 50, 108–111.
- de Oliveira, M.R., Silvestrin, R.B., Mello E Souza, T., Moreira, J.C.F., 2007. Oxidative stress in the hippocampus, anxiety-like behavior and decreased locomotory and exploratory activity of adult rats: effects of sub acute vitamin A supplementation at therapeutic doses. *Neurotoxicology* 28, 1191–1199.
- De Rosa, C.T., Hicks, H.E., Ashizawa, A.E., Pohl, H.R., Mumtaz, M.M., 2006. A regional approach to assess the impact of living in a chemical world. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1076, 829–838.
- Desor D. Contribution à l'étude du comportement social du rat. Différenciations comportementales dans des groupes de rats confrontés à une difficulté d'accès à la nourriture : typologie des individus, aspects socio-cognitifs des interactions, ontogenèse des différenciations, aspects pharmacologiques. Thèse sciences naturelles Université Nancy 1 (1994) 556 pages.
- Deviterne D. Etude des variations interindividuelles chez le rat: relations entre le développement neuro-moteur et pondéral, les performances en situation d'apprentissage et l'environnement précoce. Présentée pour l'obtention du doctorat de 3ème cycle en neurobiologie et biologie du comportement. Nancy, Université Nancy 1. (1981) 154 pages.
- de Vos, R.H., van Dokkum, W., Schouten, A., de Jong-Berkhout, P., 1990. Polycyclic aromatic hydrocarbons in Dutch total diet samples (1984-1986). *Food Chem. Toxicol* 28, 263–268.
- de Zwart, L., Scholten, M., Monbaliu, J.G., Annaert, P.P., Van Houdt, J.M., Van den Wyngaert, I., De Schaepdrijver, L.M., Bailey, G.P., Coogan, T.P., Coussement, W.C., Mannens, G.S., 2008. The ontogeny of drug metabolizing enzymes and transporters in the rat. *Reprod. Toxicol.* 26, 220–230.
- Dejmek, J., Solanský, I., Benes, I., Leníček, J., Srám, R.J., 2000. The impact of polycyclic aromatic hydrocarbons and fine particles on pregnancy outcome. *Environ. Health Perspect* 108, 1159–1164.
- Del Bubba, M., Zanieri, L., Galvan, P., Donzelli, G.P., Checchini, L., Lepri, L., 2005. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and total fats in human milk. *Ann Chim* 95, 629–641.
- Dennis, M.J., Massey, R.C., McWeeny, D.J., Knowles, M.E., Watson, D., 1983. Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in UK total diets. *Food Chem. Toxicol* 21, 569–574.
- Dennis, M.J., Massey, R.C., Cripps, G., Venn, I., Howarth, N., Lee, G., 1991. Factors affecting the polycyclic aromatic hydrocarbon content of cereals, fats and other food products. *Food Addit Contam* 8, 517–530.
- Dietrich, K.N., 1999. Environmental chemicals and child development. *J. Pediatr.* 134, 7–9.
- Directive 2010/63/EU du parlement européen et du conseil du 22 Septembre 2010 relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques.
- Dobbing, J., Sands, J., 1979. Comparative aspects of the brain growth spurt. *Early Hum. Dev* 3, 79–83.
- Dorman, D.C., Allen, S.L., Byczkowski, J.Z., Claudio, L., Fisher, J.E., Fisher, J.W., Harry, G.J., Li, A.A., Makris, S.L., Padilla, S., Sultatos, L.G., Mileson, B.E., 2001. Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment. III: pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations. *Environ. Health Perspect* 109 Suppl 1, 101–111.
- Drewett, R.F., Statham, C., Wakerley, J.B., 1974. A quantitative analysis of the feeding behaviour of suckling rats. *Anim Behav* 22, 907–913.

- Duarte-Salles, T., Mendez, M.A., Morales, E., Bustamante, M., Rodríguez-Vicente, A., Kogevinas, M., Sunyer, J., 2012. Dietary benzo(a)pyrene and fetal growth: Effect modification by vitamin C intake and glutathione S-transferase P1 polymorphism. *Environment international* 45C, 1–8.
- Dubovický, M., Kovačovský, P., Ujházy, E., Navarová, J., Brucknerová, I., Mach, M., 2008. Evaluation of developmental neurotoxicity: some important issues focused on neurobehavioral development. *Interdiscip Toxicol* 1, 206–210.
- Duffus, J.H., Templeton, D.M., Nordberg, M., 2009. *Concepts in Toxicology*, RSC Publishing, ISBN 978-0-85404-157-2, Cambridge.
- Dutta, K., Ghosh, D., Nazmi, A., Kumawat, K.L., Basu, A., 2010. A common carcinogen benzo[a]pyrene causes neuronal death in mouse via microglial activation. *PLoS ONE* 5, e9984.
- Edwards, S.C., Jedrychowski, W., Butscher, M., Camann, D., Kieltyka, A., Mroz, E., Flak, E., Li, Z., Wang, S., Rauh, V., Perera, F., 2010. Prenatal Exposure to Airborne Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Children's Intelligence at Age 5 in a Prospective Cohort Study in Poland. *Environ Health Perspect*.
- EFSA, 2008. Scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain on a request from the European Commission on polycyclic aromatic hydrocarbons in food. *EFSA J.* 724, 1–114.
- Environmental Working Group, July 14, 2004 - Body Burden - The Pollution in Newborns. A benchmark investigation of industrial chemicals, pollutants and pesticides in umbilical cord blood.
- European Commission (EC), 2002. Opinion of the Scientific Committee on Food on the Risks to Human Health of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food.
- European Commission (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs.
- European Commission (EC) No 835/2011 of 19 August 2011 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels for polycyclic aromatic hydrocarbons in foodstuffs.
- Facecchia, K., Fochesato, L.-A., Ray, S.D., Stohs, S.J., Pandey, S., 2011. Oxidative toxicity in neurodegenerative diseases: role of mitochondrial dysfunction and therapeutic strategies. *J Toxicol* 2011, 683728.
- Falcó, G., Domingo, J.L., Llobet, J.M., Teixidó, A., Casas, C., Müller, L., 2003. Polycyclic aromatic hydrocarbons in foods: human exposure through the diet in Catalonia, Spain. *J. Food Prot* 66, 2325–2331.
- Faustman, E.M., Silbernagel, S.M., Fenske, R.A., Burbacher, T.M., Ponce, R.A., 2000. Mechanisms underlying Children's susceptibility to environmental toxicants. *Environ. Health Perspect* 108 Suppl 1, 13–21.
- Ferguson, S.A., Boctor, S.Y., 2009. Use of food wafers for multiple daily oral treatments in young rats. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 48, 292–295.
- Fombonne, E., 2003. The prevalence of autism. *JAMA* 289, 87–89.
- Fox, M.W., 1966. Natural environment: theoretical and practical aspects for breeding and rearing laboratory animals. *Lab Anim Care* 16, 316–321.
- Fox, D.A., 1998. Sensory system alterations following occupational exposure to chemicals. In: *Occupational Neurotoxicology* (Costa LG, Manzo L, eds). Boca Raton, FL: CRC Press, 169–184.
- Frieder, B., Epstein, S., Grimm, V.E., 1984. The effects of exposure to diazepam during various stages of gestation or during lactation on the development and behavior of rat pups. *Psychopharmacology (Berl.)* 83, 51–55.
- Furmark, T., 2009. Neurobiological aspects of social anxiety disorder. *Isr J Psychiatry Relat Sci* 46, 5–12.

- Gasull, M., Bosch de Basea, M., Puigdomènech, E., Pumarega, J., Porta, M., 2011. Empirical analyses of the influence of diet on human concentrations of persistent organic pollutants: a systematic review of all studies conducted in Spain. *Environ Int* 37, 1226–1235.
- 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 3ème cycle en neurobiologie et biologie du comportement. Nancy, Université Nancy 1. (1979) 151 pages.
- Germann, P.G., Ockert, D., 1994. Granulomatous inflammation of the oropharyngeal cavity as a possible cause for unexpected high mortality in a Fischer 344 rat carcinogenicity study. *Lab. Anim. Sci.* 44, 338–343.
- Giannapas, M., Karnis, L., Dailianis, S., 2011. Generation of free radicals in haemocytes of mussels after exposure to low molecular weight PAH components: Immune activation, oxidative and genotoxic effects. *Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology: CBP*.
- Gingrich, J.A., 2005. Oxidative stress is the new stress. *Nat. Med.* 11, 1281–1282.
- Gladen, B.C., Zadorozhnaja, T.D., Chislovska, N., Hryhorczuk, D.O., Kennicutt, M.C., Little, R.E., 2000. Polycyclic aromatic hydrocarbons in placenta. *Hum Exp Toxicol* 19, 597–603.
- Graeter, L.J., Mortensen, M.E., 1996. Kids are different: developmental variability in toxicology. *Toxicology* 111, 15–20.
- Grandjean, P., 2008. Late insights into early origins of disease. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol* 102, 94–99.
- Grandjean, P., Landrigan, P.J., 2006. Developmental neurotoxicity of industrial chemicals. *Lancet* 368, 2167–2178.
- Grandjean, P., Weihe, P., White, R.F., Debes, F., Araki, S., Yokoyama, K., Murata, K., Sørensen, N., Dahl, R., Jørgensen, P.J., 1997. Cognitive deficit in 7-year-old children with prenatal exposure to methylmercury. *Neurotoxicol Teratol* 19, 417–428.
- Gross, C., Hen, R., 2004. The developmental origins of anxiety. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 545–552.
- Grova, N., Feidt, C., Crépineau, C., Laurent, C., Lafargue, P.E., Hachimi, A., Rychen, G., 2002. Detection of polycyclic aromatic hydrocarbon levels in milk collected near potential contamination sources. *J. Agric. Food Chem* 50, 4640–4642.
- Grova, N., Monteau, F., Le Bizec, B., Feidt, C., Andre, F., Rychen, G., 2005. Determination of phenanthrene and hydroxyphenanthrenes in various biological matrices at trace levels using gas chromatography-mass spectrometry. *J Anal Toxicol* 29, 175–181.
- Grova, N., Valley, A., Turner, J.D., Morel, A., Muller, C.P., Schroeder, H., 2007. Modulation of behavior and NMDA-R1 gene mRNA expression in adult female mice after sub-acute administration of benzo(a)pyrene. *Neurotoxicology* 28, 630–636.
- Grova, N., Schroeder, H., Farinelle, S., Prodhomme, E., Valley, A., Muller, C.P., 2008. 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* 73, S295–302.
- Grova, N., Salquère, G., Schroeder, H., Appenzeller, B.M.R., 2011. Determination of PAHs and OH-PAHs in rat brain by gas chromatography tandem (triple quadrupole) mass spectrometry. *Chem. Res. Toxicol.* 24, 1653–1667.
- Guillén, M.D., Sopelana, P., Partearroyo, M.A., 1997. Food as a source of polycyclic aromatic carcinogens. *Rev Environ Health* 12, 133–146.
- Guo, Y., Huo, X., Wu, K., Liu, J., Zhang, Y., Xu, X., 2012. Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in umbilical cord blood of human neonates from Guiyu, China. *The Science of the Total Environment*.
- Gutierrez, H., Dolcet, X., Tolcos, M., Davies, A., 2004. HGF regulates the development of cortical pyramidal dendrites. *Development* 131, 3717–3726.
- Guyda, H.J., 1991. Metabolic effects of growth factors and polycyclic aromatic hydrocarbons on cultured human placental cells of early and late gestation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 72, 718–723.

- Hall, C.S., Ballechey E.L., 1932. A study of the rat's behavior in a field: A contribution to method in comparative psychology. University of California Publications in Psychology 6:1-12.
- Hallén, I.P., Jorhem, L., Oskarsson, A., 1995. Placental and lactational transfer of lead in rats: a study on the lactational process and effects on offspring. *Arch. Toxicol.* 69, 596–602.
- Halliwell, B., 2006. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J. Neurochem.* 97, 1634–1658.
- Handley, S.L., Mithani, S., 1984. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of “fear”-motivated behaviour. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol* 327, 1–5.
- Hertz-Picciotto, I., Delwiche, L., 2009. The rise in autism and the role of age at diagnosis. *Epidemiology* 20, 84–90.
- Hess, H.H., Pope, A., 1953. Ultramicrospectrophotometric determination of cytochrome oxidase for quantitative histochemistry. *J. Biol. Chem.* 204, 295–306.
- Himwich WA, 1962a. Biochemical and neurophysiological development of the brain in the neonatal period.
- Himwich, W.A., 1962b. Neurochemistry of aging. *Postgrad Med* 31, 195–200.
- Hirai, K., Aliev, G., Nunomura, A., Fujioka, H., Russell, R.L., Atwood, C.S., Johnson, A.B., Kress, Y., Vinters, H.V., Tabaton, M., Shimohama, S., Cash, A.D., Siedlak, S.L., Harris, P.L., Jones, P.K., Petersen, R.B., Perry, G., Smith, M.A., 2001. Mitochondrial abnormalities in Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 21, 3017–3023.
- Holland, M.R., Jones, H.H., Berdowski, J., Bleeker, A., Visschedijk, A.J.H., 2001. Economic Evaluation of Air Quality Targets for PAHs. AEA Technology/TNO, Final report for European Commission DG Environment.
- Hood, D.B., Nayyar, T., Ramesh, A., Greenwood, M., Inyang, F., 2000. Modulation in the developmental expression profile of Sp1 subsequent to transplacental exposure of fetal rats to desorbed benzo[a]pyrene following maternal inhalation. *Inhal Toxicol* 12, 511–535.
- Hooker, D., 1952. The prenatal origin of behavior. Lawrence, Kansas: Kansas University press.
- IARC Monographs vol 92, 2010. Some Non-Heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and some related exposures.
- IARC Monographs vol 32, 1983. Evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans, polynuclear aromatic compounds, part I, chemical, environmental and experimental data.
- INRS, Risque chimique, dossier INRS, extrait du site www.inrs.fr. Mise à jour 18/09/2008
- INERIS, 2006. Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques. HAP
- Jackson, P.B., Boccutto, L., Skinner, C., Collins, J.S., Neri, G., Gurrieri, F., Schwartz, C.E., 2009. Further evidence that the rs1858830 C variant in the promoter region of the MET gene is associated with autistic disorder. *Autism Res* 2, 232–236.
- Jacobson, J.L., Jacobson, S.W., Humphrey, H.E., 1990. Effects of in utero exposure to polychlorinated biphenyls and related contaminants on cognitive functioning in young children. *J. Pediatr* 116, 38–45.
- Jamon, M., Clarac, F., 1998. Early walking in the neonatal rat: a kinematic study. *Behav. Neurosci.* 112, 1218–1228.
- Jayasekara, S., Sharma, R.P., Drown, D.B., 1992. Effects of benzo[a]pyrene on steady-state levels of biogenic amines and metabolizing enzymes in mouse brain regions. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 24, 1–12.
- JECFA. Summary and conclusions. Sixty-first meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Rome, June 2003.
- Jedrychowski, W., Whyatt, R.M., Camann, D.E., Bawle, U.V., Peki, K., Spengler, J.D., Dumyahn, T.S., Penar, A., Perera, F.F., 2003. Effect of prenatal PAH exposure on birth outcomes and neurocognitive development in a cohort of newborns in Poland. Study design and preliminary ambient data. *Int J Occup Med Environ Health* 16, 21–29.
- Jedrychowski, W., Perera, F., Jankowski, J., Butscher, M., Mroz, E., Flak, E., Kaim, I., Lisowska-Miszczuk, I., Skarupa, A., Sowa, A., 2011a. Effect of exclusive breastfeeding on the

- development of children's cognitive function in the Krakow prospective birth cohort study. *Eur J Pediatr*.
- Jedrychowski, W., Perera, F.P., Tang, D., Stigter, L., Mroz, E., Flak, E., Spengler, J., Budzyn-Mrozek, D., Kaim, I., Jacek, R., 2011b. Impact of barbecued meat consumed in pregnancy on birth outcomes accounting for personal prenatal exposure to airborne polycyclic aromatic hydrocarbons: Birth cohort study in Poland. *Nutrition* (Burbank, Los Angeles County, Calif.).
- Jeng, H.A., 2010. Chemical composition of ambient particulate matter and redox activity. *Environ Monit Assess* 169, 597–606.
- Jett, D.A., Navoa, R.V., Lyons, M.A., 1999. Additive inhibitory action of chlorpyrifos and polycyclic aromatic hydrocarbons on acetylcholinesterase activity in vitro. *Toxicol. Lett* 105, 223–229.
- Jones, K.L., Smith, D.W., 1973. Recognition of the fetal alcohol syndrome in early infancy. *Lancet* 302, 999–1001.
- Joseph, R., 1999. Environmental influences on neural plasticity, the limbic system, emotional development and attachment: a review. *Child Psychiatry Hum Dev* 29, 189–208.
- Josephy, P.D., Guengerich, F.P., Miners, J.O., 2005. "Phase I" and "Phase II" drug metabolism: terminology that we should phase out? *Drug Metabolism Reviews* 37, 575–580.
- Kanner, L., 1943. Autistic disturbance of affective contact. *Nervous Child*, 2, 217-250.
- Kang, J.J., Fang, H.W., 1997. Polycyclic aromatic hydrocarbons inhibit the activity of acetylcholinesterase purified from electric eel. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 238, 367–369.
- Kao, J., Patterson, F.K., Hall, J., 1985. Skin penetration and metabolism of topically applied chemicals in six mammalian species, including man: an in vitro study with benzo[a]pyrene and testosterone. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 81, 502–516.
- Kelvin, E.A., Edwards, S., Jedrychowski, W., Schleicher, R.L., Camann, D., Tang, D., Perera, F.P., 2009. Modulation of the effect of prenatal PAH exposure on PAH-DNA adducts in cord blood by plasma antioxidants. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev* 18, 2262–2268.
- Kessler, R.C., Berglund, P., Demler, O., Jin, R., Merikangas, K.R., Walters, E.E., 2005. Lifetime prevalence and age-of-onset distributions of DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. *Arch. Gen. Psychiatry* 62, 593–602.
- Kilburn, K.H., Warshaw, R.H., 1995. Neurotoxic effects from residential exposure to chemicals from an oil reprocessing facility and superfund site. *Neurotoxicol Teratol* 17, 89–102.
- Kim, S.R., Halden, R.U., Buckley, T.J., 2008. Polycyclic aromatic hydrocarbons in human milk of nonsmoking U.S. women. *Environ. Sci. Technol* 42, 2663–2667.
- Kishikawa, N., Wada, M., Kuroda, N., Akiyama, S., Nakashima, K., 2003. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in milk samples by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci* 789, 257–264.
- Kjellstrom, T., Kennedy, P., Walis, S., et al. 1989. Physical and mental development of children with prenatal exposure to mercury from fish. Stage 2: Interviews and psychological tests at age 6. Report 3642: Solna, Sweden
- Knuckles, M.E., Inyang, F., Ramesh, A., 2001. Acute and subchronic oral toxicities of benzo[a]pyrene in F-344 rats. *Toxicol. Sci* 61, 382–388.
- Kogan, M.D., Blumberg, S.J., Schieve, L.A., Boyle, C.A., Perrin, J.M., Ghandour, R.M., Singh, G.K., Strickland, B.B., Trevathan, E., van Dyck, P.C., 2009. Prevalence of parent-reported diagnosis of autism spectrum disorder among children in the US, 2007. *Pediatrics* 124, 1395–1403.
- Konstandi, M., Harkitis, P., Thermos, K., Ogren, S.O., Johnson, E.O., Tzimas, P., Marselos, M., 2007. Modification of inherent and drug-induced dopaminergic activity after exposure to benzo(alpha)pyrene. *Neurotoxicology* 28, 860–867.
- Kotin, P., Falk, H.L., Busser, R., 1959. Distribution, retention, and elimination of ¹⁴C -3,4-benzo(a)pyrene after administration to mice and rats. *J Natl Cancer Inst*, 23, 541-555.
- Koupernik, C., Dailly, P., 1972. Développement neuropsychique du nourrisson. Presses Universitaires de France.
- Kraemer, P.J., Gilbert, M.E., Innis, N.K., 1983. The influence of cue type and configuration upon radial maze performance in the rat. *Animal Learning and Behavior* 11(3), 373-380.

- Labie, D., 2007. [Developmental neurotoxicity of industrial chemicals]. *Med Sci (Paris)* 23, 868–872.
- Landrigan, P.J., Sonawane, B., Mattison, D., McCally, M., Garg, A., 2002. Chemical contaminants in breast milk and their impacts on children's health: an overview. *Environ. Health Perspect* 110, A313–315.
- Landrigan, P.J., Kimmel, C.A., Correa, A., Eskenazi, B., 2004. Children's health and the environment: public health issues and challenges for risk assessment. *Environ. Health Perspect.* 112, 257–265.
- Landrigan, P.J., Sonawane, B., Butler, R.N., Trasande, L., Callan, R., Droller, D., 2005. Early environmental origins of neurodegenerative disease in later life. *Environ. Health Perspect* 113, 1230–1233.
- Landrigan, P.J., 2010. What causes autism? Exploring the environmental contribution. *Curr. Opin. Pediatr.* 22, 219–225.
- Landrigan, P.J., Goldman, L.R., 2011. Children's vulnerability to toxic chemicals: a challenge and opportunity to strengthen health and environmental policy. *Health Aff (Millwood)* 30, 842–850.
- Landrigan, P., Lambertini, L., Birnbaum, L., 2012. A Research Strategy to Discover the Environmental Causes of Autism and Neurodevelopmental Disabilities. *Environmental health perspectives.*
- Lanphear, B.P., Vorhees, C.V., Bellinger, D.C., 2005. Protecting children from environmental toxins. *PLoS Med.* 2, e61.
- Larsson, B.K., Sahlberg, G.P., Eriksson, A.T., Busk, L.A., 1983. Polycyclic aromatic hydrocarbons in grilled food. *J. Agric. Food Chem* 31, 867–873.
- Larsson, B.K., 1986. Formation of polycyclic aromatic hydrocarbons during the smoking and grilling of food. *Prog. Clin. Biol. Res.* 206, 169–180.
- LeDoux, J., 2007. The amygdala. *Curr. Biol* 17, R868–874.
- Li, Z., Mulholland, J.A., Romanoff, L.C., Pittman, E.N., Trinidad, D.A., Lewin, M.D., Sjödin, A., 2010. Assessment of non-occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons through personal air sampling and urinary biomonitoring. *J Environ Monit* 12, 1110–1118.
- Li, Z., Chadalapaka, G., Ramesh, A., Khoshbouei, H., Maguire, M., Safe, S., Rhoades, R.E., Clark, R., Jules, G., McCallister, M., Aschner, M., Hood, D.B., 2011. PAH Particles Perturb Prenatal Processes and Phenotypes: Protection from Deficits in Object Discrimination Afforded by Dampening of Brain-Oxidoreductase Following in utero Exposure to Inhaled Benzo(a)pyrene. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology.*
- Liu, H.-H., Lin, M.-H., Chan, C.-I., Chen, H.-L., 2010. Oxidative damage in foundry workers occupationally co-exposed to PAHs and metals. *Int J Hyg Environ Health* 213, 93–98.
- Lodovici, M., Dolara, P., Casalini, C., Ciappellano, S., Testolin, G., 1995. Polycyclic aromatic hydrocarbon contamination in the Italian diet. *Food Addit Contam* 12, 703–713.
- Lucchini, R., Albin, E., Placidi, D., Alessio, L., 2000. Mechanism of neurobehavioral alteration. *Toxicol. Lett* 112-113, 35–39.
- Madhavan, N.D., Naidu, K.A., 1995. Polycyclic aromatic hydrocarbons in placenta, maternal blood, umbilical cord blood and milk of Indian women. *Hum Exp Toxicol* 14, 503–506.
- Maitre JF. *Revue des différents tests comportementaux disponible pour le criblage des anxiolytiques. Mise au point au laboratoire du labyrinthe en croix surélevée. Présentée pour l'obtention du doctorat de 3ème cycle en pharmacie. Nancy, Université Nancy 1. (1991).*
- Majchrzak, R., Sroczynski, J., Chelmecka, E., 1990. [Evaluation of the nervous system in workers in the furnace and coal divisions of the coke-producing plants]. *Med Pr* 41, 108–113.
- Mancuso, M., Filosto, M., Bosetti, F., Ceravolo, R., Rocchi, A., Tognoni, G., Manca, M.L., Solaini, G., Siciliano, G., Murri, L., 2003. Decreased platelet cytochrome c oxidase activity is accompanied by increased blood lactate concentration during exercise in patients with Alzheimer disease. *Exp. Neurol.* 182, 421–426.

- Markram, H., Rinaldi, T., Markram, K., 2007. The intense world syndrome--an alternative hypothesis for autism. *Front Neurosci* 1, 77–96.
- Marsh, D.O., Clarkson, T.W., Cox, C., Myers, G.J., Amin-Zaki, L., Al-Tikriti, S., 1987. Fetal methylmercury poisoning. Relationship between concentration in single strands of maternal hair and child effects. *Arch. Neurol.* 44, 1017–1022.
- Martí-Cid, R., Llobet, J.M., Castell, V., Domingo, J.L., 2008. Evolution of the dietary exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in Catalonia, Spain. *Food Chem. Toxicol* 46, 3163–3171.
- Martorell, I., Perelló, G., Martí-Cid, R., Castell, V., Llobet, J.M., Domingo, J.L., 2010. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in foods and estimated PAH intake by the population of Catalonia, Spain: Temporal trend. *Environ Int.*
- Maurer, I., Zierz, S., Möller, H.J., 2000. A selective defect of cytochrome c oxidase is present in brain of Alzheimer disease patients. *Neurobiol. Aging* 21, 455–462.
- Mazmanian, D.S., Roberts, W.A., 1983. Spatial memory in rats under restricted viewing conditions. *Learning and Motivation* 14(2), 123-139.
- McCallister, M.M., Maguire, M., Ramesh, A., Aimin, Q., Liu, S., Khoshbouei, H., Aschner, M., Ebner, F.F., Hood, D.B., 2008. Prenatal exposure to benzo(a)pyrene impairs later-life cortical neuronal function. *Neurotoxicology* 29, 846–854.
- Mendola, P., Selevan, S.G., Gutter, S., Rice, D., 2002. Environmental factors associated with a spectrum of neurodevelopmental deficits. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 8, 188–197.
- Menzie, C.A., Potocki, B.B., Santodonato, J., 1992. Exposure to carcinogenic PAHs in the environment. *Environmental Science & Technology* 26, 1278–1284.
- Miodovnik, A., 2011. Environmental neurotoxicants and developing brain. *Mt. Sinai J. Med* 78, 58–77.
- Montgomery, K.C., 1955. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. *J Comp Physiol Psychol* 48, 254–260.
- Mumtaz, M.M., Ruiz, P., De Rosa, C.T., 2007. Toxicity assessment of unintentional exposure to multiple chemicals. *Toxicol. Appl. Pharmacol* 223, 104–113.
- Nakano, M., Takagi, N., Takagi, K., Funakoshi, H., Matsumoto, K., Nakamura, T., Takeo, S., 2007. Hepatocyte growth factor promotes the number of PSD-95 clusters in young hippocampal neurons. *Exp. Neurol* 207, 195–202.
- National Research Council, 2000. *Scientific Frontiers in Developmental Toxicology and Risk Assessment*. Washington, DC: National Academy Press.
- Needleman, H.L., Gunnoe, C., Leviton, A., Reed, R., Peresie, H., Maher, C., Barrett, P., 1979. Deficits in psychologic and classroom performance of children with elevated dentine lead levels. *N. Engl. J. Med.* 300, 689–695.
- Neubert, D., 1988. Significance of pharmacokinetic variables in reproductive and developmental toxicity. *Xenobiotica* 18 Suppl 1, 45–58.
- Neubert, D., Tapken, S., 1988. Transfer of benzo(a)pyrene into mouse embryos and fetuses. *Arch. Toxicol.* 62, 236–239.
- Ng, F., Berk, M., Dean, O., Bush, A.I., 2008. Oxidative stress in psychiatric disorders: evidence base and therapeutic implications. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 11, 851–876.
- Nicholson, T.E., Renton, K.W., 1999. Modulation of cytochrome P450 by inflammation in astrocytes. *Brain Res.* 827, 12–18.
- Nie, J.-S., Zhang, H.-M., Sun, J.-Y., Shi, Y.-T., Wang, F., Zeng, P., Wang, L.-P., Song, J., Wang, J., Liu, H.-J., Niu, Q., 2008. [Characteristic of the neurobehavioral functional changes in coke oven workers]. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi* 42, 25–29.
- Niu, Q., Zhang, H., Li, X., Li, M., 2009. B[a]P-induced neurobehavioral function and neurotransmitter alterations in coke oven workers. *Occup Environ Med.*
- Ohl, F., 2003. Testing for anxiety. *Clinical Neuroscience Research* 3(4-5), 233-238.
- Olney, J.W., 2002. New insights and new issues in developmental neurotoxicology. *Neurotoxicology* 23, 659–668.

- Olton, D.S., Samuelson, R.J., 1976. Remembrance of places passed: Spatial memory in rats. *Journal of Experimental Psychology. Animal Behavior Processes* 2, 97-116.
- OMS/IPCS, 1998. Selected Non-heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Environmental Health Criteria* 202. International Programme on Chemical Safety, World Health Organization, Geneva.
- Organisation de Coopération et de Développement Economiques 2007. Guideline 426: Etude de neurotoxicité pour le développement.
- Otto, D.A., Skalik, I., House, D.E., Hudnell, H.K., 1996. Neurobehavioral Evaluation System (NES): comparative performance of 2nd-, 4th-, and 8th-grade Czech children. *Neurotoxicol Teratol* 18, 421-428.
- Otto, D., Skalik, I., Bahboh, R., Hudnell, K., Srám, R., 1997. Neurobehavioral performance of Czech school children born in years of maximal air pollution [Abstract] *Neurotoxicology* 18, 903.
- Palayer, J., Degardin, P., Lohest, P., Mourey, V., Pereira-Ramos, L., 1997. Le point sur... Les Hydrocarbures aromatiques polycycliques. Agence de l'eau Seine-Normandie, direction de la recherche et des études sur l'agriculture et les milieux, service environnement.
- Pan, C.-H., Chan, C.-C., Huang, Y.-L., Wu, K.-Y., 2008. Urinary 1-hydroxypyrene and malondialdehyde in male workers in Chinese restaurants. *Occup Environ Med* 65, 732-735.
- Patin, V., Lordi, B., Vincent, A., Thoumas, J.L., Vaudry, H., Caston, J., 2002. Effects of prenatal stress on maternal behavior in the rat. *Brain Res. Dev. Brain Res* 139, 1-8.
- Patin, V., Lordi, B., Vincent, A., Caston, J., 2005. Effects of prenatal stress on anxiety and social interactions in adult rats. *Brain Res. Dev. Brain Res* 160, 265-274.
- Pelkonen, O., 1980a. Environmental influences on human foetal and placental xenobiotic metabolism. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 18, 17-24.
- Pelkonen, O., 1980b. Biotransformation of xenobiotics in the fetus. *Pharmacol. Ther.* 10, 261-281.
- Pellow, S., Chopin, P., File, S.E., Briley, M., 1985. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neurosci. Methods* 14, 149-167.
- Perera, F.P., Whyatt, R.M., Jedrychowski, W., Rauh, V., Manchester, D., Santella, R.M., Ottman, R., 1998. Recent developments in molecular epidemiology: A study of the effects of environmental polycyclic aromatic hydrocarbons on birth outcomes in Poland. *Am. J. Epidemiol* 147, 309-314.
- Perera, F.P., Jedrychowski, W., Rauh, V., Whyatt, R.M., 1999. Molecular epidemiologic research on the effects of environmental pollutants on the fetus. *Environ. Health Perspect* 107 Suppl 3, 451-460.
- Perera, F.P., Rauh, V., Tsai, W.-Y., Kinney, P., Camann, D., Barr, D., Bernert, T., Garfinkel, R., Tu, Y.-H., Diaz, D., Dietrich, J., Whyatt, R.M., 2003. Effects of transplacental exposure to environmental pollutants on birth outcomes in a multiethnic population. *Environ. Health Perspect* 111, 201-205.
- Perera, F.P., Rauh, V., Whyatt, R.M., Tang, D., Tsai, W.Y., Bernert, J.T., Tu, Y.H., Andrews, H., Barr, D.B., Camann, D.E., Diaz, D., Dietrich, J., Reyes, A., Kinney, P.L., 2005a. A summary of recent findings on birth outcomes and developmental effects of prenatal ETS, PAH, and pesticide exposures. *Neurotoxicology* 26, 573-587.
- Perera, F.P., Tang, D., Rauh, V., Lester, K., Tsai, W.Y., Tu, Y.H., Weiss, L., Hoepner, L., King, J., Del Priore, G., Lederman, S.A., 2005b. Relationships among polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts, proximity to the World Trade Center, and effects on fetal growth. *Environ. Health Perspect* 113, 1062-1067.
- Perera, F.P., Rauh, V., Whyatt, R.M., Tsai, W.-Y., Tang, D., Diaz, D., Hoepner, L., Barr, D., Tu, Y.-H., Camann, D., Kinney, P., 2006. Effect of prenatal exposure to airborne polycyclic aromatic hydrocarbons on neurodevelopment in the first 3 years of life among inner-city children. *Environ. Health Perspect* 114, 1287-1292.
- Perera, F.P., Li, Z., Whyatt, R., Hoepner, L., Wang, S., Camann, D., Rauh, V., 2009. Prenatal airborne polycyclic aromatic hydrocarbon exposure and child IQ at age 5 years. *Pediatrics* 124, e195-202.

- Perera, F.P., Wang, S., Vishnevetsky, J., Zhang, B., Cole, K.J., Tang, D., Rauh, V., Phillips, D.H., 2011. PAH/Aromatic DNA Adducts in Cord Blood and Behavior Scores in New York City Children. *Environ Health Perspect.*
- Perera, F., Li, T.Y., Lin, C., Tang, D., 2012a. Effects of prenatal polycyclic aromatic hydrocarbon exposure and environmental tobacco smoke on child IQ in a Chinese cohort. *Environmental Research.*
- Perera, F.P., Tang, D., Wang, S., Vishnevetsky, J., Zhang, B., Diaz, D., Camann, D., Rauh, V., 2012b. Prenatal Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) Exposure and Child Behavior at Age 6-7 Years. *Environ. Health Perspect.* 120, 921–926.
- Pfannhauser, W., 1991. Polynuclear aromatic hydrocarbons (PAH) in food and selected vegetables in Austria. *MittGeb Lebensmittelunters Hyg.* 82, 66-79.
- Phelps, E.A., LeDoux, J.E., 2005. Contributions of the amygdala to emotion processing: from animal models to human behavior. *Neuron* 48, 175–187.
- Phillips, D.H., 1999. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the diet. *Mutat. Res* 443, 139–147.
- Raha, S., Robinson, B.H., 2001. Mitochondria, oxygen free radicals, and apoptosis. *Am. J. Med. Genet.* 106, 62–70.
- Ramesh, A., Walker, S.A., Hood, D.B., Guillén, M.D., Schneider, K., Weyand, E.H., 2004. Bioavailability and risk assessment of orally ingested polycyclic aromatic hydrocarbons. *Int. J. Toxicol.* 23, 301–333.
- Ravindranath, V., Bhamre, S., Bhagwat, S.V., Anandatheerthavarada, H.K., Shankar, S.K., Tirumalai, P.S., 1995. Xenobiotic metabolism in brain. *Toxicol. Lett* 82-83, 633–638.
- Reddy, P.H., McWeeney, S., Park, B.S., Manczak, M., Gutala, R.V., Partovi, D., Jung, Y., Yau, V., Searles, R., Mori, M., Quinn, J., 2004. Gene expression profiles of transcripts in amyloid precursor protein transgenic mice: up-regulation of mitochondrial metabolism and apoptotic genes is an early cellular change in Alzheimer's disease. *Hum. Mol. Genet.* 13, 1225–1240.
- Reed, M.D., Besunder, J.B., 1989. Developmental pharmacology: ontogenic basis of drug disposition. *Pediatr. Clin. North Am* 36, 1053–1074.
- Rice, D., Barone, S., 2000. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. *Environ. Health Perspect* 108 Suppl 3, 511–533.
- Rich, K.J., Boobis, A.R., 1997. Expression and inducibility of P450 enzymes during liver ontogeny. *Microsc. Res. Tech.* 39, 424–435.
- Rodier, P.M., 1994. Vulnerable periods and processes during central nervous system development. *Environ. Health Perspect* 102 Suppl 2, 121–124.
- Rodier, P.M., Ingram, J.L., Tisdale, B., Croog, V.J., 1997. Linking etiologies in humans and animal models: studies of autism. *Reprod. Toxicol.* 11, 417–422.
- Rodier, P.M., 2000. The early origins of autism. *Sci. Am.* 282, 56–63.
- Rodier, P.M., 2004. Environmental causes of central nervous system maldevelopment. *Pediatrics* 113, 1076–1083.
- Rouet, P., Alexandrov, K., Markovits, P., Frayssinet, C., Dansette, P.M., 1981. Metabolism of benzo[a]pyrene by brain microsomes of fetal and adult rats and mice. Induction by 5,6 benzoflavone, comparison with liver and lung microsomal activities. *Carcinogenesis* 2, 919–926.
- Rychen, G., Ducoulombier-Crépineau, C., Grova, N., Jurjanz, S., Feidt, C., 2005. Modalités et risques de transfert des polluants organiques persistants vers le lait. *INRA Productions Animales* 18, 355-366.
- Saghir, S.A., Khan, S.A., McCoy, A.T., 2012. Ontogeny of mammalian metabolizing enzymes in humans and animals used in toxicological studies. *Crit. Rev. Toxicol.* 42, 323–357.
- Sah, P., Faber, E.S.L., Lopez De Armentia, M., Power, J., 2003. The amygdaloid complex: anatomy and physiology. *Physiol. Rev* 83, 803–834.

- Salim, S., Asghar, M., Taneja, M., Hovatta, I., Chugh, G., Vollert, C., Vu, A., 2011. Potential contribution of oxidative stress and inflammation to anxiety and hypertension. *Brain Res.* 1404, 63–71.
- Salum, C., Roque-da-Silva, A.C., Morato, S., 2003. Conflict as a determinant of rat behavior in three types of elevated plus-maze. *Behav. Processes* 63, 87–93.
- Santodonato, J., Howard, P., Basu, D., 1981. Health and ecological assessment of polynuclear aromatic hydrocarbons. *J Environ Pathol Toxicol* 5, 1–364.
- Sanyal, M.K., Mercan, D., Belanger, K., Santella, R.M., 2007. DNA adducts in human placenta exposed to ambient environment and passive cigarette smoke during pregnancy. *Birth Defects Res. Part A Clin. Mol. Teratol.* 79, 289–294.
- Sas, K., Robotka, H., Toldi, J., Vécsei, L., 2007. Mitochondria, metabolic disturbances, oxidative stress and the kynurenine system, with focus on neurodegenerative disorders. *J. Neurol. Sci.* 257, 221–239.
- Saunders, C.R., Shockley, D.C., Knuckles, M.E., 2001. Behavioral effects induced by acute exposure to benzo(a)pyrene in F-344 rats. *Neurotox Res* 3, 557–579.
- Saunders, C.R., Ramesh, A., Shockley, D.C., 2002. Modulation of neurotoxic behavior in F-344 rats by temporal disposition of benzo(a)pyrene. *Toxicol. Lett* 129, 33–45.
- Saunders, C.R., Shockley, D.C., Knuckles, M.E., 2003. Fluoranthene-induced neurobehavioral toxicity in F-344 rats. *Int. J. Toxicol* 22, 263–276.
- Saunders, C.R., Das, S.K., Ramesh, A., Shockley, D.C., Mukherjee, S., 2006. Benzo(a)pyrene-induced acute neurotoxicity in the F-344 rat: role of oxidative stress. *J Appl Toxicol* 26, 427–438.
- Schafer, K.S., Kegley, S.E., 2002. Persistent toxic chemicals in the US food supply. *J Epidemiol Community Health* 56, 813–817.
- Schroeder, H., Toniolo, A.M., Nehlig, A., Desor, D., 1998. Long-term effects of early diazepam exposure on social differentiation in adult male rats subjected to the diving-for-food situation. *Behav. Neurosci.* 112, 1209–1217.
- Scientific Committee on Food : Opinion of the Scientific Committee on Food on the risks to human health of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in food, 2002.
http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out153_en.pdf
- Sguassero, Y. Durée optimale de l'allaitement maternel exclusif : Commentaire de la BSG (dernière révision : 28 mars 2008). *Bibliothèque de Santé Génésique de l'OMS* ; Genève : Organisation mondiale de la Santé. <http://www.who.int/topics/breastfeeding/fr/>
- Sheng, L., Ding, X., Ferguson, M., McCallister, M., Rhoades, R., Maguire, M., Ramesh, A., Aschner, M., Campbell, D., Levitt, P., Hood, D.B., 2010. Prenatal Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Exposure Leads to Behavioral Deficits and Downregulation of Receptor Tyrosine Kinase, MET. *Toxicol Sci.*
- Sheu, H.L., Lee, W.J., Lin, S.J., Fang, G.C., Chang, H.C., You, W.C., 1997. Particle-bound PAH content in ambient air. *Environ. Pollut.* 96, 369–382.
- Shimada, T., Oda, Y., Gillam, E.M., Guengerich, F.P., Inoue, K., 2001. Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons and other procarcinogens by cytochromes P450 1A1 and P450 1B1 allelic variants and other human cytochromes P450 in *Salmonella typhimurium* NM2009. *Drug Metab. Dispos.* 29, 1176–1182.
- Shimada, T., 2006. Xenobiotic-metabolizing enzymes involved in activation and detoxification of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Drug Metab. Pharmacokinet* 21, 257–276.
- Shin, L.M., Liberzon, I., 2010. The neurocircuitry of fear, stress, and anxiety disorders. *Neuropsychopharmacology* 35, 169–191.
- Singh, V.K., Patel, D.K., Jyoti, Ram, S., Mathur, N., Siddiqui, M.K.J., 2008a. Blood levels of polycyclic aromatic hydrocarbons in children and their association with oxidative stress indices: an Indian perspective. *Clin. Biochem.* 41, 152–161.
- Singh, V.K., Singh, J., Anand, M., Kumar, P., Patel, D.K., Krishna Reddy, M.M., Javed Siddiqui, M.K., 2008b. Comparison of polycyclic aromatic hydrocarbon levels in placental tissues of Indian women with full- and preterm deliveries. *Int J Hyg Environ Health* 211, 639–647.
- Slikker, W., Acuff, K., Boyes, W.K., Chelonis, J., Crofton, K.M., Dearlove, G.E., Li, A., Moser, V.C., Newland, C., Rossi, J., Schantz, S., Sette, W., Sheets, L., Stanton, M., Tyl, S., Sobotka, T.J., 2005. Behavioral test methods workshop. *Neurotoxicol Teratol* 27, 417–427.

- Slikker, W., Bowyer, J.F., 2005. Biomarkers of adult and developmental neurotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol* 206, 255–260.
- Sly, P.D., Flack, F., 2008. Susceptibility of children to environmental pollutants. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1140, 163–183.
- Smart, J.L., Dobbing, J., 1971a. Vulnerability of developing brain. VI. Relative effects of foetal and early postnatal undernutrition on reflex ontogeny and development of behaviour in the rat. *Brain Res.* 33, 303–314.
- Smart, J.L., Dobbing, J., 1971b. Vulnerability of developing brain. II. Effects of early nutritional deprivation on reflex ontogeny and development of behaviour in the rat. *Brain Res.* 28, 85–95.
- Smart, J.L., 1991. Critical periods in brain development. *Ciba Found. Symp.* 156, 109–124; discussion 124–128.
- Solomon, G.M., Weiss, P.M., 2002. Chemical contaminants in breast milk: time trends and regional variability. *Environ. Health Perspect.* 110, A339–347.
- Somogyi, A., Beck, H., 1993. Nurturing and breast-feeding: exposure to chemicals in breast milk. *Environ. Health Perspect.* 101 Suppl 2, 45–52.
- Sonawane, B.R., 1995. Chemical contaminants in human milk: an overview. *Environ. Health Perspect.* 103 Suppl 6, 197–205.
- Sousa, I., Clark, T.G., Toma, C., Kobayashi, K., Choma, M., Holt, R., Sykes, N.H., Lamb, J.A., Bailey, A.J., Battaglia, A., Maestrini, E., Monaco, A.P., 2009. MET and autism susceptibility: family and case-control studies. *Eur. J. Hum. Genet* 17, 749–758.
- Spear, L.P., 1990. Neurobehavioral assessment during the early postnatal period. *Neurotoxicol Teratol* 12, 489–495.
- Stejskalova, L., Vecerova, L., Pérez, L.M., Vrzal, R., Dvorak, Z., Nachtigal, P., Pavek, P., 2011. Aryl hydrocarbon receptor and aryl hydrocarbon nuclear translocator expression in human and rat placentas and transcription activity in human trophoblast cultures. *Toxicol. Sci.* 123, 26–36.
- Stelzner, D.J., 1971. The normal postnatal development of synaptic end-feet in the lumbosacral spinal cord and of responses in the hind limbs of the albino rat. *Exp. Neurol.* 31, 337–357.
- Stephanou, P., Konstandi, M., Pappas, P., Marselos, M., 1998. Alterations in central monoaminergic neurotransmission induced by polycyclic aromatic hydrocarbons in rats. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 23, 475–481.
- Strazielle, C., Krémarik, P., Ghersi-Egea, J.F., Lalonde, R., 1998. Regional brain variations of cytochrome oxidase activity and motor coordination in Lurcher mutant mice. *Exp Brain Res* 121, 35–45.
- Strazielle, C., Jazi, R., Verdier, Y., Qian, S., Lalonde, R., 2009. Regional brain metabolism with cytochrome c oxidase histochemistry in a PS1/A246E mouse model of autosomal dominant Alzheimer's disease: correlations with behavior and oxidative stress. *Neurochem. Int* 55, 806–814.
- Study Group of Minamata Disease. 1968. Congenital (or Fetal) Minamata Disease. In *Minamata Disease*: 93–118.
- Suk, W.A., Murray, K., Avakian, M.D., 2003. Environmental hazards to children's health in the modern world. *Mutat. Res.* 544, 235–242.
- Suzuki, S., Augerinos, G., Black, A.H., 1980. Stimulus control of spatial behavior on the eight-arm maze in rats. *Learning and Motivation* 11(1), 1-18.
- Sykes, S.E., Cheyne, J.A., 1976. The effects of prenatal and postnatal protein malnutrition of physical and motor development of the rat. *Dev Psychobiol* 9, 285–295.
- Tang, Y., Donnelly, K.C., Tiffany-Castiglioni, E., Mumtaz, M.M., 2003. Neurotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons and simple chemical mixtures. *J. Toxicol. Environ. Health Part A* 66, 919–940.
- Tang, D., Li, T., Liu, J.J., Chen, Y., Qu, L., Perera, F., 2006. PAH-DNA adducts in cord blood and fetal and child development in a Chinese cohort. *Environ. Health Perspect.* 114, 1297–1300.
- Tang, D., Li, T., Liu, J.J., Zhou, Z., Yuan, T., Chen, Y., Rauh, V.A., Xie, J., Perera, F., 2008. Effects of prenatal exposure to coal-burning pollutants on children's development in China. *Environ. Health Perspect* 116, 674–679.

- Thomson, B., Lake, R., Lill, R., 1996. The contribution of margarine to cancer risk from polycyclic aromatic hydrocarbons in the New Zealand diet, *Polycyclic Aromat. Compd.* 11, 177-184.
- Tilson, H.A., 1987. Behavioral indices of neurotoxicity: what can be measured? *Neurotoxicol Teratol* 9, 427-443.
- Tilson, H.A., 1998. Developmental neurotoxicology of endocrine disruptors and pesticides: identification of information gaps and research needs. *Environ. Health Perspect* 106 Suppl 3, 807-811.
- Tolman, E.C., 1925. Purpose and cognition: the determiners of animal learning. *Psychological Review* 32, 285-97.
- Tozuka, Y., Watanabe, N., Osawa, M., Toriba, A., Kizu, R., Hayakawa, K., 2004. Transfer of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons to Fetuses and Breast Mil of Rats Exposed to Diesel Exhaust. *Journal of Health Science* 50 (5), 497-502.
- Treit, D., Menard, J., 1997. Dissociations among the anxiolytic effects of septal, hippocampal, and amygdaloid lesions. *Behav. Neurosci* 111, 653-658.
- Ulbrich, B., Palmer, A.K., 1996. Neurobehavioral aspects of developmental toxicity testing. *Environ. Health Perspect* 104 Suppl 2, 407-412.
- US Centers for Disease Control and Prevention. Third National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals. [www.cdc.gov/exposurereport/pdf/ FourthReport.pdf](http://www.cdc.gov/exposurereport/pdf/FourthReport.pdf) (most current report). Published July 2005.
- US Centers for Disease Control and Prevention. Prevalence of autism spectrum disorders—Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, United States, 2006 [published correction appears in *MMWR Surveill Summ* 2010;59:956]. *MMWR Surveill Summ* 2009; 58: 1-20.
- US Environmental Protection Agency. The risk assessment guidelines of 1986. EPA/600/8-87/045. 1987
- US Environmental Protection Agency. Chemicals in Commerce Information System (chemical update system database). Washington, DC: US Environmental Protection Agency; 1998.
- US Environmental Protection Agency. Supplementary guidance for conducting health risk assessment of chemical mixtures. Washington DC. EPA/630/R-00/002. 2000.
- Uylings, H.B., van Eden, C.G., 1990. Qualitative and quantitative comparison of the prefrontal cortex in rat and in primates, including humans. *Prog. Brain Res.* 85, 31-62.
- Vaessen, H., Jekel, A., Wilbers, A., 1988. Dietary intake of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Toxicological & Environmental Chemistry* 16 (4), 281-294.
- Vaiserman, A., 2011. Early-life origin of adult disease: evidence from natural experiments. *Exp. Gerontol* 46, 189-192.
- Veyrand, B., Brosseau, A., Sarcher, L., Varlet, V., Monteau, F., Marchand, P., Andre, F., Le Bizec, B., 2007. Innovative method for determination of 19 polycyclic aromatic hydrocarbons in food and oil samples using gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry based on an isotope dilution approach. *J Chromatogr A* 1149, 333-344.
- Vollert, C., Zagaar, M., Hovatta, I., Taneja, M., Vu, A., Dao, A., Levine, A., Alkadhi, K., Salim, S., 2011. Exercise prevents sleep deprivation-associated anxiety-like behavior in rats: Potential role of oxidative stress mechanisms. *Behav. Brain Res.* 224, 233-240.
- Voutsas, D., Samara, C., 1998. Dietary intake of trace elements and polycyclic aromatic hydrocarbons via vegetables grown in an industrial Greek area. *Sci. Total Environ.* 218, 203-216.
- Walker, B., Jr, 2005. Pediatric environmental health. *J Natl Med Assoc* 97, 262-269.
- Walsh, R.N., Cummins, R.A., 1976. The Open-Field Test: a critical review. *Psychol Bull* 83, 482-504.
- Weiss, B., 2000. Vulnerability of children and the developing brain to neurotoxic hazards. *Environ. Health Perspect* 108 Suppl 3, 375-381.

- Weiss, B., Landrigan, P.J., 2000. The developing brain and the environment: an introduction. *Environ. Health Perspect.* 108 Suppl 3, 373–374.
- Werboff, J., Gottlieb, J.S., 1963. Drugs in pregnancy: behavioral teratology. *Obstetrical & Gynecological Survey* 18, 420–423.
- Windle, W.F., Fish, M.W., 1932. The development of the vestibular righting reflex in the cat. *The Journal of Comparative Neurology* 54, 85–96.
- Withey, J.R., Shedden, J., Law, F.P., Abedini, S., 1992. Distribution to the fetus and major organs of the rat following inhalation exposure to pyrene. *J Appl Toxicol* 12, 223–231.
- Withey, J.R., Shedden, J., Law, F.C., Abedini, S., 1993. Distribution of benzo[a]pyrene in pregnant rats following inhalation exposure and a comparison with similar data obtained with pyrene. *J Appl Toxicol* 13, 193–202.
- Wong-Riley, M.T., 1989. Cytochrome oxidase: an endogenous metabolic marker for neuronal activity. *Trends Neurosci* 12, 94–101.
- Wormley, D.D., Chirwa, S., Nayyar, T., Wu, J., Johnson, S., Brown, L.A., Harris, E., Hood, D.B., 2004a. Inhaled benzo(a)pyrene impairs long-term potentiation in the F1 generation rat dentate gyrus. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)* 50, 715–721.
- Wormley, D.D., Ramesh, A., Hood, D.B., 2004b. Environmental contaminant-mixture effects on CNS development, plasticity, and behavior. *Toxicol. Appl. Pharmacol* 197, 49–65.
- Wu, J., Ramesh, A., Nayyar, T., Hood, D.B., 2003. Assessment of metabolites and AhR and CYP1A1 mRNA expression subsequent to prenatal exposure to inhaled benzo(a)pyrene. *Int. J. Dev. Neurosci* 21, 333–346.
- WWF-UK Report June 1999, Chemical trespass: a toxic legacy Executive summary
- Xia, Y., Cheng, S., He, J., Liu, X., Tang, Y., Yuan, H., He, L., Lu, T., Tu, B., Wang, Y., 2011. Effects of subchronic exposure to benzo[a]pyrene (B[a]P) on learning and memory, and neurotransmitters in male Sprague-Dawley rat. *Neurotoxicology* 32, 188–198.
- Xue, W., Warshawsky, D., 2005. Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: a review. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 206, 73–93.
- Yeargin-Allsopp, M., Murphy, C.C., Oakley, G.P., Sikes, R.K., 1992. A multiple-source method for studying the prevalence of developmental disabilities in children: the Metropolitan Atlanta Developmental Disabilities Study. *Pediatrics* 89, 624–630.
- Yoon, E., Park, K., Lee, H., Yang, J.H., Lee, C., 2007. Estimation of excess cancer risk on time-weighted lifetime average daily intake of PAHs from food ingestion. *Hum Ecol Risk Assess* 13, 669–80.
- Zanieri, L., Galvan, P., Checchini, L., Cincinelli, A., Lepri, L., Donzelli, G.P., Del Bubba, M., 2007. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in human milk from Italian women: influence of cigarette smoking and residential area. *Chemosphere* 67, 1265–1274.
- Zhang, L., Connor, E.E., Chegini, N., Shiverick, K.T., 1995. Modulation by benzo[a]pyrene of epidermal growth factor receptors, cell proliferation, and secretion of human chorionic gonadotropin in human placental cell lines. *Biochem. Pharmacol* 50, 1171–1180.
- Zhang, H., Nie, J., Xue, C., Zhao, J., Ji, X., Li, M., Guo, W., Niu, Q., 2008. [Influence of benzo[a]pyrene on learning and memory and content of amino acid neurotransmitters in hippocampus of rats]. *Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi* 26, 546–548.
- Zheng, S., Qiu, X., Chen, B., Yu, X., Lin, K., Bian, M., Liu, Z., Huang, H., Yu, W., 2011. Toxicity evaluation of benzo[a]pyrene on the polychaete *Perinereis nuntia* using subtractive cDNA libraries. *Aquat Toxicol* 105, 279–291.
- Zhu, X., Perry, G., Moreira, P.I., Aliev, G., Cash, A.D., Hirai, K., Smith, M.A., 2006. Mitochondrial abnormalities and oxidative imbalance in Alzheimer disease. *J. Alzheimers Dis.* 9, 147–153.
- Zoladek, L., Roberts, W.A., 1978. The sensory basis of spatial memory in the rat. *Animal Learning & Behavior* 6, 77–81

VALORISATION SCIENTIFIQUE

Publications scientifiques

Acceptée

Crépeaux, G., Bouillaud-Kremarik, P., Sikhayeva, N., Rychen, G., Soulimani, R., Schroeder, H. 2012. Late effects of a perinatal exposure to a 16 PAH mixture: Increase of anxiety-related behaviours and decrease of regional brain metabolism in adult male rats. *Toxicology Letters*. 211(2), 105-13.

En révision

Chahin, A., Peiffer, J., Olry, J.C., **Crépeaux, G.**, Schroeder, H., Rychen, G., Guiavarc'h, Y. EROD activity induction in peripheral blood lymphocytes, liver and brain tissues of rats orally exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Food and Chemical Toxicology*.

Communications lors de congrès nationaux

Communications orales

Crépeaux, G., Kinzhebayeva, N., Perrin, J.L., Rychen, G., Soulimani, R., Schroeder, H. Exposition à un mélange d'Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques chez la rate gestante et allaitante : neurotoxicité juvénile à court et à long terme. *Colloque annuel de la Société Cerveau et Maladies Cérébrovasculaires, 20-21 Janvier 2011, Caen, France*

Crépeaux, G., Kinzhebayeva, N., Perrin, J.L., Rychen, G., Soulimani, R., Schroeder, H. Exposition à un mélange d'hydrocarbures aromatiques polycycliques chez la rate gestante et allaitante : neurotoxicité juvénile à court et à long terme. *Réunion de l'Association de Recherche en Toxicologie, 20-21 juin 2011, Paris, France*

Communications affichées

Crépeaux, G., Kinzhebayeva, N., Perrin, J.L., Rychen, G., Soulimani, R., Schroeder, H. Exposition à un mélange d'Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques chez la rate gestante et allaitante : neurotoxicité juvénile à court et à long terme. *Congrès Annuel de la Société Française de Toxicologie, 25-26 Novembre 2010, Paris, France*



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Toxicology Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/toxlet

Late effects of a perinatal exposure to a 16 PAH mixture: Increase of anxiety-related behaviours and decrease of regional brain metabolism in adult male rats

Guillemette Crépeaux^{*,1}, Pascaline Bouillaud-Kremarik, Nurgul Sikhayeva, Guido Rychen, Rachid Soulimani, Henri Schroeder

Unité de Recherche Animal et Fonctionnalités des Produits Animaux, INRA UC340, Nancy Université, Vandoeuvre-lès-Nancy, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 January 2012
Received in revised form 9 March 2012
Accepted 10 March 2012
Available online xxx

Keywords:

Polycyclic Aromatic Hydrocarbons
Neurotoxicity
Perinatal exposure
Anxiety
Cytochrome oxidase
Adult rats

ABSTRACT

Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) are ubiquitous pollutants originated from incomplete combustion processes. Ingestion of contaminated food is the main route of exposure for humans. These molecules are able to cross the placental barrier and are also found in breast milk. Since PAHs are neurotoxic agents, the potential adverse effects of a perinatal exposure of the developing brain is a key issue for public health especially concerning PAH mixture. In this study, female rats were exposed through diet to a mixture of 16 PAHs, at doses of 2 µg/kg/day or 200 µg/kg/day during gestation and 1.5 µg/kg/day or 150 µg/kg/day during breast-feeding period. To assess late neurotoxic effects in male offsprings, behavioural and cognitive tests were carried out and histochemical analyses using cytochrome oxidase as a cerebral metabolism marker were performed on adult animals. Results showed that anxiety-related behaviours significantly increased in exposed animals, but there was no significant alteration of motor activity and learning and memory abilities. Several brain areas of the limbic system showed a neuronal hypometabolism in exposed animals. This work highlights that exposure to PAHs at early stages of brain development can cause later troubles on behaviour and that PAHs are able to partly alter the central nervous system metabolism on adulthood.

© 2012 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Because of its high level of organization and its very sophisticated functions, the brain is often considered as the most complex organ. Even if the nervous system of an adult is described as a well-protected system (Rodier, 1994), brain sensitivity to neurotoxic chemicals is increased when exposure occurs during early developmental stages. It has been recognized that nervous system of foetus and neonate exhibit increased sensitivity to a number of environmental chemicals due to its immaturity, and to several sensitive processes (proliferation, migration, differentiation, synaptogenesis, gliogenesis, myelination and apoptosis) occurring from foetal life to many years in childhood (Landrigan et al., 2005). It has been estimated by the American National Academy of Sciences that 3% of brain developmental disorders, such as attention-deficit alter-

ation, mental retardation, autism spectrum disorders or learning disabilities, may be directly linked to exposure to environmental chemicals. Another 25% may result from an environmental insult occurring in combination with individual genetic predisposition (Miodovnik, 2011). Furthermore, it is important to note that early perturbations on brain development may rise to neurobehavioural disturbances expressed either in childhood or with delayed onset in adulthood (Olney, 2002). For instance evidence exists supporting the idea that lifelong susceptibility to anxiety disorders can be partly determined by environmental factors during early development (Gross and Hen, 2004).

Classified amongst persistent organic pollutants since 1998 by the Aarhus Protocol (United Nations Economic Commission for Europe, 1998), Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) consist of a large class of organic compounds that are constituted of two or more fused aromatic rings (Baek et al., 1991). PAHs are formed by the incomplete combustion or pyrolysis of organic matter and/or during various industrial processes. They are generally found as complex mixtures of varying composition (ATSDR, 1995). In 1984, US EPA classified 16 PAHs as priority pollutants based on their toxicity (especially carcinogenic properties), potential for human exposures, and frequency of occurrence at hazardous waste sites.

Abbreviations: B(a)P, benzo(a)pyrene; NMDA, N-methyl-D-aspartate; PAH, Polycyclic Aromatic Hydrocarbon; ROS, reactive oxygen species.

* Corresponding author at: URAFPA, INRA UC340, Faculté des Sciences et Technologies, BP 239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France. Tel.: +33 383 68 40 00; fax: +33 383 68 48 88.

E-mail address: guillemette.crepeaux@sbiol.uhp-nancy.fr (G. Crépeaux).

¹ <http://www.urafpa.fr>.

0378-4274/\$ – see front matter © 2012 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.toxlet.2012.03.005

In non-smokers, dietary intake is the major route of PAH exposure compared to inhalation (Menzie et al., 1992). The PAH contamination of food arises from environmental sources, industrial food processing and/or home food preparation (EC, 2002). PAH content in food samples and the type of food eaten by a given population are two important factors that contribute to the variations observed within exposure data reported amongst different studies. Total daily PAHs ingestion ranged from 3.70 µg/kg in United Kingdom (Dennis et al., 1983) to 12 µg/kg for an adult man in Spain (Martí-Cid et al., 2008). In the Dutch study published by de Vos et al. (1990), the PAH daily intake for an adult was estimated between 5 and 17 µg/kg. Finally it should be noticed that the PAH level of exposure via food consumption for a given population has increased from 8.4 to 12 µg/kg/day for an adult in 8 years (Falcó et al., 2003).

PAHs are now well established as human health hazards, especially due to their carcinogenic and mutagenic properties (IARC, 1983; Vyskocil et al., 2000). Neurotoxic effects of PAHs have not received much attention, whereas recent epidemiological and experimental data have been published (for review, see Schroeder, 2011). In humans, neurophysiological impairments were reported following exposure to several PAHs including benzo(a)pyrene (B(a)P) in plant workers (Majchrzak et al., 1990; Nie et al., 2008; Niu et al., 2009), and people living in the neighbourhood of contaminated places (Dayal et al., 1995; Kilburn and Warshaw, 1995; Dahlgren et al., 2003). In animal studies, B(a)P and fluoranthene were shown to induce different nervous system damages, including motor activity and anxiety level reductions, learning ability impairments, as well as neuromuscular and physiologic abnormalities (Saunders et al., 2002, 2003, 2006; Grova et al., 2007, 2008; Xia et al., 2011).

Currently, there is growing evidence that an early exposure to PAHs during pregnancy or breast-feeding may result in negative effects on foetal growth and child neurodevelopment. Exposure to PAHs occurs already *in utero* because these compounds are able to pass through the placenta (Madhavan and Naidu, 1995; Gladen et al., 2000; Singh et al., 2008), and during breast-feeding because they are capable of partitioning into breast milk (Del Bubba et al., 2005; Zanieri et al., 2007; Kim et al., 2008). In rodents, few studies showed some negative effects of a gestational or a lactating B(a)P exposure *in utero* and/or *via* breast milk on brain maturation and memory abilities measured through behavioural performances, glutamate NMDA receptor subunit expression, and long-term potentiation recording of pups exposed through the dam (Hood et al., 2000; Wormley et al., 2004a; Brown et al., 2007; McCallister et al., 2008; Bouayed et al., 2009a; Li et al., 2011). In addition, epidemiological data showed a significant association between a prenatal exposure to atmospheric PAHs and a developmental delay in intellectual development as well as a reduced IQ in children at respectively 3 and 5 years of age (Perera et al., 2006, 2009; Tang et al., 2008). Very recently, Perera et al. (2011) reported that a high level of exposure to PAHs during pregnancy, measured by DNA adducts in umbilical cord white blood cells, was correlated with higher symptom scores of anxious/depressed at 4.8 years and attention problems at 4.8 and 7 years. These data suggested that an early PAH exposure may adversely affect behaviour of developing children.

Thus, taken altogether, these data suggest that pollutants such as PAHs are hazardous substances for brain development. However, in animal studies the toxicity of only two PAHs, namely B(a)P and fluoranthene, has been usually assessed, leading to too restrictive conclusions in terms of human health. This demonstrates that there is a real need of data related to toxicity of chemical mixtures (Ramesh et al., 2004). Furthermore, a single and high level of exposure is often used within these studies, which does not reflect a real environmental dietary exposure, which is rather characterized by repeated and low doses of chemicals mixture over a longer period.

Consequently, the aim of the present study was to evaluate in rat pups the late consequences in terms of behaviour and brain metabolism of an perinatal exposure to a PAH mixture administered through the diet to the dam during both gestational and lactational periods.

2. Materials and methods

2.1. PAH mixture

The 16 PAHs were purchased from Sigma–Aldrich (St. Quentin Fallavier, France) as a powder for each compound (purity between 96% and 99%). Each PAH was weighed separately and the 16 PAHs were mixed into oil (Isio 4, Lesieur, Asnières sur Seine, France). To dissolve them, the mixture was sonicated (55 Hz) for 2 h at room temperature. The composition of the mixture was defined in order to respect the proportion of each PAH described in studies focusing on daily PAH dietary intake (EC, 2002; Martí-Cid et al., 2008; EFSA, 2008), as follow (w/w): phenanthrene (25%), naphthalene (17%), fluoranthene (11.5%), acenaphthene (10%), pyrene (8.5%), indeno[1,2,3-c,d]-pyrene (6%), chrysene (4%), anthracene (3.5%), benz[a]pyrene (2.5%), benzo[b]fluoranthene (2.5%), fluorene (2.5%), benz[a]anthracene (2%), benzo[k]fluoranthene (2%), acenaphthylene (1.5%), benzo[g,h,i]perylene (1%), dibenz[a,h]anthracene (0.5%).

2.2. Animals

Twenty female Wistar rats, weighing 175–199 g, were obtained from Harlan Laboratories (France). Upon arrival, the females were housed at 2 per cage. Animals were maintained under a reverse light cycle (lights on at 7 p.m., lights off at 7 a.m.), at a constant temperature (22 ± 2 °C) and a relative humidity of 55 ± 10%. Rats were given free access to food and water. After a 1-week period for acclimatization (Fig. 1), females underwent the exposure protocol (see Section 2.3 for details) each morning during a week. Then, females were mated with breeding males (2 females with 1 male) over day, and were examined the following evening by vaginal smear to assess successful mating. When occurring, the female was removed from the cage of the male and was housed individually. This day was considered as the day 0 of gestation (GD0). Then, female exposure to PAHs occurred daily from GD1 to postnatal day 21 (PND21). The day of birth was considered as PND0. On PND0 litters were reduced to 10 pups when possible, as recommended by the 426 OECD guideline (2007) in order to prevent the effects of litter size on pup development. Behavioural tests were performed at the adult stage (from PND60). On PND60 one male per litter was sacrificed, and the brain was removed for histological analyses.

All these experiments on animals were performed in respect with the rules provided by the European Union (Directive 2010/63/EU).

2.3. Doses and protocol of exposure

Two different doses were used. The first one, mentioned as Dose 1 in the present study, was of 2 µg/kg/day during gestation and 1.5 µg/kg/day during lactation. This lowest dose was calculated to model the quantity of PAHs daily ingested by a woman during pregnancy (9 months) and period of breast-feeding considered by the World Health Organization (6 months). The second dose, mentioned as Dose 2 in this study, corresponded to a 100-fold higher dose, i.e. 200 µg/kg/day during gestation and 150 µg/kg/day during lactation (Dose 2). This highest dose was considered to be toxic, as recommended by the 426 OECD guideline (2007) for assessment of the developmental neurotoxicity of chemical compounds. The PAH exposure started on GD1 and was stopped on PND21. To exclude the participation of a litter effect in the final results, the experiments were performed on at least 6 different litters for each group. Amongst the 20 females, 6 were allocated to the control group (fed with food added with Isio 4 oil only), 7 were exposed to the lowest dose of PAHs (Dose 1), and 7 were exposed to the highest one (Dose 2). The PAH exposure was made by daily feeding each female with 1 g of contaminated rat food. The contaminated food was prepared each morning before 9 a.m. by mixing 1 g of powder rat food usually used with water and sweet syrup in order to obtain a homogenous pastry. Then the appropriate volume of oil or the PAH solution was added according to the weight of each female. The pastry was presented as a pellet to animals. Each female was isolated in a small cage without sawdust and was given a 5 min meal. During the whole experimental period, all pellets were completely eaten by each female and no residual was found in the cage. The use of this protocol of exposure allowed the authors of the study to control daily the complete ingestion of contaminated food, and to guarantee the complete PAH intake.

2.4. Behavioural testing

From PND60, behavioural tests were performed on the same 2 males from each litter in order to assess the locomotor activity in the open-field, the level of anxiety in the elevated-plus maze, the short-term memory in the Y-maze, and the spatial memory performances in the eight-arm maze. For the open-field, the elevated-plus maze and the Y-maze, one test was carried out per day, within the same week. The eight-arm maze was performed over the two following weeks during 14 consecutive

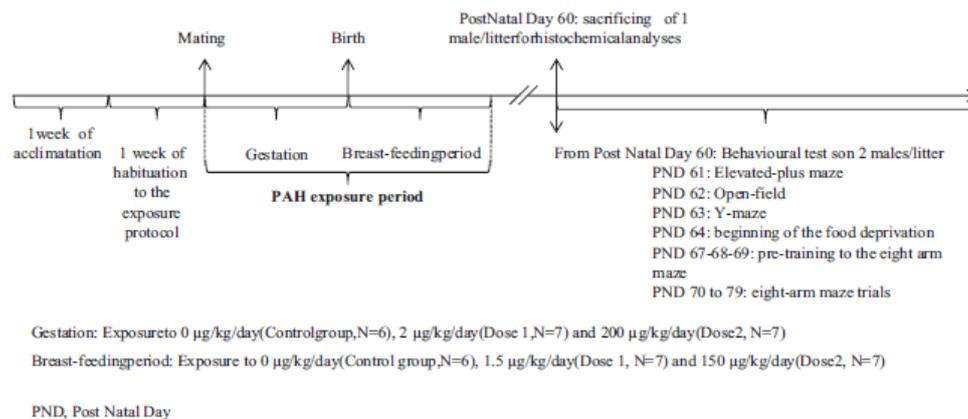


Fig. 1. Experimental protocol.

days (one session per day). Behaviour of a total number of 12 rats for control group, and 14 rats for each of the two PAH exposed groups was evaluated. All the tests were performed under a red light between 9 a.m. and 13 p.m. The testing order was randomized between rats from the 3 groups, to avoid circadian variation. Tests were recorded and all the variables were analysed by the same experimenter, using software developed and validated in our laboratory.

2.4.1. Open-field

This test was performed to assess the general locomotor activity (Walsh and Cummins, 1976). The apparatus was made of a circular open-field platform (90 cm diameter × 40 cm high walls) with the floor divided into 32 cases delimiting three circular areas: the peripheral, the medium and the central ones. At the beginning of the test, the rat was placed on the middle of the apparatus, and was let free to explore it for 5 min. During this period the total number of crossed cases, the number of rearing, the number of crossed squares and the time spent in each of the three areas were recorded. Between each animal, the apparatus was cleaned with a 30% ethanol solution.

2.4.2. Elevated-plus maze

This test was carried out to assess the level of anxiety of animals (Pellow et al., 1985). The maze was made of brown wood and was elevated to a height of 70 cm and with 2 open (50 cm × 10 cm) and 2 closed arms (50 cm × 10 cm × 40 cm). Arms of the same type were opposite to each other and were connected by a common central square (10 cm × 10 cm). To prevent the rats falling out of the maze, a ledge of 2 mm of height surrounded the open arms. Each rat was tested within a 5-min test session. At the beginning a rat was placed individually in the central area facing one of the open arms, and was allowed to freely explore the maze. The time spent in closed arms, open arms, and central square was recorded. The number of entries in each type of arms and the number of head-dippings and rearings were also considered. The apparatus was cleaned with a 30% ethanol solution between each rat.

2.4.3. Y-maze

Y-maze was used in order to assess the immediate working memory performances (Hughes, 2004). This apparatus was made of brown wood with the form of 3 arms (60 cm × 15 cm × 30 cm) positioned at equal angles. Rats were placed at the end of one arm and allowed to freely explore the maze over a 10-min session. The series of arm entries were recorded and alternation was defined as a triplet of explored arms. Alternation was considered as successful when the 3 arms were different. The percentage of alternation was calculated as the ratio of successful to total possible triplets multiplied by 100. Otherwise, the number of rearings and the total arm entries were also considered as indicators of activity. The maze was cleaned with a 30% ethanol solution between each animal.

2.4.4. Eight-arm maze

This test permits to assess spatial memory performances of animals (Olton, 1979). The apparatus consisted of 8 arms (60 cm × 10 cm × 12 cm), each of them being projected on a circular central area with a 30 cm diameter. The apparatus was made of brown wood and was covered by Plexiglas. Extra maze spatial cues were placed in the testing room to allow orientation in the maze. Rats were food-deprived 3 days before the beginning of the pre-training up till the end of the test. The pre-training period consisted for rats on a 15 min session per day for 3 days with a large amount of pellets by the end of each arm to get used to the maze, prior starting a 10 consecutive day period of testing. One trial for each animal was performed each day. On the 10 testing days, a 15 mg pellet was placed at the end of each arm before each trial. At each trial, a rat was placed on the central area of the maze, and had to

find the 8 pellets. The pellets were not removed during the test, so a maximum of 8 pellets could have been collected by the rat during each session. The trial ended when the 8 pellets were collected. The time taken to successfully recover the whole food, the total number of arms entries, the number of arms entries before the first error (an error was defined as a re-entry into an already visited arm) and the number of arms visited per minute were recorded. The apparatus was cleaned between each animal.

2.5. Histochemical analyses

2.5.1. Tissue preparation

On PND60, one male rat per litter was sacrificed by decapitation and the brain was removed intact, frozen rapidly in cooled 2-methylbutane at -20°C , and stored at -80°C . The 20 mm-thick coronal sections were serially cut on a cryostat, collected on gelatin-chrome alum-coated slides and conserved at a temperature of -80°C until histochemical processing.

2.5.2. Cytochrome oxidase histochemistry

Histochemical detection of cytochrome oxidase activity was carried out on one series of sections from each brain as well as several complete sets of their respective standards using a modified version based on the protocol from Wong-Riley (1979). All the chemicals used were purchased from Sigma-Aldrich (St. Quentin Fallavier, France). Sections were incubated in the dark at 37°C for 65 min in a solution of 0.04 g cytochrome c from equine heart, 0.10 g diaminobenzidine (DAB), 8 g sucrose, 0.036 g catalase in 180 ml of 0.1 M phosphate buffer, pH 7. The reaction was stopped by rinsing slides in 0.1 M phosphate buffer, pH 7, with 10% sucrose (w/v) for 5 min. Tissue was fixed in buffered formalin (4% (v/v) formaldehyde) at room temperature for 30 min. Then slides were washed in three baths of 0.1 M phosphate buffer, pH 7 for 5 min and twice 2 min. Finally, slides were dehydrated in series of ethanol baths (50%, 70%, 96%, 100%) 3 times during 3 min and twice during 5 min, and cleared with toluene twice during 5 min. Slides were then coverslipped with Eukitt. Standards for specific cytochrome oxidase activity were prepared from whole brain homogenates of adult rats. Specific cytochrome oxidase activity of brain homogenate was biochemically measured by spectrophotometry according to the protocol described by Gonzalez-Lima and Cada (1994) and remained constant in -80°C frozen standards for several months (38.4 µmol/min/g of tissue). Briefly, 0.9 ml of cytochrome c solution (Cytochrome c 30 µM in 0.05 M phosphate buffer pH 7, and 0.3% (w/v) sodium hydrosulfite) was mixed with 0.1 ml of brain homogenate in a deoxycholate solution (75%, w/v). Optical density was measured at 550 nm at 22°C for 3 min. The specific enzymatic activity of cytochrome oxidase was calculated from the slope of the curve obtained. Brain homogenate sections of variable thicknesses were used to cover the entire range of activity measured in the different brain structures. Under our experimental conditions, the staining intensity was highly correlated to the thickness of the standard sections (linear function with $r = 0.997$). Analysis of the cytochrome oxidase stained sections was carried out with the BIOCOM computer-assisted image analysis system (Les Ulis, France), in which optical density readings were converted by means of standards into enzymatic activity values expressed in mmol/min/g of tissue. Anatomical structures were defined according to the Franklin and Paxinos stereotaxic atlas of rat brain (6th edition, 2007). Multiple optical density readings were taken of labelled regions to obtain a homogeneous evaluation.

2.6. Statistical analysis

Data from behavioural and histological tests were analysed using a one-way analysis of variance (one-way ANOVA). For the 8-arm maze, a two-way ANOVA

Table 1
Effects of PAHs on motor activity and anxiety assessed in the open-field.

Variable		Control	Dose 1	Dose 2	ANOVA	
					F _(2,39)	p
In peripheral area	Number of crossed squares	81.25 ± 9.05	114.69 ± 7.90 [*]	105.38 ± 5.06	5.256	<0.05
	Time spent (s)	223.65 ± 10.60	252.82 ± 5.95 [*]	249.39 ± 4.94 [*]	4.670	<0.05
In intermediate area	Number of crossed squares	27.00 ± 3.59	20.36 ± 2.26	22.07 ± 2.57	1.454	n.s.
	Time spent (s)	57.35 ± 8.62	30.75 ± 3.97 ^{**}	31.30 ± 4.07 ^{**}	7.016	<0.01
In central area	Number of crossed squares	8.17 ± 1.12	6.36 ± 1.15	7.43 ± 1.04	0.665	n.s.
	Time spent (s)	19.00 ± 3.17	16.43 ± 3.09	19.32 ± 2.26	0.326	n.s.
Total number of crossed cases		116.42 ± 11.53	142.77 ± 8.43	136.92 ± 6.28	2.379	0.107
Total number of rearing		19.58 ± 2.85	23.73 ± 1.51	28.69 ± 2.46 [*]	3.793	<0.05

Results are expressed as mean ± S.E.M. of n = 12 control rats and n = 14 rats/exposed group. Bonferroni's t-test was used for multiple comparisons. n.s., not significant.

^{*} p < 0.05, statistical significant difference from controls.

^{**} p < 0.01, statistical significant difference from controls.

analysis was applied, considering time as a repeated factor. *Post hoc* comparisons have been performed using the Bonferroni's test when Anova was significant. Significance was set at p < 0.05. All statistical analyses were carried out using SPSS 16.0 software (SPSS INC., Chicago, IL, USA).

3. Results

3.1. Gestation outcomes and maternal behaviour

Time of gestation and size of litters from exposed mothers or control mothers were not significantly different (data not shown). No effect of PAH exposure on birth outcomes was observed. Maternal behaviour was assessed by the nest building test and the retrieving test on the first 11 days of post-natal life. Results did not show any statistical difference on exposed females compared to controls (data not shown). This avoids a direct consequence of maternal care on later offspring behaviour.

3.2. Behavioural tests

3.2.1. Open-field

One-way ANOVA revealed significant effects for treatment on the total number of rearing (Table 1). Bonferroni's *post hoc* analysis showed that rats exposed to the highest dose of PAHs made significantly more rearing in 5 min than control rats. On average the number of crossed cases was more elevated for exposed rats, but the one-way ANOVA did not reveal a significant difference (p = 0.107). Furthermore, one-way ANOVA revealed significant differences on the number of cases crossed in peripheral area, but not for crossed squares in intermediate and central areas. Rats exposed to the lowest dose of PAHs significantly crossed more cases in peripheral area compared to controls. Rats exposed to the highest dose crossed more cases than control rats in peripheral area too, but the difference was not significant. Concerning time spent

in each area, one-way ANOVA and *post hoc* analysis revealed that rats from the two exposed groups spent significantly less time in intermediate area and more time in peripheral area than controls. No significant effects were found for the time spent in the central area.

3.2.2. Elevated-plus maze

One-way ANOVA showed no significant effect for treatment on the total arm entries, the open and closed arm entries, the time spent in the central area, the percentage of head-dipping in central area and the total number of rearing (Table 2). On the other hand, statistical differences were found for treatment on the time spent in open and closed arms. Data showed that rats exposed to the two doses of PAHs spent significantly less time in open arms than controls. Similarly, rats from the two exposed groups spent significantly more time in closed arms than controls. One-way ANOVA revealed a significant difference for treatment on the total number of head-dipping. *Post hoc* analyses showed that exposed rats made significantly fewer head-dipping than controls.

3.2.3. Y-maze

In the Y-maze no significant effect was observed for treatment whatever the variable observed (Table 3).

3.2.4. Eight-arm maze

In this test two factors were taken into consideration: treatment and time with time as a repeated factor. To analyse eight-arm maze test, results of 3 days in particular were chosen, the first, the 6th, and the last one. Two-way ANOVA revealed no significant difference for interaction between treatment, and time of testing, whatever the variable considered (Table 4). As expected, significant differences for the time of testing were revealed for all variables. Indeed, total time and total number of arms visited decreased for all animals

Table 2
Effects of PAHs on anxiety assessed in the elevated-plus maze.

Variable	Control	Dose 1	Dose 2	ANOVA	
				F _(2,39)	p
Total arm entries	10.91 ± 1.10	10.21 ± 1.17	11.38 ± 0.59	0.364	n.s.
Open arm entries	5.83 ± 0.56	4.79 ± 0.67	5.46 ± 0.55	0.779	n.s.
Closed arm entries	5.08 ± 0.68	5.43 ± 0.81	5.92 ± 0.40	0.392	n.s.
% open arm entries	54.21 ± 2.86	47.64 ± 4.02	46.79 ± 3.81	1.170	n.s.
Open arm time (s)	153.41 ± 11.05	97.24 ± 12.49 [*]	98.04 ± 15.88 [*]	5.303	<0.05
Closed arm time (s)	81.01 ± 9.06	130.74 ± 10.98 [*]	131.84 ± 17.01 [*]	4.555	<0.05
Central area time (s)	65.58 ± 5.45	72.01 ± 6.64	70.12 ± 5.20	0.303	n.s.
Total head-dipping	8.92 ± 0.93	5.85 ± 1.01 [*]	5.64 ± 0.66 [*]	4.326	<0.05
% head-dipping in central area	18.58 ± 4.66	31.15 ± 7.84	28.71 ± 7.76	0.847	n.s.
Total rearing	10.33 ± 1.12	12.21 ± 1.60	14.08 ± 1.38	1.690	n.s.

Results are expressed as mean ± S.E.M. of n = 12 control rats and n = 14 rats/exposed group. Bonferroni's t-test was used for multiple comparisons. n.s., not significant.

^{*} p < 0.05, statistical significant difference from controls.

Table 3
Effects of PAHs on spontaneous alternation performances in the Y-maze.

Variable	Control	Dose 1	Dose 2	ANOVA	
				$F_{(2,39)}$	<i>p</i>
% spontaneous alternation	66.75 ± 2.09	66.33 ± 2.02	64.57 ± 2.32	0.296	n.s.
Total arm entries	33.75 ± 1.92	31.00 ± 0.93	34.71 ± 1.40	1.714	n.s.
Number of arms visited/min	3.38 ± 0.19	3.10 ± 0.09	3.47 ± 0.14	1.714	n.s.
Number of arm entries (1st min)	5.09 ± 0.28	4.92 ± 0.29	5.86 ± 0.35	2.688	n.s.

Results are expressed as mean ± S.E.M. of *n* = 12 control rats and *n* = 14 rats/exposed group. Bonferroni's *t*-test was used for multiple comparisons. n.s., not significant.

from day 1 to day 10 whereas the number of errors and the time before the first error increased. No effect for treatment was found in any variable.

3.2.5. Histochemical analyses

Density values of the different anatomical structures measured in the exposed rats and their controls are given in Table 5. Histochemical analyses focused on several key systems involved in functions potentially targeted by PAHs, such as anxiety and memory. Indeed, cytochrome oxidase activity was measured in cortices, hypothalamic nuclei and limbic system.

Regarding cortices, one-way ANOVA revealed a significant difference only in the frontal cortex. Cytochrome oxidase activity was lower than controls for animals exposed to the highest dose of PAHs. In the hypothalamus, significant differences were observed only on the ventromedial nucleus. On this structure cytochrome oxidase activity was lower than control animals for rats exposed to the lowest dose of PAHs. Amongst the limbic system, several significant effects of the treatment on cytochrome oxidase activity were found. Activity decreased for the group exposed to the lowest dose compared to controls in the lateral septum, the central, medial and basolateral amygdaloid nuclei, the CA1 and CA3 hippocampal subfields, the dentate gyrus, and the lateral and medial habenula. For animals exposed to the highest dose of PAHs, cytochrome oxidase activity was lower than controls in the central amygdaloid nucleus, the dentate gyrus and the lateral habenula.

It may be noticed that cytochrome oxidase activity for animals exposed to the highest dose of PAHs was always lower than cytochrome oxidase activity of control group, and was quite similar to the one for animals exposed to the lowest dose of PAHs for structures showing statistical differences between those animals and control group, even if these decreases are too low to be significant.

4. Discussion

4.1. Behavioural impairments

In the open-field, animals' locomotor activity was assessed with the total number of crossed squares and rearing. Increases in both variables were observed and suggested a higher level of activity following the PAH exposure, especially when the highest dose was administered. On the contrary, data from the elevated-plus maze, the Y-maze and the eight-arm maze did not show any statistical difference in the activity level of exposed animals. However, previous studies have revealed that activity is impacted by PAH exposure. For example, a decrease in activity has been reported in adult rats following an acute administration of B(a)P or fluoranthene (Saunders et al., 2001, 2003, 2006), whereas an hyperactivity induced by a 10-day B(a)P exposure has already been observed in adult mice (Grova et al., 2007). Consequently, variations in the doses used and the duration of the administration, as well as the intake of a mixture of PAHs instead of a single compound may explain such various impacts on locomotor activity.

Regarding memory and learning abilities, no effect of PAH exposure was found whatever the variable observed. Thereby, in the conditions of this study, no effect of PAHs on spatial and working memory and on learning abilities was revealed. Recent studies showed adverse effects on learning abilities (Grova et al., 2007; Li et al., 2011; Xia et al., 2011), on the expression of the N-methyl-D-aspartate glutamate (NMDA) receptor subunits genes involved in learning processes (Brown et al., 2007; Grova et al., 2007, 2008), and on long-term potentiation, a molecular model of learning (Wormley et al., 2004b). In addition, adverse consequences of PAH ingestion or inhalation have been shown on animal central nervous system, especially on dopaminergic or serotonergic systems (Andersson et al., 1998; Stephanou et al., 1998; Konstandi et al., 2007).

Table 4
Effects of PAHs on spatial memory performances assessed in the 8 arm maze.

Group	Day 1	Day 6	Day 10	Group of exposure		Time of testing		Group*time	
				$F_{(2,39)}$	<i>p</i>	$F_{(2,39)}$	<i>p</i>	$F_{(2,39)}$	<i>p</i>
Total time (s)									
Control	105.25 ± 10.32	50.83 ± 4.44	47.08 ± 4.94						
Dose 1	113.57 ± 8.66	63.86 ± 8.49	58.86 ± 10.36	1.390	n.s.	49.438	<0.01	0.329	n.s.
Dose 2	112.93 ± 9.48	68.86 ± 6.86	49.79 ± 4.75						
Total arm entries									
Control	11.75 ± 0.64	10.33 ± 0.48	9.50 ± 0.45						
Dose 1	11.36 ± 0.84	10.79 ± 1.09	9.86 ± 0.71	0.701	n.s.	5.332	<0.01	0.232	n.s.
Dose 2	12.36 ± 1.08	11.93 ± 1.06	10.07 ± 0.86						
Arm entries before the 1st error									
Control	5.33 ± 0.41	6.17 ± 0.46	6.25 ± 0.46						
Dose 1	5.93 ± 0.50	7.00 ± 0.31	6.64 ± 0.45	1.918	n.s.	6.812	<0.01	1.087	n.s.
Dose 2	5.00 ± 0.38	5.93 ± 0.43	7.07 ± 0.38						
Number of arm visited/min									
Control	7.18 ± 0.54	12.88 ± 0.83	13.13 ± 0.97						
Dose 1	6.18 ± 0.38	10.83 ± 0.69	12.30 ± 1.30	1.399	n.s.	83.044	<0.01	0.609	n.s.
Dose 2	6.63 ± 0.25	10.74 ± 0.53	12.65 ± 0.73						

Results are expressed as mean ± S.E.M. of *n* = 12 control rats and *n* = 14 rats/exposed group. Bonferroni's *t*-test was used for multiple comparisons. n.s., not significant.

Table 5
Effects of PAHs on neuronal oxidative metabolism (cytochrome oxidase activity in $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ of tissue).

Region	Control	Dose 1	Dose 2	ANOVA		
				$F_{(2,14)}$	p	
Cortexes						
Frontal cortex	43.84 \pm 1.26	39.20 \pm 1.44	37.97 \pm 1.71*	-13.39%	3.878	<0.05
Anterior cingulate cortex	45.33 \pm 1.23	43.18 \pm 1.42	44.25 \pm 1.13		0.715	n.s.
Entorhinal cortex	43.10 \pm 1.91	42.15 \pm 1.12	42.79 \pm 0.99		0.117	n.s.
Hypothalamic nuclei						
Ventromedial hypothalamic nucleus	45.53 \pm 1.82	38.21 \pm 1.28*	42.81 \pm 2.01	-16.08%	4.561	<0.05
Dorsomedial hypothalamic nucleus	38.80 \pm 1.28	38.07 \pm 0.92	39.89 \pm 1.40		0.529	n.s.
Mammillary nucleus	54.97 \pm 3.50	65.22 \pm 3.78	62.62 \pm 2.00		2.883	n.s.
Reward system						
Ventral tegmental area	25.17 \pm 1.80	21.87 \pm 1.28	28.18 \pm 2.32		1.856	n.s.
Nucleus accumbens	47.99 \pm 2.03	47.46 \pm 1.86	47.21 \pm 1.65		0.047	n.s.
Limbic system						
<i>Septum</i>						
Lateral septum	34.97 \pm 1.23	27.31 \pm 1.74**	31.07 \pm 1.86	-21.90%	5.390	<0.01
Medial septum	32.07 \pm 1.43	26.77 \pm 2.26	31.18 \pm 2.51		1.800	n.s.
<i>Amygdala</i>						
Lateral amygdaloid nucleus	36.01 \pm 1.40	34.42 \pm 1.11	34.51 \pm 1.54		0.414	n.s.
Central amygdaloid nucleus	41.41 \pm 1.08	36.33 \pm 0.92**	35.96 \pm 1.09**	-12.27%	8.679	<0.01
Medial amygdaloid nucleus	39.09 \pm 1.52	34.58 \pm 1.01*	35.87 \pm 1.28	-11.54%	3.336	<0.05
Baso-lateral amygdaloid nucleus	45.15 \pm 1.45	39.56 \pm 0.79**	41.83 \pm 1.15	-12.38%	5.742	<0.01
Baso-medial amygdaloid nucleus	40.24 \pm 1.63	36.30 \pm 0.89	36.91 \pm 1.29		2.694	n.s.
<i>Hippocampus</i>						
CA1 layer	44.9 \pm 1.43	37.81 \pm 1.34**	41.74 \pm 1.26	-15.79%	7.061	<0.01
CA3 layer	46.84 \pm 0.79	40.26 \pm 1.45**	42.94 \pm 1.05	-14.05%	8.467	<0.01
Dentate gyrus	55.02 \pm 1.23	50.25 \pm 1.05*	50.25 \pm 1.45*	-8.67%	4.809	<0.05
Subiculum	47.25 \pm 1.03	46.17 \pm 1.59	45.48 \pm 1.46		0.396	n.s.
<i>Habenula</i>						
Lateral habenula	49.86 \pm 1.00	42.39 \pm 0.83**	45.73 \pm 1.16*	-14.98%	12.637	<0.01
Medial habenula	45.08 \pm 1.28	39.04 \pm 1.55*	41.75 \pm 1.39	-13.40%	4.613	<0.05

Results are expressed as mean cytochrome oxidase activity and S.E.M. of $n=5$ male rats/group. Represented in bold are the mean percent changes in cytochrome oxidase staining as compared to the values of the vehicle group. Bonferroni's t -test was used for multiple comparisons.

* $p < 0.05$, statistical significant difference from controls.

** $p < 0.01$, statistical significant difference from controls.

Finally, exploration of both peripheral area in the open-field and the closed arms in the elevated-plus maze is considered to be representative of the level of animal anxiety. Thus, a higher time spent in such areas of the open-field and the elevated-plus maze is associated with a higher level of anxiety. In the present study, significant decreases of the time spent in the intermediate area of the open-field were observed in all PAH exposed animals in correlation with significant increases in time spent in the protected peripheral part of the maze. This demonstrated that PAH treated rats were more anxious than the control animals in the open-field. These findings were supported by the results from the elevated-plus maze. Indeed, the results obtained in this maze showed that the rats early exposed to PAHs spent significantly more time in protected closed arms and less time in the anxiogenic open arms than controls. Furthermore, the decrease in the total number of head-dipping, which is considered as an anxiety-related behaviour confirmed the increase in anxiety level of PAH exposed animals in the elevated-plus maze whatever the level of exposure. Such results confirmed those reported from other studies showing the ability of PAHs to modulate the anxiety level. Indeed, Grova et al. (2007, 2008) showed that a 10-day B(a)P injection induced a reduction in the expression of anxiety-related behaviours measured in the elevated-plus maze in adult mice. The same kind of results was described by Bouayed et al. (2009a) who reported a decrease in the anxiety level of mice born from mothers exposed to B(a)P through oral way during the lactational period. Previous and present results highlight the fact that anxiety-related behaviours may be modulated by B(a)P or PAH mixture exposure, but not necessarily in the same way. Several experimental differences between these studies, such as the use of a mixture of 16 PAHs versus a single component, different ways of administration and rodent models can be

sufficient to explain variations in anxiety-related behaviours in exposed animals.

The main difference between previously published studies showing modulation of locomotor activity and learning abilities, and decreases in anxiety-related behaviours following PAH direct exposure of adult organism, or after indirect exposure via the maternal organism, and the present one is the use of repeated low doses of a mix of 16 PAHs, and not of a single component. Indeed, several studies were previously conducted on the effects of PAHs, using only one specific component such as B(a)P or fluoranthene (Saunders et al., 2003; Grova et al., 2007, 2008). The mixture used in this work corresponds to the definition of a simple mixture according to US EPA criteria (1987). Toxicity of a mix may be lower, equal or stronger than the sum of each component toxicity and is hardly predictable, compared to a single molecule (Mumtaz et al., 2007).

In the present study, anxiety increased for all exposed animals, and effects were very similar for both Dose 1 and Dose 2 groups. The absence of such a "dose-response" effect may be first surprising, but whereas the highest dose is a 100-fold higher dose, no analytical data proved that the bioavailable dose on pups is really 100-fold higher. Indeed, it has been shown that a more prolonged B(a)P exposure on pregnant rats, compared to a single dose, did not result on a higher level of parent compound or metabolites on pup tissue, probably due to a faster elimination rate on the maternal organism (Neubert and Tapken, 1988). Indeed, maternal metabolism must play a significant role, which modulates the real PAH level received by offspring from a known dose of PAH administered to the dams through diet. Thus, adverse effects are not necessarily worse for pups with higher maternal levels of exposure, which shows the actual importance of studying low environmental level of exposure instead of high unreal doses during perinatal periods.

4.2. Cytochrome oxidase activity

Besides behavioural tests, cellular activity of several brain areas was investigated in order to determine if certain cerebral structures involved in behaviour were more sensitive to PAH toxicity than others. Indeed, behavioural modifications previously observed may be strongly correlated with alterations of brain metabolism in behaviour-linked. In the brain, the main energy-generating pathway is oxidative phosphorylation by means of the mitochondrial respiratory chain (Maurer et al., 2000), thus regional cytochrome oxidase activity is considered as a marker of neural cell function (Strazielle et al., 2009). It has been shown that impairment of cytochrome oxidase activity may have significant functional effects because of the high dependence of neuronal cells on oxidative phosphorylation, particularly at the synapse level, where metabolic activity is high (Mancuso et al., 2003).

In the present work, decreases of cytochrome oxidase activity were observed in different areas of adult rat brain following a perinatal PAH exposure, even at the environmental level of exposure. PAH exposure lead to alterations of key cerebral structures metabolism directly involved or highly linked to other areas involved in cognitive functions, anxiety-related behaviours, fear, identification of emotions and reward system. A low cytochrome oxidase activity is associated with a cellular hypometabolism (Strazielle et al., 1998) and may be linked to a mitochondrial dysfunction (Sas et al., 2007). Moreover, it is also well documented that a mitochondrial defect may result from an increase of oxidative stress, thereby leading to more production in reactive oxygen species (ROS) (Facecchia et al., 2011).

On the other hand, PAHs are highly metabolized molecules inside organisms and become reactive electrophilic intermediates (Knuckles et al., 2001), which cause oxidative stress (Jeng, 2010). Moreover it is well established that PAH exposure is positively correlated with high oxidative stress levels, both for heavy or low molecular weight PAHs (Pan et al., 2008; Bae et al., 2010; Liu et al., 2010; Giannapas et al., 2011). Findings from a recent study on adult male rats suggest that B(a)P neurobehavioural toxicity may occur through oxidative stress, and that ROS generation may be a critical mechanism explaining neurobehavioural effects induced by oral exposure to B(a)P (Saunders et al., 2006).

Furthermore, a close relationship between oxidative stress and anxious behaviour on rodents has already been identified (Bouayed et al., 2009b). Indeed, several studies have highlighted the potential role of oxidative stress on induction of high anxiety level both in mice and rats (Gingrich, 2005; de Oliveira et al., 2007; Salim et al., 2011; Vollert et al., 2011).

To sum up, by using cytochrome oxidase decrease as a marker for mitochondrial dysfunction and considering this deficiency as a consequence of an oxidative stress increase in neuronal cells induced by perinatal PAH exposure, it is possible to relate some PAH behavioural effects, such as anxiety-related behaviour increase, with brain metabolism modifications. The cytochrome oxidase impairment appears to be confined to several specific cerebral structures, such as the limbic system, suggesting anatomic specificity.

Results from histochemical analyses indicated that cytochrome oxidase activity decreased in many structures for both exposed groups. But it can nevertheless be noticed that even though decreases in cytochrome oxidase activity were observed for the two groups of PAH exposed animals, strictly significant differences were found in a greater number of structures for animals exposed to the lowest dose of PAHs than for animals exposed to the highest dose. Mechanisms leading to PAH neurotoxicity are currently not well understood, especially in the present case of maternal exposure to a PAH mixture during gestation and breast-feeding period. Many possibilities may be hypothesized, compensatory mechanisms may

have occurred in the nervous system of pups exposed to the highest dose of PAHs, compared to the Dose 1 group. Furthermore effects may have been mediated by the hormone system during gestation and the mother organism may have played a role in the induction of PAH metabolism. Thus, because of the lack of analytical data in the present study, concentrations of PAHs and their metabolites in the pups are not known. At this stage, it seems hard to explain the lesser effects observed at the highest dose. But it is evident from these results that perinatal exposure to low and environmentally relevant doses of PAHs in the food can have long-lasting effects on behaviour and cerebral metabolism in later life.

5. Conclusion

The present work showed increase of anxiety-related behaviours in adult male rats following a perinatal PAH exposure through maternal dietary intake. These harmful effects were observed together with a decrease of the metabolism of several distinct cerebral areas, especially those involved in limbic system. These results suggest the role of oxidative stress for neuronal cells on the toxicity of PAHs. The present study gives rise to later impacts of a perinatal exposure to a mix of PAHs, since negative effects in exposed animals were observed 40 days after the end of exposure. This work emphasizes that late consequences of an early exposure to environmental pollutants are a key issue. Knowledge in this research field may allow a better understanding of the etiology of neurodevelopmental disorders and adult cognitive disorders.

Conflicts of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgements

The authors thank Jean-Luc Perrin for the development of software for behavioural analyses. This study was supported by the Lorraine Regional Council and the French National Institute for Agronomic Research (INRA).

References

- Andersson, H., Lindqvist, E., Westerholm, R., Grägg, K., Almén, J., Olson, L., 1998. Neurotoxic effects of fractionated diesel exhausts following microinjections in rat hippocampus and striatum. *Environ. Res.* 76, 41–51.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), 1995. *Toxicological Profiles for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs)*. US Department of Health and Human Services, Public Health Service, Atlanta.
- Bae, S., Pan, X.-C., Kim, S.-Y., Park, K., Kim, Y.-H., Kim, H., Hong, Y.-C., 2010. Exposures to particulate matter and polycyclic aromatic hydrocarbons and oxidative stress in schoolchildren. *Environ. Health Perspect.* 118, 579–583.
- Baek, S.O., Field, R.A., Goldstone, M.E., Kirk, P.W., Lester, J.N., Perry, R., 1991. A review of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: sources, fate and behavior. *Water Air Soil Pollut.* 60, 279–300.
- Bouayed, J., Desor, F., Rammal, H., Kiemer, A.K., Tybl, E., Schroeder, H., Rychen, G., Soulimani, R., 2009a. Effects of lactational exposure to benzo[alpha]pyrene (B[a]P) on postnatal neurodevelopment, neuronal receptor gene expression and behaviour in mice. *Toxicology* 259, 97–106.
- Bouayed, J., Rammal, H., Soulimani, R., 2009b. Oxidative stress and anxiety: relationship and cellular pathways. *Oxid. Med. Cell Longev.* 2, 63–67.
- Brown, L.A., Khousbouei, H., Goodwin, J.S., Irvin-Wilson, C.V., Ramesh, A., Sheng, L., McCallister, M.M., Jiang, G.C.T., Aschner, M., Hood, D.B., 2007. Down-regulation of early ionotropic glutamate receptor subunit developmental expression as a mechanism for observed plasticity deficits following gestational exposure to benzo(a)pyrene. *Neurotoxicology* 28, 965–978.
- Del Bubba, M., Zanieri, L., Galvan, P., Donzelli, G.P., Checchini, L., Lepri, L., 2005. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and total fats in human milk. *Ann. Chim.* 95, 629–641.
- Dahlgren, J., Warshaw, R., Thornton, J., Anderson-Mahoney, C.P., Takhar, H., 2003. Health effects on nearby residents of a wood treatment plant. *Environ. Res.* 92, 92–98.
- Dayal, H., Gupta, S., Trieff, N., Maierson, D., Reich, D., 1995. Symptom clusters in a community with chronic exposure to chemicals in two superfund sites. *Arch. Environ. Health* 50, 108–111.

- Dennis, M.J., Massey, R.C., McWeeny, D.J., Knowles, M.E., Watson, D., 1983. Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in UK total diets. *Food Chem. Toxicol.* 21, 569–574.
- de Oliveira, M.R., Silvestrin, R.B., Mello, E., Souza, T., Moreira, J.C.F., 2007. Oxidative stress in the hippocampus, anxiety-like behavior and decreased locomotory and exploratory activity of adult rats: effects of sub acute vitamin A supplementation at therapeutic doses. *Neurotoxicology* 28, 1191–1199.
- de Vos, R.H., van Dokkum, W., Schouten, A., de Jong-Berkhout, P., 1990. Polycyclic aromatic hydrocarbons in Dutch total diet samples (1984–1986). *Food Chem. Toxicol.* 28, 263–268.
- European Commission (EC), 2002. Opinion of the Scientific Committee on Food on the Risks to Human Health of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food.
- EFSA, 2008. Scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain on a request from the European Commission on polycyclic aromatic hydrocarbons in food. *EFSA J.* 724, 1–114.
- European Union Directive, 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.
- Facecchia, K., Fochesato, L.-A., Ray, S.D., Stohs, S.J., Pandey, S., 2011. Oxidative toxicity in neurodegenerative diseases: role of mitochondrial dysfunction and therapeutic strategies. *J. Toxicol.* 2011, 683–728.
- Falcó, G., Domingo, J.L., Llobet, J.M., Teixidó, A., Casas, C., Müller, L., 2003. Polycyclic aromatic hydrocarbons in foods: human exposure through the diet in Catalonia, Spain. *J. Food Prot.* 66, 2325–2331.
- Giannapas, M., Karnis, L., Dailianis, S., 2011. Generation of free radicals in haemocytes of mussels after exposure to low molecular weight PAH components: immune activation, oxidative and genotoxic effects. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicol. Pharmacol.: CBP* 155 (2), 182–189.
- Gingrich, J.A., 2005. Oxidative stress is the new stress. *Nat. Med.* 11, 1281–1282.
- Gladen, B.C., Zadorozhnaia, T.D., Chislovska, N., Hryhorczuk, D.O., Kennicutt, M.C., Little, R.E., 2000. Polycyclic aromatic hydrocarbons in placenta. *Hum. Exp. Toxicol.* 19, 597–603.
- Gonzalez-Lima, F., Cada, A., 1994. Cytochrome oxidase activity in the auditory system of the mouse: a qualitative and quantitative histochemical study. *Neuroscience* 63, 559–578.
- Gross, C., Hen, R., 2004. The developmental origins of anxiety. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 545–552.
- Grova, N., Schroeder, H., Farinelle, S., Prodhomme, E., Valley, A., Muller, C.P., 2008. 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* 73, S295–S302.
- Grova, N., Valley, A., Turner, J.D., Morel, A., Muller, C.P., Schroeder, H., 2007. Modulation of behavior and NMDA-R1 gene mRNA expression in adult female mice after sub-acute administration of benzo(a)pyrene. *Neurotoxicology* 28, 630–636.
- Hood, D.B., Nayyar, T., Ramesh, A., Greenwood, M., Inyang, F., 2000. Modulation in the developmental expression profile of Sp1 subsequent to transplacental exposure of fetal rats to desorbed benzo(a)pyrene following maternal inhalation. *Inhal. Toxicol.* 12, 511–535.
- Hughes, R.N., 2004. The value of spontaneous alternation behavior (SAB) as a test of retention in pharmacological investigations of memory. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 28, 497–505.
- International Agency for Research on Cancer (IARC), 1983. 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.
- Jeng, H.A., 2010. Chemical composition of ambient particulate matter and redox activity. *Environ. Monit. Assess.* 169, 597–606.
- Kilburn, K.H., Warshaw, R.H., 1995. Neurotoxic effects from residential exposure to chemicals from an oil reprocessing facility and superfund site. *Neurotoxicol. Teratol.* 17, 89–102.
- Kim, S.R., Halden, R.U., Buckley, T.J., 2008. Polycyclic aromatic hydrocarbons in human milk of nonsmoking U.S. women. *Environ. Sci. Technol.* 42, 2663–2667.
- Knuckles, M.E., Inyang, F., Ramesh, A., 2001. Acute and subchronic oral toxicities of benzo(a)pyrene in F-344 rats. *Toxicol. Sci.* 61, 382–388.
- Konstandi, M., Harkitis, P., Thermos, K., Ogren, S.O., Johnson, E.O., Tzimas, P., Marselos, M., 2007. Modification of inherent and drug-induced dopaminergic activity after exposure to benzo(alpha)pyrene. *Neurotoxicology* 28, 860–867.
- Landrigan, P.J., Sonawane, B., Butler, R.N., Trasande, L., Callan, R., Droller, D., 2005. Early environmental origins of neurodegenerative disease in later life. *Environ. Health Perspect.* 113, 1230–1233.
- Li, Z., Chadalapaka, G., Ramesh, A., Khoshbouei, H., Maguire, M., Safe, S., Rhoades, R.E., Clark, R., Jules, G., McCallister, M., Aschner, M., Hood, D.B., 2011. PAH particles perturb prenatal processes and phenotypes: protection from deficits in object discrimination afforded by dampening of brain-oxidoreductase following *in utero* exposure to inhaled benzo(a)pyrene. *Toxicol. Sci.: Off. J. Soc. Toxicol.*
- Liu, H.-H., Lin, M.-H., Chan, C.-I., Chen, H.-L., 2010. Oxidative damage in foundry workers occupationally co-exposed to PAHs and metals. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 213, 93–98.
- Madhavan, N.D., Naidu, K.A., 1995. Polycyclic aromatic hydrocarbons in placenta, maternal blood, umbilical cord blood and milk of Indian women. *Hum. Exp. Toxicol.* 14, 503–506.
- Majchrzak, R., Sroczyński, J., Chelmecka, E., 1990. Evaluation of the nervous system in workers in the furnace and coal divisions of the coke-producing plants. *Med. Pr.* 41, 108–113.
- Mancuso, M., Filosto, M., Bosetti, F., Ceravolo, R., Rocchi, A., Tognoni, G., Manca, M.L., Solaini, G., Siciliano, G., Murri, L., 2003. Decreased platelet cytochrome c oxidase activity is accompanied by increased blood lactate concentration during exercise in patients with Alzheimer disease. *Exp. Neurol.* 182, 421–426.
- Marti-Cid, R., Llobet, J.M., Castell, V., Domingo, J.L., 2008. Evolution of the dietary exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in Catalonia, Spain. *Food Chem. Toxicol.* 46, 3163–3171.
- Maurer, I., Zierz, S., Möller, H.J., 2000. A selective defect of cytochrome c oxidase is present in brain of Alzheimer disease patients. *Neurobiol. Aging* 21, 455–462.
- McCallister, M.M., Maguire, M., Ramesh, A., Aimin, Q., Liu, S., Khoshbouei, H., Aschner, M., Ebner, F.F., Hood, D.B., 2008. Prenatal exposure to benzo(a)pyrene impairs later-life cortical neuronal function. *Neurotoxicology* 29, 846–854.
- Menzie, C.A., Potocki, B.B., Santodonato, J., 1992. Exposure to carcinogenic PAHs in the environment. *Environ. Sci. Technol.* 26, 1278–1284.
- Miodovnik, A., 2011. Environmental neurotoxins and developing brain. *Mt. Sinai J. Med.* 78, 58–77.
- Mumtaz, M.M., Ruiz, P., De Rosa, C.T., 2007. Toxicity assessment of unintentional exposure to multiple chemicals. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 223, 104–113.
- Neubert, D., Tapken, S., 1988. Transfer of benzo(a)pyrene into mouse embryos and fetuses. *Arch. Toxicol.* 62, 236–239.
- Nie, J.-S., Zhang, H.-M., Sun, J.-Y., Shi, Y.-T., Wang, F., Zeng, P., Wang, L.-P., Song, J., Wang, J., Liu, H.-J., Niu, Q., 2008. Characteristic of the neurobehavioral functional changes in coke oven workers. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi* 42, 25–29.
- Niu, Q., Zhang, H., Li, X., Li, M., 2009. B[a]P-induced neurobehavioral function and neurotransmitter alterations in coke oven workers. *Occup. Environ. Med.*
- Olney, J.W., 2002. New insights and new issues in developmental neurotoxicology. *Neurotoxicology* 23, 659–668.
- Olton, D.S., 1979. Mazes, maps, and memory. *Am. Psychol.* 34, 583–596.
- Organization for Economic Cooperation, Development (OECD), 2007. Guideline 426: Developmental Neurotoxicity Study.
- Pan, C.-H., Chan, C.-C., Huang, Y.-L., Wu, K.-Y., 2008. Urinary 1-hydroxypyrene and malondialdehyde in male workers in Chinese restaurants. *Occup. Environ. Med.* 65, 732–735.
- Pellow, S., Chopin, P., File, S.E., Briley, M., 1985. Validation of open/closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neurosci. Methods* 14, 149–167.
- Perera, F.P., Li, Z., Whyatt, R., Hoepner, L., Wang, S., Camann, D., Rauh, V., 2009. Prenatal airborne polycyclic aromatic hydrocarbon exposure and child IQ at age 5 years. *Pediatrics* 124, e195–e202.
- Perera, F.P., Rauh, V., Whyatt, R.M., Tsai, W.-Y., Tang, D., Diaz, D., Hoepner, L., Barr, D., Tu, Y.-H., Camann, D., Kinney, P., 2006. Effect of prenatal exposure to airborne polycyclic aromatic hydrocarbons on neurodevelopment in the first 3 years of life among inner-city children. *Environ. Health Perspect.* 114, 1287–1292.
- Perera, F.P., Wang, S., Vishnevetsky, J., Zhang, B., Cole, K.J., Tang, D., Rauh, V., Phillips, D.H., 2011. PAH/aromatic DNA adducts in cord blood and behavior scores in New York city children. *Environ. Health Perspect.* 119 (8), 1176–1181.
- Ramesh, A., Walker, S.A., Hood, D.B., Guillén, M.D., Schneider, K., Weyand, E.H., 2004. Bioavailability and risk assessment of orally ingested polycyclic aromatic hydrocarbons. *Int. J. Toxicol.* 23, 301–333.
- Rodier, P.M., 1994. Vulnerable periods and processes during central nervous system development. *Environ. Health Perspect.* 102 (Suppl. 2), 121–124.
- Salim, S., Asghar, M., Taneja, M., Hovatta, I., Chugh, G., Vollert, C., Vu, A., 2011. Potential contribution of oxidative stress and inflammation to anxiety and hypertension. *Brain Res.* 1404, 63–71.
- Sas, K., Robotka, H., Toldi, J., Vécsei, L., 2007. Mitochondria, metabolic disturbances, oxidative stress and the kynurenine system, with focus on neurodegenerative disorders. *J. Neurosci. Sci.* 257, 221–239.
- Saunders, C.R., Das, S.K., Ramesh, A., Shockley, D.C., Mukherjee, S., 2006. Benzo(a)pyrene-induced acute neurotoxicity in the F-344 rat: role of oxidative stress. *J. Appl. Toxicol.* 26, 427–438.
- Saunders, C.R., Ramesh, A., Shockley, D.C., 2002. Modulation of neurotoxic behavior in F-344 rats by temporal disposition of benzo(a)pyrene. *Toxicol. Lett.* 129, 33–45.
- Saunders, C.R., Shockley, D.C., Knuckles, M.E., 2001. Behavioral effects induced by acute exposure to benzo(a)pyrene in F-344 rats. *Neurotox. Res.* 3, 557–579.
- Saunders, C.R., Shockley, D.C., Knuckles, M.E., 2003. Fluoranthene-induced neurobehavioral toxicity in F-344 rats. *Int. J. Toxicol.* 22, 263–276.
- Schroeder, H., 2011. Developmental brain and behavior toxicity of air pollutants. A focus on the effects of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Crit. Rev. Environ. Sci. Tech.* 41, 2026–2047.
- Singh, V.K., Singh, J., Anand, M., Kumar, P., Patel, D.K., Krishna Reddy, M.M., Javed Siddiqui, M.K., 2008. Comparison of polycyclic aromatic hydrocarbon levels in placental tissues of Indian women with full- and preterm deliveries. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 211, 639–647.
- Stephanou, P., Konstandi, M., Pappas, P., Marselos, M., 1998. Alterations in central monoaminergic neurotransmission induced by polycyclic aromatic hydrocarbons in rats. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokin.* 23, 475–481.
- Strazielle, C., Jazi, R., Verdier, Y., Qian, S., Lalonde, R., 2009. Regional brain metabolism with cytochrome c oxidase histochemistry in a PS1/A246E mouse model of autosomal dominant Alzheimer's disease: correlations with behavior and oxidative stress. *Neurochem. Int.* 55, 806–814.
- Strazielle, C., Krémárik, P., Ghersi-Egea, J.F., Lalonde, R., 1998. Regional brain variations of cytochrome oxidase activity and motor coordination in Lurcher mutant mice. *Exp. Brain Res.* 121, 35–45.

- Tang, D., Li, T.Y., Liu, J.J., Zhou, Z.J., Yuan, T., Chen, Y.H., Rauh, V.A., Xie, J., Perera, F., 2008. Effects of prenatal exposure to coal-burning pollutants on children's development in China. *Environ. Health Perspect.* 116, 674–679.
- United Nations Economic Commission for Europe, 1998. Aarhus Protocol on Persistent Organic Pollutants, Retrieved from http://live.unece.org/env/lrtap/pops_h1.html.
- Environmental Protection Agency (US EPA), 1987. The risk Assessment Guidelines of 1986, EPA/600/8-87/045.
- US Environmental Protection Agency (US EPA), 1984. Guidelines establishing test procedures for the analysis of pollutants under Clean Water Act: Method 610 – polynuclear aromatic hydrocarbons. *Fed. Regist.* 49, 43344–43352.
- Vollert, C., Zagaar, M., Hovatta, I., Taneja, M., Vu, A., Dao, A., Levine, A., Alkadhi, K., Salim, S., 2011. Exercise prevents sleep deprivation-associated anxiety-like behavior in rats: potential role of oxidative stress mechanisms. *Behav. Brain Res.* 224, 233–240.
- Vyskocil, A., Fiala, Z., Chénier, V.V., Krajak, L., Ettlerova, E., Bukac, J., Viau, C., Emminger, S., 2000. Assessment of multipathway exposure of small children to PAH. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 8, 111–118.
- Walsh, R.N., Cummins, R.A., 1976. The open-field test: a critical review. *Psychol. Bull.* 83, 482–504.
- Wong-Riley, M., 1979. Changes in the visual system of monocularly sutured or enucleated cats demonstrable with cytochrome oxidase histochemistry. *Brain Res.* 171, 11–28.
- Wormley, D.D., Chirwa, S., Nayyar, T., Wu, J., Johnson, S., Brown, L.A., Harris, E., Hood, D.B., 2004a. Inhaled benzo(a)pyrene impairs long-term potentiation in the F1 generation rat dentate gyrus. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)* 50, 715–721.
- Wormley, D.D., Ramesh, A., Hood, D.B., 2004b. Environmental contaminant-mixture effects on CNS development, plasticity, and behavior. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 197, 49–65.
- Xia, Y., Cheng, S., He, J., Liu, X., Tang, Y., Yuan, H., He, L., Lu, T., Tu, B., Wang, Y., 2011. Effects of subchronic exposure to benzo[a]pyrene (B[a]P) on learning and memory, and neurotransmitters in male Sprague-Dawley rat. *Neurotoxicology* 32, 188–198.
- Zanieri, L., Galvan, P., Checchini, L., Cincinelli, A., Lepri, L., Dorzelli, G.P., Del Bubba, M., 2007. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in human milk from Italian women: influence of cigarette smoking and residential area. *Chemosphere* 67, 1265–1274.

**AUTORISATION DE SOUTENANCE
DU DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE**

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

**Madame LAGADIC-GOSSMANN Dominique, Directeur de Recherche CNRS, Faculté
de Pharmacie Université de Rennes1,**

Madame BELZUNG Catherine, Professeur, Université de Tours.

Le Président de l'Université de Lorraine, autorise :

Mademoiselle CREPEAUX Guillemette

à soutenir devant un jury de l'UNIVERSITE DE LORRAINE, une thèse intitulée :

**"Exposition périnatale à un mélange d'Hydrocarbures Aromatiques Polycyclique chez le
rat : Evaluation des effets neurotoxiques à court et à long terme"**

en vue de l'obtention du titre de :

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Intitulé du doctorat : **"Sciences Agronomiques"**

Fait à Vandoeuvre, le **12 Octobre 2012**

Le Président de l'Université de Lorraine,

Pierre MUTZENHARDT



Exposition périnatale à un mélange d'Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques chez le rat : Evaluation des effets neurotoxiques à court et à long terme

Classés parmi les Polluants Organiques Persistants, les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) sont des composés ubiquitaires dans l'environnement, auxquels l'Homme est exposé principalement *via* l'ingestion d'aliments contaminés. Les HAP sont connus depuis les années 1990 comme pouvant être neurotoxiques tant chez l'Homme que chez l'animal. Le transfert des HAP entre la mère et le fœtus *via* le placenta ainsi que la présence de ces composés dans le lait maternel ont été montrés à plusieurs reprises, posant ainsi la question du risque lié à une exposition survenant lors de phases précoces du développement de l'individu. Parce que ce risque n'a été que partiellement étudié, le travail de thèse présenté dans ce manuscrit a eu pour objectif d'évaluer la toxicité à court et à long terme pour le système nerveux en développement, d'un mélange de 16 HAP ingéré par la rate gestante et/ou allaitante. Les HAP ont été administrés *via* un aliment contaminé à deux doses, 2 et 200 µg/kg/jour. La dose la plus faible correspond aux niveaux de contamination environnementale *via* l'alimentation de la mère pendant les périodes de gestation et/ou d'allaitement.

Les résultats montrent que l'exposition périnatale au mélange de HAP n'a pas induit d'effets à court terme sur le développement neuromoteur et sensoriel des jeunes rats. En revanche, une augmentation à long terme des niveaux d'activité et d'anxiété a été relevée chez les animaux exposés. Par ailleurs, des modifications du métabolisme énergétique cérébral, évalué par l'activité enzymatique de la cytochrome oxydase sur des coupes de cerveaux prélevés à différents âges ont été observées, notamment au niveau du système limbique. La mesure des concentrations de HAP dans le compartiment cérébral des rats a montré la présence de l'ensemble des molécules mères, y compris chez les animaux témoins, ce qui laisse supposer l'existence d'un bruit de fond environnemental non négligeable dans ce type d'étude. Finalement, plusieurs facteurs modulent la toxicité induite, parmi lesquelles la période d'exposition, et l'administration d'un mélange et non d'une molécule seule. En conclusion, ce travail a permis de mettre en évidence, chez le rat, une neurotoxicité retardée suite à une exposition précoce à un mélange de 16 HAP tant sur le plan comportemental que métabolique, ce qui pose la question du risque pour l'Homme, et en particulier pour l'individu en développement, d'une exposition à ce type de composés.

Mots clés : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques, contamination alimentaire, rat, neurotoxicité, développement neuromoteur et sensoriel, comportement, cytochrome oxydase

Perinatal exposure to a mixture of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the rat: Evaluation of neurotoxic effects in the short and long term

Classified among Persistent Organic Pollutants, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) are ubiquitous compounds in the environment to which human is exposed mainly through ingestion of contaminated food. PAHs are known since the 1990s as being neurotoxic both in humans and in animals. PAH transfer between mother and fetus through the placenta, and the presence of these compounds in breast milk have been shown, thus raising the question of risk exposure occurring during early stages of development of the individual. Because this risk was only partially studied, the thesis presented in this manuscript was designed to assess the short-term and long-term toxicity for the developing nervous system, of a mixture of 16 PAHs ingested by the pregnant and / or breastfeeding rat. PAHs were administered via a contaminated food at two doses, 2 and 200 µg/kg /day dose. The lowest one corresponds to the levels of environmental contamination via the mother's diet during gestation and/or lactation.

The results show that perinatal exposure to the mixture of PAHs did not induce short-term effects on neuromotor and sensory development on pups. In contrast, a long-term increase in activity and anxiety levels was observed in the exposed animals. In addition, changes in cerebral energy metabolism, as assessed by the enzymatic activity of cytochrome oxidase on brain sections taken at different ages were observed, particularly in the limbic system. Measures of the concentrations of PAHs in the pup brain compartment showed the presence of all the parent compounds, including control animals, suggesting the existence of an environmental noise significant. Finally, several factors modulate PAH toxicity, including the exposure period, and the administration of a mixture instead of a single molecule.

In conclusion, this work has highlighted, in rats, delayed neurotoxicity due to early exposure to a mixture of 16 PAHs, which raises the question of risk to humans, and in particular for the individual developing exposure to such compounds.

Keywords: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, food contamination, rat, neurotoxicity, sensory and neuromotor development, behaviour, cytochrome oxidase