



## 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](mailto: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.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

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

**Ecole Doctorale Sciences et ingénieries**

**RESSOURCES PROCÉDES PRODUITS ENVIRONNEMENT**

**Thèse de doctorat pour l'obtention du titre de**

**Docteur de l'Université de Lorraine**

**Mention : Écotoxicologie, Biodiversité, Ecosystèmes**

**Présentée par :**

***Alaa KARKABA***

**Effets neurotoxiques et multigénérationnels d'une exposition périnatale aux faibles doses de polychlorobiphényles non-dioxin-like indicateurs (PCB-NDL<sub>i</sub>) dans un modèle murin**

**Soutenue publiquement le 14 Décembre 2017**

**Jury**

<b>Mme C. Cotinot</b> , Directeur de Recherche, UMR BDR, INRA (Jouy en Josas, Fr)	<b>Présidente</b>
<b>M. J.P. Cravedi</b> , Directeur de Recherche, AlimH, INRA (Toulouse, Fr)	<b>Rapporteur</b>
<b>M. M. Kebieche</b> , MCF, Université de Jijel (Jijel, Alg)	<b>Rapporteur</b>
<b>Mme D. Pillon</b> , MCF, INRA/CNRS, Université de Tours (Tours, Fr)	<b>Membre du jury</b>
<b>M. J. Bouayed</b> , MCF, HDR, Université de Lorraine (Metz, Fr)	<b>Membre du jury</b>
<b>M.R. Soulimani</b> , Professeur, Université de Lorraine (Metz, Fr)	<b>Directeur</b>

# Remerciement

Dans un 1er temps, je souhaite remercier chaleureusement mon directeur de thèse, Pr. Rachid Soulimani, pour sa pertinence scientifique, ses conseils avisés et sa confiance qu'il m'a accordée jusqu'à la fin de ce travail. 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 et séminaires.

Je tiens à remercier le Pr. Jean-Pierre Cravedi d'avoir accepté d'être le rapporteur de mon travail de thèse et de m'apporter une réelle contribution d'un regard d'expert international sur la problématique abordée. Je suis très honorée de sa présence.

Je remercie également Dr. Mohammed Kebieche d'avoir accepté d'être le rapporteur de ma thèse. Qu'il trouve ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

Je suis très honorée que Mme le Pr. Corinne Cotinet ait accepté de siéger dans mon jury et de contribuer à l'examen de mes travaux.

J'adresse également mes sincères remerciements à Dr. Delphine Pillon d'avoir acceptée d'examiner mon travail de thèse. Je suis très reconnaissante de sa présence.

Mes sincères remerciements vont également à Dr. Jaouad Bouayed pour sa grande disponibilité, son efficacité, et ses nombreux conseils durant la valorisation des résultats et la rédaction de la thèse.

J'exprime ma vive gratitude au Pr. Hassan Rammal pour ses orientations, ses conseils, et sa confiance qui m'ont toujours enthousiasmée.

Je tiens également à remercier l'école doctorale RP2E (Ressources Procédés Produits Environnement) qui m'a permise de réaliser cette thèse.

A la faculté d'odontologie de Nancy, je tiens à remercier Dr. Catherine Strazielle pour sa gentillesse et son aide infinie pour bien effectuer l'enseignement.

Pr. Chafique Younos un grand merci pour votre encouragement et votre gentillesse.

Un immense merci à mes collègues thésards, pour tous vos conseils et votre amitié ; merci à Nidhal pour son aide et ses encouragements; merci à Imen pour son amitié, et pour nous avoir joliment prouvé qu'il y a une vie après la thèse ...

Ce travail n'aurait pas été possible sans le soutien de «l'Association de Spécialisation et d'Orientation Scientifique» à Beyrouth, qui m'a permis, grâce à sa bourse financière, de me consacrer sereinement à l'élaboration de ma thèse.

Le seul moyen de se délivrer d'une tentation, c'est d'y céder paraît-il ! Alors j'y cède en disant un grand Merci aux personnes qui ont cru en moi et qui m'ont permis d'arriver au bout de cette thèse.

Enfin, à ma famille :

نهَلِّمَ إِطِيَّ

فِيهِمْ نَهْمُ فَصُولٍ

نَلِّمُ لَشَرِّ شَرِّ

مِنْ بَهْتَمِ بَدِّ لَا زَل

رَلِّدُ دُيْبِ دِرْطِيَّ

عَنْ بَهْتَمِ مِمَّ عَشَّ هِفْلُولٍ

أَدْرِزُّ لَنْ مَن

بِحِيٍّ مُصْرِيَّ نَظْنِ

أُمِّي بَلْبِي :

نَكْتُ مَسْ لِي قَشِي ... طِيَّ نَلِّمَ إِ نَزَّ ش

إِخْوِي، فَهَمُّ دَبْبِي ع مَدِيْفِي صِلْمِي صَغَشِي

جَدِّي، جَدِّي أَخُونِي ...

نَكْتُ مَفْيِي دَوُّ مَنِبَلْتَمِنِنِ حَمْرِي

## ***Avant-Propos***

*Une partie des résultats obtenus dans ce mémoire a fait l'objet de publications et de communications scientifiques dans des congrès nationaux et internationaux.*

### **Publications**

**Alaa Karkaba**, Nidhal Soualeh, Rachid Soulimani, Jaouad Bouayed.

Perinatal effects of exposure to PCBs on social preferences in young adult and middle-aged offspring mice, *Hormones and Behavior*, 96, (2017)137-146.

### **Publications en cours de préparation**

**Alaa Karkaba**, Nidhal Soualeh, Rachid Soulimani, Jaouad Bouayed.

Multigenerational effects of perinatal exposure to PCBs on anxiety-related behavior in middle-aged F1 and F2 offspring mice: Sex dimorphic effect.

**Alaa Karkaba**, Nidhal Soualeh, Rachid Soulimani, Jaouad Bouayed.

Multigenerational effects of perinatal exposure to PCBs on depressive-like behavior in young adult F1 and F2 offspring mice: Sex-dependent effect.

### **Communications orales**

**Alaa Karkaba** : Effets neurotoxiques d'une exposition périnatale multigénérationnelle au mélange des 6 polychlorobiphényles « non-dioxin-like » ( $\Sigma$ 6 PCB-NDL) chez les souris Swiss. Assemblée consultative de l'URAFPA. 4 juillet 2014. Nancy, France.

**Alaa Karkaba**: Evaluation des effets neurotoxiques développementaux induits par la  $\Sigma$  6 PCB-NDL dans un modèle murin: Etude multigénérationnelle. Séminaire Annuel RP2E, le 15 janvier 2015, Nancy, France.

## Communications par affiches

**Alaa Karkaba**, Julie Peiffer, Hassan Rammal, Jaouad Bouayed, Rachid Soulimani.

$\Sigma$ 6 PCB-NDL: toxicité multigénérationnelle développementale et comportementale. Doctoriales de Lorraine (DocLor), 22 mai 2014, Ventron, France

**Alaa Karkaba**, Julie Peiffer, Arpiné Elnar, Frédéric Desor, Hassan Rammal, Fabian Marin, Christophe Nemos, Jaouad Bouayed, Rachid Soulimani.

Evaluation of  $\Sigma$ 6 NDL-PCBs-induced neurotoxicity in mice offspring: epigenetic multigenerational study. First international congress, global environmental contamination: challenges for the well-being of the human brain, September 7<sup>th</sup> – 10<sup>th</sup>, 2014, Luxembourg.

**Alaa Karkaba**, Julie Peiffer, Arpiné Elnar, Frédéric Desor, Fabian Marin, Hassan Rammal, Christophe Nemos, Rachid Soulimani.

Evaluation of  $\Sigma$ 6 NDL-PCB-induced neurotoxicity in mice offspring: a multigenerational epigenetic study. 2<sup>nd</sup> Paris Workshop on Endocrine Disruptors Effects on Wildlife and human health, PNRPE, 21- 22 juillet 2016, Paris, France.

**Alaa Karkaba**, Julie Peiffer, Arpiné Elnar, Frédéric Desor, Sandra Marchionni, Fabian Marin, Hassan Rammal, Christophe Nemos, Rachid Soulimani.

Evaluation des effets neuro-comportementaux induits par des expositions précoces aux  $\Sigma$ 6 PCB-NDL dans un modèle murin: Etude multigénérationnelle. La 22ème Conférence Scientifique Internationale du LAAS « Les Avenues sociales de la recherche », 14 et 15 Avril, 2016, Kaslik, Liban.

## ***Abréviations***

AChE : acétylcholinestérase

AESA : autorité européenne de sécurité des aliments

AFSSA : agence française de sécurité sanitaire des aliments

AhR : aryl hydrocarbon receptor

AR : récepteur aux androgènes

ARNm : acide ribonucléique messenger

AMAP: Arctic Monitoring and Assessment Programme

ANOVA : analyse de la variance

ATSDR : agency for Toxic Substances and Disease Registry

BF : bras fermée

BO : bras ouverte

BPA : le bisphénol A

CC : compartiment clair

CCO : chambre claire/obscur

cm : centimètre

CS : compartiment sombre

C3C : compartiment à trois chambres

CITEPA : Centre Interprofessionnel d'Etudes de la Pollution Atmosphérique

CORT : corticostérone

CYP450 : cytochrome P450

D10 : souris de la génération F2 issues de deux parents F1 exposés, via leurs mères F0, durant la période périnatale à la dose 10 ng/kg/jour de PCB-NDL<sub>i</sub>.

D1000 : souris de la génération F2 issues de deux parents F1 exposés, via leurs mères F0, durant la période périnatale à la dose 1000 de PCB-NDL<sub>i</sub>

DI-1 : la déiodinase-1

DES : diéthylstilbestrol

DIREN : Direction Régionale de l'Environnement

DJT : dose journalière tolérable

EFSA : European Food Safety Authority

ER : récepteur aux œstrogènes

E.S.M. : erreur standard à la moyenne

F: female

g : gramme

GABA : acide gamma-aminobutyrique extracellulaire

GC/ECD : chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à capture d'électrons

GC/MS : chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

GN : Géotaxie négative

GJIC : la communication intracellulaire par jonction gap

h : heures

HAP : hydrocarbures aromatiques polycycliques

HRGC- HRMS : High Resolution Gas Chromatography/High Resolution Mass Spectrometry

IARC : centre international de recherche sur le cancer

ICN : ionisation chimique négative

IUPAC : International Union of Pure and Applied Chemistry

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

INRS : Institut National de Recherche et de Sécurité

LCS : labyrinthe en croix surélevé

LOAEL : lowest observed adverse effect level

M10 : souris de la génération F2 issues des mères F1 exposées, via leurs mères F0, durant la période périnatale à la dose 10 ng/kg/jour de PCB-NDL<sub>i</sub>.

M1000 : souris de la génération F2 issues des mères F1 exposées, via leurs mères F0, durant la période périnatale à la dose 1000 ng/kg/jour de PCB-NDL<sub>i</sub>.

M: Mâle

min : minutes

NOAEL : no observed adverse effect level

MPO: myéloperoxydase

MRL: minimal risk level

ng : nanogramme

NTP : National Toxicology Program

OCDE : Organisation de Coopération et de Développement Economique

OF : Open-field

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

P10 : souris de la génération F2 issues des pères F1 exposés, via leurs mères F0, durant la période périnatale à la dose 10 ng/kg/jour de PCB-NDL<sub>i</sub>.

P10 : souris de la génération F2 issues des pères F1 exposés, via leurs mères F0, durant la période périnatale à la dose 10 ng/kg/jour de PCB-NDL<sub>i</sub>.

P1000 : souris de la génération F2 issues des pères F1 exposés, via leurs mères F0, durant la période périnatale à la dose 1000 ng/kg/jour de PCB-NDL<sub>i</sub>.

p.c.: poids corporel

PCDD: polychlorodibenzo-dioxines

PCDF : polychlorodibenzo-furanes

PCB : polychlorobiphényles

PCB-DL : biphényles polychlorés dioxin-like

PCB-NDL : biphényles polychlorés non-dioxin-like

PCB-NDL<sub>i</sub> : biphényles polychlorés non-dioxin-like indicateurs

Σ6 PCB-NDL : la somme des six biphényles polychlorés non-dioxin-like

PN : âge postnatal

POP : polluants organiques persistants

ppb : une partie par billion ;  $1 \text{ ppb} = 1 \mu\text{g}/\text{kg} = 1 \mu\text{g}/\text{l}$

ppm : une partie par million ;  $1 \text{ ppm} = 1 \text{ mg}/\text{kg} = 1 \text{ mg}/\text{l}$

QI : quotient intellectuel

QSAR : Quantitative Structure Activity Relationship

REACH : Registration, Evaluation, Authorisation and restriction of Chemicals

RI : résident/intrus

RIVM : Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu, Institut national des Pays-Bas pour la santé publique et l'environnement

RTN : retournement

RyR3 : récepteur de la ryanodine 3

SC : suspension caudale

SNC : système nerveux central

TDAH : troubles du déficit de l'attention/hyperactivité

TTR : la protéine transthyrétine

UGT1A : les enzymes uridine-glucuronosyltransférase

VKM : Vitenskapskomiteen for Mattrygghet, Comité scientifique norvégien pour la sécurité alimentaire

WESPOC : test de l'échappement de l'eau

ZC : zone centrale

ZI : zone intermédiaire

ZP : zone périphérique

# *Table des matières*

<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
<i>1. Contexte de l'étude .....</i>	<i>1</i>
<i>2. Problématique .....</i>	<i>1</i>
<i>3. Hypothèse .....</i>	<i>4</i>
<b>SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>6</b>
<b>I. Les polychlorobiphényles .....</b>	<b>6</b>
<b>I.1. Introduction .....</b>	<b>6</b>
<b>I.2. Classification .....</b>	<b>9</b>
<b>I.2.1. Les critères chimiques .....</b>	<b>9</b>
<b>I.2.2. Les critères biologiques .....</b>	<b>10</b>
<b>I.3. Production et commercialisation des PCB .....</b>	<b>11</b>
<b>I.4. Les sources de contamination .....</b>	<b>15</b>
<b>1.4.1. Les sources de contamination historiques .....</b>	<b>15</b>
<b>1.4.2. Les sources de contamination actuelle .....</b>	<b>16</b>
<b>II. Les polychlorobiphényles non-dioxine-like .....</b>	<b>17</b>
<b>II.1. Classification des congénères .....</b>	<b>17</b>

<b>II.2. Surveillance et dosage : les PCB indicateurs</b> .....	18
<b>II.3. Occurrence</b> .....	19
<b>II.4. Exposition humaine</b> .....	22
<b>II.4.1. Population générale</b> .....	22
<b>II.4.2. Population particulière</b> .....	25
<b>II.4.2.1. <i>Le fœtus</i></b> .....	25
<b>II.4.2.2. <i>Les nourrissons allaités</i></b> .....	25
<b>II.5 Les niveaux dans les tissus humains</b> .....	27
<b>II.5.1. Sérum et tissus adipeux</b> .....	27
<b>II.5.2. Placenta et sang de cordon ombilical</b> .....	27
<b>II.5.3. Le lait maternel</b> .....	28
<b>II.6 Toxicocinétique et métabolisme</b> .....	29
<b>II.7. Les effets toxicologiques</b> .....	32
<b>7.2.1. Perturbation endocrinienne</b> .....	34
<b>7.2.1.1. Hormones stéroïdiennes</b> .....	34
<b>7.2.1.2. Hormones thyroïdiennes</b> .....	34
<b>II.7.2. Neurotoxicité développementale</b> .....	35
<b>II.7.2.1. <i>Etudes épidémiologiques</i></b> .....	37

<b>II.7.2.1.1. Evaluation du risque</b> .....	35
<b>II.7.2.2. Expérimentations animales</b> .....	40
<b>III. Notions de faibles doses</b> .....	43
<b>IV. Impact de la fenêtre d'exposition</b> .....	46
<b>V. Effets transgénérationnels</b> .....	48
<b>V.1. La vinclozoline</b> .....	50
<b>V.2. Le bisphénol A</b> .....	51
<b>V.3. Le diethylstilbesterol</b> .....	52
<b>METHODOLOGIE</b> .....	54
<b>I. Préparation des mélanges de PCB-NDL<sub>i</sub></b> .....	54
<b>II. Préparation de l'aliment et exposition des animaux</b> .....	55
<b>III. Choix des doses de PCB-NDL<sub>i</sub></b> .....	55
<b>IV. Animaux et conditions d'hébergement</b> .....	55
<b>V. Traitement des mères (F0) durant la gestation et la lactation et production de la génération F1</b> .....	56
<b>VI. Production de la génération F2</b> .....	57
<b>VII. Etude fonctionnelle</b> .....	60
<b>VII.1. Evaluation du développement moteur</b> .....	60

<b>VII.1.1. Test de retournement (righting reflex) (JPN 3 - 9) .....</b>	<b>61</b>
<b>VII.1.2. Test de réaction anti-gravitaire (<i>géotaxie négative</i>) (JPN 4 - 11) .....</b>	<b>62</b>
<b>VII.2. Evaluation neuro-comportementale .....</b>	<b>63</b>
<b>VII.2.1. Test du Rotarod (JPN 28 et 35) .....</b>	<b>64</b>
<b>VII.2.2. Test de l'échappement de l'eau (WESPOC) (JPN 40) .....</b>	<b>65</b>
<b>VII.2.3. Test de la chambre claire/obscur (JPN 40) .....</b>	<b>67</b>
<b>VII.2.4. Test de la suspension caudale (JPN 50 et 330) .....</b>	<b>68</b>
<b>VII.2.5. Test du compartiment à trois chambres (JPN 50 et 330) .....</b>	<b>69</b>
<b>VII.2.6. Test du résident/intrus (JPN 80) .....</b>	<b>71</b>
<b>VII.2.7. Test de l'Open-field (JPN 330) .....</b>	<b>72</b>
<b>VII.2.8. Test du labyrinthe en croix surélevé (LCS) (JPN 330) .....</b>	<b>73</b>
<b>VIII. Récapitulatif de batterie de tests développementaux et comportementaux réalisée .....</b>	<b>75</b>
<b>IX. Prélèvement .....</b>	<b>76</b>
<b>X. Analyse biochimique .....</b>	<b>76</b>
<b>X.1. Objectifs .....</b>	<b>76</b>
<b>X.2. Dosage de corticostérone .....</b>	<b>76</b>
<b>X.3. Dosage de myéloperoxydase (MPO) .....</b>	<b>77</b>

<b>X.4. Dosage de l'activité de l'acétylcholinestérase (AChE) .....</b>	<b>77</b>
<b>X.5. Dosage de sérotonine .....</b>	<b>78</b>
<b>XI. Analyses statistiques .....</b>	<b>79</b>
<b>RESULTATS .....</b>	<b>81</b>
<b>I. Effet multigénérationnel de l'exposition des souris mères F0 aux PCB-NDL<sub>i</sub> sur la coordination locomotrice et la fonction vestibulaire des souriceaux des deux générations F1 et F2 .....</b>	<b>81</b>
<b>II. Effet multigénérationnel de l'exposition des souris mères F0 aux PCB-NDL<sub>i</sub> sur la coordination locomotrice des souris juvéniles des deux générations F1 et F2 .....</b>	<b>92</b>
<b>III. Effet multigénérationnel de l'exposition des souris mères F0 aux PCB-NDL<sub>i</sub> sur l'activité locomotrice des souris péri-adolescentes de deux générations F1 et F2 .....</b>	<b>98</b>
<b>IV. Effet multigénérationnel de l'exposition des souris mères F0 aux PCB-NDL<sub>i</sub> sur le comportement d'agressivité des souris mâles adultes des deux générations F1 et F2 .....</b>	<b>101</b>
<b>V. Effet multigénérationnel de l'exposition des souris mères F0 aux PCB-NDL<sub>i</sub> sur le niveau de l'anxiété des souris péri-adolescentes et d'âge moyen de deux générations F1 et F2 .....</b>	<b>101</b>

<b>VI. Effet multigénérationnel de l'exposition des souris mères F0 aux PCB-NDL<sub>i</sub> sur le comportement de résignation des souris jeunes adultes et d'âge moyen de deux générations F1 et F2 .....</b>	112
<b>VII. Effet multigénérationnel de l'exposition des souris mères F0 aux PCB-NDL<sub>i</sub> sur l'activité générale des souris d'âge moyen de deux générations F1 et F2 .....</b>	116
<b>VIII. Effet multigénérationnel de l'exposition des souris mères F0 aux PCB-NDL<sub>i</sub> sur le comportement social des souris jeunes adultes et d'âge moyen F1 et des souris d'âge moyen F2 .....</b>	120
<b>IX. Effet de l'exposition des souris mères F0 aux PCB-NDL<sub>i</sub> sur le niveau des marqueurs plasmatiques chez les souris d'âge moyen de la génération F1 .....</b>	137
<b>DISCUSSION .....</b>	139
<b>CONCLUSION GENERALE .....</b>	157
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	161
<b>ANNEXES .....</b>	190

# *Introduction*

## **1) Contexte de l'étude**

Au cours des dernières décennies, les effets délétères de nombreux polluants ubiquitaires sur le développement des organismes vivants et sur la reproduction constituent la préoccupation majeure des scientifiques comme d'ailleurs des pouvoirs publics. Ainsi, les polluants organiques persistants (POP) produits soit volontairement, comme certains pesticides ou des retardateurs de flammes, ou involontairement comme des sous-produits des procédés industriels ou des dérivés de l'incinération, représentent un défi sanitaire à l'échelle planétaire compte tenu de leur énorme diffusion et de leur toxicité. Les POP possèdent un ensemble de propriétés physico-chimiques communes, y compris (i) une grande stabilité dans l'environnement qui leur permet d'être transportés par le biais des phénomènes naturels sur des longues distances loin de leurs sources d'émissions (Rigét *et al.*, 2010), (ii) une haute lipophilie qui favorise leur bioaccumulation dans les tissus adipeux et dans la chaîne alimentaire (Fernández and Grimalt, 2003), (iii) une grande persistance dans l'environnement du fait qu'ils ne sont que très peu sensibles aux dégradations biologiques naturelles, (iv) et un large éventail d'effets toxiques sur la santé humaine, sur la faune et sur l'environnement (Benarroch, 2013; Landrigan *et al.*, 2005).

Devant l'ampleur de leur risque sanitaire, un grand nombre de POP a été interdit dans les années 70 et 80. Une étape essentielle en vue de supprimer les POP a été l'élaboration d'un traité international signé par plus de 150 pays et connu sous le nom de Convention de Stockholm. Entré en vigueur en mai 2004, ce traité mondial a interdit l'utilisation de 12 composés de POP extrêmement toxiques, y compris les polychlorobiphényles (PCB), les dioxines et les furanes (PCDD/F) ainsi que 9 pesticides (aldrine, dieldrine, DDT, endrine, chlordane, hexachlorobenzène, mirex, toxaphène et heptachlore) (UNEP, 2001; 2009). Par contre, dans de nombreux pays, plusieurs composés continuent à être utilisés malheureusement à grande échelle.

## **2) Problématique**

Les biphényles polychlorés (PCB) sont des composés aromatiques organochlorés largement répandus dans l'environnement depuis 1929. Leur accumulation dans les tissus adipeux de différentes espèces, leur bioamplification dans les chaînes alimentaires, leur persistance et leur

transport à longues distances ont porté une attention croissante sur leurs risques pour la santé humaine et animale d'où l'interdiction de leur production dans plusieurs pays à partir de 1970.

Les PCB ont été classés, en 1987, en tant que substances potentiellement carcinogènes pour l'Homme (IARC, 1987). En effet, l'exposition aux PCB a été liée à une augmentation des effets carcinogènes au niveau de l'estomac, des poumons (Pavuk and Cerhan, 2004), du foie (Gustavsson and Hogstedt, 1997; Porta et al., 2002; Schmitz et al., 1995) du cerveau (Loomis et al., 1997; Sinks et al., 1992), et du pancréas (Hsu et al., 1994; Porta et al., 2008) ainsi que de la prostate (Ritchie et al., 2005). De plus, ces xénobiotiques peuvent agir en tant que promoteurs de tumeurs et ils peuvent causer un carcinome hépatocellulaire et un excès de nodules néoplasiques hépatiques (Tryphonas and Feely, 2001).

De même, les PCB pourraient induire des atteintes significatives au niveau du système immunitaire (Svensson et al., 1995; Weisglas-Kuperus et al., 1995) en conduisant par exemple à l'immunodépression des lymphocytes T et des monocytes et une immunosuppression de la fonction des macrophages (Tryphonas and Feely, 2001; Tryphonas et al., 1991). En outre, l'exposition aux PCB pourrait avoir des conséquences néfastes sur la reproduction (Cohn et al., 2011; Dickerson et al., 2011), y compris, un raccourcissement des cycles menstruels chez les femmes (Mendola et al., 1997), des modifications du taux de l'œstrogène au niveau central (Colciago et al., 2006) et périphérique (Meerts et al., 2004) ainsi qu'une augmentation de l'apoptose des cellules de Leydig (Oskam et al., 2004).

La neurotoxicité des PCB a été aussi mise en évidence. En effet, ces xénobiotiques induiraient des troubles moteurs, des déficits de la mémoire et de la vigilance ainsi que de la baisse du quotient intellectuel (QI), des capacités mnésiques et d'apprentissage, et des capacités visuelles et de la reconnaissance des objets (Elnar et al., 2012 ; Schantz et al., 1997 ; Soualeh et al., 2017). En outre, les PCB pourraient altérer le système de la neurotransmission et modifier les niveaux de certains récepteurs, y compris, les récepteurs de la dopamine, du GABA, de la Ryanodine, et de la Sérotonine, qui sont impliqués dans de nombreuses fonctions comportementales et cognitives (Boix et al., 2010; 2011; Elnar et al., 2012; Kouzu et al., 2000; Ogren et al., 2008).

Les PCB regroupent 209 congénères réparties selon 2 catégories, les PCB de type dioxine, PCB dioxine-like, (PCB-DL) et les PCB non-dioxin-like (PCB-NDL). De nombreuses études ont montré que la toxicité et le mécanisme d'action des PCB-DL. Cependant peu de données sont fournies sur les PCB-NDL même s'ils sont les congénères les plus répandus dans l'environnement et dans la chaîne alimentaire. Parmi les 209 congénères de PCB, 7 congénères, appelés les « PCB indicateurs » ont été choisis par le Bureau Communautaire de Référence de la Commission Européenne (Bruxelles) comme étant les composés à rechercher à priori dans les analyses de matrices organiques contaminées en PCB (sédiment, sang, chair, graisse) (Dagnat and Fisson, 2010). Ensuite, 6 congénères indicateurs appartenant à la classe des PCB non-dioxine-like (les PCB 28, 52 et 101, 138, 153 et 180) et représentant environ 50 % des PCB totaux ont été sélectionnés afin de suivre ces contaminants (EFSA, 2005b; EFSA, 2010; INRS, 2007; Stenberg and Andersson, 2008).

Des études ont montré que l'exposition aux PCB-NDL, à fortes doses, pendant la période développementale pourrait induire des effets neurotoxiques délétères suite à leurs capacités d'altérer le système de la neurotransmission (Fernandes et al., 2010; Pessah et al., 2010), ce qui conduit au final à des altérations par exemple au niveau de l'activité motrice, de la cognition, du comportement émotionnel et celui de la résignation (Boix et al., 2010, 2011 ; Ide et al., 2010 ; Kouzu et al., 2000 ; Ogren et al., 2008). En outre, notre groupe a récemment montré que l'exposition précoce et répétée aux faibles doses d'un mélange pur de PCB-NDL<sub>i</sub> aux doses environnementales ou aux anguilles contaminées, naturellement, entre autres par ces mêmes polluants, a induit des déficiences comportementales permanentes qui ont été souvent détectées tardivement dans la vie de la progéniture, y compris un comportement anxieux (Elnar et al., 2012), un comportement hyperactif chez les femelles (Dridi et al., 2016), un comportement *dépressif-like* chez les mâles (Souhaleh et al., 2017). Selon d'autres études de notre groupe, l'anguille contaminée par les PCB a également induit des altérations cognitives qui sont apparues très tardivement chez la progéniture et d'une façon sexe dépendante. En effet, une atteinte cognitive avec une amnésie a été détectée seulement chez les femelles, et uniquement à l'âge moyen des souris exposées via leurs mères (Souhaleh et al., 2017). Les effets sexe-dépendants observés lors des différentes études pourraient être expliqués par le fait que les PCB-NDL sont des perturbateurs endocriniens (Langer and Kocan, 2003; Langer et al., 2007). Dans plusieurs cas, la perturbation endocrinienne induite par des xénobiotiques, provoquerait des effets toxiques non seulement chez la population exposée mais aussi chez les

générations suivantes. Dans le cas d'une exposition périnatale les effets transgénérationnels deviennent plus importants suite à la haute sensibilité des individus lors de la période développementale comme il a été mis en évidence par les études trans-générationnelles portant sur le bisphénol A (BPA) (Benarroch, 2013; Wolstenholme et *al.*, 2013). Il faut souligner que même si les PCB sont connus par leur toxicité développementale, très peu voire aucune étude n'a été réalisée encore pour évaluer leur neurotoxicité multigénérationnelle.

Ainsi plusieurs défis sociétaux concernent les contaminants chimiques et exposent les humains comme les animaux à de forts risques sanitaires et environnementaux. D'une part, les contaminations concernent l'ensemble des polluants organiques persistants, les métaux lourds, les pesticides comme d'autres résidus tels que les métabolites des médicaments. Ce mélange de tous ces résidus constitue souvent une mixture de l'exposition de chaque individu, d'autre part, les expositions sont devenues multiples (multi-expositions) et concernent toutes les voies vectrices de leurs transferts vers les animaux et les humains qui sont les principales cibles. Ces multi-expositions témoignent d'une contamination globale et insidieuse de notre environnement et d'une exposition inévitable à l'échelle de notre planète et de nos différents environnements qui sont devenues inéluctablement chroniques et répétées et qui constituent un réel risque sanitaire surtout chez les populations vulnérable telles que les femmes en âge de procréation, les enfants et les personnes âgées.

### 3) *Hypothèse*

Face à cette multi-exposition chronique et inévitable, nous nous sommes posés quelques questions et quelques hypothèses en lien avec l'exposition répétée par voie alimentaire via l'ingestion d'aliments (tels que les poissons) contaminés, même aux faibles doses environnementales de mélanges de contaminants dont les 6 PCB-NDL<sub>i</sub>.

1) Y'aurait-il des risques neurotoxiques à court et/ou à long terme liés à des expositions précoces et chroniques, même aux faibles doses surtout en période périnatale (gestationnelle et lactationnelle).

2) Quel serait l'impact de ces expositions précoces sur le neuro-développement et sur les fonctions comportementales et cognitives des générations suivantes (F1 et F2) même en absence d'exposition des F1 et F2.

3) Quels seront les fonctions comportementales et cognitives affectées ?

4) Quels seront les mécanismes cellulaires et moléculaires sous-jacents et les biomarqueurs qui en sont liés ?

Pour pouvoir apporter quelques réponses à nos questions et vérifier quelques-unes de nos hypothèses, nous avons accordé un intérêt particulier à l'évaluation des effets multigénérationnels sur le neuro-développement, les fonctions comportementales et cognitives induits par des expositions précoces à un mélange de PCB-NDL<sub>i</sub> dans un modèle murin (souris).

Au vu de nombreuses données de la littérature sur les perturbateurs endocriniens, nous avons pris le soin de considérer le sexe et l'âge des animaux chez les différentes générations étudiées à partir des mères exposées (F0) aux deux générations F1 et F2 suivantes.

Pour ce faire, nous avons exposé les souris mères gestantes et allaitantes (F0) à un mélange pur de PCB-NDL<sub>i</sub> mimant l'exposition humaine aux poissons contaminés en PCB.

Même si notre groupe a confirmé, auparavant, via de nombreux travaux les effets neurotoxiques sur le neuro-développement, les fonctions comportementales et les fonctions cognitives des PCB-NDL<sub>i</sub>, nous avons pris le soin de reproduire ces effets et surtout de les corrélés à de nouvelles études sur le risque du transfert de ces effets à travers les générations suivantes, même en absence des expositions. C'est une approche comportementale et cognitive d'évaluer un impact épigénétique de ces conditions expérimentales au travers d'une importante batterie de tests neuro-développementaux, cognitifs et comportementaux réalisés dès la naissance jusqu'à l'âge moyen des souris F1 et F2. Nous avons également projeté de quantifier différents marqueurs biochimiques et de les corrélés à ces altérations.

# *Synthèse bibliographique*

## I. Les polychlorobiphényles

### I.1. Introduction

Les polychlorobiphényles (PCB), des polluants organiques persistants et ubiquitaires, appartiennent à la famille des hydrocarbures halogénés polycycliques à haut poids moléculaire. Les PCB ont été générés suite à l'activité anthropique de l'Homme pour un usage purement industriel. Ils sont constitués d'un noyau biphényle comportant un nombre d'atomes de chlore qui varie de 1 à 10 (Figure 1). Virtuellement, 209 congénères de PCB peuvent exister suite aux différentes combinaisons possibles liées au nombre d'atomes de chlore et leur position dans la structure biphényle (OMS, 2000). Cependant, seulement 130 congénères de PCB ont été identifiés dans des mélanges commerciaux (Safe, 1990), avec des niveaux différents de toxicité. Chaque PCB est ainsi usuellement défini par un numéro entre 1 et 209, selon la nomenclature IUPAC (Tableau 1).

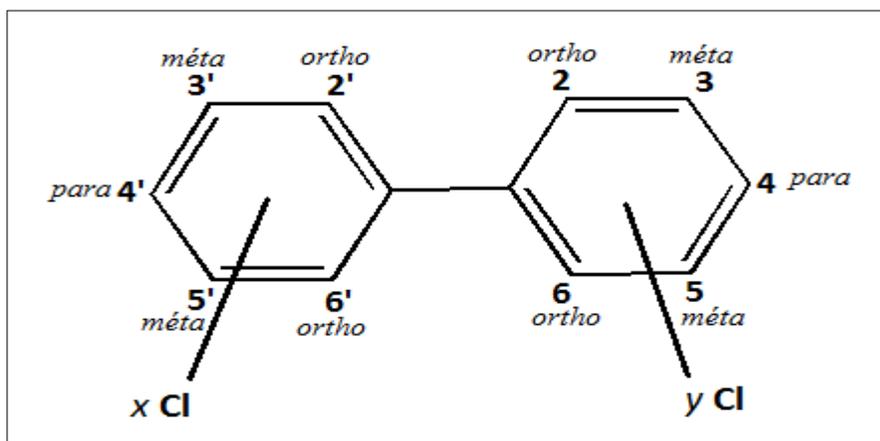


Figure 1 : Structure chimique des PCB (EFSA, 2005b)

Formule chimique :  $C_{12}H_{10-n}Cl_n$ , avec  $n = 1$  à  $10$  ( $x + y = n$ )

La nomenclature utilisée pour le positionnement des atomes de chlore est la suivante (McFarland and Clarke, 1989).

*Ortho* : Substitution du chlore au niveau des positions 2, 2'', 6 et 6''

*Méta* : Substitution du chlore au niveau des positions 3, 3'', 5 et 5''

*Para* : Substitution du chlore au niveau des positions 4 et 4''

Tableau 1: Distribution des congénères de PCB selon leur nombre de substitution en atome de chlore

Groups homologues (Sur la base du nombre de substitutions)	Congénères possibles
<b>Monochloro-biphényles</b>	3
<b>Dichloro-biphényles</b>	12
<b>Trichloro-biphényles</b>	24
<b>Tetrachloro-biphényles</b>	42
<b>Pentachloro-biphényles</b>	46
<b>Hexachloro-biphényles</b>	42
<b>Heptachloro-biphényles</b>	24
<b>Octachloro-biphényles</b>	12
<b>Nonachloro-biphényles</b>	3
<b>Decachloro-biphényle</b>	1
<b>Total</b>	<b>209</b>

Les PCB se présentent en général sous forme d'un liquide huileux dont la viscosité et la teinte s'intensifient avec le degré de chloration. Les plus légers sont liquides et incolores alors que les plus chlorés sont solides, blancs et opaques (Pellet et *al.*, 1993).

La substitution d'atomes de chlore sur les deux noyaux aromatiques confère aux PCB une grande stabilité chimique et thermique, donc une grande persistance dans l'environnement. Généralement, plus les atomes de PCB sont chlorés moins ils sont solubles et volatiles, par suite plus stables et immobiles dans l'environnement (Scrudato et *al.*, 1999). Ils résistent aux acides, bases et températures relativement élevées (<500 °C). Ils sont solubles dans la plupart des solvants

organiques et les graisses mais très peu solubles dans l'eau (0,007 à 5,9 mg/L) (INRS, 2007; Ruelle et al., 1993).

Le coefficient de partage octanol/eau (Log KOW) des PCB varie également en fonction de leurs degrés de chloration et il est plus élevé pour le PCB décachloré. Ce coefficient décrit la distribution à l'équilibre d'une molécule entre la phase polaire représenté par l'eau et la phase apolaire représenté par l'octanol qui est un solvant ayant des propriétés similaires aux membranes lipidiques des cellules. Ce coefficient constitue une référence pour étudier *in vitro* la capacité d'une molécule à franchir les membranes biologiques et à se bioaccumuler dans les organismes vivants. A partir de  $KOW > 3$  on considère que la molécule est potentiellement bioaccumulable (Noirot-Cosson, 2010) (Tableau 2).

Tableau 2: Principales données physico-chimiques des PCB pour chaque groupe de congénères (données uniques sont des moyennes) (Robertson and Hansen, 2001)

Groupe de congénères	Poids moléculaire (g/mol)	Point de fusion (°C)	Point d'ébullition (°C)	Pression de vapeur (Pa) à 25°C	Solubilité à 25°C (g/m <sup>3</sup> )	Coefficient de partage octanol/eau logKow	Taux d'évaporation approximatif à 25°C (g/(m <sup>2</sup> /h))
<b>Mono chlorobiphényle</b>	188,7	25-77,9	285	0,9 - 2,5	1,21 - 5,5	4,3 - 4,6	0,25
<b>Di chorobiphényle</b>	223,1	24,4-149	312	0,008 - 0,6	0,06 - 2	4,9 - 5,3	0,065
<b>Tri chlorobiphényle</b>	257,5	28-87	337	0,003 - 0,22	0,015 - 0,4	5,5 - 5,9	0,017
<b>Tétra chlorobiphényl</b>	292	47-180	360	0,002	0,0043 - 0,01	5,6 - 6,5	4,2.10 <sup>-3</sup>
<b>Penta chlorobiphényle</b>	326,4	76,5-124	381	0,0023 - 0,051	0,004 - 0,02	6,2 - 6,5	10 <sup>-3</sup>
<b>Hexa chlorobiphényl</b>	360,9	77-150	400	0,0007 - 0,012	0,0004-0,0007	6,7 - 7,3	2,5.10 <sup>-4</sup>

<b>Hepta chlorobiphényle</b>	395,3	122,4149	417	$1,3 \cdot 10^{-4}$	0,000045	6,7 - 7	$6,2 \cdot 10^{-5}$
<b>Octa chlorobiphényle</b>	429,8	159-162	432	$2,8 \cdot 10^{-5}$	0,0002 – 0,0003	7,1	$1,5 \cdot 10^{-5}$
<b>Nona chlorobiphényl</b>	464,2	182,8- 206	445	$6,3 \cdot 10^{-6}$	0,00018 – 0,0012	7,2 – 8,16	$3,5 \cdot 10^{-6}$
<b>Déca chlorobiphényl</b>	498,7	305,9	456	$1,4 \cdot 10^{-6}$	0,000001	8,26	$8,5 \cdot 10^{-7}$

Les PCB sont inscrits sur la liste des polluants organiques persistants (POP) établie dans le cadre du Programme des Nations Unies pour l'Environnement (PNUE), et sont considérés parmi les 12 POP les plus nocifs pour l'Homme (INERIS, 2012). Cette dangerosité des PCB envers les êtres humains a été mise en évidence suite à deux événements majeurs survenus au cours des années 1970. Le premier s'est déroulé au Japon en 1968 où les PCB étaient responsables du décès de 1780 personnes à Fukuoka et Nagasaki suite à la consommation d'huile de riz contaminée par des PCB à hauteur de 2000 ppm provenant d'une fuite de compresseur. Un événement similaire a touché 2000 personnes à Taiwan en 1979 (Hsu et *al.*, 1985; Kuratsune et *al.*, 1972). Ils sont généralement transmis aux êtres humains par voie alimentaire (Arnich et *al.*, 2009a; OMS, 2004).

## **I.2. Classification**

La classification des congénères de PCB relève des critères chimiques ou biologiques.

### **I.2.1. Les critères chimiques**

En raison de leur structure, caractérisée par substitution des atomes de chlore en position *méta* et *para*, 12 congénères ont été considérés coplanaires, à savoir les PCB 77, 81, 105, 114, 118, 123, 126, 156, 157, 167, 169 et 189. Ces PCB coplanaires ne représentent que 10 à 20 % de la totalité des PCB en poids (Grandjean and Landrigan, 2006). Ainsi, la majorité des PCB (197 congénères) sont non coplanaires, caractérisés par un ou plusieurs atomes de chlore en positions *ortho* par rapport à la molécule (Tableau 3). Cette position d'atome de chlore donne à la molécule

une configuration spatiale plus volumineuse et moins planaire, par rapport aux congénères PCB coplanaire que leur structure leur permet de se lier sur le récepteur cellulaire aryl-hydrocarbène (AhR) et enfin avoir un mécanisme d'action similaire à celui des dioxines. De ce fait, les PCB coplanaires sont donc des PCB-DL.

### **I.2.2. Les critères biologiques**

L'affinité au récepteur Ah et l'induction des enzymes cytochrome P450 (CYP450) ont été utilisés comme critères dans la première classification de la toxicité des congénères de PCB (Linden *et al.*, 2010; McFarland and Clarke, 1989). De ce fait, les congénères de PCB ont été classifiés comme inducteur de CYP1A1/2 (type 3-méthylcholanthrène (3-MC)), de CYP2B1/2 (type phénobarbital (PB)), ou de type mixte (McFarland and Clarke, 1989).

En général, les congénères *méta* et *para*-substitués sont capables de se lier avec haute affinité au même récepteur cellulaire que les dioxines, le récepteur Ah, et typiquement ils induisent seulement le CYP1A1/2. D'où leur nom les PCB « dioxine-like » (PCB-DL). En revanche, les congénères avec deux ou plusieurs *ortho*-substituants n'induisent que le CYP2B1/2, et se lient avec peu ou pas d'affinité au récepteur Ah. Tandis que les congénères PCB-NDL *mono* et *ortho*-substitués, qui se lient au récepteur Ah avec une affinité un peu plus élevée, sont des inducteurs de type mixte puisqu'ils induisent à la fois le CYP1A1/2 et le CYP2B1/2. A cause de l'absence ou de la faible affinité de ces congénères à AhR, ils sont nommés les PCB « non dioxine-like » (PCB-NDL) (Tableau 3).

Les PCB-NDL sont très chlorés et peu métabolisables et ont des mécanismes de toxicité différents de celui des dioxines et des PCB-DL. Ainsi, ils se caractérisent par leur forte occurrence dans l'environnement (Johnston *et al.*, 2009).

Tableau 3 : Numéros IUPAC des 12 congénères de PCB-DL et des 6 PCB-NDL indicateurs (OMS, 2000).

PCB	Numéro IUPAC
PCB-DL	12 congénères 77, 81, 105, 114, 118, 123, 126, 156, 157, 167, 169, 189
PCB-NDL	197 congénères 6 PCB-NDL indicateurs : 28, 52, 101, 138, 153 et 180

### I.3. Production et commercialisation des PCB

En 1929, la production industrielle des PCB a débuté aux Etats-Unis par la firme Monsanto & Co., qui a vendu des licences de production en Europe en conservant son quasi-monopole du marché (AMAP, 2000). La production mondiale des PCB est estimée à 1,5 million de tonnes, dont près de 400000 tonnes seraient dispersées dans l'environnement. La France était le 4ème producteur mondial derrière les Etats-Unis, l'Allemagne et la Russie, sa production est estimée à 135000 tonnes (De Voogt and Brinkman, 1989) (Tableau 4). Les deux sites français de production des PCB situés à proximité de Grenoble dans les communes de Jarrie et de Pont-de-Claix ont arrêté leur activité en 1987.

La firme Monsanto & Co a breveté une large gamme de produits contenant des PCB sous le nom commercial «Aroclor» (Tableaux 6 et 7). Au début, les produits «Aroclors» ont été commercialisés seuls, puis ils ont été mélangés à des solvants pour donner de nouveaux mélanges commerciaux (Asbestol, Abuntol, Inerteen, Therminol, Pyralène).

En Europe, les produits «Aroclors» sont retrouvés sous de nouvelles dénominations commerciales selon les pays et les firmes exploitantes (Sovol, Kanechlor, Fenclor...) (Tableau 5). Les États-Unis, l'Europe et le Japon ont été de grands utilisateurs de PCB. La France est particulièrement concernée en raison de sa très forte électrification notamment dans les domaines de l'hydroélectricité et du nucléaire.

Tableau 4: Quantité de PCB produite dans le monde entier (tonnes) (Breivik et al., 2007)

<i>Producteur</i>	<i>Pays</i>	<i>Début</i>	<i>Arrêt</i>	<i>Quantité (Tonnes)</i>	<i>%</i>	<i>Références</i>
<b>Monsanto</b>	USA	1930	1977	641,246	48,4	(De Voogt and Brinkman, 1989)
<b>Bayer AG</b>	West Germany	1930	1983	159,062	12,0	(De Voogt and Brinkman, 1989)
<b>Orgsteklo</b>	U.S.S.R.(Russia)	1939	1990	141,8	10,7	(AMAP, 2000)
<b>Prodelec</b>	France	1930	1984	134,654	0,2	(De Voogt and Brinkman, 1989)
<b>Monsanto</b>	U.K.	1954	1977	66,542	5,0	(De Voogt and Brinkman, 1989)
<b>Kanegafuchi</b>	Japan	1954	1972	56,326	4,2	(Tatsukawa, 1976)
<b>Orgsintez</b>	U.S.S.R.(Russia)	1972	1993	32,00	2,4	(AMAP, 2000)
<b>Caffaro</b>	Italy	1958	1983	31,092	2,3	(De Voogt and Brinkman, 1989)
<b>S.A. Cros</b>	Spain	1955	1984	29,012	2,2	(De Voogt and Brinkman, 1989)
<b>Chemko</b>	Czechoslovakia	1959	1984	21,482	1,6	(Schlosserova, 1994)
<b>Xi'an</b>	China	1960	1979	8,00	0,6	(Jiang et al., 1997)
<b>Mitsubishi</b>	Japan	1969	1972	2,461	0,2	(Tatsukawa, 1976)
<b>Electrochemical Company</b>	Poland	1966	1970	1,00	< 0,1	(Zulkowski et al., 2003)
<b>Zakłady Azotowe</b>	Poland	1974	1977	0,679	< 0,1	(Falandysz et al., 2000)
<b>Geneva industries</b>	USA	1971	1973	0,454	< 0,1	(De Voogt and Brinkman, 1989)
<b>Total</b>	Global	1930	1993	1325,810	100	

Tableau 5: Principaux noms commerciaux des produits contenant des PCB (AMAP, 2000; Van den Berg et al., 1998)

<i>Pays</i>	<i>Nom commerciaux</i>
<b>Etats-Unis</b>	Aroclor, Asbestol, Bakola 131, Clophen, cholerxtol, diaclor, Dykanol, Elemex, Hyvol, Inerteen , No-Flamol, Pyranol, Pyrenol, Pyrochlor, Saf-T-Kuhl, Therminol.
<b>France</b>	Abuntol, Asbestol, Electrophényle, Hydol, phenoclor, Pyralène, Therminol
<b>Royaume-Uni</b>	Aroclor, Pyroclor.
<b>Allemagne (ex: R.F.A.)</b>	Clophen ,Elaol.
<b>Italie</b>	Fenclor, D.K.
<b>Japon</b>	Kanechlor , santotherm
<b>Ex-U.R.S.S.</b>	Sovol , solvol
<b>Ex-Tchécoslovaquie</b>	Delor

Tableau 6 : Les caractéristiques des différents types d'Aroclor (Hutzinger et al., 1974)

Aroclor	% Chlore (Cl)	Nombre de Cl moyen par molécule	Poids moléculaire moyen
1221	20,5-21,5	1,15	192
1232	31,5-32,5	2,04	221
1242	42	3,10	261
1248	48	3,90	288
1254	54	4,96	327
1260	60	6,30	372
1262	61,5-62,5	6,80	389
1268	68	8,70	453

Tableau 7: Anciennes utilisations des différents types d'Aroclor (IARC, 1979)

Aroclor	Utilisation
1016 (1221, 1254)	Condensateurs électriques
1242, 1254, 1260	Transformateurs électriques
1248, 1254	Pompes à vide
1221, 1242	Turbines
1332, 1242, 1248, 1254, 1260	Fluides hydrauliques
1248, 1254, 1260, 1262, 1268	Résines synthétiques
1221, 1232, 1242, 1248, 1254	Adhésifs
1221, 1232, 1242, 1248, 1254, 1268	Plastifiants en caoutchouc
1242	Systèmes de transfert de chaleur
1242, 1254, 1268	Cire
1254	plastifiants, lubrifiants



#### **I.4. Les sources de contamination**

Plus de 1,5 million de tonnes de PCB ont été produits dans le monde depuis le début de sa production en fin des années 1920. Ils ont connu des applications multiples grâce à leurs propriétés physico-chimiques particulières.

Les sources de contamination peuvent être classées en deux grandes catégories: les sources historiques dues à la production des PCB de 1929 à 1987 et les sources actuelles de contamination qui permettent aujourd'hui la libération des PCB dans l'environnement.

##### **I.4.1. Les sources de contamination historiques**

Les PCB ont connu trois types d'applications pouvant être classées selon leur impact sur l'environnement (DIREN, 2009; PNUE, 2001):

**A) Les systèmes clos:** ces systèmes formaient 69 % de l'utilisation totale des PCB. Ils étaient en général des grands équipements (des transformateurs et des condensateurs) contrôlés pour éviter des fuites. Ils contenaient assez de PCB pour justifier la récupération de ces derniers. On les rencontre essentiellement dans les fluides diélectriques (liquides résistant au feu dans des transformateurs, dans des condensateurs, des interrupteurs), dans les anciens fours à micro-ondes et les moteurs électriques ...

**B) Les systèmes clos non contrôlables :** ils forment 10 % de l'utilisation totale des PCB. Ces systèmes concernaient les condensateurs de petites tailles, les fluides industriels en raison de leur pouvoir diélectrique élevé, de leur grande capacité d'absorption calorifique et de leur incombustibilité, les fluides caloporteurs (là où tout risque d'incendie était inacceptable) ainsi que les fluides hydrauliques de sécurité lorsque des contraintes thermiques interviennent (par exemple dans certaines installations minières). Des fuites étaient possibles mais pratiquement la récupération des PCB n'était pas envisageable.

**C) Les systèmes ouverts non contrôlables** : formant 21 % de l'utilisation totale de PCB. Ces systèmes correspondaient à des utilisations dispersives, comme les additifs stabilisants ou les ignifugeants dans l'encre, la peinture, les matières plastiques, les pesticides, les cires et les retardateurs de flamme. Ces utilisations en système ouvert introduisaient directement et dispersaient les PCB dans l'environnement rendant leur récupération impossible (AFSSA, 2002).

#### **I.4.2. Les sources de contamination actuelle**

Malgré leur interdiction dans presque tous les pays industriels au cours des années 1980, les PCB contaminent encore l'environnement, en raison des pratiques d'élimination inappropriées et l'utilisation des anciens matériels électriques contenant encore des PCB (La Rocca and Mantovani, 2006).

Les activités de décontamination et de traitements des déchets contaminés en PCB génèrent des rejets de ces polluants dans l'environnement. L'incinération des déchets industriels et des ordures ménagères serait à l'origine de la majorité des émissions de PCB dans l'atmosphère. La décontamination des appareils électriques contaminés (condensateurs, transformateurs) puis l'incinération de ces derniers est à l'origine du rejet des PCB dans l'environnement. En France, l'incinération génère 83% de l'émission des PCB dans l'air d'après le Centre interprofessionnel technique d'études de la pollution atmosphérique (CITEPA, 2006). Les PCB sont aussi présents dans les rejets des stations d'épuration ainsi que dans les boues d'épurations qui par rejets directs ou par épandage contribuent à la dispersion de ces polluants dans l'environnement.

Certaines activités comme le ferrailage et la récupération des métaux peuvent participer à la pollution de l'environnement en échappant à la réglementation ICPE (Installation classées pour l'environnement). De plus, certaines usines pourraient être une source de pollution en fabriquant des composés chlorés susceptibles de se dégrader pour former les PCB.

Les rejets et l'abandon de transformateurs contaminés en PCB participent encore à la pollution atmosphérique. De plus, les actes de vandalisme constitueraient aussi une source de pollution. En effet, des friches industrielles d'anciens ateliers, d'anciens supermarchés et d'anciennes décharges, s'ils ne sont pas surveillés, ils constitueraient des réservoirs de pollution parce qu'ils accueillent des transformateurs ou autres appareils contaminés susceptibles d'être

ouverts et vandalisés (ORS, 2008). Enfin, en France, le secteur résidentiel serait à l'origine de 17 % des émissions des PCB dans l'environnement suite à plusieurs activités dont la combustion de bois et l'usage de produits domestiques, d'après le CITEPA (2006).

## II. Les polychlorobiphényles non-dioxine-like

### II.1. Classification des congénères

Différentes classifications ont été attribuées aux PCB-NDL en fonction de leurs activités dans les tests *in vitro* (Stenberg et al., 2011). Les PCB-NDL avec quatre ou cinq substituants de chlore, avec une proportion élevée d'*ortho*-chlore et peu de *para*-substituants, ont un niveau d'activité plus élevé dans les bio-essais. En contrast, les congénères PCB-NDL avec six à sept atomes de chlore et un profil de substitution uniformément réparti sur le groupe biphényle ne montrent pas d'activité dans ces essais biologiques. Néanmoins, les PCB-NDL 18, 25, 26, 44, 47, 49 et 52, qui sont des congénères abondants dans l'environnement, sont classés dans le groupe biologiquement le plus actif des PCB-NDL (Stenberg et al., 2011).

Hamers et al. (2011) ont classé 24 congénères de PCB-NDL en fonction (i) de leurs propriétés agoniste/ antagoniste des récepteur aux œstrogènes (ER) et aux androgènes (AR), (ii) de leur affinité de liaison à la protéine transthyréine (TTR), une protéine de transport des hormones thyroïdiennes, (iii) de leur puissance d'inhiber la communication intracellulaire par jonction gap (GJIC), (iv) et leur puissance d'altérer l'expression de certaines protéines impliquées dans le métabolisme des hormones thyroïdiennes, telles que les enzymes uridine-glucuronosyltransférase (UGT1A1 et UGT1A6) et la déiodinase-1 (DI-1). Ces congénères ont été divisés en quatre groupes différents selon leurs profils de toxicité (Figure 2). Le PCB 168, n'appartenant pas à ces 24 congénères, a été tout de même recommandé en tant que congénère indicateur supplémentaire à cause de son abondance relativement élevée et sa caractéristique anti-androgénique et sa liaison transthyréine (Hamers et al., 2011).

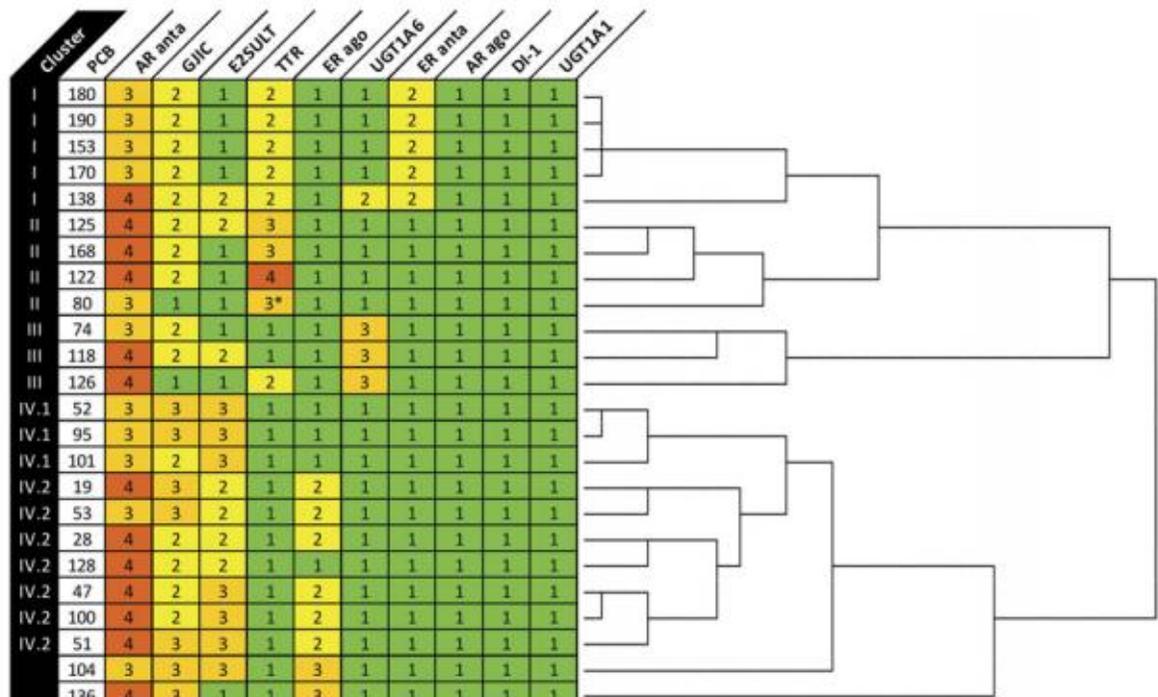


Figure 2 : La classification des 24 PCB-NDL selon leurs profils de toxicité in vivo. Les numéros de 1 à 4 représentent l'ordre croissant de la puissance de toxicité de chaque PCB selon différents mécanismes d'action (Hamers et al., 2011).

## II.2. Surveillance et dosage : les PCB indicateurs

Parmi les PCB, 7 congénères sont particulièrement présents dans l'environnement, caractérisés par leur forte occurrence dans la chaîne alimentaire en représentant environ 50 % de la charge totale de PCB. Ils sont utilisés comme des traceurs pour évaluer la contamination par les PCB, d'où leur nom : les PCB indicateurs. Les 7 PCB « indicateurs » ou les PCB<sub>i</sub> formés de PCB-NDL 28, 52, 101, 138, 153 et 180 et de PCB-DL 118, ont été sélectionnés d'un point de vue analytique plutôt que toxicologique. Ils sont les plus présents dans l'environnement et les aliments. Ils représentent de 20 à 30 % de la teneur en PCB dans les mélanges industriels (Chevreuil, 2009) et couvrent environ 50 % de la charge totale de PCB présente dans les matrices alimentaires (EFSA, 2005b). Les PCB<sub>i</sub> possèdent des propriétés toxicologiques importantes en raison de leur haut niveau de chloration (AFSSA, 2009). Ils ont été sélectionnés par le bureau communautaire de référence de

la commission européenne (Bruxelles) comme étant les composés à rechercher en priorité dans les analyses des matrices organiques contaminé par les PCB totaux (sédiments, sang, chair, graisse ...) (AFSSA, 2003; 2006a; 2008).

Par ailleurs, l'Agence européenne de sécurité des aliments (l'AESA) dans son avis du 8 novembre 2005 (EFSA, 2005) et l'Anses dans son avis du 23 octobre 2007 (AFSSA, 2007) ont retiré le PCB-DL 118 du groupe des PCB<sub>i</sub> et ils ont recommandé de ne plus retenir que les 6 PCB<sub>i</sub> sur les 7 (les PCB-NDL 28, 52, 101, 138, 153 et 180) (EFSA, 2005b; 2010; Stenberg and Andersson, 2008), en confirmant que cela ne nuise pas à la qualité et à la pertinence de l'information produite (Tard *et al.*, 2007).

L'introduction des colonnes capillaires à la chromatographie en phase gazeuse a formé une évolution importante dans l'analyse des PCB, en permettant d'effectuer de dosage pour les PCB individuels présents dans des échantillons environnementaux, alimentaires et humains (Sonchik, 1983). En plus, la combinaison de la chromatographie en phase gazeuse capillaire et la spectrométrie de masse (GC/MS), fonctionnant en mode ionisation par impact d'électrons (IE) ou ionisation chimique négative (ICN) est utilisée pour éviter d'éventuels problèmes de coélution avec autres composés organohalogénés.

### II.3. Occurrence

L'alimentation est la principale source d'exposition aux congénères de PCB, en représentant plus de 90 % de l'exposition totale (OMS). L'exposition cutanée et celle par inhalation sont pertinents dans des situations d'exposition professionnelle (Duarte-Davidson and Jones, 1994; Lees *et al.*, 1987; Smith *et al.*, 1982; Wilson *et al.*, 2001; Wolf, 1985). Des valeurs moyennes relativement élevées de PCB-NDL<sub>i</sub> ont été trouvées dans des échantillons alimentaires d'origine animale. Une collecte des échantillons d'aliments dans 20 pays européens a été réalisée durant la période 1998-2008 pour mesurer le taux de contamination par les PCB-NDL<sub>i</sub>. Les analyses ont révélé que les plus hauts niveaux de contamination se sont trouvés dans le poisson et ses dérivés (entre 23,4 ng/kg et 223 ng/kg). Les niveaux les plus bas ont été trouvés dans les fruits, les légumes et les céréales (environ 0,08 ng/kg) (Tableau 6). Dans la viande de ruminants, de volailles, de porcs et leurs produits, le taux de contamination par les PCB-NDL<sub>i</sub> a été entre 2,8 et 4,6 ng/kg (EFSA, 2010).

En Belgique, une analyse de profil des PCB dans différentes matrices alimentaires a montré que le PCB 138 et le PCB 153 sont les congénères les plus répandus suite à leur présence respective dans 97,5 % et 85 % d'échantillons analysés. Les PCB indicateurs 28, 52 et 101 ont été détectés seulement dans 60 % d'échantillons analysés. Par contre, le PCB 180 a été le moins répandu puisqu'il a été détecté uniquement dans 32,5 % d'échantillons analysés (Cimenci *et al.*, 2013). Ces résultats concordent avec des études similaires rapportées dans la littérature (Fattore *et al.*, 2008; Kvaalem *et al.*, 2009). Comme le montre la figure 3, les principaux contributeurs à la somme totale des PCB-NDL<sub>i</sub> étaient les PCB 138, 153 et 28. Le PCB 180 n'a pas été détecté dans de nombreux échantillons, à l'exception des poissons et des fromages. Par exemple, dans le poisson, la matrice alimentaire la plus contaminée aux PCB, le PCB 138 et le PCB 153 constituent respectivement 37 % et 32 % du total des PCB-NDL<sub>i</sub> suivi par le PCB 101 (12 %), le PCB 180 (11 %), le PCB 52 (6 %) et le PCB 28 (2 %) (Bhavsar *et al.*, 2007; VKM, 2008).

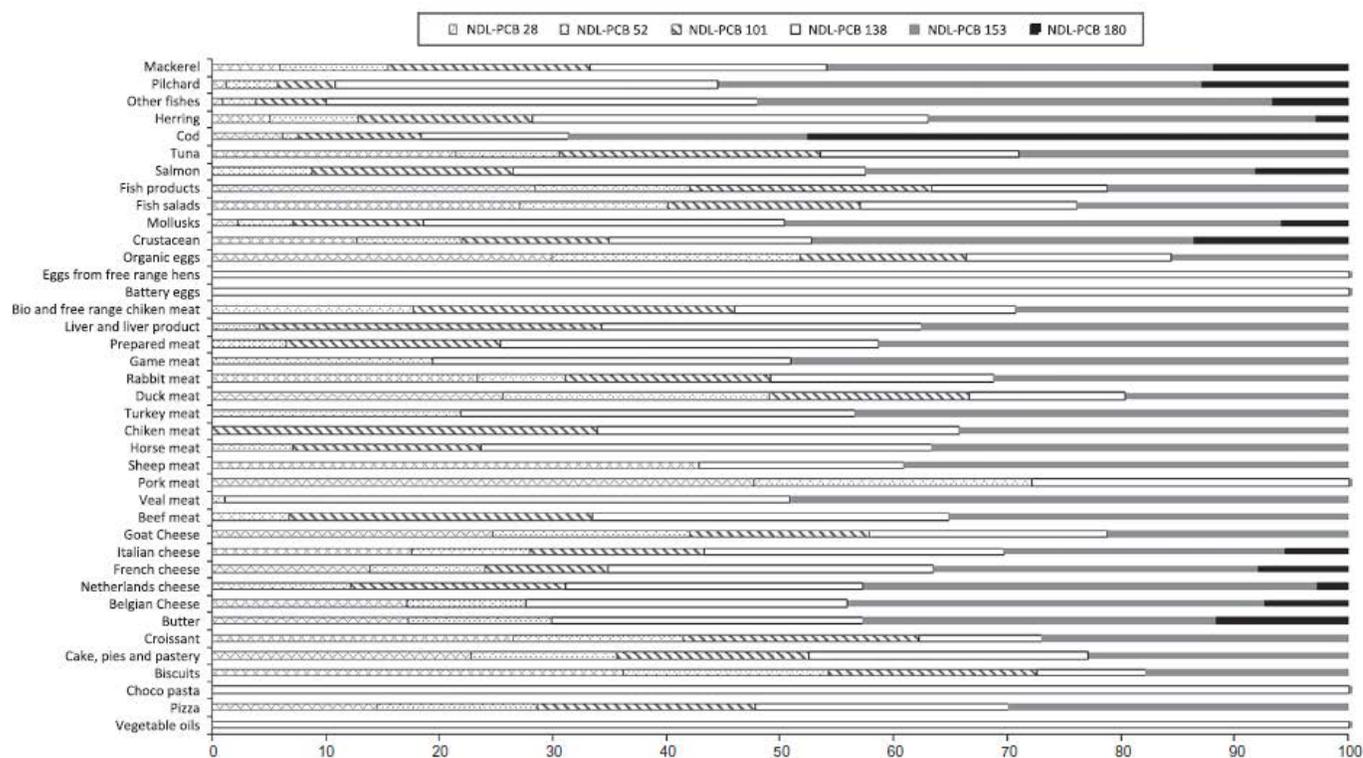


Figure 3 : Contribution individuelle en pourcentage (%) de chaque congénère de PCB-NDL<sub>i</sub> à la somme totale des PCB-NDL<sub>i</sub> dans différents types d'échantillons alimentaires (Cimenci *et al.*, 2013).

Le tableau 8 donne un aperçu des niveaux moyens des PCB-NDL<sub>i</sub> dans diverses catégories d'aliments (EFSA, 2010).

Tableau 8: Charge totale de PCB-NDL dans des échantillons alimentaires collectés de 20 pays européens durant la période allant de 1998 à 2008. Les valeurs sont fondées sur les PCB-NDL<sub>i</sub> (EFSA, 2010)

Produits alimentaires	Les 6 PCB-NDL <sub>i</sub> (µg/kg)
Viande de ruminants et ses produits	4,64
Viande de volaille et ses produits	2,88
Viande de porc et ses produits	3,69
Foie et ses produits (animaux terrestres)	2,1
Poissons et produits de la pêche, à l'exclusion de l'anguille	23,4
Anguille	223
Lait cru et produits laitiers, y compris le beurre	9,2
Oeufs de poule et ses produits	16,7
Graisse des ruminants	8,71
Graisse de volaille	2,85
Graisse de porcs	1,04
Huiles et graisses végétales	3,21
Huiles marines	117
Foie de poisson	163
Fruits, légumes et céréales	0,08
Autres produits	21,1

## II.4. Exposition humaine

### II.4.1. Population générale

Les PCB-NDL constituent une partie importante de PCB totaux présents dans les tissus humains et l'aliment. La population générale est continuellement exposée aux PCB-NDL mais les données disponibles dans les pays industrialisés ont montré une réduction de niveaux d'exposition de la population au cours des dernières décennies par contre cette réduction est stabilisée.

Parmi les PCB-NDL<sub>i</sub>, les congénères 138, 153 et 180, sont dominants dans l'apport alimentaire (Juan et al., 2002), étant donné que ces congénères dominent également la composition de PCB dans les aliments tels que le poisson, les œufs, la viande, et les produits laitiers (Szlinder-Richert et al., 2009a).

Dans les pays industrielles, la consommation moyenne de PCB-NDL chez les adultes est estimé entre 10 et 45 ng/kg de poids corporel/ jour, alors que l'estimation de l'exposition des grands consommateurs de poisson est dans la fourchette de 60-80 ng/kg de poids corporel par jour (EFSA, 2005b). En France, l'exposition journalière moyenne aux 6 PCB-NDL<sub>i</sub> est de 7,6 ng/ kg de poids corporel chez les femmes en âge de procréer (19-44 ans), de 7,7 ng/kg chez les adultes (15 ans et plus) et de 12,9 ng/kg chez les enfants (3-14 ans) (Arnich et al., 2009b). Une étude néerlandaise a trouvé que l'exposition moyenne de PCB-NDL<sub>i</sub> chez les personnes âgées (70 ans) est de 5,6 ng/kg de poids corporel/jour (Baars et al., 2004b; Bakker et al., 2003), alors que les enfants âgés de 2 ans ont des expositions plus élevées avec un apport moyen de 12,1 ng/ kg de poids corporel/jour (Bakker et al., 2003). En Allemagne, une exposition moyenne de 15,3 ng/kg de poids corporel/ jour a été calculée comme une somme pour les 3 congénères de PCB 138, 153 et 180 (Arnold et al., 1998). Une étude italienne a estimé une dose journalière de PCB-NDL<sub>i</sub> à 18 ng/ kg de poids corporel/ jour (Zuccato et al., 1999).

Outre les variations géographiques, l'exposition quotidienne est également dépendante de l'âge. Une étude italienne a montré que la plus forte exposition journalière s'est produite au cours des deux premières années de la vie avec une exposition journalière de 111 ng de PCB-NDL<sub>i</sub>/kg de poids corporel (Fattore et al., 2008). Si l'on exclut les nourissons allaités, l'exposition quotidienne chez les nourissons/les bébés/les enfants (0-6 ans) a été estimée à 24,6 ng de PCB-NDL<sub>i</sub>/kg de

poids corporel (Fattore et *al.*, 2008). Chez les enfants les plus âgés (7-12 ans), une exposition quotidienne a été estimée à 16,1 ng de PCB-NDL<sub>i</sub>/kg de poids corporel tandis que chez les jeunes, les adultes et les personnes âgées de 13 à 94 ans, cette exposition a été de 10,9 ng de PCB-NDL<sub>i</sub>/kg de poids corporel (Fattore et *al.*, 2008). En Suède, la dose journalière a été calculée pour 23 congénères de PCB chez les hommes et les femmes à différents groupes d'âge. Chez les femmes, les résultats ont montré que l'apport quotidien médian estimé était de l'ordre de 5,5 à 11,5 ng/kg de poids corporel. Chez les hommes, l'apport quotidien médian était de 6,22 à 9,62 ng/kg de poids corporel (Lind et *al.*, 2002). L'exposition quotidienne aux PCB-NDL<sub>i</sub> chez les pêcheurs a été de l'ordre de 41,5 ng/kg de poids corporel, ce qui est environ 5 à 10 fois plus élevée que les niveaux détectés chez la population générale adulte masculine, en Suède (EFSA, 2005b).

Un aperçu global de 14 études menées dans différents pays sur l'exposition alimentaire aux PCB-NDL est résumé dans le tableau 9. L'exposition quotidienne aux PCB-NDL dans ces différents pays varie de 4,26 ng/kg de poids corporel, observée en Norvège, à 17,7 ng/kg de poids corporel, observée en Russie. Les estimations des expositions élevées dans certains pays pourraient s'expliquer par leur échantillonnage effectué 10 ans auparavant et également par leurs habitudes alimentaires telles que la consommation élevée des produits de la pêche (Cimenci et *al.*, 2013).

Tableau 9: Aperçu de l'apport alimentaire estimé de PCB-NDL dans 13 pays et estimation de l'EFSA pour la population européenne moyenne.

Pays (période d'échantillonnage)	Apport alimentaire de PCB-NDL (ng/Kg p.c./jour)	Hypothèse statistique	Méthode d'analyse	Référence
Norvège (2000-2006)	Moyenne $\sum 6$ Population moyenne = 4,26	Borne inférieure	Non marqué	(Kvalem et <i>al.</i> , 2009)
Egypte (2005)	Moyenne $\sum 6$ Population moyenne = 4,36	Borne inférieure	HRGC- HRMS	(Loutfy et <i>al.</i> , 2009)
Corée du Sud (2005 - 2007)	Moyenne $\sum 22$ Population moyenne (2-65 ans) = 4,36	Limite moyenne	GC-MS-EI	(Moon et <i>al.</i> , 2009)

<b>Suède (2005)</b>	Moyenne $\sum 16$ Adultes = 4,9	Limite moyenne	GC-MS	(Kiviranta et al., 2004; Tornkvist et al., 2011),
<b>Etats-Unis (1997)</b>	Moyenne $\sum 6$ Adultes = 5	Non marqué	Non marqué	(ATSDR, 2000)
<b>Pays-Bas (1999)</b>	Médiane $\sum 7$ Adultes (40 ans) = 4,8	Borne inférieure	GC-MS	(Baars et al., 2004a)
<b>Allemagne (2005)</b>	Moyenne $\sum 6$ Population de Munich (19-58 ans) = 5,6	Limite moyenne	HRGC- MS-EI	(Fromme et al., 2009)
<b>Chine (2010)</b>	Moyenne $\sum 25$ Population moyenne = 7,31	Non marqué	GC-MS	(Xing et al., 2010)
<b>France (2002-2006)</b>	Moyenne $\sum 6$ Adultes ( $\geq 15$ ans) = 7,7	(Pas de donnée < LQ	HRGC-HRMS	(Arnich et al., 2009b)
<b>Italie (1994-1996)</b>	Moyenne $\sum 6$ Adultes (13-93 ans) = 10,9	Donnée < LQ ont été exclus	Non marqué	(Fattore et al., 2008)
<b>Danemark (1998-2003)</b>	Moyenne $\sum 10$ Population moyenne = 12,9	Donnée < LQ réglée à 1/3 LD	GC/ECD	(Fromberg et al., 2005)
<b>Russie (1998-2002)</b>	Moyenne $\sum 16$ Population moyenne = 17,7	Limite moyenne	GC/ECD	(Pokler et al. 2010)
<b>EFSA (Non marqué)</b>	Moyenne $\sum 6$ Population moyenne population = 15	Non marqué	Non marqué	(EFSA, 2005b)
<b>Belgique (2008)</b>	Moyenne $\sum 6$	Borne inférieure	GC-MS/MS	(Cimenci et al., 2013)

	Adultes = 5,33			
	Médiane $\Sigma$ 6			
	Adultes = 4,9			

## II.4.2. Population particulière

Les PCB ont été détectés dans le placenta, le cordon ombilical, le sang de cordon et dans le lait maternel (ATSDR, 2000; Aylward *et al.*, 2014; DeKoning and Karmaus, 2000; Fukata *et al.*, 2005; Koopman-Esseboom *et al.*, 1994b) ce qui met en évidence le danger sanitaire encouru par les fœtus, les nourrissons et les bébés.

### II.4.2.1. Le fœtus

Chez les rongeurs et les singes, plusieurs expériences ont montré que les PCB peuvent traverser la barrière placentaire et atteindre le fœtus (Cincinnati *et al.*, 1990).

En Espagne, une étude a montré que la teneur des PCB 153 et 180 dans le sang du cordon ombilical représente 95 % des PCB totaux et augmente parallèlement avec l'ingestion de fruits de mer par les mères (Llop *et al.*, 2010).

### II.4.2.2. Les nourrissons allaités

L'allaitement est reconnu comme une pratique saine optimisant la croissance et le développement des nourrissons (PSEA, 2002). Mais la forte contamination du lait humain par les PCB soulève des préoccupations concernant leurs effets potentiels sur la santé développementale des nouveau-nés. Donc, il est nécessaire de réduire la concentration de ces contaminants et de fournir des conseils alimentaires aux femmes en âge de procréer (AMAP, 2009).

Les PCB-NDL s'accumulent en grandes quantités dans le lait maternel en raison de sa forte teneur en graisses (ATSDR, 2000). Chez les mammifères, les PCB-NDL se transfèrent de la mère aux nourrissons par l'allaitement. Lee *et al.* (2007) ont montré que la souris femelle relargue environ 40 % de sa charge corporelle en PCB 153 aux souris juvéniles durant les deux premières semaines de l'allaitement (Lee *et al.*, 2007). Chez les femelles de singe exposées aux PCB durant

l'allaitement, il a été constaté que la concentration sanguine de la progéniture en PCB a régulièrement augmenté jusqu'au sevrage (Mes et *al.*, 1994; 1995a). Ainsi, des études ont montré que la charge en PCB dans le lait maternel diminue avec le nombre de maternités. En effet, les concentrations en PCB totaux trouvées dans le lait maternel des mères multipares sont 4 fois inférieures à celles trouvées chez des mères primipares (Haraguchi et *al.*, 2009).

L'allaitement représente donc une importante source d'exposition des nourrissons. Des études ont montré que l'exposition des nourrissons allaités aux PCB-NDL dépasse jusqu'à deux fois celle des adultes. Les congénères dominants des PCB-NDL dans le lait maternel sont les PCB 138, 153 et 180 (Güvenius et *al.*, 2003; Polder et *al.*, 2009). Sur la base des données provenant d'échantillons groupés (« pools ») de lait humain de 18 pays européens, il a été estimé que la dose journalière moyenne de PCB-NDL<sub>i</sub> chez les nourrissons allaités est de 984 ng/kg de poids corporel (EFSA, 2005b). Une autre étude a estimé que la consommation moyenne des PCB-NDL 28, 138, 153, 170 et 180 par kg de poids corporel et par jour chez les nourrissons allaités était de 418 ng pour ceux ayant 1 mois, de 294 ng/kg pour ceux ayant 3 mois et 165 ng pour ceux ayant 6 mois, ce qui a montré une tendance de réduction de l'apport de PCB-NDL durant la période de l'allaitement maternel (Bergkvist et *al.*, 2010). Au cours de ces dernières décennies, l'exposition des nourrissons aux PCB durant l'allaitement a diminué d'une façon significative dans les pays qui ont adopté des mesures pour réglementer l'application ouverte et fermée des mélanges industriels de PCB. Par exemple, à l'ouest de l'Allemagne, il a été signalé que la consommation des PCB par les nourrissons allaités a diminué d'environ 80 % (Fürst, 2006).

Une bonne corrélation a été observée entre les niveaux de PCB dans le sang de la mère et dans le lait maternel. Le taux des PCB est environ 10 fois supérieur dans le lait maternel que dans le sang. Par conséquent, il est possible d'estimer le niveau de PCB dans le lait maternel à partir des concentrations sanguines (Byczkowski et *al.*, 1994).

Hara (1985) a publié une étude de cohorte (1973-1979) d'un groupe de travailleurs exposés aux PCB dans une usine de fabrication de condensateurs au Japon (Hara, 1985). L'usine a utilisé les PCB (Kanechlor-500 avec 55 % de chlore et KC-300 avec 43 % de chlore) de 1950 à 1972. La cohorte était composée de 155 travailleurs et travailleuses et de 158 enfants nés après 1975. L'étude a montré que, comparativement aux femmes vivant dans la préfecture d'Osaka, le niveau de PCB

contenu dans le lait maternel des travailleuses qui ont accouché entre 1975 et 1979 était de 10 à 100 fois plus élevé, variant entre 40 et 400 ppb.

## **II.5. Les niveaux dans les tissus humains**

### **II.5.1. Sérum et tissus adipeux**

Le dosage des PCB dans les tissus adipeux et dans le sérum a toujours servi comme indicateur de la charge corporelle. Chez les femmes, une bonne corrélation a été obtenue entre le taux des PCB 74, 99, 118, 138, 146, 153, 156, 167, 170, 180, 183 et 187 dosés dans les tissus adipeux et le sérum, et la charge corporelle en PCB totaux (Stellman et *al.*, 1998).

Les congénères de PCB prédominants dans les tissus adipeux humains et le foie sont les PCB-NDL 138, 153 et 180 (Covaci et *al.*, 2002b; Covaci et *al.*, 2008; Meironyte-Guvenius et *al.*, 2001; Schechter et *al.*, 1989). Les PCB moins chlorés, comme les PCB-NDL 28, 52, 74 et 95 ont une fréquence de détection très faible. Des études ont montré chez une population d'amérindiens exposée aux PCB par la pollution industrielle et également par la consommation fréquente des poissons locaux des concentrations sériques moyennes de PCB 153 et de la somme de 101 congénères de PCB de 124 et 953 ng/g de lipides, respectivement (Goncharov et *al.*, 2009). Chez les femmes Inuits, la concentration moyenne en PCB dans le sang maternel (comme Aroclor 1260) a été estimée à 8 µg/L de plasma sachant que les concentrations des congénères de PCB se trouvent dans l'ordre suivant : PCB 153 (le congénère prédominant) > 138 > 180 > 187. En se basant sur le poids de lipide, la concentration en PCB chez les femmes Inuits a été estimée à 454 µg/kg de lipides (Van Oostdam et *al.*, 2005). Les pêcheurs de la côte suédoise avaient les concentrations plasmatiques en PCB les plus élevées, y compris les PCB 138, 153 et 180, par rapport au reste de la population (Svensson et *al.*, 1995). Les concentrations plasmatiques de ces congénères étaient 442, 836 et 661 ng/g de lipides, respectivement chez les pêcheurs du sud-est de la côte alors qu'elles étaient de 186, 336 et 290 ng/g de lipides, respectivement, chez les pêcheurs de la côte ouest.

### **II.5.2. Placenta, sang de cordon ombilical**

Les taux des PCB-NDL 138, 153 et 180 dans le tissu placentaire et dans le sang de cordon ombilical ont été utilisés comme indicateurs de l'exposition de fœtus aux PCB (DeKoning and

Karmaus, 2000; Koopman-Esseboom *et al.*, 1994b). La concentration de PCB dans le placenta (5027 ng/g de lipides) était 2,8 fois plus élevée que la plus forte concentration présente dans le lait maternel (1770 ng/g de graisse) (DeKoning and Karmaus, 2000). A noter que les niveaux de contamination aux PCB dans les tissu fœtal et infantile sont bien corrélés aux taux plasmatiques maternels (Koopman-Esseboom *et al.*, 1994a).

Le congénère dominant dans les échantillons du sang de cordon ombilical collectés à Minorque était le PCB 180, tandis que les PCB 153 et PCB 138 étaient les congénères qui dominant dans les échantillons du sang de cordon recueillies à Valence (Vizcaino *et al.*, 2011). A Valence, la concentration médiane de la somme des 7 PCB: 28, 52, 101, 118, 138, 153, et 180 était de 150 ng/g de lipides, tandis que chez la cohorte de Minorque, la concentration médiane de ces 7 PCB était de 240 ng/g de lipides, ce qui est plus élevé que ceux rapportés dans des nombreux autres pays tels que la Suède (Guvenius *et al.*, 2003), les États-Unis (Herbstman *et al.*, 2007) et l'Italie (Bergonzi *et al.*, 2009), mais inférieur aux niveaux rapportés en Slovaquie (Park *et al.*, 2008) et en Russie (Eik Anda *et al.*, 2007).

### **II.5.3. Le lait maternel**

A partir de nombreuses données bibliographiques, la contamination du lait maternel par les PCB-NDL est devenue un phénomène mondial (Asante *et al.*, 2011; Cerna *et al.*, 2010; Cok *et al.*, 2012; Darnerud *et al.*, 2011; Deng *et al.*, 2011; Devanathan *et al.*, 2009; Devanathan and Ramanathan, 2012; Ennaceur *et al.*, 2008; Polder *et al.*, 2009; Rodríguez-Dozal *et al.*, 2012). Depuis les années 1970 et dans la plupart des pays, les niveaux de PCB dans le lait maternel ont diminué d'une façon significative. Cette diminution est stabilisée au cours des dix dernières années (Abballe *et al.*, 2008; Hooper *et al.*, 2007; Raab *et al.*, 2008; Ulaszewska *et al.*, 2011; Zietz *et al.*, 2008). Par contre, dans certaines régions de la République tchèque, le niveau des PCB-NDL dans le lait maternel n'a pas diminué, en raison de la forte contamination des zones environnantes (EFSA, 2005b). Les taux des PCB-NDL 138, 153 et 180 dans le lait maternel ont été utilisés comme indicateurs de l'exposition des nourrissons allaités (DeKoning and Karmaus, 2000; Koopman-Esseboom *et al.*, 1994b; Koopman-Esseboom *et al.*, 1994a).

Les résultats d'une étude menée sur la cohorte d'Inuits a révélé que le congénère de PCB le plus abondant dans tous les échantillons biologiques analysés était le PCB 153, représentant environ

40 % de la charge corporelle totale en PCB (Ayotte et *al.*, 2003). Il a été également montré que les femmes Inuits avaient une concentration totale moyenne en PCB dans le lait maternel 7 fois plus forte que celle trouvée chez les femmes du sud du Québec (Dewailly et *al.*, 1993b).

## **II.6 Toxicocinétique et métabolisme**

Les propriétés physico-chimiques des PCB permettent à ces xénobiotiques d'être facilement absorbés au niveau gastro-intestinal par diffusion passive (Albro and Fishbein, 1972). Il a été observé que l'efficacité d'absorption des congénères des PCB est dépendante de plusieurs facteurs, tels que de la quantité de graisse corporelle, de la perte/gain de poids, des propriétés de composés (sensibilité à un métabolisme) et de l'exposition antérieure (Juan et *al.*, 2002). Environ 80 % des PCB-NDL 28, 52, 101 et 105 sont absorbés chez l'Homme (Schlummer et *al.*, 1998).

Une fois absorbé, les PCB sont facilement distribués à tous les compartiments de l'organisme par une association non spécifique aux cellules sanguines et aux protéines plasmatiques (Matthews and Dedrick, 1984). En raison de leur lipophilie, les PCB se concentrent dans les tissus riches en lipides et dans le sang (Park et *al.*, 2005). La distribution initiale des PCB est déterminée par des facteurs biophysiques comme le volume de tissu, le rapport de partition tissu/sang et le taux de perfusion. D'autres facteurs contribuent à la distribution des différents congénères comme l'étendue de la récente consommation, l'apport à long terme, la teneur de l'organe en matières grasses, la protéine de liaison et, surtout, le potentiel de métabolisme. Par exemple, l'allaitement ou la perte significative de poids augmente la libération de PCB dans le sang.

La première étape de la biotransformation des PCB implique leur oxydation par les cytochromes P-450. Cette étape a pour but de détoxifier les PCB, en les rendant polaires et par conséquent ils pourraient être éliminés par l'organisme. Cette étape dépend du degré de chloration du congénère. Généralement, le taux du métabolisme des PCB est inversement proportionnel au degré d'halogénéation, ce qui suggère que les PCB moins halogénés sont plus rapidement transformés (Parham and Portier, 1998). Toutefois, le métabolisme des PCB devient plus complexe avec l'augmentation du degré de chloration (Tanabe et *al.*, 1981).

La deuxième phase de la biotransformation implique la sulfatation, la glucuronidation, la méthylation, ou la conjugaison au glutathion ou à l'acide mercapturique, d'où la formation des

métabolites de PCB sulfonylés, glucuronidés, méthylés, conjugué à l'acide mercapturique ... Les différents métabolites de 6 PCB-NDL détectés dans les tissus et les liquides biologiques humains et animaux sont représentés dans le tableau 10.

Tableau 10: Métabolites des congénères de PCB-NDL<sub>i</sub> (Bergman et al., 1994; Boix et al., 2010; Glynn et al., 2011; Haraguchi et al., 2009)

Congénères parents	Nomenclature	Métabolites	Nomenclature
<b>PCB 28</b>	2,4,4''-trichloroPCB	3''-OH-CB28	3''OH-2,4,4''trichloroCB
<b>PCB 52</b>	2,2''5,5''-tétraPCB	3-MeSO <sub>2</sub> -CB 52 4-MeSO <sub>2</sub> -CB 52	3-MeSO <sub>2</sub> 2,2''5,5''-tétraCB 4-MeSO <sub>2</sub> 2,2''5,5''-tétraCB
<b>PCB 101</b>	2,2''4,5,5''-pentaPCB	4''-OH-CB 101 4''-MeO-CB 101 3-MeSO <sub>2</sub> -CB 101 4-MeSO <sub>2</sub> -CB 101	4''-OH-2,2''4,5,5''-pentaCB 4''-MeO-2,2''4,5,5''-pentaCB 3-MeSO <sub>2</sub> 2,2''4,5,5''-pentaCB 4-MeSO <sub>2</sub> 2,2''4,5,5''-pentaCB
<b>PCB 138</b>	2,2''3,4,4''5,5''-hexaPCB	3''-OH-CB 138 4-OH-CB 146 4''-MeO-CB 130 3''-MeO-CB 138	2,2''3,4,4''5,5''-hexaCB 4-OH-2,2''3,4,4''5,5''-hexaCB 4''-MeO-2,2''3,4,4''5,5''-hexaCB 3''-MeO-2,2''3,4,4''5,5''-hexaCB
<b>PCB 153</b>	2,2''4,4''5,5''-hexaPCB	3-OH-CB 153 4-OH-CB 146 3-MeO-CB 153 4-MeO-CB 146	3-OH-2,2''4,4''5,5''-hexaCB 4-OH-2,2''4,4''5,5''-hexaCB 3-MeO-2,2''4,4''5,5''-hexaCB 4-MeO-2,2''4,4''5,5''-hexaCB
<b>PCB 180</b>	2,2''3,4,4''5,5''-heptaPCB	4''-OH-CB 172	4''-OH-2,2''3,4,4''5,5''-heptaCB

Ainsi, les phénols formés peuvent être excrétés plus facilement que les PCB parents, mais peuvent également se lier aux protéines plasmatiques. D'autres métabolites, tels que les dérivés méthylsulfonyl, présentent une lipophilie relativement élevée et sont conservés plus longtemps dans le corps (foie et poumons) par rapport aux métabolites phénoliques. Öberg *et al.* (2002) ont étudié la corrélation entre le poids moléculaire, et la biodisponibilité et la distribution des congénères de PCB. Les observations ont montré qu'un poids moléculaire élevé a été corrélé à une absorption plus faible et une redistribution plus lente.

L'élimination des PCB non métabolisés est très faible. Ce processus est plutôt dépendant de l'excrétion des métabolites polaires dans l'urine et la matière fécale. Des valeurs de demi-vie des congénères de PCB chez l'Homme ont été présentées dans le tableau 11 montrant que les congénères fortement chlorés ont une demi-vie plus longue, donc une plus grande accumulation, ce qui est le cas de PCB-NDL 138, 153, 170 et 180. L'excrétion des PCB et de leurs métabolites méthyl-sulfonyl s'effectue principalement par les selles (excrétion biliaire), l'urine et le lait maternel.

Tableau 11: La demi-vie de certains congénères PCB-NDL signalé dans des études humaines (EFSA, 2005a)

Congénère PCB-NDL	Demi-vie	Références
<b>28</b>	18/44 jours <sup>a</sup>	(Luatamo <i>et al.</i> , 1991)
	182 jours	(Wolff and Schechter, 1991)
	1,4 an	(Brown <i>et al.</i> , 1989)
	4.8 ans	(Wolff <i>et al.</i> , 1992)
	3,0 ans	(Yakushiji <i>et al.</i> , 1984)
	3,5 ans	(Ritter <i>et al.</i> , 2011)
<b>52</b>	2,6 ans	(Ritter <i>et al.</i> , 2011)
	5,5 ans <sup>b</sup>	Wolff <i>et al.</i> (1992)
<b>101</b>	7/14 jours <sup>a</sup>	(Luatamo <i>et al.</i> , 1991)
	5,7 ans <sup>c</sup>	(Wolff <i>et al.</i> , 1992)
<b>138</b>	0,89 ans	(Böhler <i>et al.</i> 1988)

	3,4 ans 6/7 ans 16,3 ans 16,7 ans 20/32 ans <sup>a</sup>	(Ryan <i>et al.</i> , 1993) (Brown <i>et al.</i> , 1989) (Yakushiji <i>et al.</i> , 1984) (Wolff <i>et al.</i> , 1992) (Yakushiji <i>et al.</i> , 1984)
<b>153</b>	0,94 ans 3,9 ans 12,4 ans 14,4 ans 26/47 ans <sup>a</sup> 27 ans	Böhler <i>et al.</i> (1988) (Ryan <i>et al.</i> , 1993) (Brown <i>et al.</i> , 1989) (Ritter <i>et al.</i> , 2011) (Chen <i>et al.</i> , 1982) (Yakushiji <i>et al.</i> , 1984)
<b>170</b>	4,5 ans 15,3 ans 47/71 ans <sup>a</sup>	(Ryan <i>et al.</i> , 1993) (Ritter <i>et al.</i> , 2011) (Chen <i>et al.</i> , 1982)
<b>180</b>	0,34 ans 11,5 ans 4,8 ans 9,9 ans	(Böhler <i>et al.</i> 1988) (Ritter <i>et al.</i> , 2011) (Ryan <i>et al.</i> , 1993) (Wolff <i>et al.</i> , 1992)

<sup>a</sup>Deux valeurs données dans l'étude en fonction des sélections d'échantillons.

<sup>b</sup>Coélution entre PCB 47,49 et 52.

<sup>c</sup>Coelution entre les PCB 99 et 101.

## II.7. Les effets toxicologiques

Les PCB-NDL (et leurs métabolites), déclenchent différents types de réponses toxicologiques y compris neurotoxiques, comme cela a été mis en évidence pour les PCB 180, 152 et 138, neuro-endocrinologiques, comme cela a été mis en évidence pour les PCB 52, 74, 77, 138,

153, 180 et immunologiques, comme cela a été mis en évidence pour les PCB 101, 153, 180 (Boix et al., 2010; 2011; Bonfeld-Jørgensen et al., 2001; De Boever et al., 2013; Ferrante et al., 2011; Huang et al., 1998; Jacobson and Jacobson, 1996; Lilienthal et al., 2011; Lilienthal et al., 2010; Park et al., 2010; Viluksela et al., 2014).

Les PCB ont été classés parmi les premiers perturbateurs endocriniens. Ils sont capables d'agir sur la synthèse, la sécrétion, le transport, l'excrétion des hormones ou encore sur leur fixation aux récepteurs correspondants (Crisp et al., 1998; Koopman-Esseboom et al., 1994b; Langer et al., 2007; Langer et al., 2003). Cela pourrait engendrer des troubles physiologiques, de la reproduction et du comportement. Des études ont montré que l'exposition aux PCB pourrait induire une diminution des concentrations circulantes des hormones thyroïdiennes qui jouent un rôle principal dans le développement du système nerveux central, ce qui pourrait entraîner une hypothyroïdie (Roos et al., 2011; Cheek et al., 1999).

Les PCB-NDL peuvent également induire des atteintes morphologiques et fonctionnelles du système immunitaire, en aboutissant entre autre à la réduction pondérale du thymus et de la rate, à une sensibilité accrue aux attaques virales ou microbiennes ainsi à l'augmentation de la réponse lymphocytaire à un stimulus mitogène (EFSA, 2010; Ferrante et al., 2011).

En outre, les PCB-NDL peuvent induire la narcose, la génotoxicité (Marabini et al., 2011; Strathmann et al., 2006), des effets hépatiques, une activité promotrice de tumeur (Cogliano, 1998; Goncharov et al., 2011; Knerr and Schrenk, 2006), des effets neurologiques tels que des troubles de l'activité motrice, une altération de la production de dopamine, un déficit de mémoire, un dysfonctionnement cognitif et des effets dépressifs (Boix et al., 2011; Jacobson and Jacobson, 1996; Park et al., 2010; Soualeh et al., 2017), un développement de l'hypertension (pression artérielle systolique et diastolique), diabète II et maladie cardiovasculaire (Everett et al., 2011). Ces effets peuvent survenir après une forte ingestion accidentelle (exposition aiguë) ou après une bioaccumulation suite à des prises prolongées, lors par exemple d'une exposition chronique.

## 7.2.1. Perturbation endocrinienne

### 7.2.1.1. Hormones stéroïdiennes

En Allemagne, une étude réalisée sur des nouveau-nés exposés durant la période périnatale au PCB, a montré une corrélation positive entre la concentration des PCB-NDL<sub>i</sub> dans le sang et le lait maternel, et la diminution significative du taux de la testostérone dans le sang du cordon ombilicale chez les bébés femelles (Cao *et al.*, 2008).

De plus, une exposition développementale des rats mâles au PCB 180 a montré une diminution aussi bien du taux de la testostérone que celui des hormones lutéinisantes (LH) et folliculo-stimulantes (FSH). De même, une réduction du poids de la prostate ainsi du nombre des spermatozoïdes épидидymaires a été révélée (Viluksela *et al.*, 2014).

D'un autre part, des analyses *in-vitro* réalisées sur l'effet des PCB sur les cellules cancéreuses de sein (T47) ont montré une activité œstrogénique pour les congénères les moins chlorés (tels que les PCB 28 et 52), et une activité anti-œstrogénique pour les congénères les plus chlorés (tels que les PCB 138, 153 et 180) (Plísková *et al.*, 2005 ; Hamers *et al.*, 2011 ). L'analyse de l'expression protéique au niveau du foie chez les rats femelles suggère un effet œstrogénique du PCB-NDL 180. En revanche, le taux des hormones stéroïdiennes et gonadotropes n'a pas été affecté chez les rats adultes suite à l'exposition sub-aigue aux PCB-NDL 52 ou 180.

En outre, les métabolites hydroxylés des PCB (PCB-OH) ont montré aussi bien des effets œstrogéniques qu'anti-œstrogéniques par l'inhibition de la l'œstradiol-sulfotransférase. Cependant, à des fortes concentrations, ces métabolites montrent une activité androgénique par l'inhibition de l'aromatase (Fernandes *et al.*, 2011).

### 7.2.1.2. Hormones thyroïdiennes

La perturbation du transport des hormones thyroïdiennes est un mécanisme important par lequel les PCB peuvent altérer l'homéostasie de ces hormones. Une étude *in vitro* sur la liaison des PCB à la protéine transthyréline (TTR), une importante protéine de transport des hormones thyroïdiennes T4 et T3, a montré que les PCB mono-ortho substitués présentent une importante liaison au TTR, alors que les PCB multi-substitués en ortho montrent une diminution d'affinité à

ces transporteurs. D'une autre part, les PCB mono-substitués en méta, ressemblant au cycle mono-iodophénolique de T3, montrent une faible liaison à la TTR. Ceci pourrait être expliqué par la petite taille de chlore par rapport à l'iode, et l'activité de liaison relativement faible de T3. De plus, les congénères ressemblant au cycle di-iodophénolique de T4, c'est-à-dire les PCB di-méta-substitués, présentent la plus forte activité de liaison à la TTR (Chauhan et *al.*, 2000).

En outre, les métabolites hydroxylés des PCB (PCB-OH) sont capables d'affecter les hormones thyroïdiennes. Des expériences *in vitro* ont indiqué que les PCB-OH inhibent la liaison de la T4 à la TTR, impliquée dans son transport à travers le placenta et la barrière hémato-encéphalique (Cheek et *al.*, 1999 ; Viluksela et *al.*, 2010). Le détachement de T4 de la TTR sous l'action des PCB-OH empêchent donc le passage de cette hormone pour le cerveau du fœtus.

L'hypothyroïdie s'interfère avec le développement du système nerveux central et est associée à la déplétion du follicule thyroïdien et à l'activation de la clairance hépatique des hormones thyroïdiennes par l'induction des uridine di-phosphoglucuronosyl transférases (UGT) dans le foie. Le PCB 180 peut induire le métabolisme des hormones thyroïdiennes en sur-exprimant le récepteur CAR (constitutive active receptor) dépendant des enzymes UGT1A1 et UGT1A6, et en améliorant ainsi l'élimination des hormones thyroïdiennes circulantes. Donc la puissance des différents congénères pour l'induction de l'UGT dans le foie reflète très probablement leur capacité à provoquer une hypothyroïdie chez les rats (Roos et *al.*, 2011). Cependant, chez l'Homme, il n'est pas clair si l'exposition aux PCB entraîne des effets similaires, car la principale protéine transporteuse de T4, la thyroxine-binding globulin (TBG), protège les hormones thyroïdiennes circulantes contre la dégradation.

Par ailleurs, une augmentation du poids de la glande thyroïdienne a été observée chez des rats mâles adultes après une exposition subaiguë de 28 jours au PCB 180, accompagnée d'une vacuolisation accrue des cellules folliculaires thyroïdiennes, suggérant une activation thyroïdienne (Viluksela et *al.*, 2014).

## II.7.2. Neurotoxicité développementale

Chez l'Homme, il a été trouvé que l'exposition périnatale aux PCB induit une altération de la voie glutamate-oxyde nitrique (NO) - guanosine monophosphate cyclique (GMPc), ce qui pourrait

contribuer à des altérations cognitives. Chez le rat, l'exposition précoce aux PCB-NDL 138 ou 180 a induit une altération de la fonction de la voie glutamate-NO-cGMP, et ce par différents mécanismes. Ce résultat a été aussi confirmé par des essais *in vitro* sur des neurones cérébelleux de rat (Llansola *et al.*, 2010). En effet, les PCB 138 et 180 ont réduit la quantité des récepteurs N-méthyl-D-aspartate (NMDA), ce qui a ensuite réduit la fonction de la voie glutamate-NO-GMPc. Cet effet pourrait contribuer à l'altération de la capacité d'apprentissage de ces animaux. Egalement, l'exposition aux PCB 138 ou 180 pendant la gestation et la période de la lactation modifie la modulation de la neurotransmission dopaminergique par le glutamate dans le noyau accumbens, ce qui pourrait entraîner une altération de l'activité locomotrice (Boix *et al.*, 2010). Chez le rat, l'exposition développementale au PCB 52 a augmenté le taux d'acide gamma-aminobutyrique extracellulaire (GABA) dans le cervelet qui peut contribuer à l'altération de la coordination motrice chez la progéniture. L'activation et la potentialisation des récepteurs humains GABA<sub>A</sub> par les PCB-NDL sont des modes d'action récemment découverts. Ces mécanismes pourraient être l'origine de l'altération de la coordination motrice par les PCB-NDL (Fernandes *et al.*, 2010). Par ailleurs, l'exposition développementale aux 6 PCB-NDL<sub>i</sub> à une faible dose (10 ng/kg) a induit une augmentation significative au niveau de l'expression des gènes codant le récepteur de la ryanodine 3 (RyR3), qui joue un rôle important dans la régulation de l'homéostasie du calcium intracellulaire, dans le cervelet des souris juvéniles (Giannini *et al.*, 1995). De même, l'exposition développementale aux PCB-NDL a affecté la fonction auditive chez la progéniture adulte de rat, en augmentant les seuils des potentiels évoqués auditifs du tronc cérébral (Lilienthal *et al.*, 2011). Le PCB 74 était le congénère le plus puissant parmi les PCB-NDL testés, suivis par le PCB 95 et le PCB 52, qui étaient similaires dans leurs effets. Par contre, le PCB 180 était le moins puissant. Les effets de PCB 74 et de PCB 52 ont été plus exprimés chez les mâles que les femelles, tandis que le PCB 95 a augmenté les seuils seulement chez les mâles.

Par ailleurs, des modifications de l'expression génique ont été observées dans différentes régions cérébrales des rats exposés pendant la période périnatale aux PCB 52, PCB 138 ou PCB 180. Les changements induits par l'exposition au PCB 138 étaient les plus importants. Une analyse protéomique détaillée au niveau du tissu cérébral exposé au PCB 138 a montré une perturbation principale des voies biologiques associées à l'homéostasie du calcium et des voies de signalisation des récepteurs aux androgènes (Campagna *et al.*, 2011). Les données transcriptomiques et protéomiques montrant les effets toxiques des PCB ont été souvent sexe dépendantes. En fait,

L'exposition au PCB 180 a sous-régulé l'expression de l'ARNm du récepteur des androgènes (AR) uniquement dans le cerveau des femelles, ce qui suggère que l'exposition intra-utérine et lactationnelle au PCB 180 pourrait affecter le système neuroendocrinien féminin au niveau de l'expression génique.

De plus, les PCB *ortho*-chlorés exercent un double effet sur l'homéostasie du calcium (Langeveld et al., 2012). D'une part, ces PCB augmentent les niveaux intracellulaires basaux de calcium, qui pourraient se rapporter à des changements dans la phosphorylation des protéines, dans l'expression des gènes, dans la viabilité cellulaire et dans le développement neurologique. D'autre part, les PCB *ortho*-chlorés inhibent les canaux calciques voltage-dépendants, réduisant ainsi l'influx de calcium pendant l'activation neuronale et inhibant par conséquent la neurotransmission. En outre, des analyses protéomiques des neurones primaires réalisées chez le rat ont montré l'interférence des PCB-NDL avec la plasticité synaptique par la modulation des différents effecteurs liés à l'organisation du cytosquelette (Brunelli et al., 2012).

En conclusion, l'évaluation *in vivo* et *in vitro* des études neurotoxiques des PCB-NDL a ajouté de nouvelles connaissances sur les mécanismes sous-jacents qui peuvent interpréter les rapports épidémiologiques sur les altérations cognitives et les troubles moteurs chez les enfants exposés aux PCB pendant la période périnatale.

### ***II.7.2.1. Etudes épidémiologiques***

De nombreuses études épidémiologiques mettent en évidence la relation entre l'exposition précoce aux PCB et l'incidence de nombreuses pathologies telles que l'épilepsie, les troubles de l'anxiété, la dépression, la psychose, l'autisme, et le trouble du déficit de l'attention avec hyperactivité (TDAH) (Dietert et al., 2011; Eubig et al., 2010; Pessah et al., 2008; Williams and Ross, 2007).

L'exposition gestationnelle aux PCB semble augmenter le risque de développer chez les personnes âgées les maladies neurodégénératives telles que l'Alzheimer (Bang et al., 2011; Juárez de Ku and Meserve, 1994) et le Parkinson (Caudle et al., 2006; Landrigan et al., 2005; Liu et al., 2003). Une étude réalisée sur 708 personnes, âgées de 60 à 84 ans, révèle un lien entre les

concentrations sériques de PCB dont les 7 PCB-NDL (PCB 99, 138, 146, 153, 170, 180 et 187) et le déclin cognitif des personnes âgées de 70 à 84 ans (Bouchard et *al.*, 2011).

Berghuis *et al.* (2013) a aussi mis en évidence l'implication de l'exposition gestationnelle au PCB 187 et le métabolite OH-PCB (4-OH-PCB-107) dans la diminution du développement moteur des nourrissons à l'âge de 3 mois (Berghuis et *al.*, 2013). En outre, une étude japonaise réalisée sur 40 femmes enceintes exposées pendant la période périnatale à un mélange de PCB-NDL a montré une altération du développement et du fonctionnement social de leurs nourrissons à l'âge de 4 mois (Doi et *al.*, 2013).

Des analyses ont montré une relation entre le taux des PCB-NDL 118, 138, 153 et 180 dans le cordon ombilical, le lait et le sang maternel, et la susceptibilité aux maladies de l'oreille moyenne chez leurs enfants scolarisés (Weisglas-Kuperus et *al.*, 2004). De plus, d'autres analyses ont confirmé la relation qui existe entre les concentrations des PCB 118, 138, 153 et 180 dans le cordon ombilical et la mauvaise performance des enfants dans certains tests neuropsychologiques (Grandjean et *al.*, 2012).

Par ailleurs, une étude chinoise récente a montré qu'une inhalation de la poussière domestique portant un taux élevé de mélange des PCB-NDL (PCB 3, 6, 16, 22, 25, 44, 71, 174 et 203) pourrait développer de l'anxiété, la dépression et l'agressivité chez les enfants à l'âge 4 et 5 ans (Wang et *al.*, 2015).

#### **II.7.2.1.1. Evaluation du risque**

Sur la base de plusieurs études, l'ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry) (ATSDR, 2000), le RIVM (Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu, Institut national des Pays-Bas pour la santé publique et l'environnement), Baars et *al.*, (2001) et L'OMS, à l'occasion du deuxième congrès international sur les PCB en mai 2002 à Borno (Covaci et *al.*, 2002b), ont suggéré une dose journalière tolérable (DJT) de 20 ng/kg de poids corporel pour la somme de 209 congénères. Cette DJT, qui correspond à la quantité de substances qui peut être ingérée quotidiennement par le consommateur tout au long de sa vie sans provoquer un effet néfaste

sur sa santé, est calculée à partir des effets néfastes observés sur des animaux exposés à une gamme de doses de PCB ou lors d'une étude épidémiologique.

Rice et ses collaborateurs ont effectué des expérimentations sur le singe afin de trouver la DJT des PCB pour la prévention des effets neurotoxiques (Rice, 1997; Rice, 1998; Rice, 1999; Rice and Hayward, 1997; Rice and Hayward, 1999). Après une exposition de 15 jours à un an, à un mélange représentatif de PCB mimant l'exposition humaine à partir de lait maternel, la dose minimale ayant un effet indésirable (LOAEL) a été déterminé de 7,5 µg/kg/j. Ensuite, une DJT de 0,025 a été calculée à partir de LOAEL et du facteur de sécurité de 300. Ce facteur a été obtenu suite à la multiplication des valeurs de quatre facteurs : (i) la dose maximale sans effet néfaste observable (NOAEL) (3,16 µg/kg/j), (ii) le facteur de l'extrapolation du singe à l'Homme (3,16), (iii) le facteur de la variabilité inter-individuelle (10) et (iv) le facteur du passage d'une étude sub-chronique à une exposition chronique (3,16). Cette LOAEL de 7,5 µg/kg/j était également la plus petite dose responsable d'un effet immunotoxique chez le singe (Arnold et al., 1999). Par ailleurs, chez les singes exposés à l'Aroclor 1254 pendant la période développementale, la LOAEL de 5 µg/kg/j a été déterminée en tenant compte des faibles modifications cutanées et oculaires chez ces animaux. La DJT calculée était proche de 0,02 µg/kg/j en tenant compte le même facteur de sécurité (300) (Arnold et al., 1995).

D'un autre côté, les données épidémiologiques recueillies chez l'homme ont montré que la NAOEL est estimée à 0,093 µg/kg/j (Cogliano, 2001). Compte tenu de facteur d'incertitudes (2/3), une DJT de 0,02 µg/kg/j a été obtenue. Par conséquent, tous les calculs de DJT de PCB effectués à partir d'études expérimentales ainsi que des données humaines sont tout à fait concordants pour fixer une DJT à 0,02 µg/kg/j (20 ng/kg/j).

Pour les PCB-NDL<sub>i</sub>, une DJT de 10 ng/kg de poids corporel a été fixée. Cette valeur a été déduite de la DJT des PCB totaux (20 ng/kg/j) en considérant que les PCB-NDL<sub>i</sub> représentent près de 50 % des 209 congénères présents (AFSSA, 2007). Cette DJT a été adoptée par AFSSA et VKM (Vitenskapskomiteen pour Mattrygghet, Comité scientifique norvégien pour la sécurité alimentaire) pour laquelle leur avis se concentre sur les données toxicologiques provenant de l'exposition au mélange de PCB, et non pas sur les PCB-DL individuels. Par conséquent, certains des effets indésirables observés sont probablement également liés à la présence de PCB-DL. Il est important

de noter qu'aucune étude expérimentale ou épidémiologique n'a été effectuée afin de prouver que la dose réglementaire adoptée pour les PCB-NDL<sub>i</sub> ne provoque pas des effets neurotoxiques chez les populations à risque.

### **II.7.2.2. Expérimentations animales**

Des études expérimentales réalisées sur les animaux ont montré des effets neurotoxiques suite à des expositions précoces aux PCB-NDL.

Une exposition des souris Swiss pendant la période lactationnelle aux faibles doses de PCB-NDL<sub>i</sub>, mimant la mixture de ces 6 congénères indicateurs trouvés dans la matrice poisson, a induit une altération significative de l'intégration visuomotrice chez les souris mâles périadolescents et une anxiété persistante chez les souris mâles adultes (Elnar et al., 2012).

En outre, une exposition gestationnelle et lactationnelle des souris femelles aux anguilles contaminées par entre autres les PCB-NDL<sub>i</sub>, a induit chez la progéniture F1 des effets neurotoxiques dépendants du sexe : une hyperactivité persistante chez les souris femelles détectée à l'âge adulte avancé (jour postnatal (JPN) 195) et en âge moyen (JPN 305 et 329) (Dridi et al., 2016) et un effet *dépressif-like* chez les souris mâles adultes (Soualeh et al., 2017). De même, une exposition périnatale à un mélange de PCB 47 et 77 a induit une altération de l'activité locomotrice et exploratrice uniquement chez les rats, les rats périadolescents et les rats adultes mâles (Krishnan et al., 2014).

Egalement, une exposition pendant la période juvénile aux PCB 153 et 180 a induit une diminution de l'activité chez les rats mâles traités (Johansen et al., 2011).

Le tableau 12 résume différentes études sur les PCB-NDL réalisées *in vivo* dans le cadre du projet ATHON (Évaluation de la toxicité et du danger des PCB non-dioxines présents dans les aliments) et dans des autres études *in vivo* identifiées dans la littérature ouverte.

Tableau 12: Etudes toxicologiques des PCB-NDL dans le cadre du projet ATHON (Évaluation des effets toxiques et dangereux des PCB non-dioxine-like présents dans les aliments) et dans des expériences in vivo

Type of study	Duration of study (days)	Species (strain)	Sex (no/group)	Route (vehicle)	Congener (dose)	Treatment schedule	Parameters monitored	Response level	References
<b>In vivo brain microdialysis after in utero lactational exposure</b>	Pups tested on PNDs 90 and 110	Rat (Wistar)		Oral/corn oil (sweet jelly)	52, 180, 138 (1 mg/kg b.w./day)	Dams exposed on GD 7 to PND 21	Function of the glutamate-NO-cGMP pathway; extracellular dopamine, GABA and glutamate		(De Boever et al., 2010; Fernandes et al., 2010; Lilienthal et al., 2009; 2010; Llansola et al., 2009; Wigstrand et al., 2013)
<b>In vivo motor activity and coordination after in utero lactational exposure</b>	Pups tested on PNDs 60 and 90	Rat (Wistar)			52, 180, 138 (1 mg/kg b.w./day)	Dams exposed on GD7 to PND 21	Locomotor activity, open field and motor coordination, proteomics		(Boix et al., 2010; Campagna et al., 2011; Fernandes et al., 2010)
<b>In vivo learning ability after in utero lactational exposure</b>	Pups tested on PNDs 75 and 90	Rat (Wistar)			52, 180, 138 (1 mg/kg b.w./day)	Dams exposed on GD7 to PND 21	Ability to learn a Y-maze conditional discrimination task, proteomics		(Boix et al., 2010; Campagna et al., 2011)
<b>In utero lactational exposure study on neurotoxicity</b>		Rat (Long Evans)	12 dams per congener		74 (11.68 mg/kg/day) 95 (13.06 mg/kg/day)	Developmental treatment, GD10 to PND7	Endocrine-related neurobehavior in offspring, sweet preference, haloperidol-induced catalepsy, brain stem auditory evoked potentials		(Lilienthal et al., 2010, 2011)
<b>In utero lactational exposure study including follow-up of offspring</b>	Dams terminated on PND 28, Pups terminated on PNDs 7, 35, 84	Rat (Sprague-Dawley)	Dams: 6F Offspring: M,F 52: 5M, 5F/dam, 180: 4M, 4F/dam	Dams: oral gavage/ (corn oil ) Offspring: in utero+ lactational	52 (30, 100, 300, 1000, 3000 mg/kg) 180 (10, 30, 100, 300, 1000 mg/kg)	PCB52: total dose divided into ten equal subdoses, dams were exposed to the subdoses on GDs 7, 9, 11, 14, 16 and PNDs 1, 10. PCB 180: total dose divided four equal subdoses, dams were	Development of the reproductive system, bone and teeth , sex steroidogenesis, limited histopathology, biochemistry, molecular biology		(Roos et al., 2012 )

						exposed to the subdoses on GDs 7-10			
<b>Repeated 28-day oral gavage toxicity study</b>	28 days	Rat (Sprague-Dawley)	M, F, (5)	Oral gavage (corn oil)	52, 180 (3, 10, 30, 100, 300, 1000, 1700* mg/kg)	PCB 180: loading dose administered during the first study week in six equal subdoses + maintenance dose once a week for three weeks	Clinical signs, organ weights, clinical chemistry, hematology, histopathology, molecular biology, proteomics, bone quality		(Roos <i>et al.</i> , 2012 ; Viluksela <i>et al.</i> , 2014)
<b>Gene expression in liver</b>	1 day 5 days 28 days	Mouse (C57BL/6)	M, F, (6)	Oral gavage (corn oil)	28, 52, 101, 138, 153, 180 (0.2, 2, 10, 20 mg/kg b.w.)  1 26 (2, 20, 100, 200 µg/kg b.w.)	Single oral dose in male and female adults. For 28d study, animals were closed on days 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27 (PCBs 28, 52, 101) and 0, 3, 7, 14, 21 (PCBs 126, 138, 153, 180)	Gene expression microarray analysis, RT-PCR, PCB analysis, enzyme assays (CYP1A, CYP2B), proteomics		(Heimeier <i>et al.</i> , 2010); Schoenauer, 2011 ; ThÖrnqvist <i>et al.</i> , 2010)
<b>Subchronic oral toxicity study</b>	90 days	Rat (Sprague-Dawley)	M, F (10)	In diet (corn oil)	28 (0, 0.05, 0.5, 5.0, or 50 mg/kg feed)	Adult exposure daily via diet	Growth rate, food consumption, clinical toxicity, enzyme activity, tissue vitamin A content, histology	NOAEL 0.5 ppm in diet or 36 µg/kg b.w./day	(Chu <i>et al.</i> , 1996a)
<b>Subchronic oral toxicity study</b>	90 days	Rat (Sprague-Dawley)	M, F (10)	In diet (corn oil)	153 (0.05, 0.5, 5.0, or 50 mg/kg feed)	Adult exposure daily via diet	Growth rate, food consumption, clinical toxicity, enzyme activity, tissue vitamin A content, histology	NOAEL 0.5 ppm in diet or 34 µg/kg b.w./day	(Chu <i>et al.</i> , 1996b)
<b>Subchronic oral toxicity study</b>	90 days	Rat (Sprague-Dawley)	M, F (10)	In diet (corn oil)	128 (0, 0.05, 0.5, 5 or 50 mg/kg feed)	Adult exposure daily via diet	Growth rate, food consumption, clinical toxicity, enzyme activity, tissue vitamin A content, histology	NOAEL 0.5 ppm in diet or 42 µg/kg b.w. per day	(Lecavalier <i>et al.</i> , 1997)

<b>Chronic oral toxicity and carcinogenesis study</b>	2 years	RAT (Harlan Sprague-Dawley)	F (50)	Gavage (corn oil)	153 (0, 10, 100, 300, 1000 or 3000 µg/kg b.w.)	5 days per week	Hypertrophy of thyroid gland, follicular cell and liver hepatocytes. Liver enzyme activity PROD, EROD		(NTP, 2006)
<b>In utero/lactational exposure study</b>	3 months	Rat (Wistar-Hannover)	M, F ( 3 dams with pups )	(Corn oil)	153 (0.5, 1 mg/kg b.w./ day)	GD 7 to PND 21	Pups; learn a conditional discrimination task in a Y-maze, function of the glutamate-nitric oxide-cGMP pathway	NOAEL 1 mg/kg b.w. per day	(Piedrafita et al., 2008)
<b>In utero/lactational exposure study</b>	8 months	Rat (Wistar-Hannover)	M, F (3 dams with pups )	(Corn oil)	153 (1 mg/kg b.w./day)	GD 7 to PND 21	Pups; learn a conditional discrimination task in a Y-maze, function of the glutamate-nitric oxide-cGMP pathway	NOAEL 1 mg/kg b.w./ day	(Piedrafita et al., 2008)

\*Dose adjusted after signs of toxicity in dams. (M: Male, F: female)

### III. Notions de faibles doses

L'Homme est exposé tout le long de sa vie à des mélanges de polluants présents le plus souvent à des faibles doses, cependant les chercheurs continuent à faire des screening par molécule et souvent à des doses supérieures à la NOAEL. 95 % des études toxicologiques ont traité les effets d'une seule molécule (Yang et al., 1994). Les chercheurs recourent souvent au modèle animal pour le modèle souris, afin de faciliter l'extrapolation de l'âge de la souris à l'Homme. Flurkey et ses collaborateurs (2007) ont présenté toutes les équivalences d'âge entre les 2 espèces (Tableau 13).

Tableau 13 : les équivalences d'âge entre la souris et l'Homme (Flurkey et al., 2007)

Age	
Souris	Equivalent = Age-Humain
1 jour	1 mois
7 jours	4 ans
14 jours	7 ans
1 mois	14 ans
2 mois	19 ans
3 mois	22 ans
4 mois	24 ans
5 mois	27 ans
6 mois	30 ans
7 mois	32 ans
8 mois	34 ans
9 mois	37 ans
10 mois	39 ans
12 mois = 1 an	44 ans
24 mois = 2 ans	70 ans

36 mois = 3 ans	100 ans
-----------------	---------

Les définitions des faibles doses restent imprécises. Welshons *et al.* (2003) a défini les faibles doses par des concentrations proches de celles de nos hormones endogènes, et qui agissent dans la plupart du temps selon des courbes non-monotoniques. Cependant, des grandes difficultés en lien avec la notion des faibles doses peuvent surgir:

- Les doses auxquelles l'Homme est réellement exposé, ne correspondent pas toujours aux faibles doses testées dans les études toxicologiques sur le modèle animal.

- Les doses inférieures aux NOAEL et LOAEL s'avèrent provoquer des effets toxiques en particulier lors de l'exposition périnatale.

Dans ce contexte, il y a peu d'études qui ont été réalisées pour évaluer les effets neurotoxiques des PCB-NDL à faibles doses mimant l'exposition environnementale humaine. Cependant, une étude a testé l'effet de la DJT (10 ng/kg) des PCB-NDL<sub>i</sub> sur le développement et l'anxiété des souris exposées via le lait maternel. Une diminution significative de l'activité générale a été trouvée chez les souris femelles juvéniles. En outre, une anxiété persistante sexe-indépendante a été montrée chez les souris périadolescentes et adultes (Elnar *et al.*, 2012). D'une façon surprenante, dans cette étude, même la dose 1 ng/kg (soit 10 fois moins que la DJT) a provoqué les mêmes effets délétères chez les souris, ce qui met en évidence l'urgence d'établir une valeur toxicologique de référence basée sur des études toxicologiques et non estimée comme le cas de la DJT pour les PCB-NDL<sub>i</sub> (Elnar *et al.*, 2012).

En outre, une exposition périnatale des souris de la génération F1 aux anguilles contaminées à un mélange de polluants dont les PCB-NDL<sub>i</sub> aux doses 85, 216 et 400 ng/kg/jour, a été à l'origine d'une hyperlocomotion persistante chez les souris femelles moyennement âgées (Dridi *et al.*, 2016). De même, cette exposition a induit l'apparition d'un comportement *dépressif-like*, chez les souris mâles adultes (Soualeh *et al.*, 2017).

Les altérations induites par les PCB-NDL varient en fonction de la concentration, ce qui signifie que l'action de ces polluants suit une courbe non-monotonique et ils s'échappent donc à la règle de « *La dose est proportionnelle aux effets* ».

#### **IV. Impact de la fenêtre d'exposition**

La neurotoxicité développementale est définie comme « toute action d'un agent toxique quel que soit 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 le plan structural, fonctionnel, neurochimique, et comportemental » (Dorman et al., 2001; Slikker and Bowyer, 2005).

Durant la période de développement et de croissance cérébrale, le cerveau immature est extrêmement vulnérable aux agressions environnementales (Costa et al., 2004; Houlihan et al., 2005; Rice and Barone, 2000). Cette période relativement longue lui offre des fenêtres temporaires de sensibilité dues entre autres à une plasticité extrêmement importante, un développement non terminé de système immunitaire, une barrière hémato-encéphalique qui n'est pas bien différenciée et un système de détoxification hépatique qui n'a pas atteint sa maturité (Diamanti-Kandarakis et al., 2009).

En effet, plusieurs processus neurodéveloppementaux débutent pendant la période développementale tels que la neurulation, la prolifération, la migration, la différenciation cellulaire, la neuromaturation ainsi que la plasticité neuronale et synaptique. Ces différents processus contribuent à la formation d'une bonne structure cérébrale et au bon fonctionnement du cerveau (Semple et al., 2013).

Cependant une exposition aux xénobiotiques pendant la période périnatale pourrait perturber l'un de ces processus et ensuite induire des effets délétères sur le cerveau en développement avec peu de chance pour qu'une réparation ultérieure soit possible, et donc entraîner des conséquences permanentes (Costa et al., 2004; Dobbing, 1975; Rice and Barone, 2000). Par exemple, l'apoptose est un processus adopté par les cellules neuronales pendant la période de développement qui contribue à la maturation du cerveau (Giordano and Costa, 2012).

Tout produit chimique intervenant avec ce processus en favorisant l'activation de la voie d'apoptose ou en provoquant la mort des neurones en cours de différenciation peut induire des effets délétères voire irréversibles dans le système nerveux central (Giordano and Costa, 2012). Au niveau des neurotransmetteurs, toute interférence des xénobiotiques avec ces médiateurs peut perturber leur fonction principale de transmission ainsi la modulation de la prolifération, et la différenciation cellulaire, ce qui pourrait causer des défauts permanents dans le système nerveux central. En conséquence, l'exposition précoce aux substances chimiques constitue un des principaux facteurs de risque pouvant atteindre sérieusement le développement normal du système nerveux central. Selon l'Académie Nationale des Sciences aux Etats-Unis, une exposition précoce à des substances environnementales pourrait être responsable de 3% des désordres développementaux et de 25 % de ces désordres s'il y a une combinaison entre telle exposition et une prédisposition génétique (Grandjean and Landrigan, 2014; National Research Council, 2000). Les troubles les plus fréquemment décrits sont les déficits d'apprentissage et de la mémoire, le trouble du déficit de l'attention/hyperactivité (TDAH), la paralysie cérébrale, les troubles autistiques, l'épilepsie, ainsi que les troubles de l'anxiété (Atladóttir et al., 2007; Calderón-Garcidueñas et al., 2008; Hertz-Picciotto et al., 2006; Labie, 2007; Porterfield, 2000; Rice and Barone, 2000; Roberts et al., 2007; Yeargin-Allsopp et al., 1992).

Par ailleurs, au cours du développement, certaines barrières biologiques comme le placenta et la barrière hémato-encéphalique, qui ont un rôle principal dans l'empêchement de la pénétration des toxines, sont particulièrement vulnérables à l'action des molécules chimiques (Kimura-Kuroda et al., 2007; Seelbach et al., 2010). De nombreuses études ont montré un lien entre les concentrations en xénobiotiques détectées dans le placenta, le cordon ombilical ou dans le lait maternel, et l'induction de pathologies ultérieures chez l'Homme (Crinnion, 2009).

Les PCB-NDL peuvent franchir le placenta et la barrière hémato-encéphalique et provoquer des effets irréversibles et persistantes jusqu'à un âge tardif de la vie (Kuroda, 2003; Landrigan et al., 2005). Récemment, des études ont montré que l'exposition précoce au mélange de PCB-NDL<sub>i</sub> aussi bien *in utero* que lors de l'allaitement induit plusieurs altérations comportementales permanentes incluant une hyperactivité (Dridi et al., 2016) et un comportement *dépressif-like* (Soualeh et al., 2017).

## V. Effets transgénérationnels

L'environnement est capable d'interagir avec les gènes. Une exposition environnementale pendant les périodes critiques de développement peut changer l'expression génique et induire des modifications phénotypiques qui peuvent s'étendre à plusieurs générations. Ce phénomène se produit via des mécanismes dits épigénétiques (Skinner et *al.*, 2013).

En effet, l'exposition environnementale précoce induit des modifications dans l'épigénome et influe sur le développement de l'individu, mais également elle modifie l'épigénome des cellules germinales qui est en cours de fixation (Skinner et *al.*, 2013). Cette altération permanente de l'épigénome des cellules germinales (Guerrero-Bosagna et *al.*, 2010a) peut alors être transmise via la lignée germinale et, par conséquent, les générations futures peuvent afficher des variations phénotypiques (Skinner, 2011).

En outre, les périodes sensibles du développement des cellules germinales affecteront la probabilité de la transmission d'information à la génération suivante. Par exemple, si le stimulus environnemental est reçu avant la différenciation des cellules germinales, il en résulterait alors des gamètes qui porteront en totalité la variation épigénétique induite par l'environnement ; alors que si le stimulus est reçu dans un stade tardif de développement, seulement une proportion des gamètes porterait la variation épigénétique induite par l'environnement.

Cependant, ces périodes sont susceptibles de varier entre les espèces. Chez les vertébrés, par exemple, ces périodes peuvent inclure le remodelage épigénétique global qui accompagne la fertilisation pour générer un état de cellule totipotente et le remodelage des cellules germinales primordiales lors de l'embryogenèse précoce. Ces événements de remodelage ne sont caractérisés que dans deux espèces: la souris (Smith et *al.*, 2012) et le poisson zèbre (Jiang et *al.*, 2013; Potok et *al.*, 2013).

Si les modifications épigénétiques des cellules germinales deviennent définitivement fixes, elles seront transmises et héritées par les générations futures, on parle alors de l'hérédité transgénérationnelle.

La définition de l'hérédité épigénétique transgénérationnelle est « l'hérédité des informations épigénétiques entre différentes générations médiée par la lignée germinale en absence

d'influences environnementales directes, ce qui entraîne une variation phénotypique » (Skinner, 2011).

Par contre, une transmission multigénérationnelle est induite lorsque les cellules somatiques ou les cellules germinales produisant les générations suivantes sont directement exposées aux influences environnementales. La différence entre une transmission transgénérationnelle et une transmission multigénérationnelle peut être expliquée par l'exemple de l'action fœtale du diéthylstilbestul (DES). Une exposition gestationnelle des femmes au DES a induit des anomalies et un risque accru des maladies chez les enfants (F1) et les petits-enfants (F2) sans aucun effet observé chez la génération des F3 (arrière-petits-enfants). En effet, la femme enceinte traitée avec DES (F0), le fœtus (F1) ainsi les cellules germinales (F2) du fœtus produisant la génération F3 auraient directement été exposés au DES, d'où les effets observés sur les générations exposées directement au DES, ce sont des effets multigénérationnels. Afin de répondre à la définition de l'hérédité épigénétique transgénérationnelle, l'hérédité des informations épigénétiques médiée par la lignée germinale doit se produire en absence d'expositions environnementales directes. Par conséquent, la première génération non exposée est la génération F3 (Figure 4). Dans ce cas il s'agit d'une hérédité épigénétique multigénérationnelle. Il existe plusieurs exemples d'hérédité épigénétique multigénérationnelle dans la littérature et qui n'est pas transgénérationnelle (Kaati *et al.*, 2002; Newbold, 2004) et dans lesquelles le terme transgénérationnel est utilisé d'une manière incompatible avec les définitions actuelles (Byrnes, 2005; Ruden *et al.*, 2005).

Un autre exemple de la transmission multigénérationnelle est l'exposition gestationnelle des rats à des concentrations élevées de dexaméthasone, une hormone glucocorticoïde de synthèse. Cette exposition a induit chez les mâles de la génération F2 une réduction du poids à la naissance, une intolérance au glucose et une élévation de l'activité hépatique de l'enzyme cytoplasmique phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK) qui est spécifique de la gluconéogenèse. Ces effets n'ont pas été transmis à la génération F3 ce qui implique que ces changements multigénérationnels sont dus à des effets directs de l'exposition gestationnelle à la dexaméthasone sur le développement des cellules germinales F1 qui, à son tour, ont donné la génération F2.

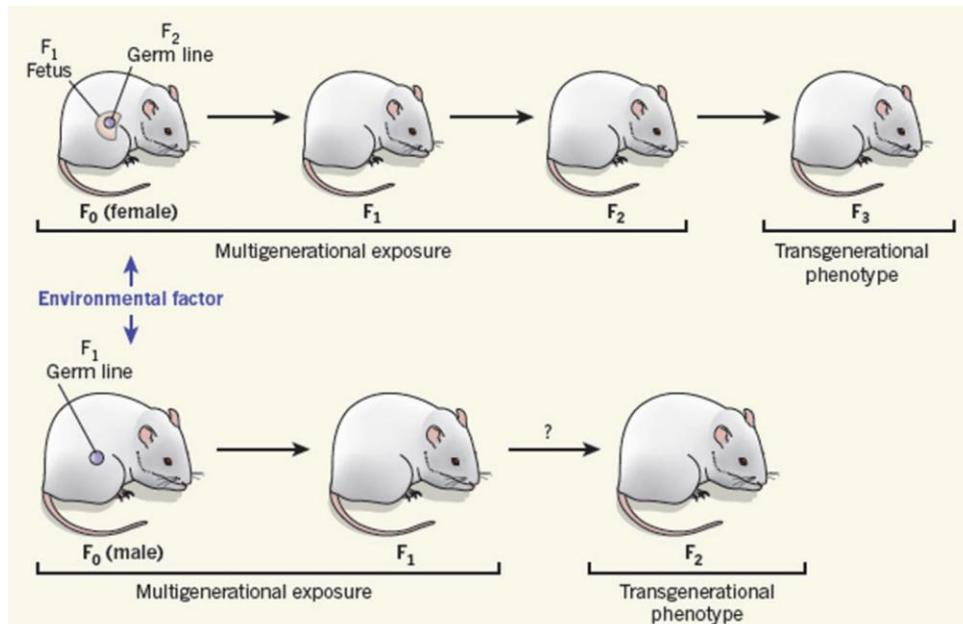


Figure 4 : Effets environnementaux intergénérationnelles. Chez les femmes enceintes (F<sub>0</sub>), l'exposition directe à l'environnement peut entraîner des modifications épigénétiques dans les deux générations suivantes (F<sub>1</sub> et F<sub>2</sub>) à partir de fœtus et sa lignée germinale. L'effet de cette exposition multigénérationnelle dans les générations suivantes (F<sub>3</sub> et au delà) est considéré comme un phénotype transgénérationnel. En revanche, l'exposition multigénérationnelle chez les mâles est limitée aux générations F<sub>0</sub> et F<sub>1</sub> (Skinner et al., 2010).

Plusieurs études ont été réalisées sur des modèles animaux afin de montrer les effets transgénérationnels de plusieurs produits chimiques. Nous examinons ci-dessous les effets transgénérationnels des substances chimiques les plus signalées dans la littérature : La vinclozoline, le Bisphénol A et le diéthylstilbestrol (DES).

### V.1. La vinclozoline

La vinclozoline est un fongicide fréquemment utilisé dans l'industrie viticole. Elle est considérée comme perturbateur endocrinien en raison de ses actions anti-androgéniques. Depuis 2007, sa production a été interdite en France (Gray et al., 1999; Jehring et al., 1989; Kelce et al., 1997; Monosson et al., 1999; Nellemann et al., 2003; Wolf et al., 2000).

Plusieurs effets transgénérationnels ont été attribués à la vinclozoline (Crews et *al.*, 2012; 2007; Guerrero-Bosagna et *al.*, 2012; 2010b; Nilsson et *al.*, 2008a; Stouder and Paoloni-Giacobino, 2010; Vandegheuchte et *al.*, 2010).

En effet, une exposition *in utero* de rats mâles à des fortes doses de la vinclozoline s'est avérée causer des effets multiples dans la spermatogenèse. Les effets se sont manifestés sur plusieurs générations lorsqu'ils sont passés par la lignée paternelle (Wolff et *al.*, 2007).

Par ailleurs, l'exposition des mâles et des femelles de la génération F0 à la dose 100 mg/kg/jour de la vinclozoline a montré des changements dans l'épigénome et le transcriptome des cellules de Sertoli chez les rats mâles de la génération F3. L'exposition directe des mâles et des femelles de la génération F0 a empêché de déterminer quelle lignée germinale était responsable de la transmission de cette altération (Guerrero-Bosagna et *al.*, 2013).

Dans une autre étude, l'exposition des rats femelles à la vinclozoline a entraîné plusieurs pathologies chez leurs descendants femelles F2 et F3, y compris une hémorragie utérine et une anémie au cours de la dernière moitié de la grossesse, des anomalies rénales et un risque accru de cancer (Nilsson et *al.*, 2008b).

Autres effets transgénérationnels de la vinclozoline ont été observés chez la génération F3 des souris CD1 tels que des défauts au niveau des cellules testiculaires et des cellules germinales, des anomalies de la prostate et des reins et des changements dans l'épigénome du sperme (Guerrero-Bosagna et *al.*, 2012). Dans la même étude, les souris femelles F3 ont présenté une polykystose ovarienne.

## **V.2. Le bisphénol A**

Le bisphénol A (BPA) est un produit chimique largement utilisé dans la production des nombreux articles ménagers courants, y compris les bouteilles en plastique, la garniture des boîtes de conserve, les articles en carton et les produits d'étanchéité dentaires. C'est un perturbateur endocrinien capable de se lier et activer les deux récepteurs d'œstrogène (ESR1 et ESR2) (Vandenberg et *al.*, 2012; Vandenberg et *al.*, 2009). Il a été démontré que ce produit chimique seul ou en combinaison avec autre substance chimique peut induire des effets transgénérationnels (Jang et *al.*, 2012; Manikkam et *al.*, 2012; 2013; Wolstenholme et *al.*, 2012; 2013).

Le traitement des souris femelles (C57Bl6J) avec un régime alimentaire privé de phytoœstrogène et supplémenté en 5 mg/kg de BPA (dose environnementale) a réduit les interactions sociales de la progéniture F1 (Wolstenholme et *al.*, 2012). En revanche, les mâles et les femelles F2 et F4 générés par des mâles et des femelles F1 étaient socialement plus curieux. De plus, des gènes impliqués dans le comportement social, l'anxiété, la dépression et les comportements parentaux ont été sous-exprimé dans le cerveau des deux générations F1 et F4 (Benarroch, 2013; Feldman, 2012; McCall and Singer, 2012; Neumann and Landgraf, 2012).

Une autre étude transgénérationnelle du BPA a révélé que les descendants F3 mâles et femelles ont présenté vraisemblablement des déficits de mémoire sociale (Wolstenholme et *al.*, 2013).

En outre, l'exposition des souris entre les jours gestationnels 6 et 17 à 10 mg/kg de BPA a altéré la production des certaines protéines et les cascades de signalisation chez la génération F2: une réduction de la neurogenèse hippocampique, une diminution de l'expression de la kinase phosphorylé (ERK), du facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF), et de la protéine CREB phosphorylée (C-AMP Response Element-binding protein) dans l'hippocampe, et une déficience de la mémoire chez la génération F2 (Jang et *al.*, 2012). Néanmoins, cette étude devrait être continuée en examinant les générations suivantes pour étudier la persistance et l'héritabilité des phénotypes révélés.

### V.3. Le diethylstilbesterol

Le diethylstilbesterol (DES) est un œstrogène de synthèse, perturbateur endocrinien, utilisé dans les années 1950-1970 par environ 5 millions femmes enceinte en prévention des avortements spontanés, mais sans efficacité démontrée (Rubin, 2007).

Par conséquent, 10 millions de mères, de filles et de fils ont été exposés *in utero* à cet œstrogène synthétique. Des nombreux descendants exposés ont par la suite développé une gamme d'anomalies du développement reproductif et de cancers du tractus génital, du sein et des testicules (Rubin, 2007; Storgaard et *al.*, 2006 ).

Des effets transgénérationnels ont été observés chez les progénitures murines F1 et F2 suite à l'exposition *in utero* des souris femelles F0 au DES. Les descendantes femelles ont montré une

incidence plus élevée de cancer du système reproducteur, y compris les cancers de l'ovaire, de l'utérus, du col de l'utérus et des glandes mammaires (Newbold et *al.*, 2000; Walker and Haven, 1997). Alors que les mâles ont développé une inflammation dans l'épididyme, des lésions prolifératives des testicules et une incidence accrue de tumeurs du système reproducteur, telle que les cellules réticulaires, les cellules de Leydig, l'épithélium séminifère et la prostate (Newbold et *al.*, 2000).

La transmission paternelle des effets multigénérationnels du DES est devenue évidente après l'accouplement des souris mâles exposées *in utero* à des femelles contrôles. En effet, les souris femelles F2 générées ont présenté une incidence accrue des sarcomes utérins, des tumeurs ovariennes et des lymphomes. Des études expérimentales devront examiner les effets transgénérationnels de DES chez les descendants F3 et F4 afin de déterminer l'existence des préoccupations héréditaires potentielles pour la santé humaine chez les générations futures provenant des femmes initialement exposées au DES (Newbold et *al.*, 2000).

# *Méthodologie*

## I. Préparation des mélanges de PCB-NDL<sub>i</sub>

Des mélanges purs de PCB-NDL<sub>i</sub> ont été préparés d'une façon à mimer une contamination alimentaire en PCB *via* les poissons contaminés. Les 6 congénères indicateurs de PCB-NDL<sub>i</sub> (28, 52, 101, 138, 153 et 180) ont été choisis à cause de leur forte occurrence dans les matrices de type poissons contaminés en présentant environ 56 % de PCB totaux (Van der Oost et *al.*, 1996). Dans ce mélange des PCB-NDL<sub>i</sub>, le PCB 153 et 138 sont les congénères les plus abondants en constituant respectivement environ 37 % et 32 %, suivis par le PCB 101 (12 %), le PCB 180 (11 %), le PCB 52 (6 %) et le PCB 28 (2 %) (Elnar et *al.*, 2012; Karl et *al.*, 2010; Naso et *al.*, 2005; Szlinder-Richert et *al.*, 2009b).

Les six PCB-NDL<sub>i</sub> ont été achetés de « Sigma-Aldrich Co. » (St. Quentin Fallavier, France, pureté > 99 %). Une solution mère de 10 mg de PCB-NDL<sub>i</sub> a été préparée dans 10 ml d'huile de colza, en fonction des proportions de chaque congénère dans les matrices poissons contaminés (voir ci-dessus). Ensuite, les doses 10 ng/kg et 1000 ng/kg des PCB-NDL<sub>i</sub> ont été obtenues par dilution (Tableau 14). Les doses utilisées dans cette étude sont des doses faibles, l'une représente la DJT (10 ng/kg) et la deuxième est une dose environnementale faible (1000 ng/kg).

Tableau 14 : Formulation des mélanges de PCB-NDL<sub>i</sub> en se basant sur l'occurrence de chaque congénère indicateur dans les matrices de type poissons contaminés.

	Les PCB-NDL <sub>i</sub>					
Doses (ng/kg)	PCB 153 (ng/kg)	PCB 138 (ng/kg)	PCB 101 (ng/kg)	PCB 180 (ng/kg)	PCB 52 (ng/kg)	PCB 28 (ng/kg)
<b>10</b>	3,70	3,20	1,20	1,10	0,60	0,20
<b>1000</b>	3700	3200	1200	1100	600	200

## **II. Préparation de l'aliment et exposition des animaux**

Trois lots de jelly ont été, quotidiennement, préparés dès le début de l'exposition des souris gestantes puis allaitantes jusqu'au sevrage. Pour ce faire, 10 g de nourriture en poudre destinée à l'alimentation des animaux (SDS Dietex, St Gratien, France) ont été mélangés avec 10 ml d'eau, 0,5 ml de sirop de fraise, 1 ml d'huile de colza et 1 ml de solution diluée de PCB-NDL<sub>i</sub> pour obtenir une pâte homogène, dans laquelle la dose en PCB indicateurs a été préparée pour chaque groupe expérimental. Un chauffage de la pâte a été effectué dans un four à 37 °C pendant 24h. Le lendemain de la préparation, la pâte a été découpée en petites portions en fonction du poids de chacune des souris mères gestantes puis allaitantes afin d'apporter soit 0, 10 ou 1000 ng de PCB-NDL/kg/jour. Pour les souris du groupe contrôle, la pâte a été préparée avec les mêmes ingrédients cités ci-dessus mais sans les PCB-NDL<sub>i</sub>.

L'exposition des mères gestantes puis allaitantes (F0) aux PCB-NDL<sub>i</sub> a été réalisée quotidiennement, par voie orale, à partir du JG7 (jour 7 gestationnel) jusqu'au sevrage des souris F1 au jour postnatal (JPN) 21. La prise alimentaire a été quotidiennement contrôlée.

## **III. Choix des doses de PCB-NDL<sub>i</sub>**

Deux doses de PCB-NDL<sub>i</sub> ont été choisies en raison du risque réelle d'exposition chez l'Homme: (i) la dose 10 ng/kg/jour, qui correspond à la dose journalière tolérable (DJT) chez l'Homme fixée par Afssa (2007), et (ii) la dose 1000 ng/kg/jour qui représente l'exposition lactationnelle moyenne des nourissons dans 18 pays européens (EFSA, 2005b).

## **IV. Animaux et conditions d'hébergement**

Les animaux utilisés lors de cette étude sont des souris Swiss albinos (CD1). Les souris de la première génération (F0), âgées de 9 semaines, ont été obtenus auprès du centre d'élevage Charles River (France). Dès leur réception, les souris ont été réparties dans des cages standards en groupe de 5 souris/sexe pour une période d'acclimatation d'une semaine. Elles ont été gardées dans une animalerie à température constante (22 ± 2) °C, une humidité relative à 55 ± 10 % et exposées à un cycle de lumière/obscurité de 12 h/12 h. La phase obscure de ce cycle débute à 8 h, heure de réveil des animaux. De plus ils ont eu un accès libre à l'eau et à la nourriture (SDS Dietex, St Gratien, France). Les deux générations F1 et F2 produites ont été soumises aux mêmes conditions

d'élevage (température, lumière, humidité, accès à la nourriture). Les différentes expériences ont toujours eu lieu de 10 h à 13 h correspondant à la phase active de l'animale et afin d'éviter la fluctuation de la vigilance durant les tests de développement et de comportement.

## **V. Traitement des mères (F0) durant la gestation et la lactation et production de la génération F1**

Après une semaine d'habituation aux locaux, les femelles ont été mises en reproduction avec les mâles (1:1). Le lendemain matin, les souris femelles fécondées ont été déterminées par la mise en place du bouchon copulatoire (vaginal) et ont été ensuite placées individuellement dans des cages. Ce jour où ce bouchon était observé, il était considéré le JG 0 (jour de gestation 0).

Après accouplement, 75 femelles ont été réparties en trois groupes expérimentaux: un groupe témoins non exposé au PCB et deux groupes à exposer durant la période périnatale aux PCB aux doses 10 ou 1000 ng/kg/j. Ensuite, les souris femelles de trois groupes ont été habituées au protocole d'exposition pendant leurs six premiers jours de gestation durant lesquels des portions de jelly dépourvues de PCB ont été données aux souris. A partir du JG 7, l'exposition des femelles de chaque groupe aux mélanges de PCB-NDL<sub>i</sub> a commencé. Une semaine avant la mise bas, du papier absorbant est placé dans les cages des futures génitrices pour la construction du nid.

Au jour de la mise bas (JPN 0), selon les recommandations de l'Organisation de Coopération et de Développement Économiques (OCDE) (OCDE, 2007), le poids et le sexe de chaque individu de la progéniture F1 ont été déterminés et le nombre des nouveau-nés de souris a été réduit à un effectif de  $n = 10$ , soit 5 mâles et 5 femelles par litière, quand c'est possible, en raison de la relation qui existe entre la taille de la portée et le développement comportemental de la progéniture par rapport à l'accès au lait maternel (Tanaka, 2004). Le reste de la portée a été euthanasié à l'isoflurane. A partir de la mise bas, les femelles ont été quotidiennement observées, et un suivi pondéral de la progéniture a été réalisé.

Après l'exposition gestationnelle du JG7 à JPN0, et durant toute la période de l'allaitement, qui s'étale de JPN 0 jusqu'à JPN 21, les souris allaitantes (F0) ont continué à être exposées, par accès libre, à la jelly contaminée par les PCB-NDL<sub>i</sub>. Au sevrage, les souris juvéniles de chaque litière ont été séparées suivant leur sexe dans 2 cages différentes ( $n=5/\text{cage}$ ). Ensuite les mâles et les

femelles de la génération F1 ont été séparés dans deux boîtes différents afin d'éviter l'effet des phéromones sexuelles sur le comportement à l'âge adulte.

## **VI. Production de la génération F2**

A l'âge adulte (> JPN 60), correspondant à la maturation sexuelle des souris, 15 mâles de 15 portées différentes au sein de même groupe expérimental de la génération F1 ont été accouplés avec 15 femelles de même groupe pour générer les souris F2. La femelle et le mâle F1 choisis pour l'accouplement sont du même groupe expérimental mais de portée différente pour éviter la consanguinité.

Trois modalités d'accouplement de F1 exposés aux PCB ont été adoptées pour la production de la troisième génération de souris (F2) (Figure 5) :

- Modalité 1 : des mâles et des femelles F1, exposés aux PCB, de deux portées différentes et de même groupe expérimental ont été accouplés pour générer les deux premiers sous-groupes de F2 : **D10** et **D1000**, correspondant respectivement aux souris F2 issues de deux **parents** F1 exposés durant la période périnatale aux PCB-NDL<sub>i</sub> aux doses 10 et 1000 ng/kg/jour.

- Modalité 2 : des femelles F1 exposées ont été accouplées à des mâles non-exposés aux PCB-NDL<sub>i</sub> pour générer le deuxième sous-groupe de F2 : **M10** et **M1000**, correspondant respectivement aux souris F2 issues des **mères** F1 exposées durant la période périnatale aux doses 10 et 1000 ng/kg/jour de PCB-NDL<sub>i</sub>.

- Modalité 3 : des mâles F1 exposés ont été accouplés à des femelles non-exposées aux PCB-NDL<sub>i</sub> pour générer le troisième sous-groupe de F2 : **P10** et **P1000**, correspondant respectivement aux souris F2 issues des **pères** F1 exposés durant la période périnatale aux doses 10 et 1000 ng/kg/jour de PCB-NDL<sub>i</sub>.

Pour les souris témoins, les souris F2 témoins ont été obtenues en croisant les souris témoins F1 issues de litières différentes.

L'objectif de ces trois modalités d'accouplement est la détermination de l'origine parentale de la transmission potentielle de la neurotoxicité des PCB-NDL<sub>i</sub>.

L'élevage des souris F2 a été effectué de la même façon décrite ci-dessus pour les souris F1.

<b>F1</b> 			
	<b>T</b>	<b>P10</b>	<b>P1000</b>
	<b>M10</b>	<b>D10</b>	
	<b>M1000</b>		<b>D1000</b>

Figure 5 : Les différentes modalités d'accouplement des F1 pour produire les 7 sous-groupes de la génération F2 (Les souris mâles et femelles de couleur orange et ceux de couleur rouge sont des souris F1 respectivement exposées durant la période périnatale aux doses 10 et 1000 ng/kg/jour de PCB-NDL<sub>i</sub>)

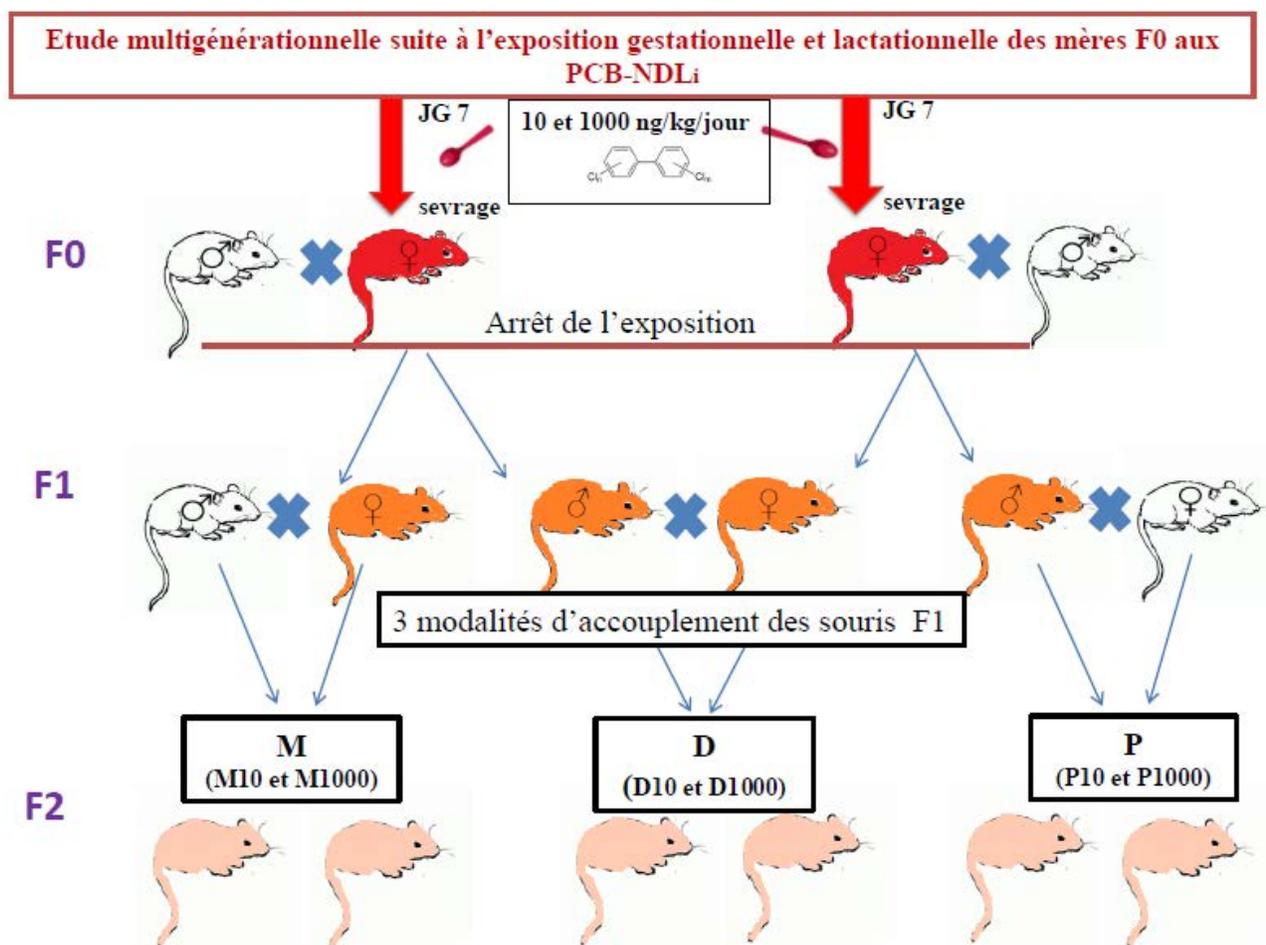


Figure 6 : Schéma récapitulatif du protocole expérimental global représentant l'exposition orale des souris mères F0 (représentées en rouge), pendant la période de la gestation et de l'allaitement, aux doses 10 et 1000 ng/kg de PCB-NDL<sub>i</sub> et la production des deux générations F1 (souris exposées lors de la période périnatale, représentées en orange) et F2 (souris issues des parents F1 exposés, représentées en rose). Les souris F2 ont été obtenues selon trois types de modalité différente de reproduction impliquant les souris F1 exposées aux PCB-NDL<sub>i</sub>: la modalité P, générant les souris F2 issues uniquement des pères F1 exposés aux PCB-NDL<sub>i</sub>, la modalité M, générant les souris F2 issues uniquement des mères F1 exposées aux PCB-NDL<sub>i</sub> ou la modalité D, générant les souris F2 issues de deux parents F1 exposés durant la période périnatale aux PCB-NDL<sub>i</sub>. Les souris non colorées sont des souris non exposées aux PCB-NDL<sub>i</sub>.

## **VII. Etude fonctionnelle**

Durant le développement des souris des générations F1 et F2, des tests développementaux et comportementaux ont été conduits conformément aux recommandations de l'OCDE (2007).

Pour réaliser les tests développementaux, couvrant environ les deux premières semaines après la naissance, 5 souris/sexe ont été choisies de chaque litière, ce qui fait que le nombre d'animaux étudiés dans chaque test était de 100 souris par groupe, soit 50 animaux/sexe/groupe. Alors que pour la réalisation des tests comportementaux, une souris/sexe a été sélectionnée au hasard, de chaque litière, soit 10 animaux/sexe/groupe.

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

### **VII.1. Evaluation du développement moteur**

L'ensemble des tests utilisés chez le rongeur dans le cadre de ces études tentent de mimer les tests neuro-pédiatriques effectués dès la naissance du nouveau-né humain pour vérifier l'intégrité des fonctions et du développement neuro-moteurs et neurosensoriel.

Le développement du comportement moteur résulte d'interactions complexes entre des mécanismes génétiques et les effets de stimuli externes précoces (Jamon and Clarac, 1998). La souris fait partie des mammifères dits « non précoces », car elle est née dans un état relativement immature et doit subir un développement postnatal considérable pour atteindre l'état mature et devenir adulte.

A la naissance de la souris, son organisme généralement et son système nerveux particulièrement sont immatures (Fox, 1965). Ses mouvements ne sont pas coordonnés. Elle n'est capable que de quelques activités spécifiques telles que vocaliser, téter, et rouler sur le côté.

En outre, sa période de croissance et de maturation cérébrale intense se déroule en période postnatale, couvrant les 3 premières semaines de la vie. Cette période connue sous le nom de « la poussée de croissance du cerveau » (Himwich, 1962). Par conséquent, la souris présente un bon

modèle pour l'étude de la maturation des fonctions cérébrales et de mettre en évidence des facteurs influençant ce développement

Une batterie standardisée des tests développementaux développés au laboratoire (Gelly, 1979), couvrant la période allant environ de la naissance (JPN 3) jusqu'à JPN 11, a été réalisée sur les deux générations F1 et F2 pour évaluer leur développement moteur suite à l'exposition de leurs ascendants (femelles F0) pendant les périodes de la gestation et de l'allaitement aux PCB-NDL<sub>i</sub>.

### VII.1.1. Test de retournement (**righting reflex**) (JPN 3 - 9)

**Principe** : C'est le premier test effectué chez la souris après la naissance. Il est utilisé pour étudier le réflexe chez les rongeurs. Dans ce test, l'animal cherche à retrouver une position dorso-ventrale normale (la position debout de 4 pattes) après un déséquilibre (la mise du souriceau sur le dos par l'expérimentateur).

**Dispositif** : la souris est testée sur une planche horizontale en bois recouverte de feutrine (Photo 1).

**Procédure** : ce test est réalisé de JPN 3 à JPN 9 chez les souris F1 et F2. L'animal est initialement déposé sur la planche sur le dos sans effectuer aucune impulsion en le lâchant. La durée maximale du test est 2 minutes.

**Réactions de l'animal** : initialement, la souris est placée sur le dos dans une situation de déséquilibre. Elle effectue une série de balancements vers la droite et la gauche afin d'établir sa position quadrupède. La tête amorce le mouvement. Un « pseudo-retournement » peut être effectué par l'animal dans le cas où une de ses pattes postérieures restent sous l'abdomen de l'animal. Cela lui laisse dans une position instable et le ramène à nouveau sur le dos, en position initiale.

**Variable mesurée** : le temps (en seconde) nécessaire pour que l'animal se retourne complètement est relevé.

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



*Photo 1 : Test de retournement*

### VII.1.2. Test de réaction anti-gravitaire (*géotaxie négative*) (JPN 4 - 11)

**Principe** : ce test permet d'évaluer la réaction motrice de l'animal suite à une position inhabituelle dans l'espace en impliquant la coordination des pattes antérieures. De même, la maturité du système moteur est nécessaire pour la réussite de ce test car la réaction de la souris face à la position initiale met en œuvre des structures centrales matures très précocement (Altman and Sudarshan, 1975; Hooker, 1952).

**Dispositif** : une planche en bois (45 x 40 cm) recouverte de feutrine, et inclinée de 20° par rapport à l'horizontale est utilisée dans ce test (Photo 2).

**Procédure** : ce test est réalisé de JPN 4 à JPN 11 chez les souris F1 et F2. L'animal est initialement placé sur la planche inclinée avec la tête dirigée vers le bas. L'animale commence à effectuer des mouvements de rotation afin de diriger sa tête vers le haut. Le test est terminé lorsque l'animal effectue une rotation de 180° par rapport à la position initiale. La durée maximale de ce test est de 2 minutes.

**Réactions de l'animal** : les mouvements de l'animal commencent au niveau de la tête, qui oscille vers la droite ou la gauche. Les pattes antérieures effectuent des mouvements de poussée latérale pour permettre à la tête de se diriger vers le haut. Le passage à l'horizontale (rotation de 90°) constitue pour le jeune rat le moment d'instabilité maximale. Avec l'âge la rotation se fait avec moins d'oscillations, une plus grande rapidité et une plus grande précision.

**Variable mesurée** : le temps nécessaire pour que l'animal se rétablisse en position verticale, la tête vers le haut, est chronométré.

**Structures nerveuses impliquées** : ce test permet de renseigner sur la maturation du système vestibulaire et sur les structures du cervelet.



Photo 2 : Test de réaction anti-gravitaire

## VII.2. Evaluation neuro-comportementale

L'observation des effets sur le comportement est un bon indicateur de perturbations du système nerveux central et constitue ainsi un nécessaire prérequis pour l'étude ultérieure des mécanismes biochimiques, cellulaires ou moléculaires impliqués dans ces altérations. En outre, la détermination des effets neuro-comportementaux suite à une exposition à des substances chimiques est un élément fondamental pour la compréhension des mécanismes de neurotoxicité ou de toxicité comportementale (Lucchini et *al.*, 2000). Le défi principal de l'évaluation comportementale est la complexité inhérente du comportement lui-même. Différents tests classiquement utilisés pour l'étude du comportement de l'animal, et plus spécifiquement du rongeur, tel que les fonctions motrices et sensorielles, les fonctions cognitives, les émotions, et les comportements sociaux sont utilisés et constituent une fenêtre sur d'éventuels dysfonctionnements des fonctions centrales (Slikker et *al.*, 2005).

Une batterie des tests comportementaux a été réalisée pour évaluer la coordination locomotrice chez les souris juvéniles, l'intégration visuomotrice, la coordination locomotrice ainsi le niveau de l'anxiété chez les souris péri-adolescentes, puis le comportement sociale et le comportement de résignation chez les souris jeune-adultes, ensuite l'agressivité chez les souris adultes, et finalement à l'âge moyen, nous avons testé l'activité générale, le comportement de résignation, le niveau de l'anxiété et le comportement sociale chez les souris F1 et F2, afin d'évaluer l'effet neurotoxique de l'exposition des mères F0, gestantes et allaitantes, aux PCB-NDL<sub>i</sub> sur le comportement des générations futures successives.

Cette approche nous semble préliminaire avant de se lancer dans les évaluations épigénétiques moléculaires couteuses et lourdes.

### VII.2.1. Test du Rotarod (JPN 28 et 35)

**Principe** : ce test est utilisé pour tester la coordination locomotrice, l'équilibre et la fatigue chez les rongeurs. L'exercice imposé nécessite des ajustements posturaux afin que les animaux parviennent à maintenir leur équilibre (Carter et *al.*, 2001; Santora et *al.*, 2013).

**Dispositif** : le dispositif est composé d'un cylindre horizontal (diamètre : 3,5 cm) rotatif situé à 15 cm du socle, divisé par des cloisons opaques en 5 compartiments et relié à un axe moteur. Dans chaque compartiment est placé un levier amovible pouvant être relevé et abaissé manuellement. A l'arrière, un aimant permet de le relier mécaniquement à l'appareil. Un écran de control renseigne sur le mode de test programmé par l'expérimentateur et les performances en temps réel des animaux testés, suivant leur placement dans les 5 compartiments (Photo 3).

**Procédure** : L'animal, tenu par la queue, est placé sur le cylindre rotatif d'un compartiment. Lorsqu'il parvient à s'y stabiliser, il est lâché. Après quelques secondes de familiarisation de la souris avec la rotation, on appuie sur le bouton qui démarre le programme et déclenche le chronomètre. Lorsque l'animal n'arrive plus à rester en équilibre sur le cylindre en rotation et qu'il chute, le levier s'abaisse sous le poids de l'animal et le chronomètre s'arrête. L'écran de control indique alors le temps durant lequel l'animal est resté en équilibre.

Le test a été réalisé en deux phases :

- Phase d'entraînement : à JPN 28, chaque souris a été ramenée à effectuer 3 passages successifs (essais) espacés de 15 min.
- Phase de test : une semaine après la phase d'entraînement (JPN 35), les animaux ont été re-testés au cours d'un passage.

**Réactions de l'animal** : une fois l'animal est placé sur le cylindre en rotation, il commence à mouvoir ses 4 pattes d'une façon à se maintenir en équilibre. Avec le temps et l'augmentation de la vitesse de rotation du cylindre, la souris bouge plus rapidement et met plus d'effort pour rester en équilibre sur le cylindre en rotation. Quand la souris se fatigue et n'arrive plus à rester en équilibre, elle tombe.

**Variable mesurée** : Le temps durant lequel la souris est restée en équilibre sur le cylindre en rotation s'affichant sur l'écran est relevé pendant la phase d'entraînement et la phase de test.



Photo 3 : Le dispositif de Rotarod

### VII.2.2. Test de l'échappement de l'eau (WESPOC) (JPN 40)

**Principe** : A la péri-adolescence (JPN 40), la motricité et la résistance physique de l'animal est en évolution très rapide. Ce test est composé de plusieurs étapes, chacune représente une activité physique différente. Les activités physiques effectuées par l'animal provoquent une dépense énergétique importante, la fatigue et la diminution des performances de l'animal testé. WESPOC nécessite un bon sens de l'équilibre, une maturation de la coordination des quatre membres, ainsi qu'un effort physique important (Essman and Jarvik, 1961).

**Dispositif** : Le dispositif est composé d'un récipient cylindrique (h : 50 cm, diamètre : 25 cm) rempli d'eau à mi-hauteur (Photo 3). Une tige filetée (diamètre : 8 mm), plongée dans l'eau, émerge du centre du récipient, et une plate-forme y est fixée, à 35 cm au-dessus de l'eau (Photo 4).

**Procédure** : ce test est réalisé à JPN 40. Au début du test, l'animal est placé dans l'eau, face contre la paroi du cylindre. En nageant (phase I), il va trouver la tige filetée (phase II), s'y accrocher et l'escalader (phase III). Le test est terminé lorsque l'animal réussit à se rétablir sur la plate-forme (phase IV). La durée maximale du test est de 3 minutes (Photo 4).

**Réactions de l'animal** : au départ, la souris commence par nager dans l'eau tiède, puis escalade la tige filetée dès qu'elle la saisit. L'eau représentant pour elle un milieu aversif. L'escalade de la tige puis le rétablissement sur la plate-forme, forment les étapes les plus critiques. Pour cela, L'animal peut chuter au cours de l'ascension ainsi lors de la transition entre la tige filetée et la plate-forme. La plupart des souris entreprennent alors un nouvel essai pour atteindre la plate-forme, seul endroit où l'animal peut se reposer. La durée du test est limitée à 4 minutes.

**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), le temps total ainsi le nombre de chutes sont chronométrés.

**Structures nerveuses impliquées** : ce test permet d'évaluer, entre autres, l'intégration visuomotrice de l'animal, lors de son orientation vers la tige visible, la coordination locomotrice, la fonction neuro-musculaire et l'aptitude musculaire de la souris lors de l'escalade sur la tige métallique et le rétablissement à une position quadrupède sur la plate-forme (Essman and Jarvik, 1961).

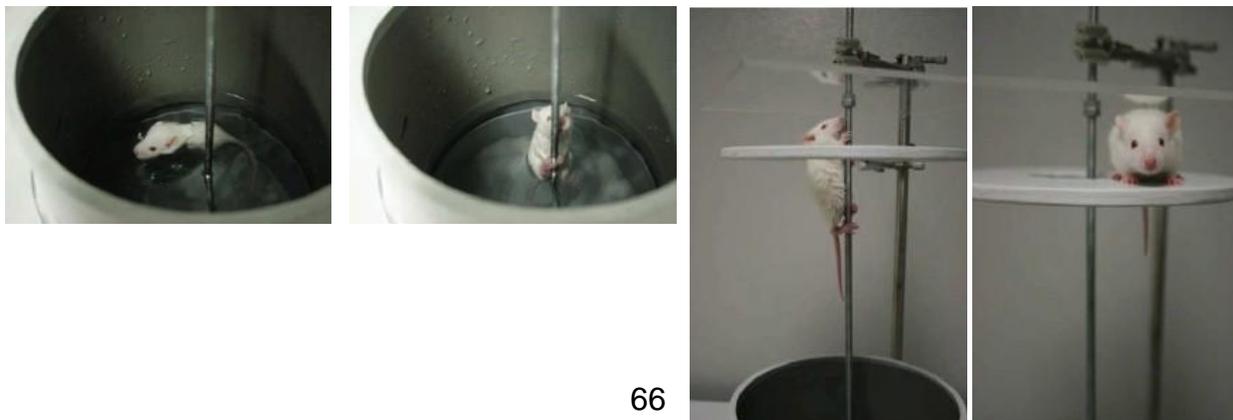


Photo 4 : Test de coordination locomotrice

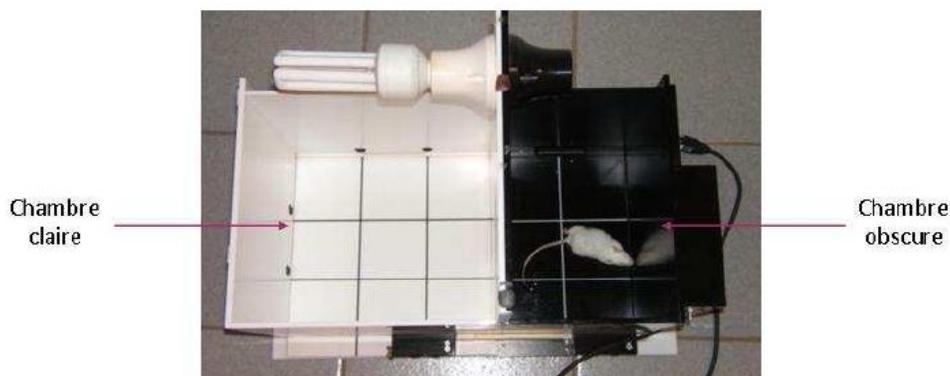
### VII.2.3. Test de la chambre claire/obscur (JPN 40)

**Principe** : Ce test, adapté du dispositif mis au point par Crawley et Goodwin en 1980, est destiné à évaluer le niveau d'anxiété chez l'animal, en le confrontant à un espace fortement illuminé anxiogène et aversif et à un milieu obscur plus sécurisant et moins anxiogène. Le temps passé dans chaque compartiment est quantifié et plus l'animal passe du temps dans le compartiment illuminé et anxiogène moins son anxiété est élevée.

**Dispositif** : La chambre claire/obscur (CCO) est constituée de deux compartiments, l'une carrée obscur (80- 90 lux) et étroit (27 x 18 x 29 cm), composé de 6 carrés, constituant ainsi 40 % de la surface totale du dispositif est appelée « compartiment sombre (CS) » et l'autre étant clair (éclairé par une lumière blanche de 390 à 400 lux) et spacieux (27 x 27 x 29 cm), divisé en 9 carrés de surfaces égales (9 x 9 cm), appelée « compartiment clair (CC) ». Les deux compartiments communiquent entre eux par une ouverture (Photo 5).

**Procédure** : Ce test a été conduit à JPN 40 uniquement chez la génération F1. La souris a été introduite dans la chambre claire, la tête orientée vers l'ouverture de la chambre obscure. La durée totale de ce test a été fixée à 5 min.

**Variables mesurées** : Différentes performances de l'animal liées à son état de l'anxiété ont été enregistrés, à savoir la latence d'entrée dans le CC, le temps passé dans chacun des compartiments et le nombre de tentatives d'entrées dans le CC. Le nombre de carrés traversés dans la chambre obscure (CS) renseigne plus spécifiquement sur l'activité locomotrice et exploratoire des animaux testés.



*Photo 5 : Le dispositif du test de la chambre claire-obscur montrant une souris qui explore la chambre obscure, milieu sécurisant).*

#### VII.2.4. Test de la suspension caudale (JPN 50 et 330)

**Principe** : le test de la suspension caudale a été décrit dans les années 80 par Steru et ses collaborateurs. Il permet d'évaluer rapidement les effets psychotropes des substances médicamenteuses sur les rongeurs notamment les effets antidépressifs (Steru et *al.*, 1985). Ce test quantifie d'une manière indirecte la résilience de l'animal face à cette situation anxio-dépressogène. C'est l'un des modèles d'études dit *dépressif-like* et moins le temps de résilience est important plus l'animal exprime une difficulté à surmonter la situation expérimentale et plus il est considéré dans cet état *dépressif-like*.

**Dispositif** : une barre perpendiculaire sur laquelle une ou plusieurs souris peuvent être accrochées. Un ruban adhésif est utilisé pour fixer la queue de la souris sur la barre (Figure 8).

**Procédure** : ce test est effectué aux JPN 50 et 330 des souris F1 et F2. Les animaux testés ont été individuellement expérimentés, de telle sorte que la base de la queue soit perpendiculaire à la barre, à l'aide d'un ruban adhésif (une méthode sans douleur) (Figure 7). La souris reste suspendue durant 6 min.

**Réactions de l'animal** : les souris suspendues essayent, de manière systématique, d'échapper à cette position inconfortable, en essayant de se redresser pour saisir la barre. A force d'échouer dans leurs tentatives de redressement, elles génèrent un état de désespoir qui se traduit par une immobilité et une résignation. Un tel comportement d'une souris peut être décrit comme « *dépressif-like* », sans que l'on ne puisse jamais dire que la souris est dépressive (Boissy et *al.*, 2007). Une souris qui ne se résigne pas à cette situation, son temps d'immobilité sera diminué. Cette diminution du temps dans ce test est observée suite au prétraitement des animaux par les antidépresseurs de référence et l'effet est considéré comme « *antidépessif-like* ».

**Variables mesurées :** La magnitude de l'immobilité est considérée comme corrélée à un comportement « *dépressive-like* ». Pour cela, le temps de résignation des animaux a été révélé lors des 4 dernières minutes de test (Steru et *al.*, 1985).



Figure 7 : Le dispositif du test de la suspension caudale montrant trois souris suspendues par la queue.

#### VII.2.5. Test du compartiment à trois chambres (JPN 50 et 330)

**Principe :** Ce test permet d'évaluer l'interaction sociale chez le rongeur. L'animal testé est confronté à un choix entre l'exploration d'un environnement nouveau et l'exploration d'un congénère inconnu. Il renseigne également sur les niveaux d'activité et d'anxiété sociale de l'animal testé.

**Dispositif :** le dispositif est constitué d'une boîte (L : 60 cm × l : 40 cm × h : 25 cm) divisée en trois chambres (L : 40 cm × l : 20 cm × h : 25 cm) par des cloisons verticales. Les trois chambres étant disposées en enfilade, une ouverture dans chaque cloison (5 × 5 cm) et des portes guillotines coulissantes permettent le passage entre elles. Deux cages métalliques perforées (diamètre : 12 cm, h : 13 cm) viennent compléter le dispositif en étant placées au centre des chambres périphériques.

**Procédure :** Les animaux testés ont été isolés environ une semaine avant l'expérimentation.

Ce test formé de trois phases a été réalisé à l'âge jeune-adulte (JPN 50) des souris F1 et à l'âge moyen (JPN 330) des souris des générations F1 et F2 (Figure 8).

➤ Phase I : essai d'habituation

L'animal testé est placé dans la chambre centrale durant 1 minute pour lui permettre de s'habituer à cet espace, les accès aux deux autres chambres étant fermés par les portes guillottes

➤ Phase II : essai de sociabilité

Un congénère non familier, du même sexe de l'animal testé, est placé sous une des deux cages, dans une des deux chambres latérales du dispositif. Les portes sont ensuite ouvertes et l'animal testé est laissé libre d'explorer les trois chambres durant 5 min. L'animal testé est ensuite cloisonné dans la chambre centrale par la fermeture des portes.

➤ Phase III : essai de préférence pour la nouveauté

Un 2<sup>ème</sup> congénère non familier, du même sexe de l'animal testé, est introduit au sein de la cage inoccupée dans la chambre latérale, tandis que le 1<sup>er</sup> congénère devenant familier est laissé, à la cage, dans la chambre latérale qu'il occupait lors de l'essai de sociabilité. Les portes sont ré-ouvertes et l'animal testé est à nouveau laissé libre d'explorer les trois chambres (et les 2 souris congénères familière et nouvelle) durant 5 min (Klaric et al., 2017).

**Variables mesurées** : Le temps passé dans les deux chambres périphériques, le temps et le nombre de reniflement du congénère non familier sont relevés dans les phases II et III pour évaluer la sociabilité et la préférence pour la nouveauté chez l'animal testé. Le temps passé dans la chambre centrale ainsi que le nombre d'entrée dans la chambre périphérique non occupée de la phase II sont relevés pour évaluer respectivement le niveau de l'anxiété sociale et l'activité de l'animal testé.

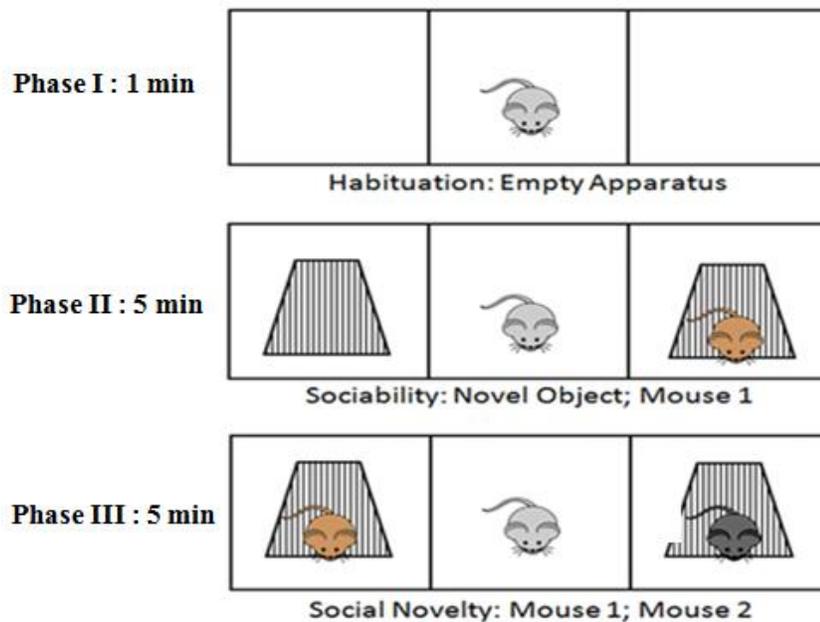


Figure 8 : Test du compartiment à trois chambres. La phase I : habituation de la souris testée à la chambre centrale du dispositif. La phase II est l'essai de sociabilité qui consiste à évaluer la sociabilité de la souris testée en la laissant choisir entre le souris étrangère (congénère 1) qui se trouve dans une de deux chambres latérale et la chambre vide. Phase III est l'essai de la préférence pour la nouveauté sociable qui consiste à évaluer la préférence de la souris testée pour la souris devenue familière (congénère 1) vis-à-vis de la nouvelle souris (congénère 2) ajoutée dans la deuxième chambre latérale qui était vide durant la phase II.

#### VII.2.6. Test du résident/intrus (JPN 80)

**Principe** : Ce test est fréquemment utilisé pour évaluer l'agressivité uniquement chez les souris mâles. Il consiste à confronter deux animaux dans un même espace et à observer leurs interactions. L'animal appelé « résident » est celui qui reste dans sa cage d'habitation, alors que le congénère mâle « intrus » est celui qui est placé dans la cage du résident (Koolhaas et al., 2013).

**Dispositif** : Le test est réalisé dans la cage d'habitation de l'animal résident.

**Procédure** : A JPN 80, l'animal intrus, a été placé dans la cage de l'animal «résident», à l'opposé de celui-ci. L'intrus utilisé doit être un congénère étranger au résident. De même, ils doivent surtout avoir le même sexe (mâles) et le même âge.

**Réactions de l'animal** : Une fois le résident rencontre l'intrus, une interaction commence entre les deux souris. Cela se traduit soit par une exploration du congénère inconnu présentée par des reniflements, soit par une inacceptation de la présence d'intrus reflétée par une agressivité du résident contre lui. En réponse à cette agressivité, l'intrus adopte une situation défensive caractérisée par une posture de soumission, éloignement, fuite, immobilisation, vocalisation et/ou attaques défensives.

**Variables mesurées** : Le temps de latence (en seconde) de la première attaque ainsi le nombre d'attaques initiées par le résident sont relevés.

### VII.2.7. Open-field (JPN 330)

**Principe** : l'Open-field a été conçu pour la première fois par Ballechey en (1932). Ce test permet d'évaluer le niveau d'activité générale et exploratoire ainsi que le niveau de l'anxiété de l'animal placé dans une situation nouvelle.

**Dispositif** : Le dispositif est constitué d'une plate-forme circulaire de 50 cm de diamètre divisée en 36 cases, répartie en 3 zones : La zone périphérique (20 cases), la zone médiane (12 cases), et la zone centrales (4 cases). Cette plate-forme est délimitée par une paroi en plexiglas noire de 27 cm de hauteur. L'éclairage a été homogène en tout point du dispositif du test (Photo 6).

**Procédure** : Ce test est effectué à JPN 330. La souris testée a été placée dans la zone périphérique du dispositif, le visage en face de la paroi de l'appareil et elle a été autorisée d'explorer librement la surface de l'Open-field pendant 5 min.

**Variables mesurées** : Après 1 min d'habituation, le nombre de cases totales parcourues, le nombre de redressements, le nombre de cases parcourues de chaque zone, le temps de latence ainsi le temps passé dans la zone centrale sont relevés durant les 4 minutes.

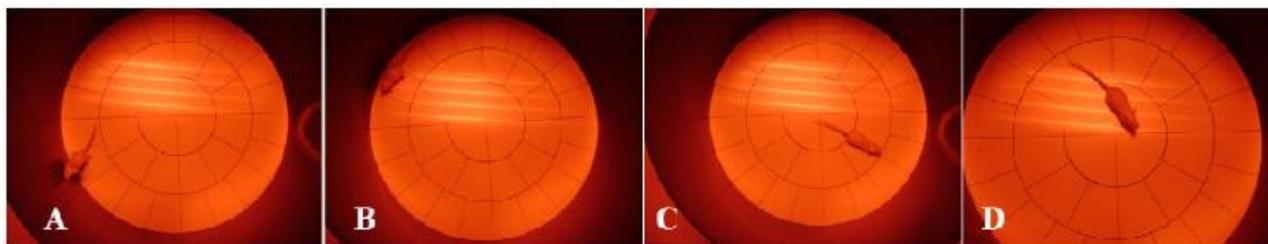


Photo 6 : Le dispositif du test de l'Open field montrant la souris qui explore le milieu verticalement (A), et horizontalement (B : zone périphérique ; C : zone médiane ; D : zone centrale).

### VII.2.8. Labyrinthe en croix surélevé (LCS) (JPN 330)

**Principe** : Basé sur les travaux de Montgomery (1955), le labyrinthe en croix surélevé a été mis au point par Handley et Mithani (1984) puis validé chez le rat par Pellow et *al.*, en (1985). Il permet d'évaluer le niveau d'anxiété et l'activité locomotrice chez les rongeurs. 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 6). 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. Une corrélation peut être établie entre le niveau d'anxiété de l'animal et le temps qu'il passe dans les deux BO, qui constituent une zone découverte aversive (Hogg, 1996). La ZC constitue une zone de décision, et est considérée, avec les BF, comme un espace protégé (Photo 7).

**Procédure** : À JPN 330, ce test a été réalisé chez les souris de deux générations F1 et F2. Au début du test, la souris est placée dans la ZC avec la tête orientée vers une BO. Elle est alors laissée libre d'explorer son environnement pendant 5 minutes. Le principe de ce test est basé sur

l'exploration forcée de l'animal dans deux milieux contrastés : bras fermés dont les parois sont proches et donc faiblement éclairées (80 lux) par rapport aux bras ouverts surélevés qui sont fortement éclairés (390 - 400 Lux).

**Réactions de l'animal :** l'absence de parois, la présence du vide et le fort éclairage représentent les trois paramètres anxigènes dans les bras ouverts, constituant par conséquent le milieu aversif ou anxigène pour les rongeurs. Par contre, les bras fermés constituent la partie sécurisée ou préférée de l'animal au cours de cette exploration forcée dans la labyrinthe (Lister, 1990).

**Variables mesurées :**

- Le nombre total d'entrées en BO
- Le temps cumulé dans les BO
- le nombre de tentatives de visites des bras ouverts
- Le temps de latence de la première entrée dans un BO

Les résultats du temps cumulé ainsi que le nombre d'entrées dans les bras ouverts ont été exprimés en pourcentages. Plus le pourcentage est faible plus l'anxiété de l'animal est élevée.

Ainsi, le niveau d'activité est évalué par le nombre total d'entrées en BF.



Photo 7 : Le dispositif du test du labyrinthe en croix surélevé montrant une souris qui explore le milieu aversif (bras ouvert).

### VIII. Récapitulatif de batterie de tests développementaux et comportementaux réalisée

Le schéma ci-dessous englobe les différentes expérimentations conduites au cours de cette étude, mettant en évidence l'étude multi-générationnelle des effets neurotoxiques potentiels des PCB-NDL<sub>i</sub>. Le JG 7 marque le début de l'exposition orale par accès libre des souris mères F0 gestantes et allaitantes aux 6 PCB-NDL<sub>i</sub> jusqu'au sevrage de F1 à JPN 21.

Les différents tests de développement et de comportement ont été conduits chez les souris de deux génération F1 et F2 à partir de JPN 3 jusqu'à JPN 330 selon l'ordre indiqué dans la figure 9.

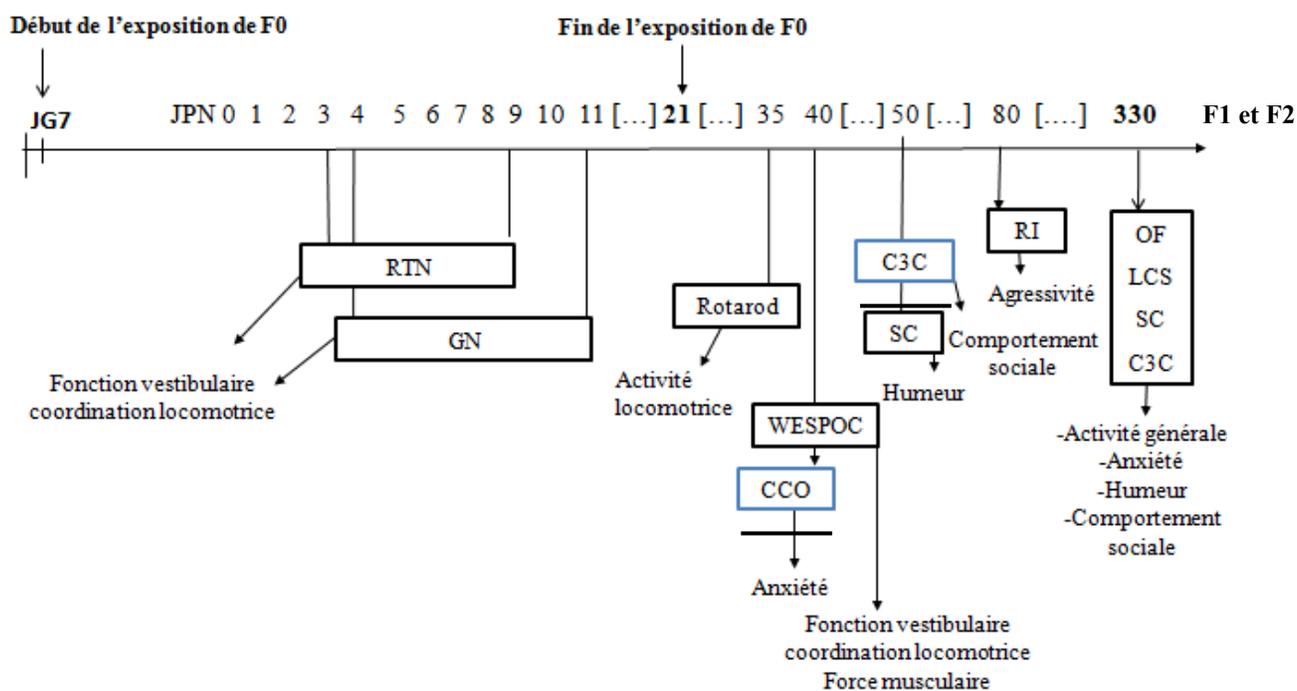


Figure 9 : Schéma expérimental général mené chez les progénitures de souris F1 et F2 dont leurs ascendantes (mères F0) ont été exposées durant la période gestationnelle et lactationnelle aux PCB-NDL<sub>i</sub>. Le protocole expérimental prend en compte l'âge des progénitures de souris. Il sert à mesurer les effets à court terme en conduisant les tests développementaux chez les souriceaux (le test de retournement et test de la géotaxie négative) ainsi que les effets à moyen et long terme en utilisant les tests comportementaux chez

*les souris juvéniles (le test de Rotarod), chez les souris péri-adolescentes (le test de l'échappement à l'eau (WESPOC) et le test de la chambre claire-obscur (CCO)), chez les souris jeune-adultes (le test de la suspension caudale (SC) et le test du comportement social (C3C)), chez les souris adultes (le test de résident/intrus) et à l'âge moyen (le test de l'Open field (OF), le test de labyrinthe en croix surélevé (LCS), et les tests de la SC et du C3C).*

*A noter que les tests soulignés (CCO à JPN 40 et C3C au JPN 50) sont des tests qui n'ont été réalisés que chez la progéniture F1. JG : jour gestationnel. JPN : jour postnatal.*

## **IX. Prélèvement**

A l'âge moyen, après avoir terminé les tests de comportement programmés dans le cadre de ce travail, six souris de portée différente de la génération F1, par sexe, par groupe, ont été choisies au hasard et euthanasiées à l'isoflurane puis sacrifiées. Le sang a été collecté dans les trois minutes suivantes puis héparinisé ensuite conservé à -80 °C pour des dosages biochimiques ultérieurs.

## **X. Analyse biochimique**

### **X.1. Objectifs**

Plusieurs dosages biochimiques ont été réalisés lors de cette étude, afin d'évaluer l'effet de l'exposition périnatale aux mélanges purs de PCB-NDL<sub>i</sub> chez les souris de la génération F1 à l'âge moyen (JPN 330):

- Analyses des niveaux plasmatiques de la corticostérone, de la sérotonine et de la myéloperoxydase ainsi que l'activité de l'acétylcholinestérase.

### **X.2. Dosage de corticostérone**

#### **Principe**

La corticostérone est une hormone glucocorticoïde sécrétée par les zones glomérulées et fasciculées du cortex surrénalien chez les rongeurs. Elle correspond à l'hormone cortisol chez l'Homme. La corticostérone est un marqueur de stress puisqu'elle est libérée dans le sang suite à un stress, un événement nouveau ou inquiétant, et elle est à l'origine de diverses réactions physiologiques optimisant la réponse à la situation stressante (Rosen et *al.*, 1998; Schulkin et *al.*, 2005).

## **Mode opératoire**

Les concentrations plasmatiques totales de corticostérone ont été testées dans le sang de souris en utilisant le kit ELISA acheté chez Enzo Life Sciences (sensibilité: 27 pg / ml, Farmingdale, NY, États-Unis) selon les instructions du fabricant.

### **X.3. Dosage de myéloperoxydase (MPO)**

#### **Principe**

La myéloperoxydase est une enzyme hémoprotéine glycosylée stockée dans les granules azurophiles des neutrophiles et des macrophages polymorphonucléaires. Elle est caractérisée par ses puissantes propriétés pro-oxydantes et pro-inflammatoires (Zawadski et *al.*, 1998). Certaines études ont montré l'implication de cette enzyme dans le comportement de résignation chez les souris (Soualeh et *al.*, 2017).

#### **Mode opératoire**

Les niveaux de MPO ont été évalués dans le plasma recueilli des souris F1 en utilisant un kit ELISA de souris (catalogue n ° ab155458; Abcam, Cambridge, Royaume-Uni).

### **X.4. Dosage de l'activité de l'acétylcholinestérase (AChE)**

#### **Principe**

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

Nous nous sommes intéressés à étudier l'activité de cette protéinase (AChE) vue son rôle important dans la régulation synaptique du message nerveux en catalysant l'hydrolyse de l'acétylcholine.

## Mode opératoire

L'activité de l'acétylcholinestérase a été déterminée par spectrophotométrie (DU 720 UV/spectrophotomètre visible, Beckman Coulter, Palo Alto, CA) dans le plasma de souris descendant d'âge moyen selon Ellman et *al.* (1961). Brièvement, on a mélangé 0,85 ml de tampon phosphate (0,1 M; pH 7,5) avec 0,05 ml d'acide 5,5'-dithiobis- (2-nitrobenzoïque) de concentration 8 mM et avec 0,05 ml de plasma. Après 5 min à température ambiante, la réaction a été amorcée par addition de 0,05 ml d'acétylthiocholine (8,25 mM) au mélange. L'activité de l'acétylcholinestérase a été évaluée à 412 nm (à 20 °C) par une mesure cinétique en utilisant le coefficient d'extinction molaire [ $\epsilon$ ] 13,6 mM<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>]. Les résultats ont été exprimés sous la forme de nanomoles acétylthiocholine hydrolysée par minute par milligramme.

## X.5. Dosage de sérotonine

### Principe

La sérotonine est un dérivé métabolique du tryptophane. Ce dernier, sous l'action d'une tryptophane-hydroxylase, puis d'une décarboxylase, conduit à la formation de 5-hydroxy-tryptamine (5HT) ou la sérotonine.

La sérotonine est un neuromédiateur intervenant dans le contrôle de nombreuses fonctions cérébrales : le cycle veille/sommeil, la thermorégulation, le comportement de faim/satiété, le comportement sexuel, etc. De plus, des désordres neuropsychiatriques tels que la dépression, la démence et l'anxiété sont associés à des anomalies fonctionnelles des neurones sérotoninergiques. Cette diversité de fonctions de la sérotonine est très probablement en rapport avec la multiplicité de ses récepteurs (Allain, 2014).

### Mode opératoire

Les niveaux plasmatiques de sérotonine ont été analysés dans le sang de souris en utilisant le kit ELISA acheté chez Abcam (sensibilité: 0,293 ng/ml, catalogue n ° ab133053;).

## XI. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel SPSS 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL). Le seuil de significativité est fixé à  $p \leq 0,05$ .

Les données des tests de retournement et de la géotaxie négative ont été analysées à l'aide d'ANOVA à mesures répétées en prenant l'exposition des souris F1 aux PCB-NDL<sub>i</sub> et le sexe des souris F1 et F2 comme deux facteurs fixes, et l'âge des souris F1 et F2 comme un facteur de répétition.

Les mesures comportementales des tests *Rotarod*, *Wespoc*, la chambre claire/obscur et l'open field des deux générations F1 et F2 ont été analysées à l'aide d'ANOVA à deux facteurs pour mettre en évidence les effets de l'exposition périnatale des souris F1 aux PCB-NDL<sub>i</sub> et du sexe des souris testées dans l'expression du comportement de l'animal. Dans le test de résident/intrus, où les mâles uniquement ont été testés, les données ont été analysées à l'aide d'ANOVA à un seul facteur en considérant l'exposition périnatale des souris F1 aux PCB-NDL<sub>i</sub> comme un facteur fixe. Par ailleurs, les résultats du test de la suspension caudale ont été analysés à l'aide d'ANOVA à trois facteurs, en prenant l'exposition précoce des souris F1 aux PCB-NDL<sub>i</sub>, le sexe et l'âge des souris testées comme des facteurs indépendants. Les résultats issus du test de labyrinthe en croix surélevé réalisé chez la génération F1 ont été analysés à l'aide de deux tests statistiques différents : le test *Kruskal-wallis* pour les données de distribution non-gaussienne et ANOVA à deux facteurs pour les données normalement distribuées. Alors que les résultats de ce test effectué chez la génération F2 ont été analysés à l'aide d'ANOVA à deux facteurs.

Dans le cas d'un effet significatif du facteur lié à l'exposition aux PCB-NDL<sub>i</sub>, des comparaisons *a posteriori* ont été réalisées à l'aide du test de Fisher.

Les résultats relevés en comportement social ont été analysés par différents tests statistiques. Chez la génération F1, ANOVA à trois facteurs (exposition, sexe et âge) a été utilisé pour comparer les groupes expérimentaux. Alors que chez la génération F2, le test d'ANOVA à deux facteurs (exposition et sexe) a été utilisé pour comparer les groupes expérimentaux. Les analyses *post hoc* entre les groupes témoins et traités ont été conduites en utilisant le test de Fisher. Pour les comparaisons au sein de même groupe chez les deux générations, le test de *Student* indépendant, dans le cas d'une distribution normale, ou le test de *Mann-Whitney*, dans une distribution non

gaussienne, ont été utilisés pour comparer la préférence à un congénère ou à une chambre (c.à.d chambre de congénère étranger *vs.* chambre vide dans la phase II et chambre du congénère devenu familier *vs.* chambre du congénère nouveau dans la phase III).

ANOVA à 2 facteurs a été utilisée pour analyser les résultats des dosages biochimiques effectués sur la génération F1 en prenant l'exposition périnatale des souris F1 aux PCB-NDL<sub>i</sub> et leur sexe comme des facteurs indépendants. Des comparaisons *a posteriori* ont été réalisées par le test de Fisher.

Les résultats sont indiqués comme moyenne ( $\pm$  SEM).

# *Résultats*

## **I. Effet multigénérationnel de l'exposition des souris mères F0 aux PCB-NDL<sub>i</sub> sur la coordination locomotrice et la fonction vestibulaire des souriceaux des deux générations F1 et F2**

### **1. Test de retournement**

#### **Génération F1 (Figures 10A et 10B)**

Dans le test de retournement, le test statistique ANOVA à mesures répétées a montré que le réflexe du retournement des souriceaux de la génération F1 a dépendu significativement de leur âge [F(6, 292) = 101,87,  $p < 0,001$ ] ainsi que de l'interaction entre les deux facteurs « âge » et « exposition périnatale, via leurs mères F0, aux PCB-NDL<sub>i</sub> » [F(12, 278) = 1,98,  $p < 0,05$ ]. Cependant, cette performance n'a dépendu ni de l'exposition aux PCB-NDL<sub>i</sub> [F(2, 296) = 0,09,  $p > 0,05$ ], ni du sexe des souriceaux [F(1, 297) = 1,83,  $p > 0,05$ ], ni de l'interaction entre ces deux facteurs [F(2, 293) = 1,54,  $p > 0,05$ ].

Les analyses a posteriori ont montré une diminution significative de temps de retournement, à JPN 5, des souriceaux femelles exposées à la dose 10 ng/kg de PCB-NDL<sub>i</sub> par rapport aux femelles témoins ( $p < 0,05$ ) (Figure 1B). A JPN 6, les souriceaux mâles et femelles exposés aux doses 10 et 1000 ng/kg de PCB-NDL<sub>i</sub> ont mis significativement moins de temps pour se retourner par rapport aux souriceaux témoins ( $p < 0,05$ ) (Figure 1A et 1B). Egalement, à JPN 8, une diminution significative de temps de retournement a été observée uniquement chez les souriceaux mâles exposés à la dose 10 ng/kg de PCB-NDL<sub>i</sub> par rapport aux témoins ( $p \leq 0,05$ ) (Figure 10A).

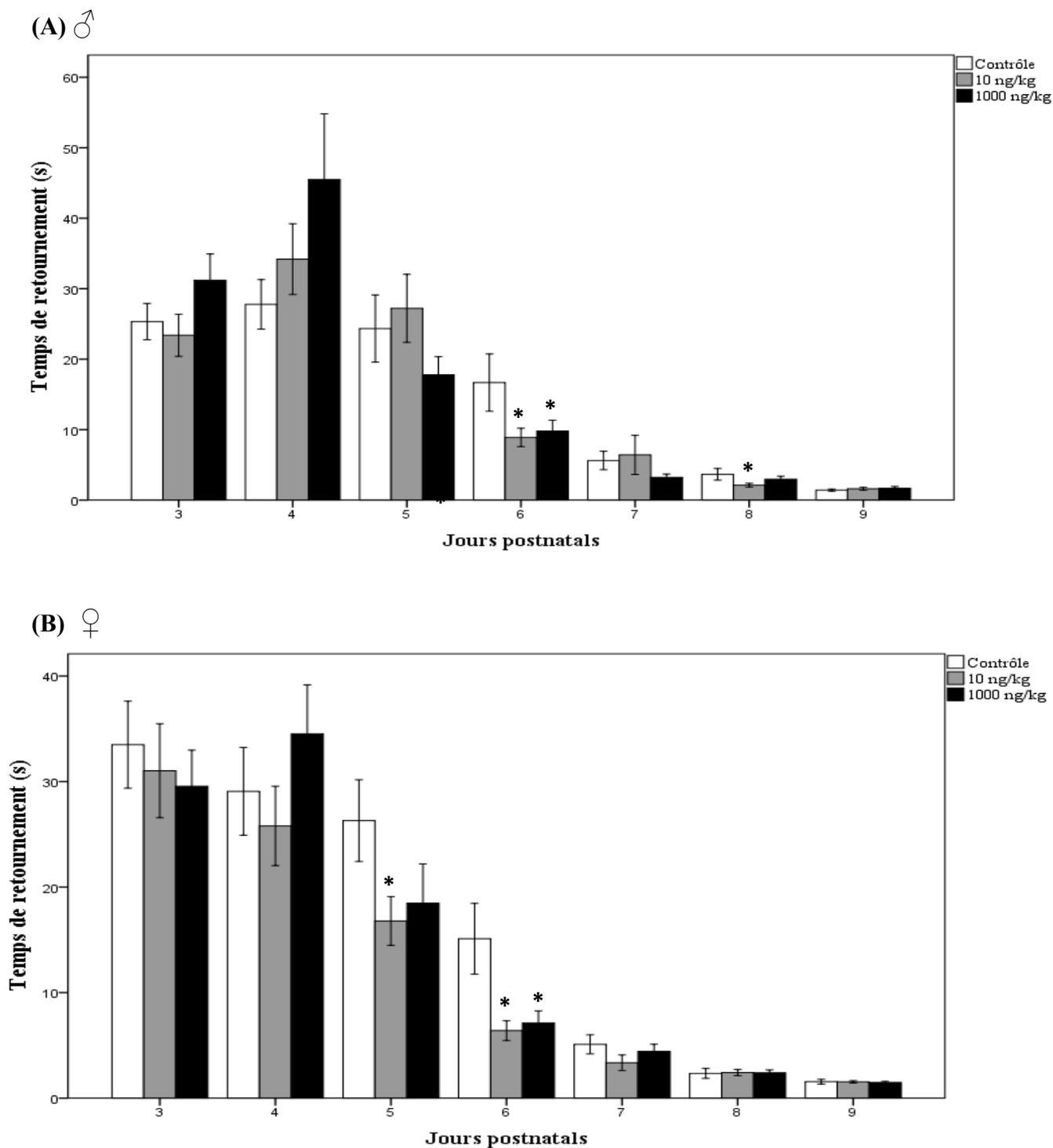


Figure 10 : Le réflexe de retournement (en sec) des souriceaux mâles (A) et femelles (B) F1 exposés durant la période périnatale, via leurs mères F0, aux doses 10 et 1000 ng/kg de PCB-NDL<sub>i</sub>, comparé à celui des

souriceaux témoins dans le test de retournement ( $n = 49-50/\text{sexe}/\text{groupe}$ ). Les résultats sont reportés en moyennes  $\pm$  ESM. \* $p < 0,05$  et \*\* $p < 0,01$  : différences significatives par rapport aux témoins.

## Génération F2

Génération F2 issue de deux parents F1 exposés périnatale, via leurs mères F0, aux PCB-NDL<sub>i</sub> durant la période (Figure 11)

ANOVA à mesures répétées a montré un effet significatif de l'exposition précoce de deux parents F1 aux PCB-NDL<sub>i</sub> [ $F(2, 296) = 3,97, p < 0,05$ ] ainsi de l'âge [ $F(6, 292) = 127,18, p < 0,001$ ] sur le temps de retournement des souriceaux F2. Aucun effet du sexe n'a été trouvé [ $F(1, 298) = 1,85, p > 0,05$ ]. De même, aucune interactions entre les différents facteurs de l'étude n'a été signalée [exposition  $\times$  sexe :  $F(2, 293) = 0,54, p > 0,05$  ; exposition  $\times$  âge :  $F(12, 278) = 1,25, p > 0,05$  ; exposition  $\times$  sexe  $\times$  âge :  $F(12, 257) = 1,36, p > 0,05$ ].

Les analyses a posteriori par le test de Fisher ont montré une diminution significative de temps de retournement à JPN 3 chez les souriceaux mâles F2 dont leurs deux parents F1 ont été exposés durant la période périnatale, via leurs mères, aux doses 10 (D10) et 1000 (D1000) ng/kg de PCB-NDL<sub>i</sub> ( $p < 0,05$  et  $p < 0,01$  respectivement). De même, à JPN 5, les souriceaux mâles D1000 ont mis significativement moins de temps pour se retourner par rapport aux souriceaux témoins ( $p < 0,05$ ) (Figure 11). Par contre, chez les souriceaux femelles, aucune modification au niveau du temps de retournement n'a été constatée par rapport aux souriceaux témoins ( $p > 0,05$ ).

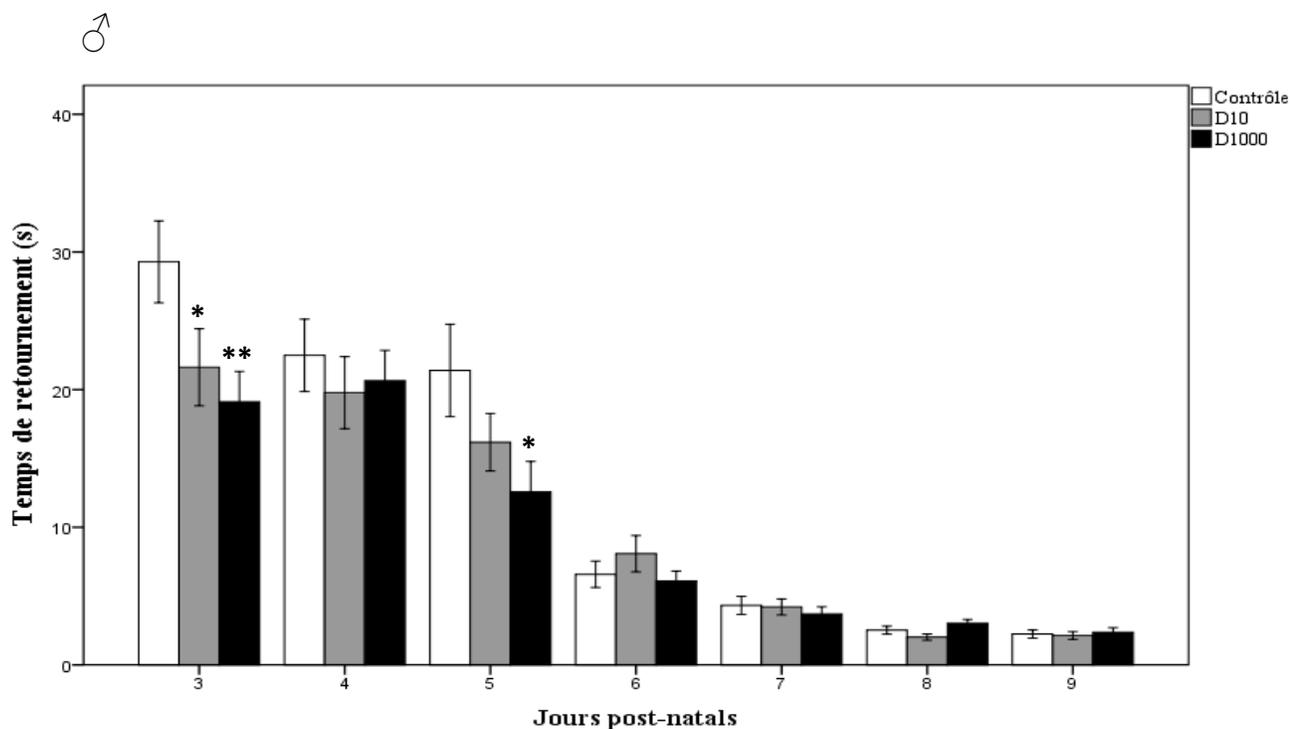


Figure 11 : Le réflexe de retournement (en sec) des souriceaux mâles D10 et D1000 de la génération F2, issus de deux parents F1 exposés durant la période périnatale, via leurs mères F0, aux doses 10 et 1000 ng/kg de PCB-NDL<sub>i</sub>, respectivement, comparé à celui des souriceaux témoins dans le test de retournement ( $n = 49-50/\text{sexe}/\text{groupe}$ ). Les résultats sont reportés en moyennes  $\pm$  ESM. \* $p < 0,05$  et \*\* $p < 0,01$  : différences significatives par rapport aux témoins.

### Génération F2 issue uniquement des pères F1 exposés, via leurs mères F0, aux PCB-NDL<sub>i</sub> durant la période périnatale

Le traitement statistique des données des souriceaux F2 a révélé que l'exposition périnatale des pères F1 aux PCB-NDL<sub>i</sub>, via leurs mères F0 [ $F(2, 293) = 2,30, p > 0,05$ ], leur sexe [ $F(1, 294) = 0,30, p > 0,05$ ], leur âge [ $F(6, 289) = 130,5, p > 0,05$ ] ainsi que l'interaction entre ces trois facteurs [exposition  $\times$  sexe :  $F(2, 290) = 0,57, p > 0,05$  ; exposition  $\times$  âge :  $F(12, 275) = 1,57, p > 0,05$  ; exposition  $\times$  sexe  $\times$  âge :  $F(12, 254) = 0,89, p > 0,05$ ] n'ont pas eu d'impact sur le temps de retournement.

Génération F2 issue uniquement des mères F1 exposées, via leurs mères F0, aux PCB-NDL<sub>i</sub> durant la période périnatale (Figure 12)

Dans le test de retournement, le réflexe du retournement des souriceaux F2 a dépendu significativement de l'exposition périnatale des mères F1 aux PCB-NDL<sub>i</sub>, via leurs mères F0 [F(2, 256) = 9,09,  $p < 0,001$ ], de leur âge [F(6, 252) = 11,57,  $p < 0,001$ ], ainsi de l'interaction entre ces deux facteurs [F(12, 238) = 2,88,  $p < 0,01$ ]. Cette performance n'a dépendu ni du sexe des souriceaux F2 [F(1, 257) = 0,49,  $p > 0,05$ ] ni de l'interaction entre les différents facteurs étudiés [exposition × sexe : F(2, 253) = 0,90,  $p > 0,05$  ; exposition × sexe × âge : F(12, 217) = 1,29,  $p > 0,05$ ].

Les analyses a posteriori ont montré une diminution significative de temps de retournement, à JPN 3, uniquement chez les souriceaux mâles M10 et M1000 de la génération F2 issus des mères F1 exposées durant la période périnatale, via leurs mères F0, aux doses 10 et 1000 ng/kg de PCB-NDL<sub>i</sub>, respectivement, ( $p < 0,05$ ). En plus, à JPN 4, les souriceaux mâles M1000 ont mis significativement moins de temps pour se retourner par rapport aux témoins ( $p < 0,01$ ). De même, à JPN 5, les souriceaux mâles M10 se sont retournés plus rapidement que les souriceaux témoins ( $p < 0,01$ ) (Figure 12). Par contre, chez les souriceaux femelles, aucune modification au niveau du temps de retournement n'a été révélée par rapport aux souriceaux témoins ( $p > 0,05$ ).

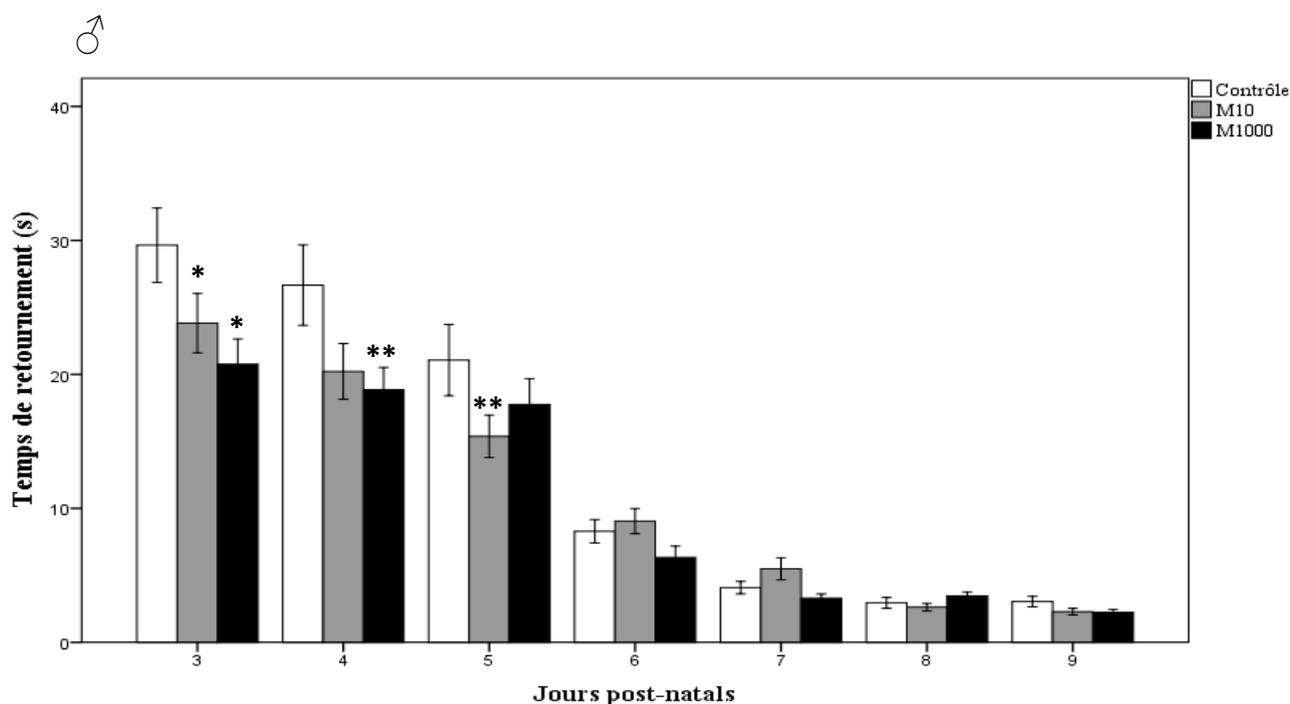


Figure 12 : Le réflexe de retournement (en sec) des souriceaux mâles M10 et M1000 de la génération F2, issus uniquement des mères F1 exposées durant la période périnatale, via leurs mères F0, aux doses 10 et 1000 ng/kg de PCB-NDL<sub>i</sub>, respectivement, comparé à celui des souriceaux témoins dans le test de retournement ( $n = 30-50/\text{sexe}/\text{groupe}$ ). Les résultats sont reportés en moyennes  $\pm$  ESM. \* $p < 0,05$  et \*\* $p < 0,01$  : différences significatives par rapport aux témoins.

## Conclusion

Les résultats du test de retournement réalisé de JPN 3 à JPN 9 sur les souriceaux F1 et F2 ont montré une diminution significative mais transitoire (dans le sens où cette diminution ne se prolonge pas au-delà de JPN 9) de temps de retournement aussi bien chez les souriceaux mâles que femelles de la génération F1, exposés, via leurs mères F0, aux doses 10 et 1000 ng/kg de PCB-NDL<sub>i</sub> durant la période périnatale. Chez la génération F2, uniquement les mâles provenant soit de deux parents ou seulement des mères de la génération F1, ont montré une diminution transitoire de temps de retournement. Il s'agit donc d'une transmission d'origine maternelle.

## 2. Test de la géotaxie négative

### Génération F1

Dans le test de la géotaxie négative, ANOVA à mesures répétées a révélé que le réflexe de rotation des souriceaux F1 a dépendu significativement de leur âge [ $F(7, 289) = 26,63, p < 0,001$ ]. Cependant, cette performance n'a dépendu ni de leur exposition périnatale aux PCB-NDL<sub>i</sub> [ $F(2, 294) = 0,15, p > 0,05$ ], ni de leur sexe [ $F(1, 295) = 0,85, p > 0,05$ ], ni de l'interaction entre les facteurs étudiés [exposition  $\times$  sexe :  $F(2, 291) = 1,76, p > 0,05$  ; exposition  $\times$  âge :  $F(14, 273) = 1,01, p > 0,05$  ; exposition  $\times$  sexe  $\times$  âge :  $F(14, 249) = 0,90, p > 0,05$ ].

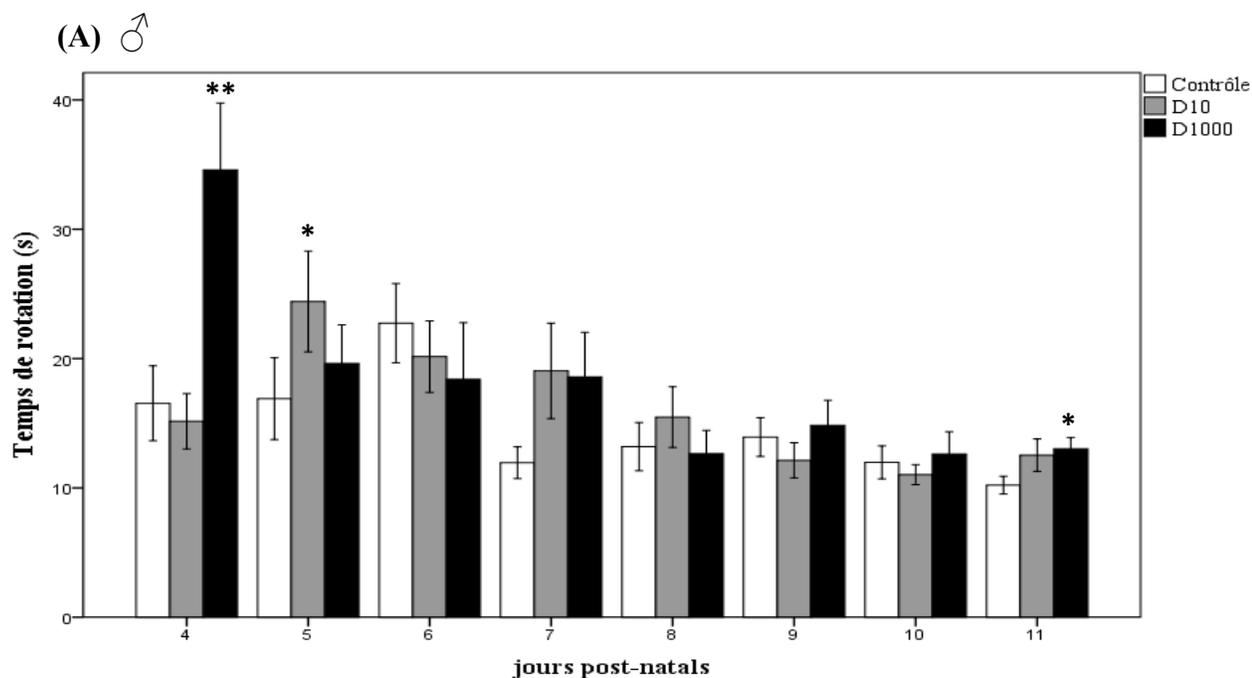
### Génération F2

Génération F2 issue de deux parents F1 exposés, via leurs mères F0, aux PCB-NDL<sub>i</sub> durant la période périnatale (Figures 13A et 13B)

ANOVA à mesures répétées a montré un effet significatif de l'exposition précoce de deux parents F1 aux PCB-NDL<sub>i</sub> [ $F(2, 266) = 10,69, p < 0,001$ ], de l'âge des souriceaux F2 [ $F(7, 261) =$

18,31,  $p < 0,001$ ], ainsi de l'interaction entre ces deux facteurs [exposition  $\times$  âge :  $F(14, 245) = 4,47$ ,  $p < 0,001$ ] sur le temps de rotation des souriceaux F2.

Le test de Fisher a montré une augmentation significative de temps de rotation, à JPN 4, chez les souriceaux mâles et femelles D1000 de la génération F2, issus de deux parents F1 exposés durant la période périnatale, via leurs mères F0, à la dose 1000 ng/kg de PCB-NDL<sub>i</sub> ( $p < 0,01$  et  $p < 0,001$  respectivement). Cette augmentation a réapparu à JPN 11 ( $p < 0,05$ ) (Figures 4A et 4B). Concernant les mâles et les femelles D10 de la génération F2, issus de deux parents exposés durant la période périnatale, via leurs mères F0, à la dose 10 ng/kg de PCB-NDL<sub>i</sub>, ces animaux ont mis significativement plus de temps pour effectuer une rotation 180° par rapport aux témoins à JPN 5 ( $p \leq 0,05$  et  $p < 0,01$  respectivement) (Figures 4A et 4B). Cependant, uniquement les femelles D10 et D1000 ont montré respectivement aux JPN 4 et 5 une augmentation significative de temps de rotation par rapport aux souriceaux témoins ( $p < 0,05$ ) (Figure 13B).



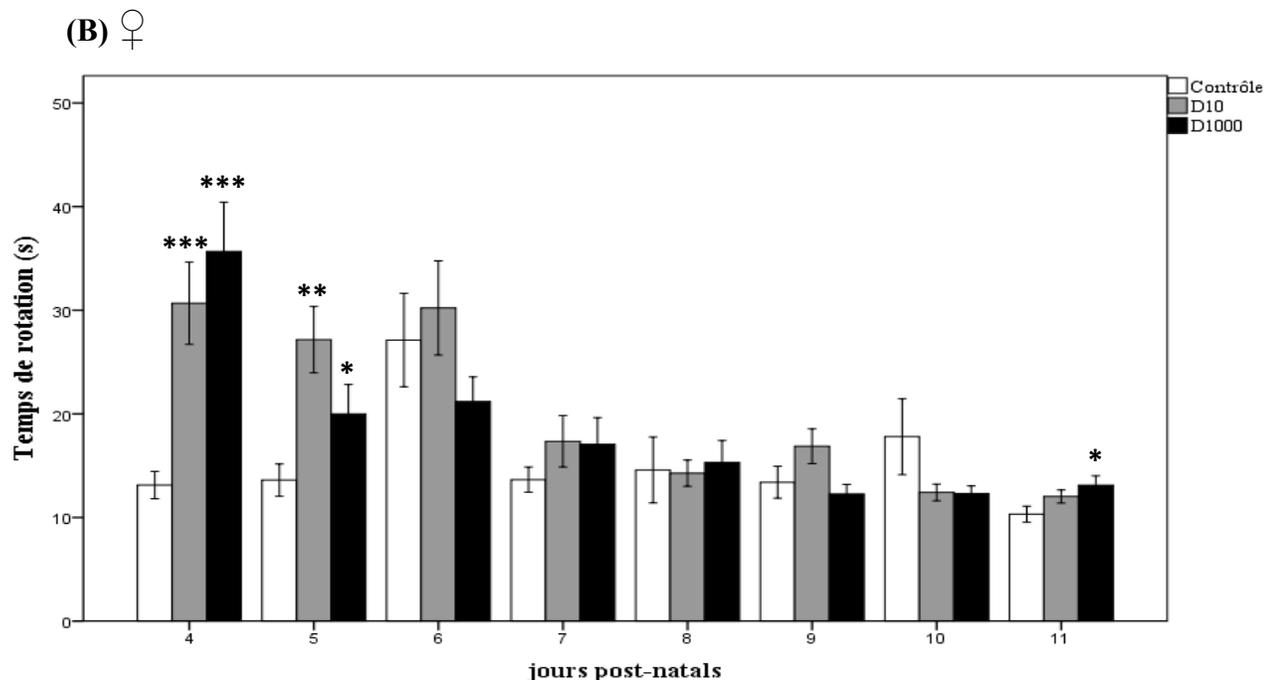


Figure 13 : Le réflexe de rotation (en sec) des souriceaux mâles (A) et femelles (B) D10 et D1000 de la génération F2 issus de deux parents F1 exposés durant la période périnatale, via leurs mères F0, aux doses 10 et 1000 de PCB-NDL<sub>i</sub> ng/kg, respectivement, comparé à celui des souriceaux témoins dans le test de la géotaxie négative ( $n = 49-50/\text{sexe}/\text{groupe}$ ). Les résultats sont reportés en moyennes  $\pm$  ESM. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  et \*\*\* $p < 0,001$  : différences significatives par rapport aux témoins.

Génération F2 issue uniquement des pères F1 exposés, via leurs mères F0, aux PCB-NDL<sub>i</sub> durant la période périnatale (Figures 14A et 14B)

Dans le test de la géotaxie négative, un effet significatif de l'exposition périnatale des pères F1, via leurs mères F0, aux PCB-NDL<sub>i</sub> [ $F(2, 274) = 4,21, p < 0,05$ ], de l'âge des souriceaux F2 [ $F(7, 269) = 12,48, p < 0,001$ ], ainsi de l'interaction entre les facteurs étudiés [ $F(14, 253) = 3,54, p < 0,001$ ] a été trouvé sur le temps de rotation des souriceaux F2.

Les analyses a posteriori ont montré une augmentation significative de temps de rotation à JPN 4 chez les souriceaux mâles P1000 de la génération F2, issus uniquement des pères F1 exposés durant la période périnatale, via leurs mères F0, à la dose 1000 ng/kg de PCB-NDL<sub>i</sub> par rapport aux témoins ( $p < 0,05$ ) (Figure 14A). Cependant, cette augmentation a été observée à JPN 4 chez les souriceaux femelles P10 et P1000, issus uniquement des pères F1 exposés aux doses 10 et 1000

ng/kg de PCB-NDL<sub>i</sub>, respectivement ( $p \leq 0,05$  et  $p < 0,001$  respectivement). A JPN 11, cet effet est réapparu chez les femelles P1000 ( $p < 0,05$ ) (Figure 14B).

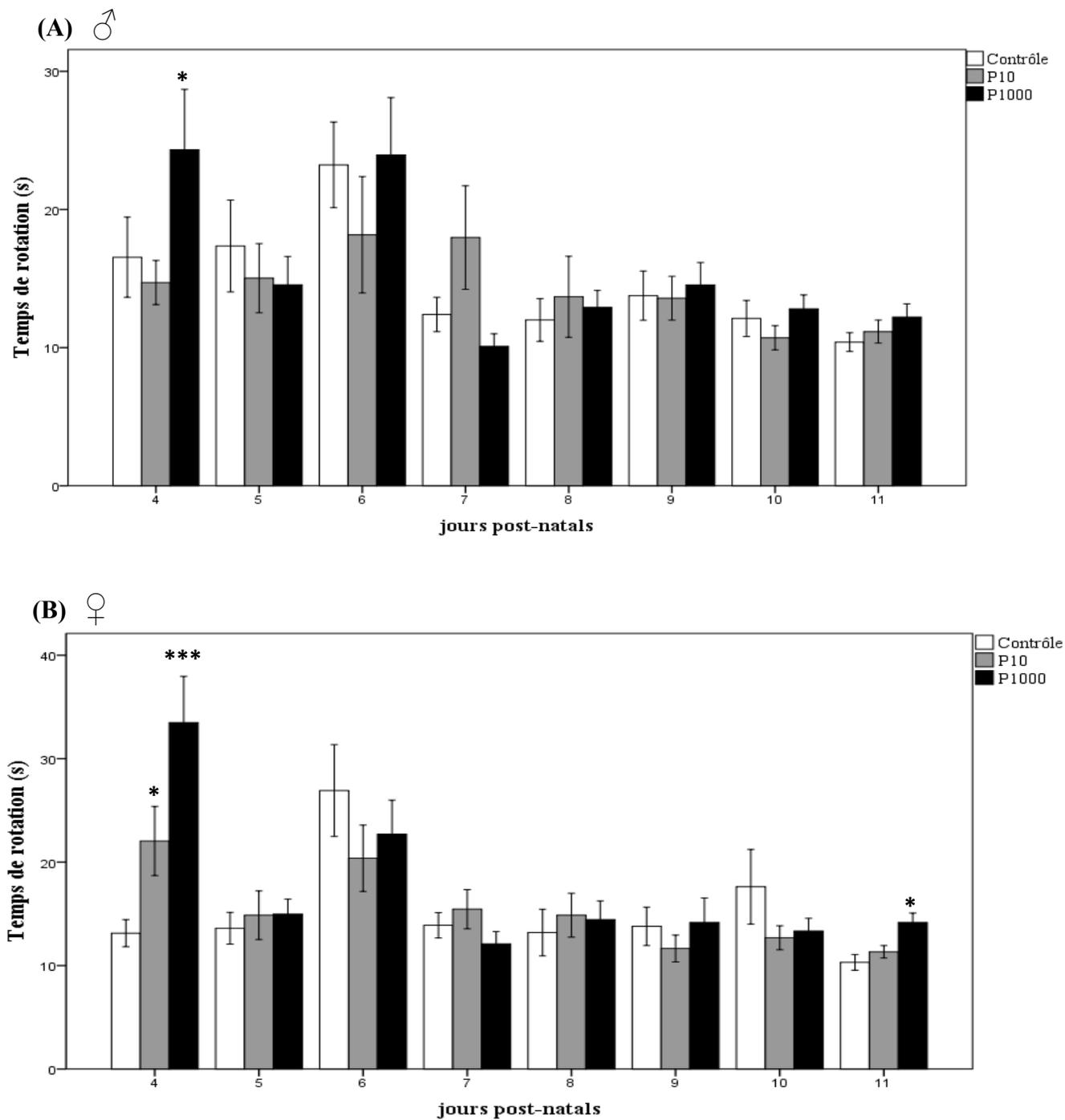


Figure 14 : Le réflexe de rotation (en sec) des souriceaux mâles (A) et femelles (B) P10 et P1000 de la génération F2, issus uniquement des pères F1 exposés durant la période périnatale, via leurs mères F0, aux doses 10 et 1000 ng/kg de PCB-NDL<sub>i</sub>, respectivement, comparé à celui des souriceaux témoins dans le test de la géotaxie négative ( $n = 46-50/\text{sexe}/\text{groupe}$ ). Les résultats sont reportés en moyennes  $\pm$  ESM. \* $p < 0,05$  et \*\*\* $p < 0,001$ : différences significatives par rapport aux témoins.

Génération F2 issue uniquement des mères exposées, via leurs mères F0, aux PCB-NDL<sub>i</sub> durant la période périnatale (Figures 15A et 15B)

Les analyses de la variance (ANOVA) à des mesures répétées ont démontré un effet significatif de l'âge des souriceaux F2 [ $F(7, 240) = 11,41, p < 0,001$ ] ainsi une interaction entre ce facteur et l'exposition périnatale des mères F1, via leurs mères F0, aux PCB-NDL<sub>i</sub> [exposition  $\times$  âge :  $F(14, 224) = 5,03, p < 0,001$ ] sur le temps de rotation des souriceaux F2. Cette différence significative est indépendante du sexe des souriceaux F2 et de l'exposition périnatale des mères F1 aux PCB [sexe :  $F(1, 246) = 3,43, p > 0,05$  ; exposition:  $F(2, 245) = 2,78, p > 0,05$ ].

Les analyses a posteriori ont montré une augmentation significative de temps de rotation à JPN 5 chez les souriceaux mâles M10 de la génération F2, issus uniquement des mères F1 exposées durant la période périnatale, via leurs mères F0, à la dose 10 ng/kg de PCB-NDL<sub>i</sub> par rapport aux témoins ( $p < 0,01$ ) (Figure 15A). Par ailleurs, à JPN 4, les femelles M10 et M1000 F2, issues des mères F1 exposées durant la période périnatale, via leurs mères F0, aux doses 10 et 1000 ng/kg de PCB-NDL<sub>i</sub>, respectivement, ont mis plus de temps pour effectuer une rotation complète par rapport aux souriceaux témoins ( $p < 0,01$  et  $p < 0,05$  respectivement). Cette augmentation a continué à JPN 5 chez les souriceaux femelles M10 ( $p < 0,001$ ), alors qu'elle a réapparu à JPN 11 chez les souriceaux femelles M1000 ( $p < 0,01$ ) (Figure 15B).

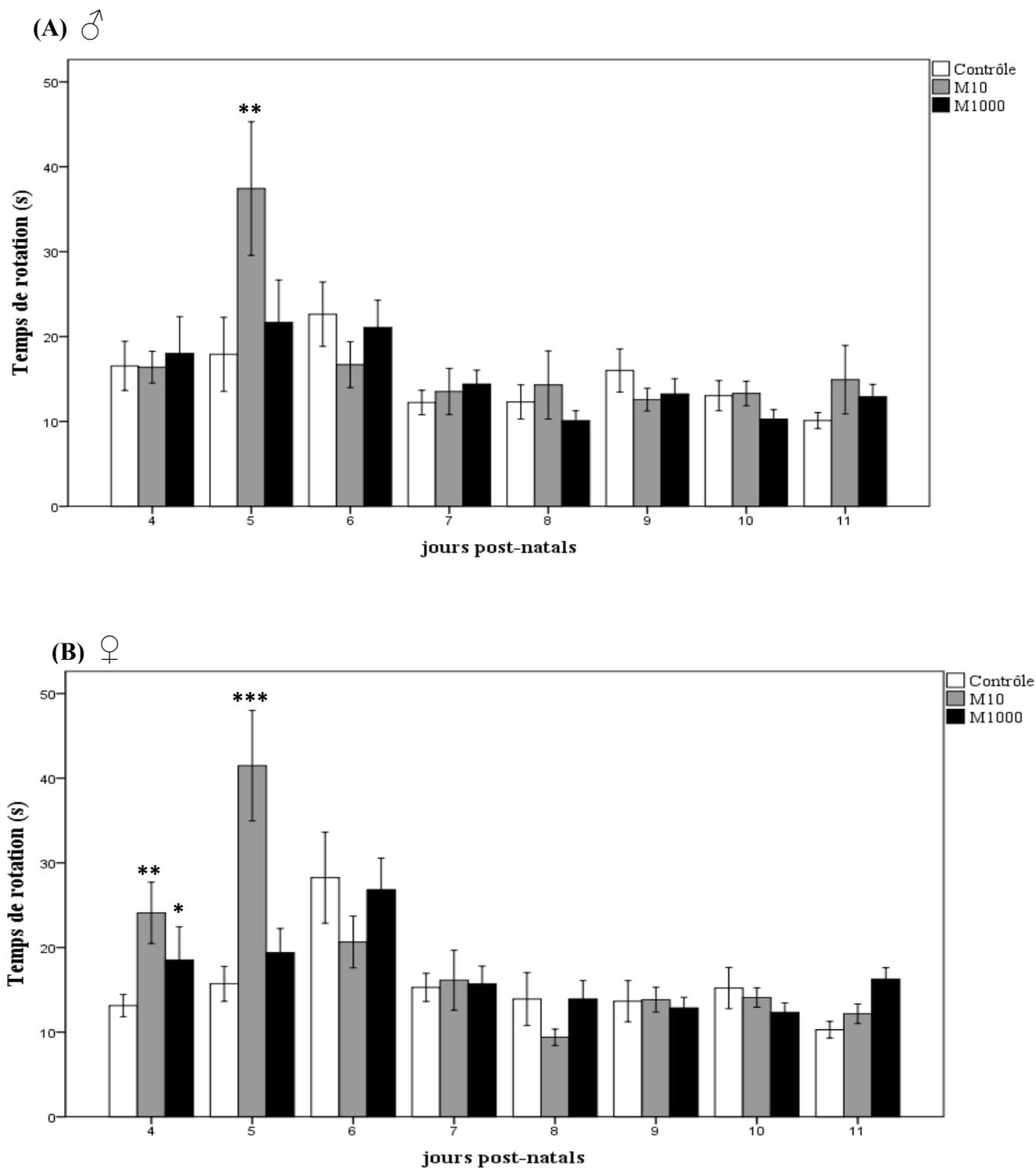


Figure 15 : Le réflexe de rotation (en sec) des souriceaux mâles (A) et femelles (B) M10 et M1000 de la génération F2, issus uniquement des mères F1 exposées durant la période périnatale, via leurs mères F0,

aux doses 10 et 1000 ng/kg de PCB-NDL<sub>i</sub>, respectivement, comparé à celui des souriceaux témoins dans le test de la géotaxie négative ( $n = 30-50/\text{sexe}/\text{groupe}$ ). Les résultats sont reportés en moyennes  $\pm$  ESM. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  et \*\*\* $p < 0,001$  : différences significatives par rapport aux témoins.

## Conclusion

Les résultats du test de la géotaxie négative réalisé de JPN 4 à JPN 11 sur les souriceaux F1 et F2 ont montré :

- Qu'il n'y ait aucune modification significative du temps de rotation chez les souriceaux mâles et femelles de la génération F1 exposés, via leurs mères F0, aux doses 10 et 1000 ng/kg de PCB-NDL<sub>i</sub> durant la période périnatale par rapport aux témoins.

- Une augmentation significative mais transitoire, de temps de rotation a été constatée chez tous les souriceaux mâles et femelles de la génération F2 suite à l'exposition de l'un ou des deux parents F1, via leurs mères F0, aux doses 10 et 1000 ng/kg de PCB-NDL<sub>i</sub> durant la période périnatale. Cette modification du temps de rotation est la preuve d'un impact de l'exposition précoce aux PCB sur le développement des mécanismes neurobiologiques du positionnement dans l'espace chez la génération F2.

- L'altération du temps de rotation chez les souriceaux F2 malgré l'absence d'effet chez leurs parents F1 pourrait être expliquée par des altérations au niveau des cellules germinales mâles et femelles des souris F1 suite à leur exposition, via leurs mères F0, aux doses 10 et 1000 ng/kg de PCB-NDL<sub>i</sub> durant la période périnatale.

## II. Effet multigénérationnel de l'exposition des souris mères F0 aux PCB-NDL<sub>i</sub> sur la coordination locomotrice des souris juvéniles des deux générations F1 et F2

### Génération F1 (Figure 16)

L'ANOVA à deux facteurs réalisée sur les données obtenues dans le test de *Rotarod* a montré une différence significative de l'exposition précoce des souris juvéniles F1 aux PCB-NDL<sub>i</sub> [ $F(2, 57) = 5,65, p < 0,01$ ] sur le temps de latence du deuxième essai de la phase d'entraînement.

Aucun effet significatif n'a été trouvé sur les temps de latence du premier [ $F(2, 57) = 2,28, p > 0,05$ ] et du troisième [ $F(2, 57) = 2,80, p > 0,05$ ] essai de la phase d'entraînement ainsi sur le temps de latence de la phase de test après l'entraînement [ $F(2, 57) = 1,34, p > 0,05$ ]. Une différence significative du sexe a été trouvée sur le temps de latence du deuxième essai de la phase d'entraînement [ $F(1, 58) = 5,15, p < 0,05$ ] et celui de la phase de test après l'entraînement [ $F(1,58) = 6,69, p < 0,05$ ]. Par contre, les temps de latence du premier [ $F(1, 58) = 3,13, p > 0,05$ ] et du troisième [ $F(1, 58) = 2,87, p > 0,05$ ] essai de la phase d'entraînement ont été sexe indépendants. Aucune interaction n'a été observée entre l'exposition périnatale des souris F1, via leurs mères F0, aux PCB-NDL<sub>i</sub> et leur sexe sur les temps de latence de deux phases (tous  $p > 0,05$ ).

Les analyses a posteriori ont montré une diminution significative de temps de latence du deuxième essai de la phase d'entraînement chez les souris femelles F1 exposées durant la période périnatale, via leurs mères F0, à la dose 10 ng/kg de PCB-NDL<sub>i</sub> ( $p < 0,05$ ) par rapport aux souristémoin, alors qu'une tendance de diminution de cette variable a été trouvée chez les mâles ( $p = 0,08$ ) (Figure 16).

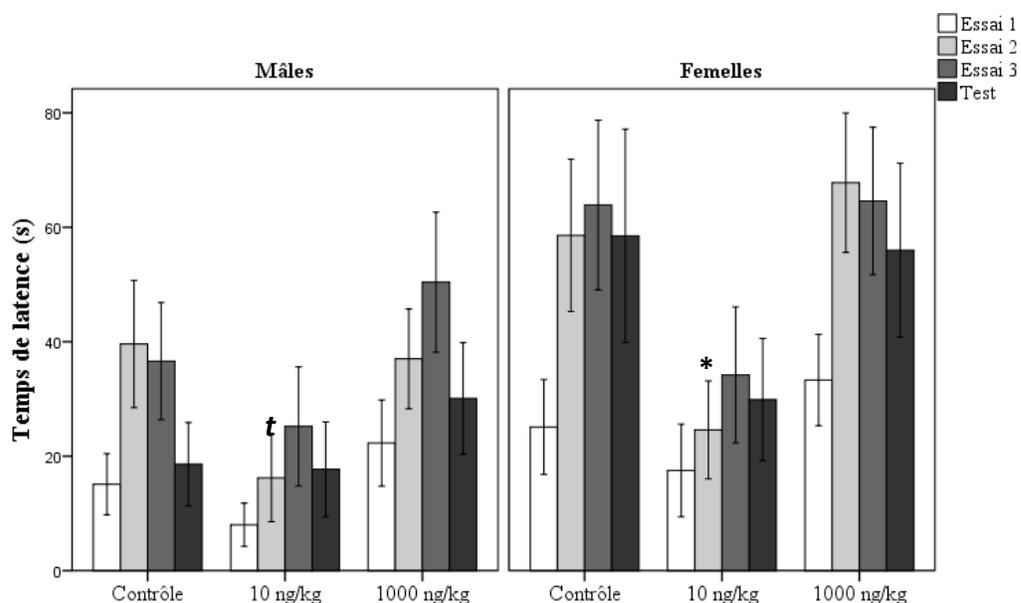


Figure 16: Les temps de latence (s) des souris mâles et femelles juvéniles (JPN 28 et 35) exposées durant la période périnatale, via leurs mères F0, aux doses 10 et 1000 ng/kg de PCB-NDL<sub>i</sub> comparé à ceux des souris juvéniles témoins dans le test de Rotarod ( $n = 10/\text{sexe}/\text{groupe}$ ). Les données sont reportées en moyennes  $\pm$

ESM.  $t$  = une tendance à une différence significative. \* $p < 0,05$ : différence significative par rapport aux témoins.

## Génération F2

Génération F2 issue de deux parents F1 exposés, via leurs mères F0, aux PCB-NDL<sub>i</sub> durant la période périnatale (Tableau 15)

ANOVA à deux facteurs n'a montré aucun effet significatif des facteurs étudiés à savoir l'exposition périnatale des parents F1, via leurs mères F0, aux PCB-NDL<sub>i</sub>, le sexe des souris F2, ni l'interaction entre ces deux facteurs sur les temps de latence de la phase d'entraînement et celui de la phase de test après l'entraînement chez les souris F2 ( $p > 0,05$ ) (Tableau 15).

Tableau 15 : Les temps de latence (s) des souris mâles et femelles juvéniles D10 et D1000 de la génération F2 (JPN 28 et 35), issues de deux parents F1 exposés durant la période périnatale, via leurs mères F0, aux doses 10 et 1000 ng/kg de PCB-NDL<sub>i</sub>, respectivement, comparé à ceux des souris juvéniles témoins dans le test de Rotarod ( $n = 10$ /sexe/groupe).

Groupe	Sexe	Temps de latence (s)			
		Essai 1	Essai 2	Essai 3	Test
Témoins	Mâles	21,00 +/- 5,086	48,70 +/- 10,31	71,60 +/- 10,89	35,7 +/- 7,79
	Femelles	27,7000 +/- 6,91	51,90 +/- 8,2	62,80 +/- 13,51	39,50 +/- 11,27
	Total	24,35 +/- 4,24	50,30 +/- 6,43	67,20 +/- 8,50	37,60 +/- 6,73
D10	Mâles	14,00 +/- 2,72	26,70 +/- 6,89	28,40 +/- 9,70	27,30 +/- 7,41
	Femelles	24,30 +/- 7,13	47,30 +/- 8,06	61,10 +/- 6,55	56,90 +/- 14,98
	Total	19,15 +/- 3,90	37,00 +/- 5,67	44,75 +/- 6,82	42,10 +/- 8,81
D1000	Mâles	22,80 +/- 5,54	37,20 +/- 9,02	56,80 +/- 12,04	23,30 +/- 8,58
	Femelles	20,50 +/- 3,07	59,20 +/- 14,19	73,50 +/- 14,06	34,20 +/- 12,92

Total	21,65 +/- 3,09	48,20 +/- 8,56	65,15 +/- 9,21	28,75 +/- 7,65
Mâles	19,26 +/- 2,66	37,53 +/- 5,20	52,26 +/- 6,93	28,76 +/- 4,56
<b>Total</b> Femelles	24,16 +/- 3,39	52,80 +/- 5,95	65,80 +/- 6,69	43,53 +/- 7,54
Total	21,71 +/- 2,162	45,16 +/- 4,04	59,03 +/- 4,86	36,15 +/- 4,47

Génération F2 issue uniquement des pères F1 exposés, via leurs mères F0, aux PCB-NDL<sub>i</sub> durant la période périnatale (Figure 17)

ANOVA à deux facteurs a révélé une différence significative uniquement de l'interaction entre l'exposition périnatale des pères F1, via leurs mères F0, aux PCB-NDL<sub>i</sub> et le sexe des souris F2 sur le temps de latence du premier essai de la phase d'entraînement chez les souris de la génération F2 [exposition × sexe :  $F(2, 54) = 3,79, p < 0,05$ ].

Les analyses a posteriori ont montré une augmentation significative de temps de latence du premier essai de la phase d'entraînement uniquement chez les souris mâles P10 de la génération F2, issues uniquement des pères F1 exposés durant la période périnatale, via leurs mères F0, à la dose 10 ng/kg de PCB-NDL<sub>i</sub>, par rapport aux souris témoins ( $p \leq 0,05$ ) (Figure 17).

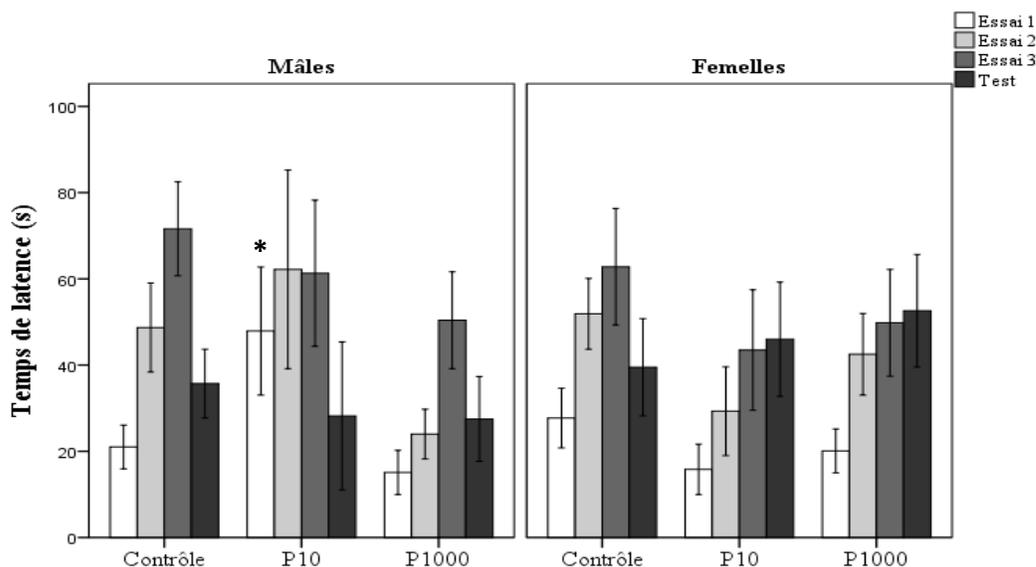
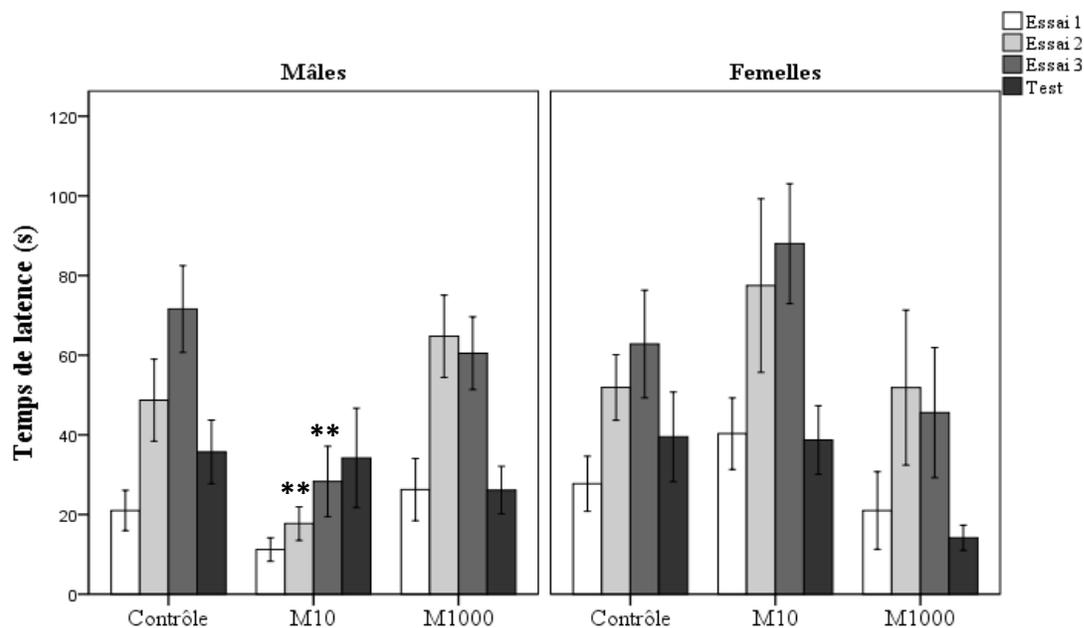


Figure 17 : Les temps de latence (s) des souris mâles et femelles juvéniles P10 et P1000 de la génération F2 (JPN 28 et 35), issues uniquement des pères F1 exposés pendant la période périnatale, via leurs mères F0, aux doses 10 et 1000 ng/kg de PCB-NDL<sub>i</sub>, respectivement, comparé à ceux des souris juvéniles témoins dans le test de Rotarod (n = 10/sexe/groupe). Les données sont reportées en moyennes ± ESM. \*p ≤ 0,05: différence significative par rapport aux témoins.

Génération F2 issue uniquement des mères exposées, via leurs mères F0, aux PCB-NDL<sub>i</sub> durant la période périnatale (Figure 18)

L'analyse des résultats à l'aide d'ANOVA à deux facteurs a montré une différence significative uniquement de l'interaction entre l'exposition périnatale des mères F1, via leurs mères F0, aux PCB-NDL<sub>i</sub> et le sexe des souris F2 sur les temps de latence du deuxième [F(2,49) = 4,00, p < 0,05] et du troisième essai [F(2,49) = 5,62, p < 0,01] de la phase d'entraînement dans le test de Rotarod.

Comparé aux souris témoins, les analyses à posteriori ont révélé une diminution significative des temps de latence durant le deuxième et le troisième essai de la phase d'entraînement uniquement chez les souris mâles M10 de la génération F2, issues uniquement des mères F1 exposées, via leurs mères F0, durant la période périnatale à la dose 10 ng/kg de PCB-NDL<sub>i</sub> (Figure 18).



*Figure 18 : Les temps de latence (s) des souris mâles et femelles juvéniles M10 et M1000 de la génération F2 (JPN 28 et 35), issues uniquement des mères F1 exposées pendant la période périnatale, via leurs mères F0, aux doses 10 et 1000 ng/kg de PCB-NDL<sub>i</sub>, respectivement, comparé à ceux des souris juvéniles témoins dans le test de Rotarod (n = 7-10/sexe/groupe). Les données sont reportées en moyennes ± ESM. \*p < 0,05 et \*\*p < 0,01: différences significatives par rapport aux témoins.*

## Conclusion

L'exposition des souris mères gestantes et allaitantes de la génération F0 à la dose 10 ng/kg de PCB-NDL<sub>i</sub> a induit une altération multigénérationnelle transitoire de la coordination locomotrice des souris juvéniles F1 et F2.

Chez la génération F1, uniquement les souris femelles exposées durant la période périnatale, via leurs mères F0, à la dose 10 ng/kg de PCB-NDL<sub>i</sub> ont montré une altération transitoire de la coordination locomotrice. Cependant, chez la génération F2, cette altération transitoire a été observée chez les souris mâles, issues des mères F1 ou bien des pères F1, exposés pendant la période périnatale, via leurs mères F0, à la dose 10 ng/kg de PCB-NDL<sub>i</sub>.

Donc l'altération transitoire de la coordination locomotrice chez les deux générations F1 et F2 est sexe dépendante. Elle ne toucherait que les femelles de la génération F1 et que les mâles de la génération F2. Par conséquent, l'altération transitoire de la coordination locomotrice est transmise uniquement des mères F1 exposées à la dose 10 ng/kg de PCB-NDL<sub>i</sub> à leurs descendants mâles (M10). On parle alors d'une transmission d'origine maternelle. Par contre, l'altération transitoire de la coordination locomotrice chez les souris P10 de la génération F2 malgré l'absence d'effet chez leurs pères F1 pourrait être expliquée par des altérations au niveau des cellules germinales des souris mâles F1 suite à leur exposition, via leurs mères F0, à la dose 10 ng/kg de PCB-NDL<sub>i</sub> durant la période périnatale.

L'absence d'effet chez les souris D10 de la génération F2, issues de deux parents F1 exposés à la dose 10 ng/kg de PCB-NDL<sub>i</sub> pourrait être expliquée par l'effet d'addition des deux effets opposés causés par les pères F1 (amélioration transitoire de la coordination locomotrice des souris mâles F2) et par les mères F1 (altération transitoire de la coordination locomotrice des souris mâles F2) sur leurs descendants.

### III. Effet multigénérationnel de l'exposition des souris mères F0 aux PCB-NDL<sub>i</sub> sur l'activité locomotrice des souris péri-adolescentes de deux générations F1 et F2

#### Génération F1 (Tableau 16)

Dans le test de l'échappement à l'eau, l'analyse des résultats à l'aide d'ANOVA à deux facteurs a révélé que l'exposition précoce des souris F1 aux PCB-NDL<sub>i</sub>, leur sexe ainsi que l'interaction entre ces deux facteurs n'a aucun effet significatif sur le temps (s) de la nage, le temps d'escalade et le temps de rétablissement sur la plate-forme ainsi sur le nombre de chutes chez les souris péri-adolescentes de la génération F1 (tous  $p > 0,05$ ) (Tableau 16).

Tableau 16 : Le temps de la nage, le temps d'escalade et le temps de rétablissement ainsi le nombre de chutes en fonction du sexe des souris péri-adolescentes F1 et des doses d'exposition maternelle (F0) (0-10-1000 ng/kg) dans le test du WESPOC ( $n = 10$ / sexe/groupe).

Groupe	Sexe	Temps de la nage (s)	Temps d'escalade (s)	Temps de rétablissement (s)	Nombre de chutes
Témoins	Mâles	30,10 +/- 17,95	6,60 +/- 1,24	5,20 +/- 1,19	0,10 +/- 0,10
	Femelles	44,70 +/- 24,78	5,60 +/- 1,28	4,80 +/- 1,20	0,10 +/- 0,10
	Total	37,40 +/- 14,98	6,10 +/- 0,87	5,00 +/- 0,82	0,10 +/- 0,06
10 ng/kg	Mâles	57,20 +/- 17,72	11,90 +/- 5,01	6,50 +/- 2,36	0,00 +/- 0,00
	Femelles	35,70 +/- 6,47	7,60 +/- 1,57	6,90 +/- 2,02	0,10 +/- 0,10
	Total	46,45 +/- 9,51	9,75 +/- 2,60	6,70 +/- 1,51	0,05 +/- 0,05
1000 ng/kg	Mâles	51,10 +/- 16,09	7,40 +/- 1,90	6,20 +/- 1,94	0,00 +/- 0,00
	Femelles	18,20 +/- 4,55	9,00 +/- 3,76	8,30 +/- 1,66	0,20 +/- 0,20
	Total	34,65 +/- 8,97	8,20 +/- 2,06	7,25 +/- 1,26	0,10 +/- 0,10

	Mâles	46,13 +/- 9,86	8,63 +/- 1,82	5,97 +/- 1,06	0,03 +/- 0,03
<b>Total</b>	Femelles	32,87 +/- 8,61	7,40 +/- 1,40	6,67 +/- 0,964	0,13 +/- 0,07
	Total	39,50 +/- 6,54	8,02 +/- 1,14	6,32 +/- 0,71	0,08 +/- 0,04

### Génération F2 (Tableau 17)

L'analyse statistique des résultats du test de WESPOC, à l'aide d'ANOVA à deux facteurs, n'a montré aucun effet significatif de l'exposition précoce de l'un ou des deux parents F1 aux PCB-NDL<sub>i</sub>, le sexe des souris F2 ainsi l'interaction entre les facteurs étudiés sur les temps (s) de nage, d'escalade et de rétablissement sur la plate-forme ainsi sur le nombre de chutes chez tous les animaux périadolescents de la génération F2 (tous  $p > 0,05$ ) (Tableau 17).

*Tableau 17 : Le temps de la nage, le temps d'escalade et le temps de rétablissement ainsi le nombre de chutes des souris mâles et femelles péri-adolescentes de la génération F2, issues des mères, des pères ou de deux parents F1 exposés durant la période périnatale, via leurs mères F0, aux doses 10 et 1000 ng/kg de PCB-NDL<sub>i</sub> dans le test du WESPOC (n = 10/ sexe/groupe).*

Groupe	Sexe	Temps de la nage (s)	Temps d'escalade (s)	Temps de rétablissement (s)	Nombre des chutes
<b>Témoins</b>	Mâles	14,10 +/- 4,78	6,30 +/- 1,00	8,80 +/- 3,80	0,70 +/- 0,39
	Femelles	15,7 +/- 3,02	7,10 +/- 1,21	8,0 +/- 3,33	0,50 +/- 0,167
	Total	14,90 +/- 2,76	6,70 +/- 0,77	8,40 +/- 2,46	0,60 +/- 0,21
<b>D10</b>	Mâles	22,50 +/- 6,48	6,60 +/- 1,24	8,40 +/- 3,64	0,80 +/- 0,41
	Femelles	10,10 +/- 2,85	7,50 +/- 1,75	5,80 +/- 2,02	0,30 +/- 0,21
	Total	16,30 +/- 3,72	7,05 +/- 1,05	7,10 +/- 2,04	0,55 +/- 0,23

<b>P10</b>	Mâles	25,90 +/- 8,28	11,50 +/- 4,07	5,10 +/- 1,12	1,60 +/- 0,60
	Femelles	23,10 +/- 5,54	9,10 +/- 2,12	4,30 +/- 0,70	1,20 +/- 0,69
	Total	24,50 +/- 4,86	10,30 +/- 2,25	4,70 +/- 0,64	1,40 +/- 0,45
<b>M10</b>	Mâles	17,90 +/- 3,80	6,60 +/- 1,69	6,00 +/- 1,43	1,00 +/- 0,42
	Femelles	12,50 +/- 4,83	6,50 +/- 1,61	4,20 +/- 0,61	0,60 +/- 0,30
	Total	15,20 +/- 3,05	6,55 +/- 1,13	5,10 +/- 0,78	0,80 +/- 0,25
<b>D1000</b>	Mâles	37,70 +/- 14,02	10,50 +/- 4,98	5,60 +/- 0,74	0,60 +/- 0,22
	Femelles	21,20 +/- 7,49	5,20 +/- 1,14	7,50 +/- 1,74	0,30 +/- 0,21
	Total	29,45 +/- 7,96	7,85 +/- 2,56	6,55 +/- 0,95	0,45 +/- 0,15
<b>P1000</b>	Mâles	13,50 +/- 5,54	7,30 +/- 2,08	6,70 +/- 2,25	0,20 +/- 0,20
	Femelles	21,90 +/- 7,00	8,50 +/- 2,48	6,70 +/- 1,61	0,90 +/- 0,58
	Total	17,70 +/- 4,45	7,90 +/- 1,58	6,70 +/- 1,35	0,55 +/- 0,31
<b>M1000</b>	Mâles	14,86 +/- 7,66	3,14 +/- 0,26	3,57 +/- 0,81	0,14 +/- 0,14
	Femelles	23,00 +/- 5,86	7,14 +/- 1,53	6,14 +/- 2,37	0,86 +/- 0,55
	Total	18,93 +/- 4,76	5,14 +/- 0,93	4,86 +/- 1,25	0,50 +/- 0,29
<b>Total</b>	Mâles	21,19 +/- 3,03	7,61 +/- 1,06	6,43 +/- 0,81	0,75 +/- 0,15
	Femelles	18,00 +/- 2,07	7,30 +/- 0,65	6,09 +/- 0,72	0,66 +/- 0,16
	Total	19,60 +/- 1,83	7,46 +/- 0,62	6,26 +/- 0,57	0,70 +/- 0,11

## Conclusion

L'exposition des souris mères F0, au cours de la période gestationnelle et lactationnelle, à des faibles doses environnementales de PCB-NDL<sub>i</sub> n'a induit aucune modification multigénérationnelle au niveau de l'activité locomotrice chez les souris péri-adolescentes de générations F1 et F2.

## IV. Effet multigénérationnel de l'exposition des souris mères F0 aux PCB-NDL<sub>i</sub> sur le comportement d'agressivité des souris mâles adultes des deux générations F1 et F2

### Génération F1 (Figure 19)

Dans le test de résident/intrus, ANOVA a montré qu'il n'y a aucun effet significatif de l'exposition périnatale des souris mâles F1, via leurs mères F0, aux PCB-NDL<sub>i</sub> sur le temps de latence de la première attaque [ $F(2,57) = 0,90, p > 0,05$ ] et le nombre d'attaques [ $F(2,57) = 1,16, p > 0,05$ ] effectuées par les souris mâles F1 résidentes contre les souris intruses de même sexe (Figure 19).

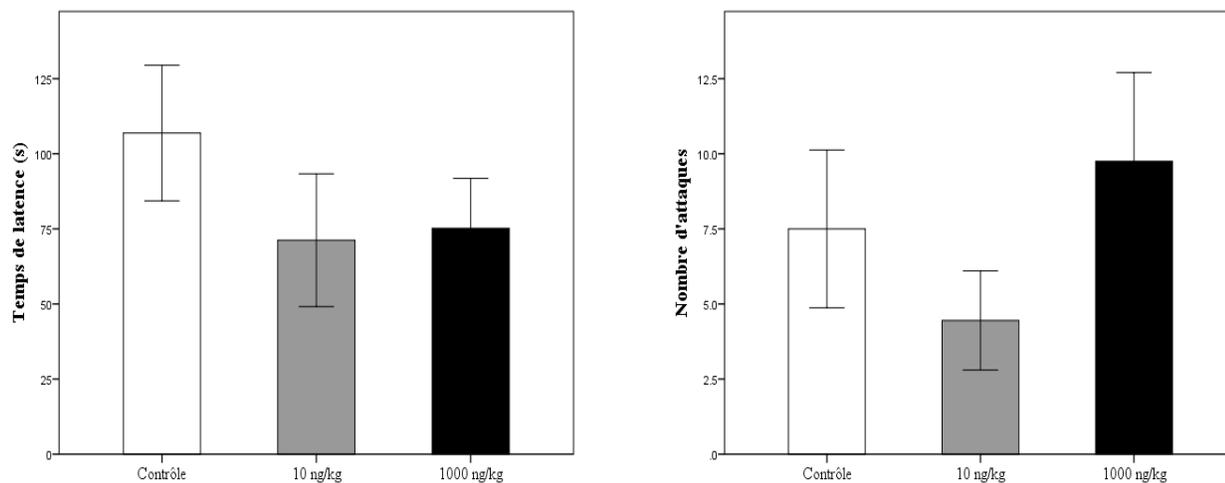


Figure 19 : Le temps de latence (s) de la première attaque et le nombre d'attaques effectuées par les souris mâles de la génération F1 résidentes, exposées pendant la période périnatale, via leurs mères F0, aux doses 10 et 1000 ng/kg de PCB-NDL<sub>i</sub>, contre les souris mâles intruse par rapport aux témoins ( $n = 10/\text{groupe}$ ). Les données sont reportées en moyennes  $\pm$  ESM.

## Génération F2

Génération F2 issue de deux parents exposés, via leurs mères F0, aux PCB-NDL<sub>i</sub> durant la période périnatale (Figure 20)

Le test d'ANOVA n'a montré aucun effet significatif de l'exposition précoce des parents F1 aux PCB-NDL<sub>i</sub> sur le comportement d'agressivité des souris mâles F2 résidentes contre les souris mâles intruses, en évaluant le temps de latence (s) de la première attaque [ $F(2, 27) = 2,35, p > 0,05$ ] et le nombre d'attaques [ $F(2, 27) = 0,77, p > 0,05$ ] effectuées par les souris F2 résidentes (Figure 20).

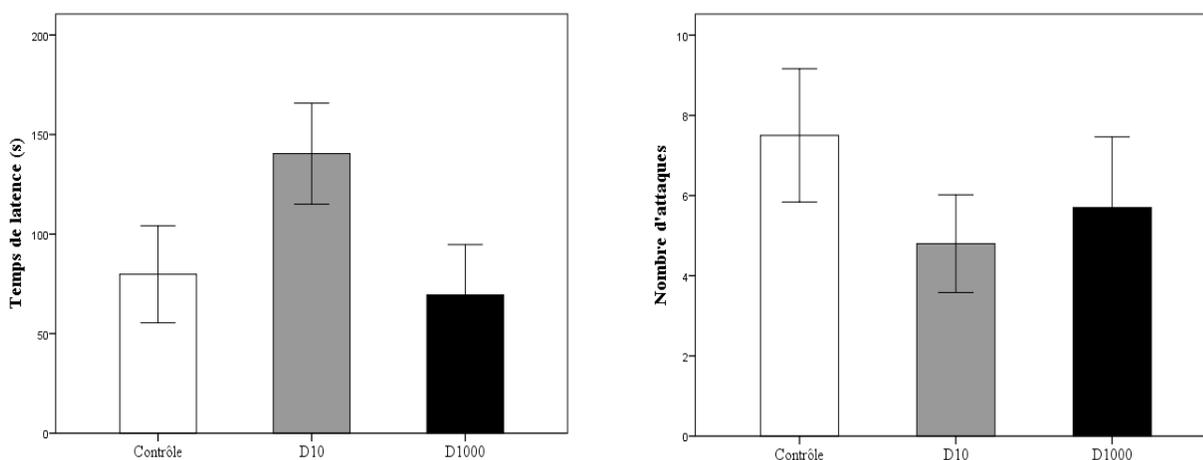


Figure 20 : Le temps de latence (s) de la première attaque et le nombre d'attaques effectuées par les souris mâles D10 et D1000 de la génération F2 résidentes, issues de deux parents F1 exposés pendant la période périnatale, via leurs mères F0, aux doses 10 et 1000 ng/kg de PCB-NDL<sub>i</sub>, respectivement, contre les souris mâles intruses ( $n = 10/\text{groupe}$ ). Les données sont reportées en moyennes  $\pm$  ESM.

Génération F2 issue uniquement des pères F1 exposés, via leurs mères F0, aux PCB-NDL<sub>i</sub> durant la période périnatale (Figure 21)

ANOVA n'a révélé aucun effet significatif de l'exposition périnatale des pères F1, via leurs mères F0, aux PCB-NDL<sub>i</sub>, sur le temps de latence (s) de la première attaque [ $F(2,27) = 0,50, p >$

0,05] et le nombre d'attaques [ $F(2, 27) = 0,46, p > 0,05$ ] effectuées par les souris mâles de la génération F2 résidentes contre les souris mâles intruses (Figure 21).

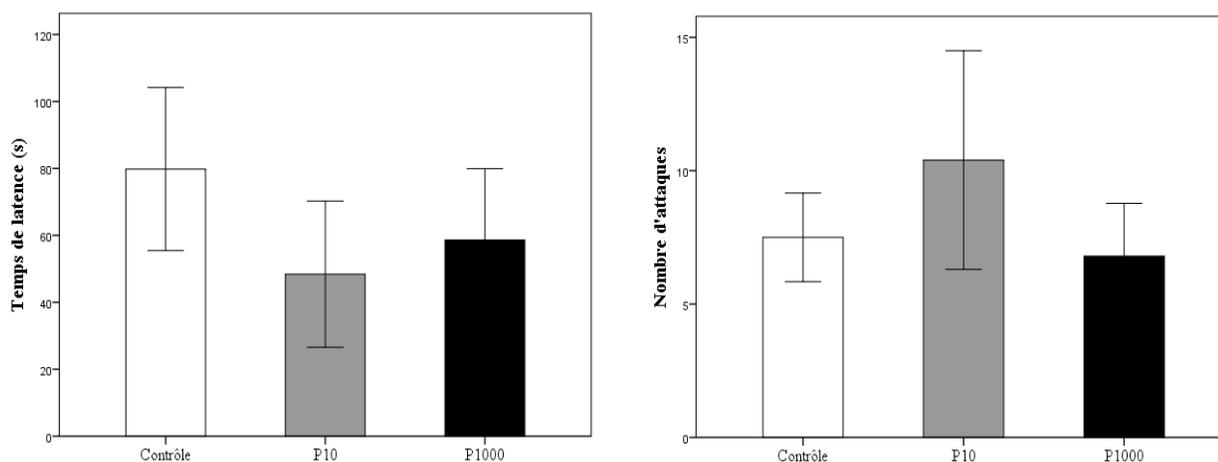


Figure 21 : Le temps de latence (s) de la première attaque et le nombre d'attaques effectuées par les souris mâles P10 et P1000 de la génération F2 résidentes, issues uniquement des pères F1 exposés pendant la période périnatale, via leurs mères F0, aux doses 10 et 1000 ng/kg de PCB-NDL<sub>i</sub>, respectivement, contre les souris mâles intruses ( $n = 10/\text{groupe}$ ). Les données sont reportées en moyennes  $\pm$  ESM.

Génération F2 issue uniquement des mères F1 exposées, via leurs mères F0, aux PCB-NDL<sub>i</sub> durant la période périnatale (Figure 22)

ANOVA n'a signalé aucune différence significative de l'exposition périnatale des souris mères F1, via leurs mères F0, aux PCB-NDL<sub>i</sub> sur le comportement d'agressivité des souris F2 résidentes, manifesté par le temps de latence (s) de la première attaque [ $F(2, 24) = 0,21, p > 0,05$ ] et le nombre d'attaques [ $F(2, 24) = 1,86, p > 0,05$ ] effectués par ces animaux contre les souris mâles intruses (Figure 22).

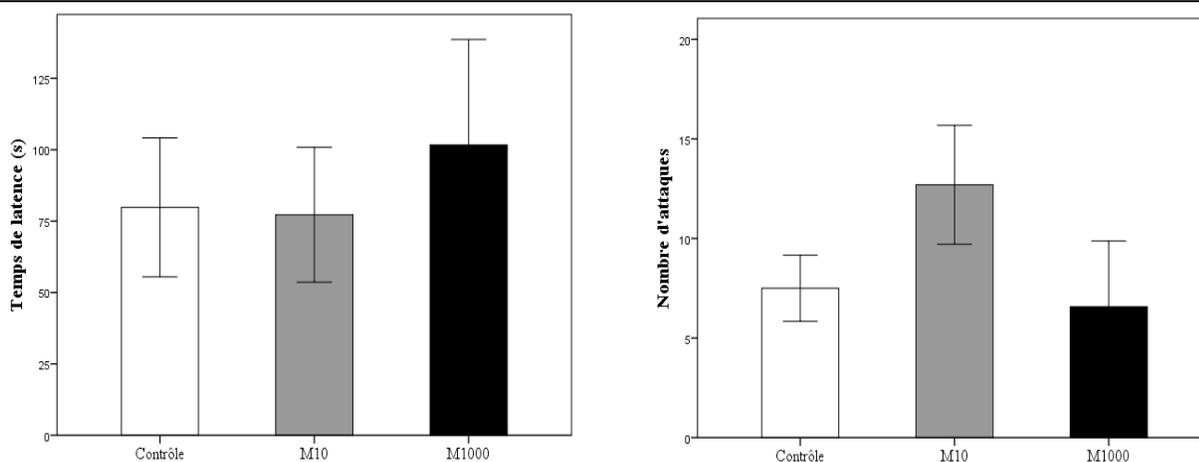


Figure 22 : Le temps de latence (s) de la première attaque et le nombre d'attaques effectuées par les souris mâles M10 et M100 de la génération F2 résidentes, issues uniquement des mères F1 exposées pendant la période périnatale, via leurs mères F0, aux doses 10 et 1000 ng/kg de PCB-NDL<sub>i</sub>, respectivement, contre les souris mâles intruses (n = 7-10/groupe). Les données sont reportées en moyennes ± ESM.

## Conclusion

L'exposition des souris mères F0, au cours de la période gestationnelle et lactationnelle, à des faibles doses environnementales de PCB-NDL<sub>i</sub> telles que 10 et 1000 ng/kg n'a pas induit un comportement agressif multigénérationnel chez les souris mâles adultes de deux générations F1 et F2.

## V. Effet multigénérationnel de l'exposition des souris mères F0 aux PCB-NDL<sub>i</sub> sur le niveau de l'anxiété des souris péri-adolescentes et d'âge moyen de deux générations F1 et F2

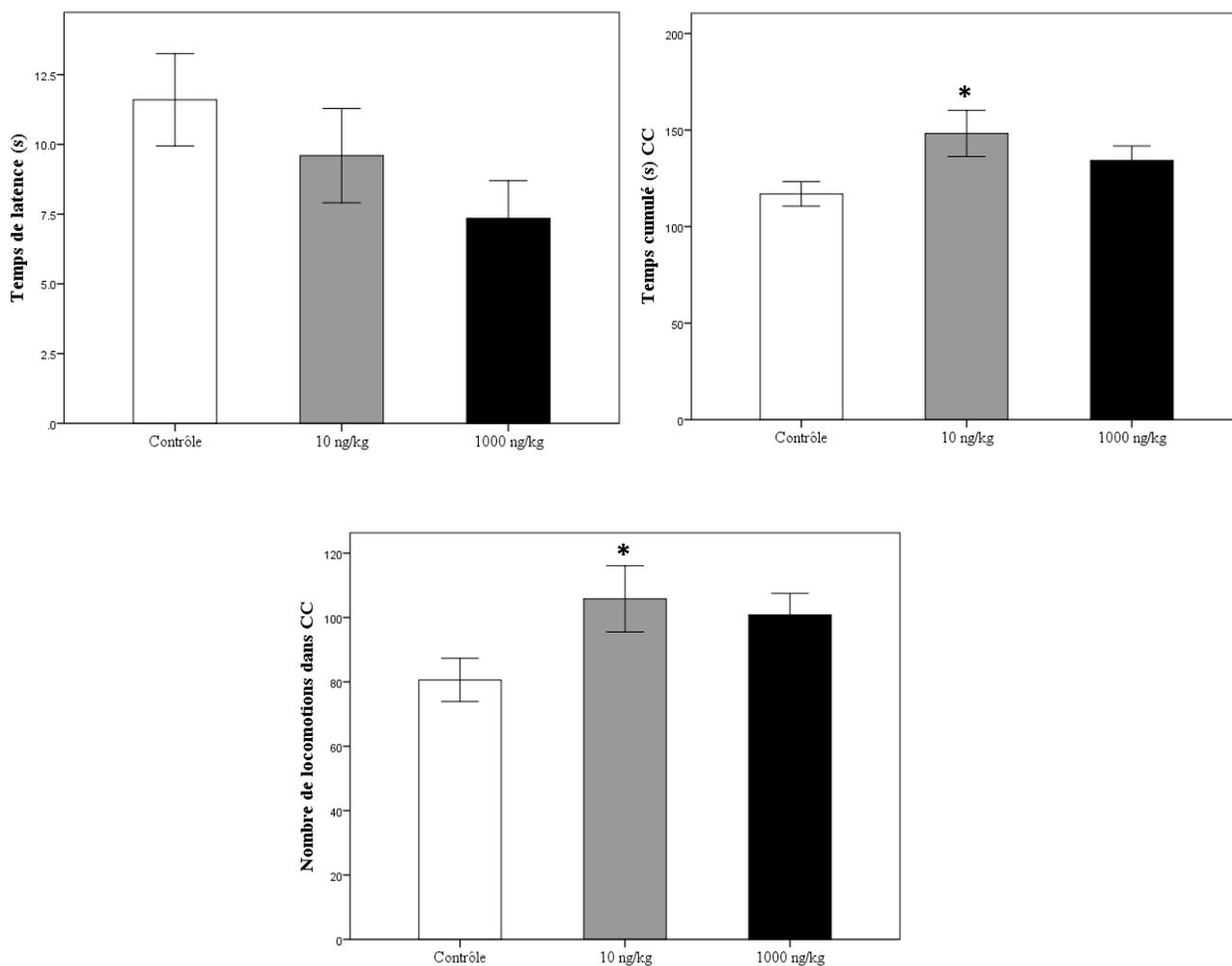
### Génération F1

#### Test de chambre claire-obscur (CCO) à la périadolescence (Figure 23)

Les résultats statistiques du test CCO analysés à l'aide d'ANOVA à deux facteurs ont montré que l'exposition périnatale des souris F1, via leurs mères F0, aux PCB-NDL<sub>i</sub> a induit des

effets significatifs sur le temps cumulé dans la chambre claire [ $F(2, 57) = 4,85, p < 0,05$ ] et le nombre de locomotions dans cette chambre [ $F(2, 57) = 4,32, p < 0,05$ ] chez les souris péri-adolescentes F1. En outre, des effets significatifs du sexe ont été signalés sur le temps cumulé dans la chambre claire [ $F(1, 58) = 15,36, p < 0,001$ ] et le nombre de locomotions dans cette chambre [ $F(1, 58) = 4,96, p < 0,001$ ]. Par contre, aucune différence significative n'a été trouvée de l'exposition périnatale des souris F1, via leurs mères F0, aux PCB-NDL<sub>i</sub> [ $F(2, 57) = 0,10, p > 0,05$ ] et de l'interaction entre les facteurs étudiés [exposition  $\times$  sexe :  $F(2, 54) = 0,17, p > 0,05$ ] sur l'activité générale des souris F1 représentée par la locomotion effectuée dans la chambre obscure.

Comparé aux témoins, les analyses a posteriori ont montré une augmentation significative uniquement chez les souris mâles F1 exposés, durant la période périnatale, via leurs mères F0, à la dose 10 ng/kg de PCB-NDL<sub>i</sub>, aussi bien au niveau du temps passé dans la chambre claire que du nombre de la locomotion dans cette chambre ( $p < 0,05$ ) (Figure 23).



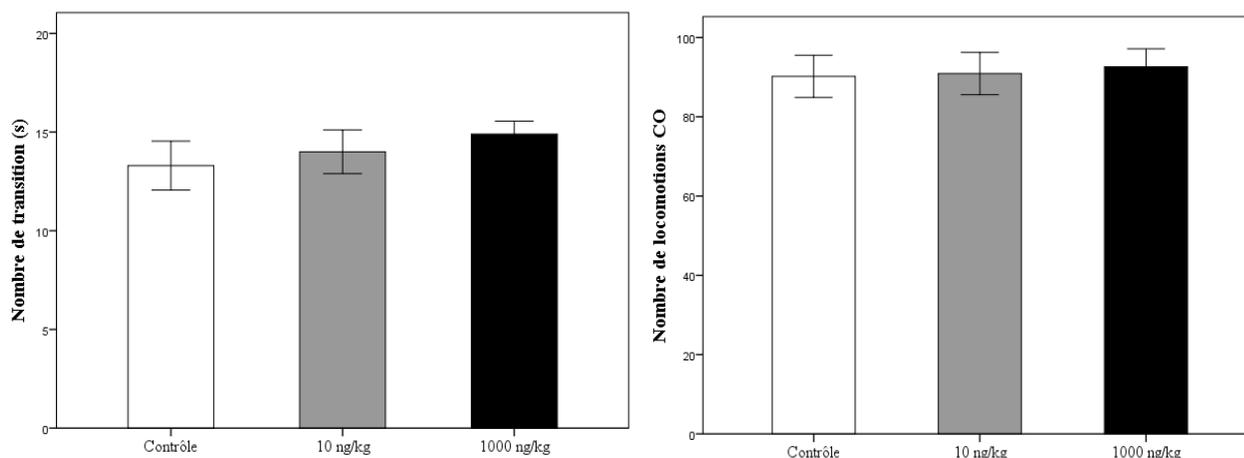


Figure 23 : Le temps de latence, le temps cumulé dans la chambre claire (CC) (s), le nombre de locomotion dans la CC, le nombre de transition et le nombre de locomotions dans la chambre obscure (CO) mesurés dans le test de chambre claire-obscur chez les souris mâles péri-adolescentes F1, exposées durant la période périnatale, via leurs mères F0, aux doses 10 et 1000 ng/kg de PCB-NDL<sub>i</sub> (n = 10/groupe). Les données sont reportées en moyennes ± ESM. \* $p < 0,05$  : différence significative par rapport aux témoins.

### Test labyrinthe en croix surélevé (LCS) à l'âge moyen (Figure 24)

Les résultats du test du LCS, réalisé chez les souris d'âge moyen de la génération F1, ont été analysés à l'aide de deux tests statistiques différents : Le test non paramétrique *Kruskal-wallis* pour les données qui n'étaient pas normalement distribuées tels que le temps de latence, le pourcentage de temps passé dans les bras ouverts et le pourcentage de nombre d'entrées aux bras ouverts, alors que le test ANOVA à deux facteurs a été utilisé pour analyser les données normalement distribuées telles que le nombre d'entrées aux bras fermés.

A l'âge moyen, uniquement les souris mâles F1 exposées à la dose 10 ng/kg de PCB-NDL<sub>i</sub> ont montré des effets significatifs par rapport aux souris témoins. Ces animaux ont pris significativement moins de temps pour entrer la première fois aux bras ouverts ( $H = 6,64$ ,  $p < 0,05$ ) (Figure 14A) et ils ont passé significativement moins de temps dans les bras ouverts ( $H = 5,98$ ,  $p < 0,05$ ) (Figure 14B). De même, ils ont effectué significativement moins de passages dans les bras

ouverts ( $H = 6,71$ ,  $p < 0,05$ ) (Figure 24C) par rapport aux souris témoins. Par ailleurs, aucune différence significative au niveau de l'exposition périnatale des souris F1, via leurs mères F0, aux PCB-NDL<sub>i</sub> [ $F(2, 57) = 0,87$ ,  $p > 0,05$ ] ainsi qu'au niveau de l'interaction entre l'exposition et le sexe des souris F1 [ $F(2, 54) = 0,33$ ,  $p > 0,05$ ] n'a été montrée sur le nombre de passages dans les bras fermés chez les souris F1 d'âge moyen (Figure 24D).

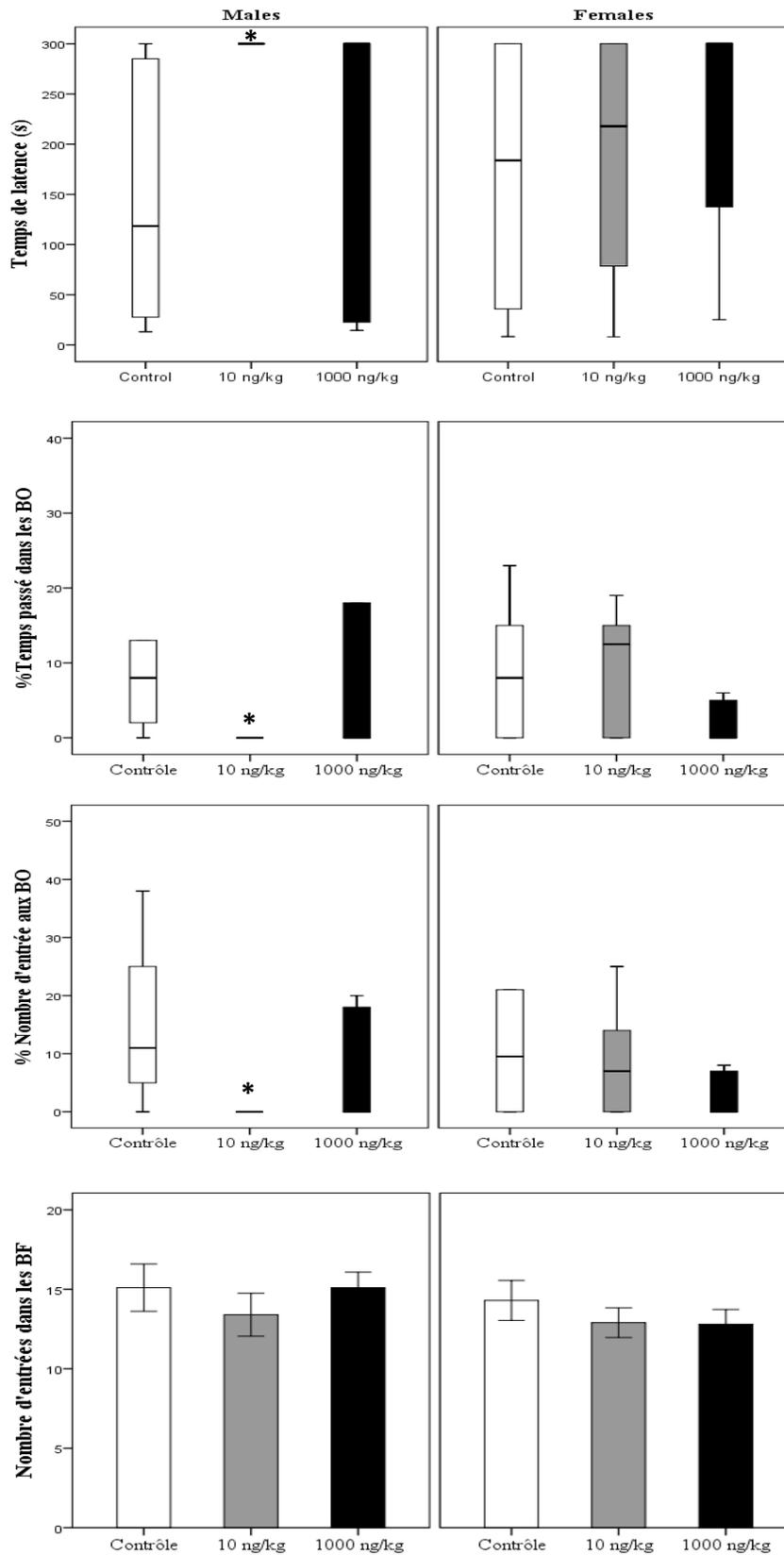


Figure 24: Le temps de latence (s) (A), le pourcentage de temps passé dans les bras ouverts (BO) (B), le pourcentage d'entrées aux BO (C) et le nombre d'entrées aux BF (D) mesurés dans le test de labyrinthe en croix surélevé chez les souris d'âge moyen F1 exposées durant la période périnatale, via leurs mères F0, aux doses 10 et 1000 ng/kg de PCB-NDL<sub>i</sub> (n = 10/sexe/groupe). Les données sont reportées en moyennes ± ESM. \*p < 0,05 : différence significative par rapport aux témoins.

### **Test de l'Open field (OF) à l'âge moyen**

Les données issues du test de l'OF, analysées à l'aide d'ANOVA à deux facteurs, n'ont montré aucun effet significatif ni de l'exposition précoce des souris F1 aux PCB-NDL<sub>i</sub>, ni de celui de leur sexe, ni de celui de l'interaction entre les facteurs étudiés sur les temps passés dans la zone centrale [exposition : F(2, 56) = 1,58, p > 0,05 ; sexe : F(1, 57) = 0,13, p > 0,05 ; exposition × sexe : F(2, 53) = 1,26, p > 0,05], la zone médiane [exposition : F(2, 56) = 1,49, p > 0,05 ; sexe : F(1, 57) = 0,00, p > 0,05 ; exposition × sexe : F(2, 53) = 0,40, p > 0,05] et la zone périphérique [exposition : F(2, 56) = 0,96, p > 0,05 ; sexe : F(1, 57) = 1,54, p > 0,05 ; exposition × sexe : F(2, 53) = 0,89, p > 0,05] de l'OF.

## **Génération F2**

### **Test du labyrinthe en croix surélevé à l'âge moyen**

Génération F2 issue de deux parents F1 exposés, via leurs mères F0, aux PCB-NDL<sub>i</sub> durant la période périnatale (Figure 25)

Les résultats du test du labyrinthe en croix surélevé, analysés à l'aide d'ANOVA à deux facteurs, ont montré des différences significatives de l'interaction entre le sexe des souris F2 et l'exposition périnatale de leurs parents F1, via leurs mères F0, aux PCB-NDL<sub>i</sub> sur le temps de latence [F (2, 47) = 3,09, p ≤ 0,05], le pourcentage de temps passé dans les BO [F (2, 47) = 4,35, p < 0,05] et le pourcentage de nombre d'entrées aux BO [F (2, 47) = 5,01, p < 0,05] chez les souris d'âge moyen F2. Ces résultats ne dépendaient ni du sexe des souris F2 ni de l'exposition précoces de leurs parents F1 aux PCB-NDL<sub>i</sub> (p > 0,05).

Les analyses a posteriori ont montré qu'uniquement les souris mâles D10 de la génération F2, issues des parents F1 exposés durant la période périnatale, via leurs mères F0, à la dose 10 ng/kg de PCB-NDL<sub>i</sub>, ont pris significativement moins de temps pour entrer la première fois aux bras ouverts ( $p < 0,05$ ) (Figure 25A) et ils ont passé significativement moins de temps dans les bras ouverts ( $p < 0,05$ ) par rapport aux souris témoins (Figure 25B). En plus, une tendance de diminution de pourcentage de nombre d'entrées a été observée aux BO chez ces souris ( $t = 0,06$ ) (Figure 25C).

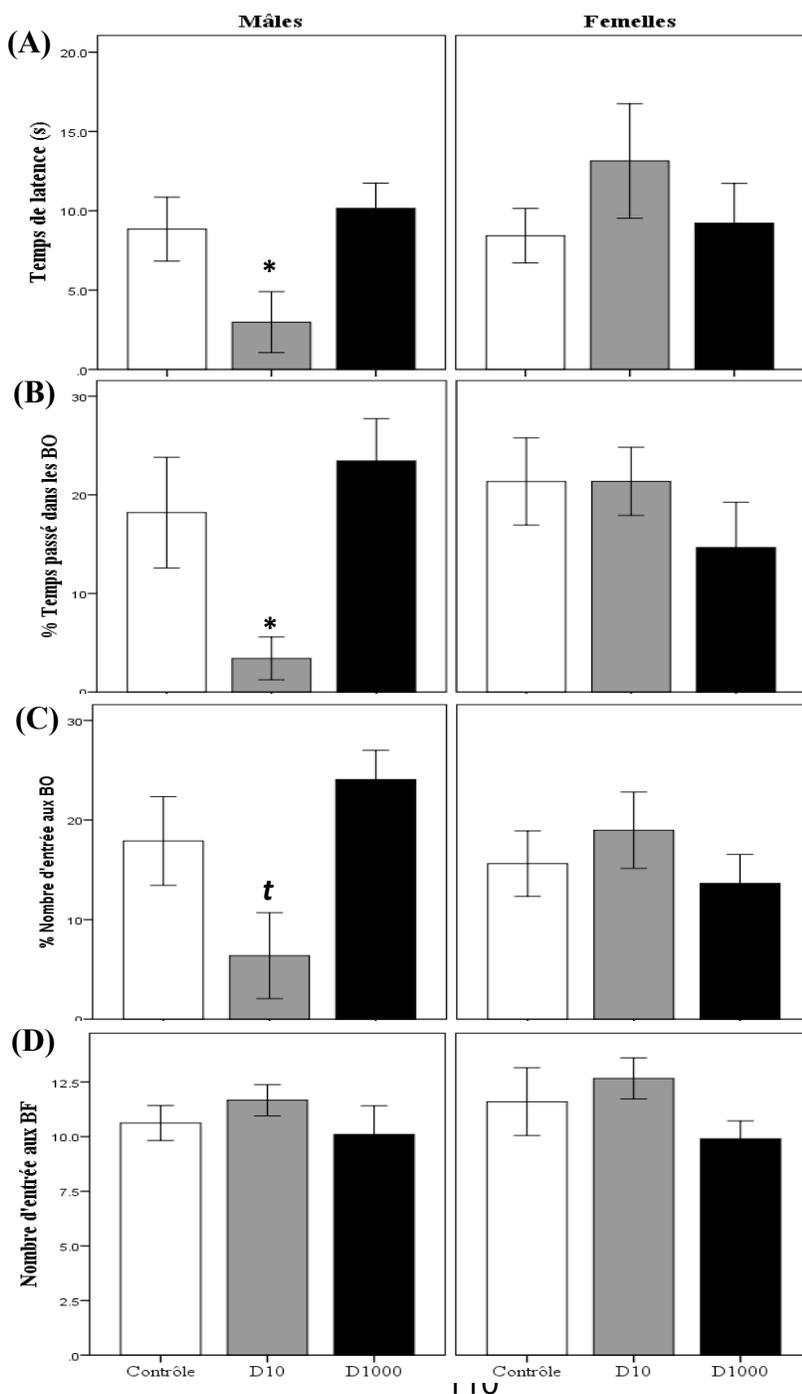


Figure 25 : Le temps de latence (s) (A), le pourcentage de temps passé dans les bras ouverts (BO) (B), le pourcentage d'entrées aux BO (C) et le nombre d'entrées aux BF (D) mesurés dans le test du labyrinthe en croix surélevé chez les souris D10 et D1000 d'âge moyen de la génération F2, issues de deux parents F1 exposés durant la période périnatale, via leurs mères F0, aux doses 10 et 1000 ng/kg de PCB-NDL<sub>i</sub> (n = 7-10/sexe/groupe). Les données sont reportées en moyennes ± ESM. \*p < 0,05 : différence significative par rapport aux témoins.

#### Génération F2 issue uniquement des pères F1 exposés, via leurs mères F0, aux PCB-NDL<sub>i</sub> durant la période périnatale

ANOVA à deux facteurs a montré un effet significatif du sexe des souris F2 sur le pourcentage d'entrées aux BO [F(1, 49) = 7,25, p < 0,05)]. Cependant, aucune différence significative de l'exposition périnatale des pères F1, via leurs mères F0, aux PCB-NDL<sub>i</sub>, ni celui de l'interaction entre le sexe des souris F2 et l'exposition de leurs pères F1 aux PCB n'a été trouvée sur tous les paramètres étudiés pour évaluer le niveau d'anxiété chez les souris d'âge moyen F2 (tous p > 0,05).

#### Génération F2 issue uniquement des mères F1 exposées, via leurs mères F0, aux PCB-NDL<sub>i</sub> durant la période périnatale

L'analyse statistique des résultats du test du LCS, à l'aide d'ANOVA à deux facteurs, n'a révélé aucun effet significatif de l'exposition périnatale des mères F1, via leurs mères F0, aux PCB-NDL, ni celui du sexe des souris F2, ni celui de l'interaction entre ces deux facteurs sur tous les paramètres étudiés pour évaluer le niveau d'anxiété chez les souris d'âge moyen F2 (tous p > 0,05).

#### **Test de l'Open field (OF) à l'âge moyen**

Le traitement statistique des données des souris d'âge moyen F2, à l'aide d'ANOVA à deux facteurs, a révélé que l'exposition périnatale de l'un ou des deux parents de la génération F1, via leurs mères F0, aux PCB-NDL<sub>i</sub>, le sexe des souris F2 ainsi que l'interaction entre ces deux facteurs n'ont pas eu d'impact sur les temps passés dans la zone centrale, la zone médiane et la zone périphérique du test de l'OF chez tous les groupes expérimentaux de la génération F2 (tous p > 0,05).

## Conclusion

L'exposition des mères F0, au cours de la période gestationnelle et lactationnelle, à la dose 10 ng/kg de PCB-NDL<sub>i</sub> a induit des modifications significatives et sexe dépendantes au niveau de l'état de l'anxiété qui ont affecté les souris mâles péri-adolescentes et d'âge moyen de la génération F1 et les souris mâles d'âge moyen de la génération F2.

Un effet de baisse de l'état d'anxiété (*anxiolytique-like*) a été relevé chez les souris mâles péri-adolescentes de la génération F1 exposées durant la période périnatale, via leurs mères F0, à la dose 10 ng/kg de PCB-NDL<sub>i</sub>. Cependant, à l'âge moyen, ces souris ont montré un effet opposé, donc se traduisant par une augmentation de leur niveau d'anxiété, une inversion de l'effet. En effet, la dose 10 ng/kg de PCB-NDL<sub>i</sub> a induit un effet *anxiolytique-like* chez les souris mâles péri-adolescentes F1 puis un effet anxiogène chez ces souris à l'âge moyen. Chez la génération F2, uniquement les souris mâles D10 d'âge moyen ont montré une augmentation significative du niveau de l'anxiété. Donc, l'effet anxiogène des PCB a été transmissible des souris pères F1 exposées durant la période périnatale, via leurs mères F0, à la dose 10 ng/kg de PCB-NDL<sub>i</sub> aux mâles de la génération F2. Il s'agit donc d'une transmission d'origine paternelle.

Par ailleurs, l'activité générale des souris péri-adolescentes et d'âge moyen de la génération F1 ainsi des souris F2 à l'âge moyen n'a pas été altérée suite à l'exposition des mères F0 aux PCB-NDL<sub>i</sub> en évaluant le nombre de transition dans le test de CCO et le nombre d'entrée aux bras fermés dans le test du LCS.

## VI. Effet multigénérationnel de l'exposition des souris mères F0 aux PCB-NDL<sub>i</sub> sur le comportement de résignation des souris jeunes adultes et d'âge moyen de deux générations F1 et F2

### Génération F1 (Figure 26)

Dans le test de la suspension caudale, les analyses de la variance (ANOVA) à trois facteurs ont montré que l'exposition précoce des souris F1 aux PCB-NDL<sub>i</sub> [ $F(2,111) = 3,37, p < 0,05$ ] et leur âge [ $F(1,112) = 13,92, p < 0,001$ ] ont eu un effet significatif sur le temps d'immobilité des souris F1, qui est l'indicateur du comportement de résignation chez les souris testés. Cependant,

aucun effet significatif du sexe [ $F(1,112) = 2,32, p > 0,05$ ] ou de l'interaction entre les facteurs étudiés n'a été trouvé [exposition  $\times$  sexe :  $F(2,108) = 0,40, p > 0,05$  ; exposition  $\times$  âge :  $F(2,108) = 0,74, p > 0,05$  ; exposition  $\times$  sexe  $\times$  âge :  $F(2,102) = 0,36, p > 0,05$ ].

Le test Fisher a montré que les souris mâles à l'âge jeune adulte exposées pendant la période périnatale, via leurs mères F0, à la dose 1000 ng/kg de PCB-NDL<sub>i</sub> ont eu un temps d'immobilité significativement plus long par rapport à celui des souris mâles témoins ( $p \leq 0,05$ ) (Figure 26). Aucun effet significatif n'a été trouvé ni chez les souris mâles jeunes adultes exposées à la dose 10 ng/kg de PCB-NDL<sub>i</sub>, ni chez les femelles jeunes adultes et les souris, mâles et femelles, à l'âge moyen exposées aux deux doses de PCB-NDL<sub>i</sub> ( $p > 0,05$ ).

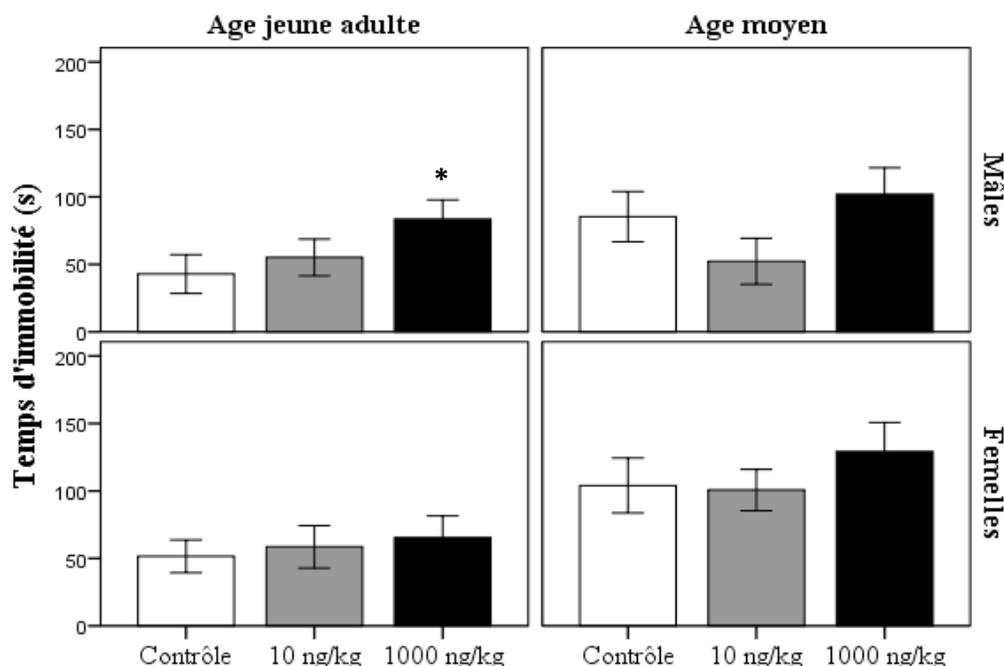


Figure 26 : Le temps d'immobilité (s) des souris mâles et femelles de la génération F1, aux âges jeune adulte et moyen, exposées durant la période périnatale, via leurs mères F0, aux doses 10 et 1000 ng/kg de PCB-NDL<sub>i</sub> comparé à celui des souris témoins dans le test de la suspension caudale ( $n = 8-10/\text{sexe}/\text{groupe}$ ). Les données sont reportées en moyennes  $\pm$  ESM. \* $p \leq 0,05$  : différence significative par rapport aux témoins.

## Génération F2

Génération F2 issue de deux parents F1 exposés, via leurs mères F0, aux PCB-NDL<sub>i</sub> durant la période périnatale (Figure 27)

ANOVA à trois facteurs a montré des effets significatifs de l'exposition périnatale des parents F1, via leurs mères F0, aux PCB-NDL<sub>i</sub> [ $F(2,98) = 5,97, p < 0.01$ ], de l'âge des souris F2 [ $F(1,98) = 23,78, p < 0.001$ ] ainsi de leurs sexes [ $F(1,98) = 6,99, p < 0.05$ ] sur le temps d'immobilité des souris F2. Aucun effet significatif de l'interaction entre les facteurs étudiés n'a été trouvé [exposition  $\times$  sexe :  $F(2, 98) = 0,44, p > 0,05$  ; exposition  $\times$  âge :  $F(2, 98) = 0,58, p > 0,05$  ; exposition  $\times$  sexe  $\times$  âge :  $F(2, 98) = 0,23, p > 0,05$ ].

Les analyses à posteriori ont révélé que les souris mâles jeunes adultes D1000 de la génération F2, issues de deux parents F1 exposés durant la période périnatale, via leurs mères F0, à la dose 1000 ng/kg de PCB-NDL<sub>i</sub>, se sont résignées plus rapidement que les souris mâles témoins ( $p < 0,05$ ) (Figure 27). Cet effet a disparu à l'âge moyen. Aucun effet significatif n'a été observé chez les autres groupes expérimentaux par rapport aux témoins ( $p > 0,05$ ).

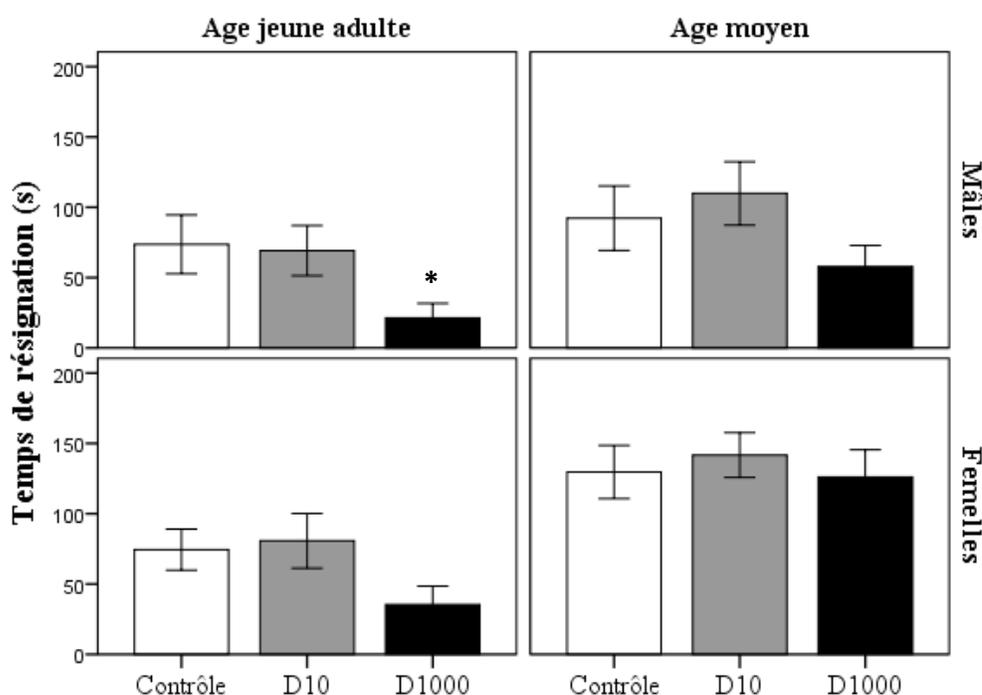


Figure 27 : Le temps d'immobilité (s) des souris mâles et femelles D10 et D1000, jeunes adultes et d'âge moyen, de la génération F2, issues de deux parents F1 exposés durant la période périnatale, via leurs mères F0, aux doses 10 et 1000 ng/kg de PCB-NDL<sub>i</sub>, respectivement, comparé à celui des souris témoins dans le test de la suspension caudale (n = 8-10/sexe/groupe). Les données sont reportées en moyennes ± ESM. \*p < 0,05 : différence significative par rapport aux témoins.

### Génération F2 issue uniquement des pères F1 exposés, via leurs mères F0, aux PCB-NDL<sub>i</sub> durant la période périnatale

Le traitement des données du test de la suspension caudale, à l'aide d'ANOVA à trois facteurs, n'a montré aucun effet significatif de l'exposition périnatale des pères F1, via leurs mères F0, aux PCB-NDL<sub>i</sub> [F(2,107) = 0,81, p > 0,05], ni celui du sexe des souris F2 [F(1,108) = 0,39, p > 0,05] ni celui de l'interaction entre les facteurs étudiés [exposition × sexe : F(2,104) = 0,40, p > 0,05 ; exposition × âge : F(2,104) = 0,48, p > 0,05 ; exposition × sexe × âge : F(2,98) = 0,01, p > 0,05] sur le temps d'immobilité des souris F2. Cependant, un effet significatif de l'âge [F(1, 98) = 11,94, p < 0.01) sur le temps d'immobilité des souris F2 a été détecté.

### Génération F2 issue uniquement des mères F1 exposées, via leurs mères F0, aux PCB-NDL<sub>i</sub> durant la période périnatale

ANOVA à trois facteurs n'a montré aucun effet significatif de l'exposition périnatale des mères F1, via leurs mères F0, aux PCB-NDL<sub>i</sub> [F(2, 100) = 0,58, p > 0,05], ni celui du sexe des souris F2 [F(1, 101) = 2,89, p > 0,05] ni celui de l'interaction entre les facteurs étudiés [exposition × sexe : F(2, 97) = 0,15, p > 0,05 ; exposition × âge : F(2, 97) = 0,57, p > 0,05 ; exposition × sexe × âge : F(2, 91) = 0,71, p > 0,05] sur le temps d'immobilité des souris F2. Par contre, un effet significatif de l'âge des souris F2 [F(1, 91) = 20,02, p < 0.001) sur le temps d'immobilité a été détecté.

## **Conclusion**

L'exposition des souris mères F0, au cours de la période gestationnelle et lactationnelle, à la dose 1000 ng/kg de PCB-NDL<sub>i</sub> a induit des modifications multigénérationnelles au niveau du comportement de résignation des souris mâles jeunes adultes des deux générations F1 et F2.

Chez la génération F1, l'exposition périnatale, via les mères F0, à la dose 1000 ng/kg de PCB-NDL<sub>i</sub> était à l'origine de l'apparition d'un comportement *dépressif-like* à l'âge jeune adulte et sexe dépendant, puisqu'il ne touchait que les souris mâles. Ce comportement n'a pas persisté au fil du temps. En effet, à l'âge moyen les souris mâles F1 ont présenté un comportement de résignation identique à celui des mâles témoins. En revanche, chez la génération F2, les souris mâles jeunes adultes D1000, issues de deux parents F1 exposés durant la période périnatale, via leurs mères F0, à la dose 1000 ng/kg de PCB-NDL<sub>i</sub>, ont montré un comportement *anti-dépressif-Like* reflété par une diminution significative de temps d'immobilité par rapport aux souris témoins. Ces modifications du comportement n'ont touché que les mâles jeunes adultes D1000. Donc, l'altération du comportement de résignation est transmissible des souris pères F1, exposées durant la période périnatale, via leurs mères F0, à la dose 1000 ng/kg de PCB, à leurs descendants mâles de la génération F2, à l'âge jeune adulte. Il s'agit donc d'une transmission d'origine paternelle.

## VII. Effet multigénérationnel de l'exposition des souris mères F0 aux PCB-NDL<sub>i</sub> sur l'activité générale des souris d'âge moyen de deux générations F1 et F2

### Génération F1 (Figure 28)

Le test de l'Open field a été réalisé afin d'évaluer l'activité générale des souris F1 exposées durant la période périnatale, via leurs mères F0, aux PCB-NDL<sub>i</sub> par rapport aux témoins. Les résultats des analyses statistiques à l'aide d'ANOVA à deux facteurs ont démontré que la locomotion réalisée par les souris de la génération F1, n'a dépendu ni de l'exposition des souris F1 aux PCB-NDL<sub>i</sub> [ $F(2, 56) = 0,10, p > 0,05$ ], ni du sexe [ $F(1, 57) = 1,23, p > 0,05$ ], ni de l'interaction entre ces deux facteurs [exposition  $\times$  sexe :  $F(2, 53) = 1,10, p > 0,05$ ]. Cependant, le nombre de redressement des souris F1 dépendait uniquement du sexe [ $F(1, 57) = 8,22, p < 0,01$ ] (Figure 28).

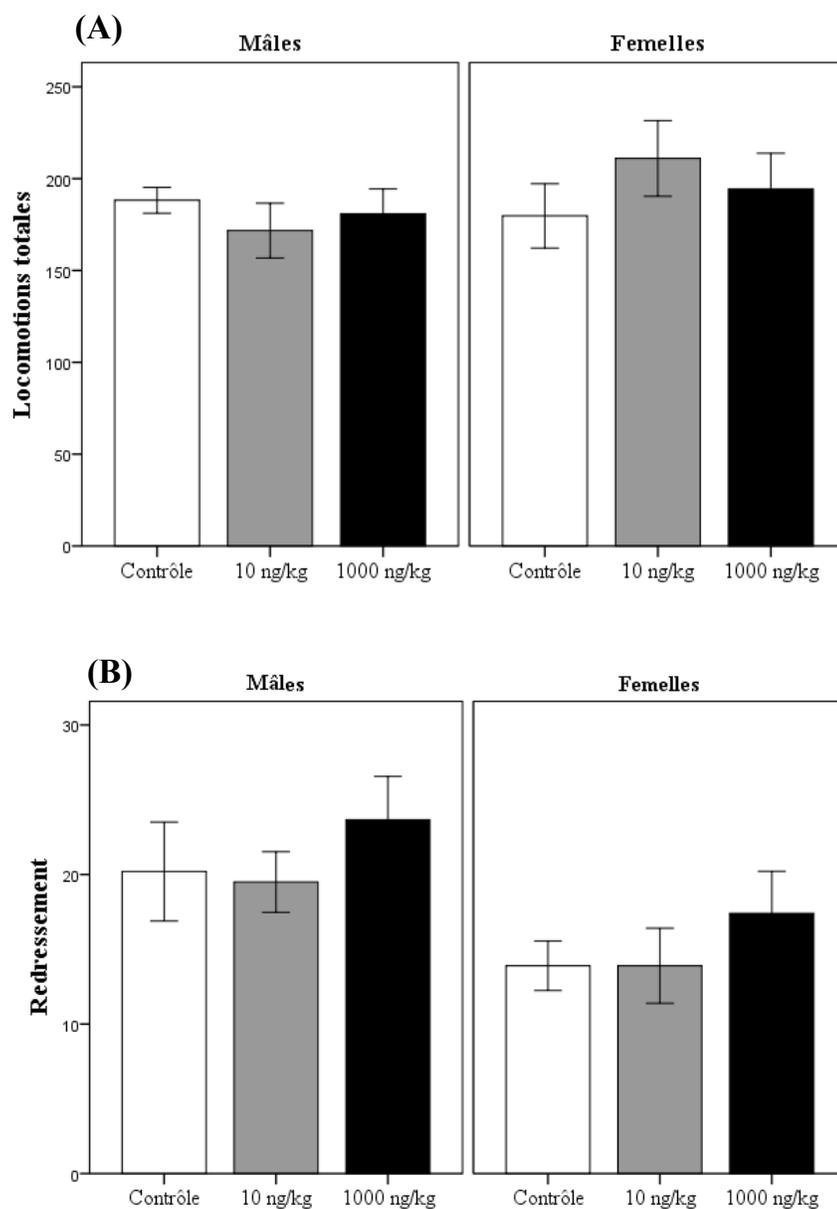


Figure 28 : Le nombre de locomotions totales (A) et de redressement (B) effectués par les souris mâles et femelles de la génération F1 à l'âge moyen, exposées durant la période périnatale, via leurs mères F0, aux doses 10 et 1000 ng/kg de PCB-NDL<sub>i</sub> comparé à ceux des souris témoins dans le test de l'Open field ( $n = 9-10$ /sexe/groupe). Les données sont reportées en moyennes  $\pm$  ESM.

**Génération F2 (Tableau 18)**

Les analyses des résultats du test de l'Open field à l'aide d'ANOVA à deux facteurs ont démontré que l'exposition périnatale de l'un ou les deux parents F1, via leurs mères F0, aux PCB-NDL<sub>i</sub>, le sexe des souris F2 ainsi que l'interaction entre ces deux facteurs n'ont induit aucune différence significative ni sur la locomotion totale ni sur le nombre de redressement effectués par tous les groupes expérimentaux de la génération F2 à l'âge moyen (Tableau 18).

*Tableau 18 : Le nombre de locomotions totales et de redressement effectués par les souris mâles et femelles de la génération F2 à l'âge moyen, dont l'un ou les deux parents F1 ont été exposés durant la période périnatale, via leurs mères F0, aux doses 10 et 1000 ng/kg de PCB-NDL<sub>i</sub> comparé à ceux des souris témoins dans le test de l'Open field (n = 7-10/sexe/groupe).*

Groupe	Sexe	Locomotions totales	Redressement
<b>Témoins</b>	Mâles	139,88 +/- 19,236	16,50 +/- 2,646
	Femelles	145,40 +/- 15,269	14,70 +/- 2,944
	Total	142,94 +/- 11,693	15,50 +/- 1,969
<b>D10</b>	Mâles	154,14 +/- 7,232	14,71 +/- 1,861
	Femelles	175,86 +/- 18,549	15,43 +/- 2,235
	Total	165,00 +/- 10,027	15,07 +/- 1,400
<b>P10</b>	Mâles	171,71 +/- 8,005	23,00 +/- 2,204
	Femelles	157,33 +/- 13,877	18,44 +/- 1,811
	Total	163,62 +/- 8,508	20,44 +/- 1,475
<b>M10</b>	Mâles	151,00 +/- 7,478	16,33 +/- 2,261
	Femelles	160,80 +/- 14,775	15,50 +/- 1,973

	Total	156,16 +/- 8,399	15,89 +/- 1,453
<b>D1000</b>	Mâles	153,00 +/- 14,896	14,67 +/- 3,232
	Femelles	128,56 +/- 10,621	13,78 +/- 2,521
	Total	140,78 +/- 9,356	14,22 +/- 1,991
<b>P1000</b>	Mâles	130,89 +/- 11,358	17,33 +/- 3,851
	Femelles	142,70 +/- 20,132	13,80 +/- 3,389
	Total	137,11 +/- 11,651	15,47 +/- 2,514
<b>M1000</b>	Mâles	143,56 +/- 11,244	15,22 +/- 3,017
	Femelles	132,86 +/- 23,891	12,13 +/- 2,503
	Total	138,88 +/- 11,819	13,76 +/- 1,962
<b>Total</b>	Mâles	148,38 +/- 4,662	16,69 +/- 1,093
	Femelles	148,76 +/- 6,312	14,84 +/- 0,963
	Total	148,58 +/- 3,948	15,73 +/- 0,727

## Conclusion

L'exposition des souris mères F0, au cours de la période gestationnelle et lactationnelle, aux doses 10 et 1000 ng/kg de PCB-NDL<sub>i</sub> n'a induit aucun effet multigénérationnel sur l'activité générale des souris mâles et femelles d'âge moyen de deux générations F1 et F2.

## VIII. Effet multigénérationnel de l'exposition des souris mères F0 aux PCB-NDL<sub>i</sub> sur le comportement social des souris jeunes adultes et d'âge moyen F1 et des souris d'âge moyen F2

### Génération F1

(Annexe : Article publié dans le journal « Hormones & Behavior »)

### Génération F2

#### *Comparaison entre les groupes expérimentaux*

Génération F2 issue de deux parents F1 exposés, via leurs mères F0, aux PCB-NDL<sub>i</sub> durant la période périnatale (Figure 29 et 30)

Dans l'essai de sociabilité, les résultats du test de compartiment à trois chambres (C3C), analysés à l'aide d'ANOVA à deux facteurs, ont montré un effet significatif de l'interaction entre l'exposition précoce des parents F1 aux PCB-NDL<sub>i</sub> et le sexe des souris F2 sur le temps passé dans la zone non sociale [ $F(2, 43) = 3,81, p < 0,05$ ] ainsi qu'un effet significatif du sexe des souris F2 [ $F(1, 47) = 0,36, p < 0,05$ ] sur le temps passé dans la zone centrale.

Les analyses a posteriori n'ont montré aucune différence significative de l'exposition aux PCB-NDL<sub>i</sub> sur le temps passé dans la zone non sociale chez les souris D10 et D1000 de la génération F2, issues de deux parents F1 exposés durant la période périnatale, via leurs mères F0, aux doses 10 et 1000 ng/kg de PCB-NDL<sub>i</sub>, respectivement, par rapport aux témoins ( $p > 0,05$ ).

Dans l'essai de la nouveauté sociale, les résultats analysés à l'aide d'ANOVA à deux facteurs ont montré un effet significatif uniquement du sexe des souris F2 sur le temps de reniflement du nouveau congénère [ $F(1, 47) = 8,10, p < 0,01$ ].

Génération F2 issue uniquement des pères F1 exposés, via leurs mères F0, aux PCB-NDL<sub>i</sub> durant la période périnatale (Figure 31 et 32)

Dans la phase de sociabilité, l'analyse statistique des données du test C3C, réalisé chez les souris témoins et celles de la génération F2, issues uniquement des mères F1 exposés durant la période périnatale, via leurs mères F0, aux PCB-NDL<sub>i</sub>, a montré des effets significatifs du sexe des souris F2 sur le temps passé dans la zone sociale [ $F(1, 48) = 6,86, p < 0,05$ ] et sur le nombre d'entrée dans la zone sociale [ $F(1, 48) = 4,15, p < 0,05$ ].

Dans l'essai de la nouveauté sociale, les analyses statistiques n'ont montré aucun effet significatif, ni de l'exposition précoce des pères F1 aux PCB-NDL<sub>i</sub>, ni de celui du sexe des souris F2, ni de celui de l'interaction entre ces deux facteurs chez les souris d'âge moyen F2 ( $p > 0,05$ ).

Génération F2 issue uniquement des mères F1 exposées, via leurs mères F0, aux PCB-NDL<sub>i</sub> durant la période périnatale (Figure 33 et 34)

Dans l'essai de sociabilité, les résultats du test C3C ont montré un effet significatif de l'exposition périnatale des mères F1, via leurs mères F0, aux PCB-NDL<sub>i</sub> [ $F(2, 49) = 3,32, p < 0,05$ ] sur le temps passé dans la zone non sociale chez les souris F2.

Par contre, le test de Fisher n'a montré aucun effet significatif de l'exposition aux PCB-NDL<sub>i</sub> sur le temps passé dans la zone non sociale chez les souris M10 et M1000 F2, issues uniquement des mères F1 exposées aux doses 10 et 1000 ng/kg de PCB-NDL<sub>i</sub>, respectivement, par rapport aux témoins.

Dans l'essai de la nouveauté sociale, ANOVA à deux facteurs a montré des effets significatifs de l'interaction entre l'exposition précoce des mères F1 aux PCB-NDL<sub>i</sub> et le sexe des souris F2 sur le nombre de reniflement du nouveau congénère [ $F(2, 46) = 3,33, p < 0,05$ ] ainsi du sexe des souris F2 sur le temps de reniflement du nouveau congénère [ $F(1, 50) = 6,94, p < 0,05$ ].

Par contre, les comparaisons a posteriori n'ont montré aucun effet significatif sur le nombre de reniflement du nouveau congénère chez les souris M10 et M1000 F2, issues

uniquement des mères F1 exposées aux doses 10 et 1000 ng/kg de PCB-NDL<sub>i</sub>, respectivement, par rapport aux souris témoins ( $p > 0,05$ ).

## Conclusion

Les résultats issus de la comparaison entre les groupes expérimentaux n'ont montré aucune différence significative dans la sociabilité ni dans la préférence à la nouveauté chez tous les groupes expérimentaux de la génération F2 dont l'un ou les deux parents F1 ont été exposés durant la période périnatale, via leurs mères F0, aux PCB-NDL<sub>i</sub> par rapport aux témoins.

De même, aucun effet significatif n'a été observé ni au niveau de l'activité ni au niveau de l'anxiété sociale chez les souris F2, issues des mères, des pères ou voire des deux parents F1 exposés durant la période périnatale, via leurs mères F0, aux PCB-NDL<sub>i</sub>, par rapport aux témoins.

## Comparaisons au sein des groupes expérimentaux

Dans l'essai de sociabilité, le test de *student* a montré que les mâles D10 de la génération F2, issus de deux parents F1 exposés à la dose 10 ng/kg de PCB-NDL<sub>i</sub> ainsi les femelles M1000 et D1000 F2, issues, respectivement, des uniquement des mères ou de deux parents F1 exposés à la dose 1000 ng/kg de PCB, ont passé significativement plus du temps dans la chambre sociale par rapport à la chambre vide ( $t = -2,25, p < 0,05$  ;  $t = 2,42, p < 0,05$  ;  $t = -2,79, p < 0,05$ , respectivement) (Figures 29A et 33A). Les femelles P10 de la génération F2, issues uniquement des pères exposés à la dose 10 ng/kg de PCB-NDL<sub>i</sub> ont montré une augmentation significative du nombre d'entrée à la chambre sociale par rapport à la chambre vide ( $t = -2,07, p \leq 0,05$ ) (Figure 31B).

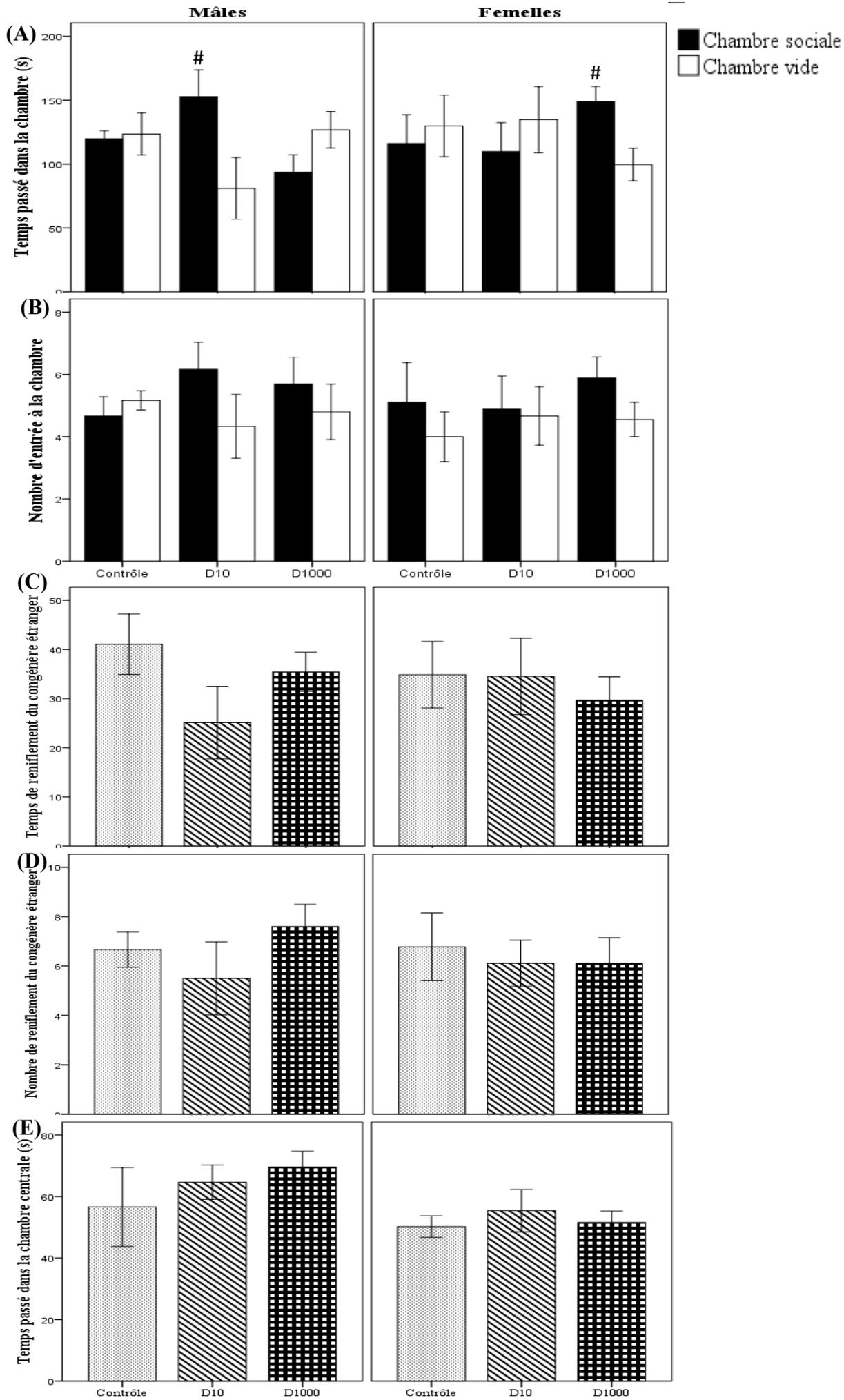
Dans l'essai de la nouveauté sociale, le test de Mann-Whitney a montré que les mâles témoins ont passé, significativement, plus de temps en reniflant le nouveau congénère par rapport au congénère familial ( $z = -2,24, p < 0,05$ ) (Figure 30C). Le test de *student* a révélé que les mâles D10 et D1000 de la génération F2, issus de deux parents F1 exposés à la dose 10 et 1000 ng/kg de PCB-NDL<sub>i</sub>, respectivement, ont montré une préférence significative à la nouveauté en passant plus de temps dans la chambre non familière par rapport à la chambre familière ( $t = -2,87, p < 0,05$  ;  $t = -2,85, p < 0,05$ , respectivement) (Figure 30A) et en mettant

plus de temps en reniflant le nouveau congénère par rapport au congénère familial ( $t = -2,81, p < 0,05$  ;  $t = -2,45, p < 0,05$ , respectivement) (Figure 30C). De même, les mâles M1000 F2, issus uniquement des mères exposées à la dose 1000 ng/kg de PCB, ont montré une préférence à la nouveauté en passant significativement plus de temps dans la chambre non familière par rapport à la chambre familière ( $t = -2,55, p < 0,05$ ) (Figure 34A).

## Conclusion

D'après la comparaison au sein de même groupe, les mâles D10 et les femelles D1000 et M1000 de la génération F2 ont montré une altération du niveau de la sociabilité, manifestée par une préférence de la chambre sociale par rapport à la chambre vide. D'autre part, les mâles D10 et D1000 de la génération F2 ont montré une altération du niveau de la préférence pour la nouveauté, en exhibant une préférence pour la chambre non familière contenant le nouveau congénère par rapport à la chambre familière contenant le congénère familial. Les mâles M10, M1000, P10 et P1000 F2 ont montré une diminution de la préférence pour la nouveauté sociale indifférence par rapport aux souris témoins qui ont présenté une préférence pour le nouveau congénère.

En dépit de l'absence d'effets chez les souris F1, exposées durant la période périnatale, via leurs mères F0, aux PCB-NDL<sub>i</sub>, l'altération de la préférence pour la nouveauté sociale chez leurs descendants mâles D1000, P1000, M10 et M1000 et la sociabilité chez leur descendant femelle M1000 de la génération F2 pourrait être expliquée par des altérations au niveau des cellules germinales mâles et femelles des souris parents F1.



---

*Figure 29: La sociabilité des souris D10 et D1000 d'âge moyen de la génération F2 issues de deux parents exposés durant la période périnatale, via leurs mères F0, à la dose 10 et 1000 ng/kg de PCB-NDL<sub>i</sub>, respectivement. (n =6-10/sexe/groupe). (A) Le temps passé dans la chambre (s), reflétant le choix de la souris testée entre la chambre contenant le congénère étranger (chambre sociale) et la chambre vide (chambre non sociale). (B) Nombre d'entrée dans la chambre sociale vs. la chambre non sociale. (C) Temps de reniflement du congénère étranger (s). (D) Nombre de reniflement du congénère étranger. (E) Temps passé dans la chambre centrale (s). Les données sont reportées en moyennes  $\pm$  ESM. <sup>#</sup>p < 0,05: différence significative au sein de même groupe entre la chambre sociale et la chambre vide.*

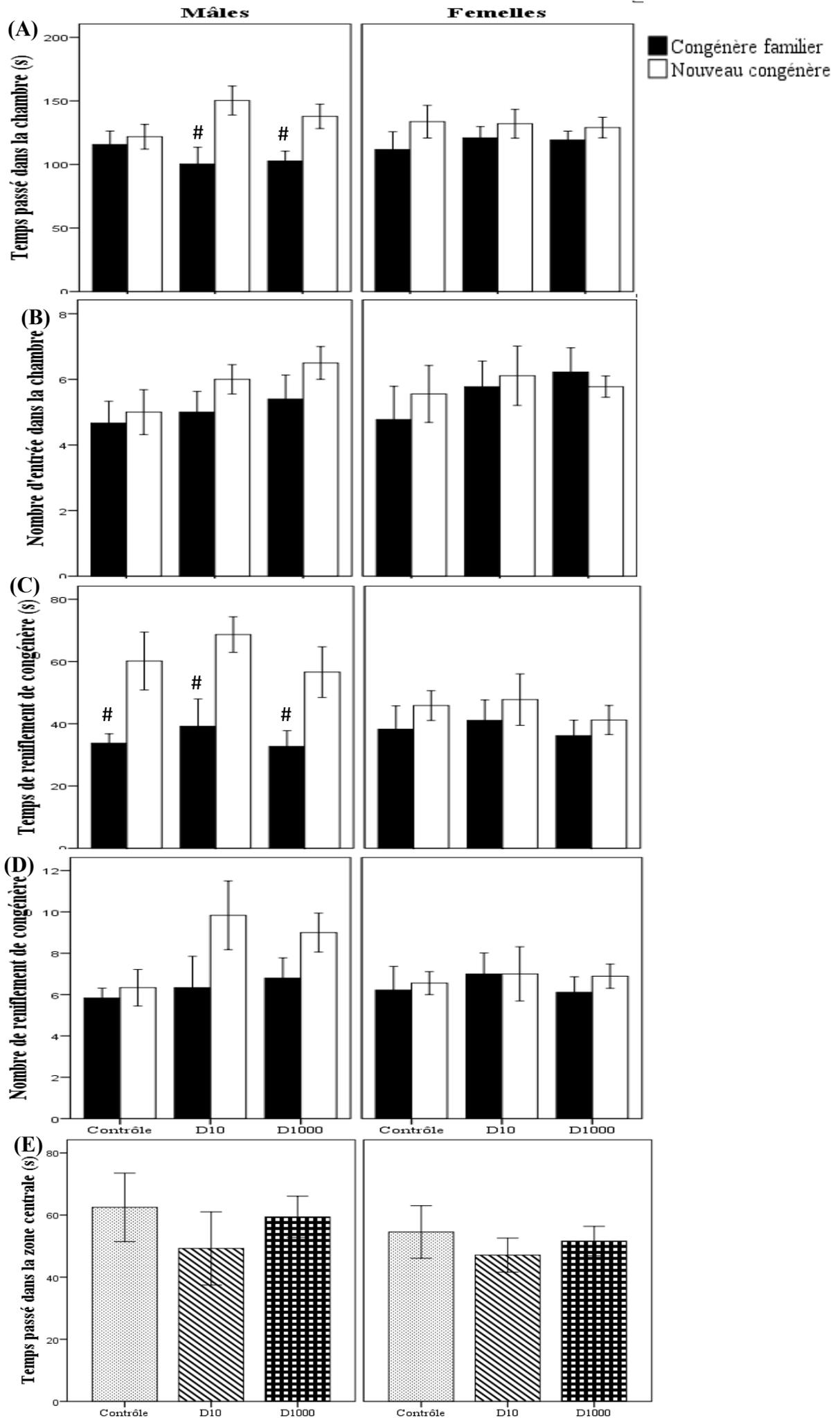
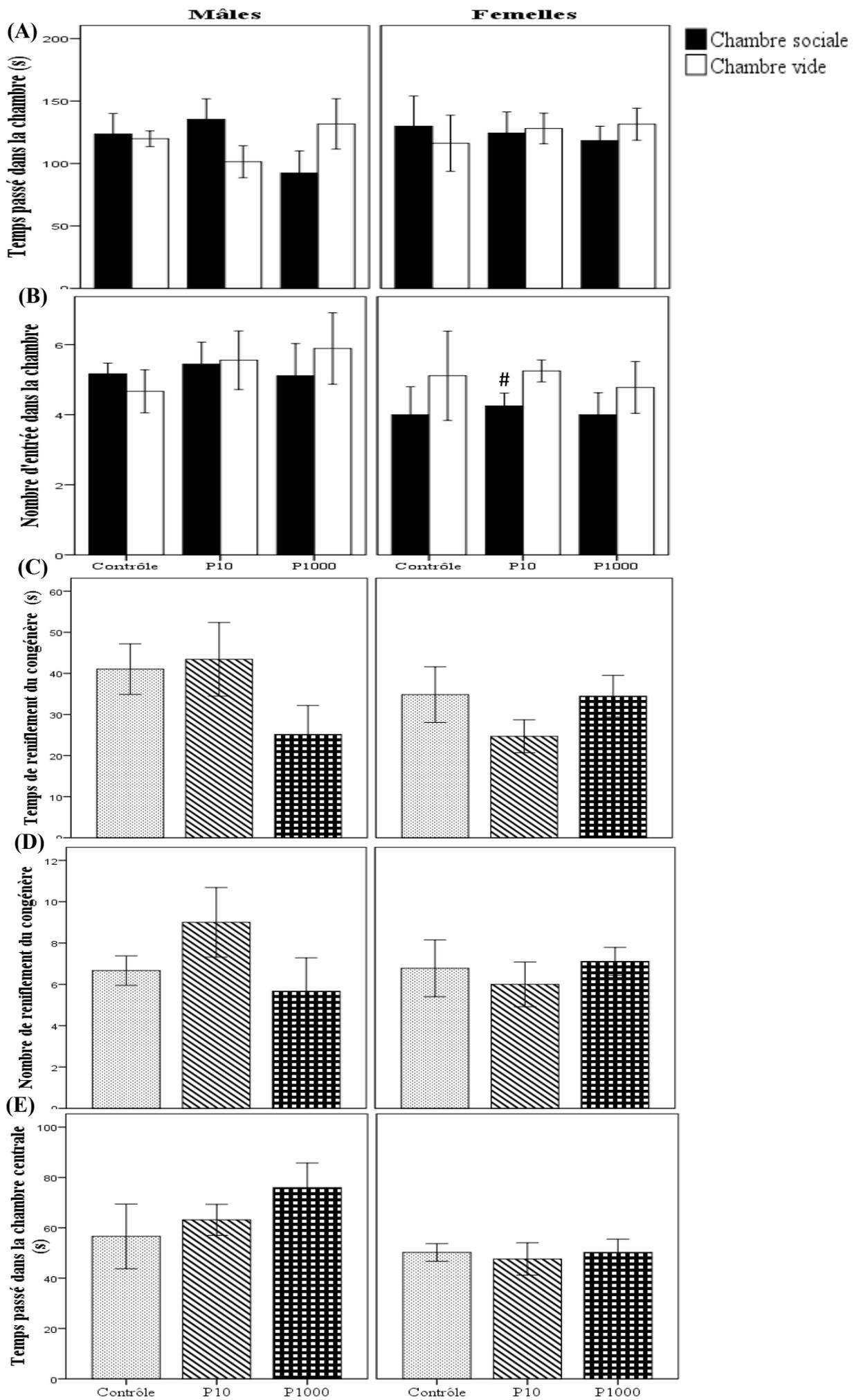
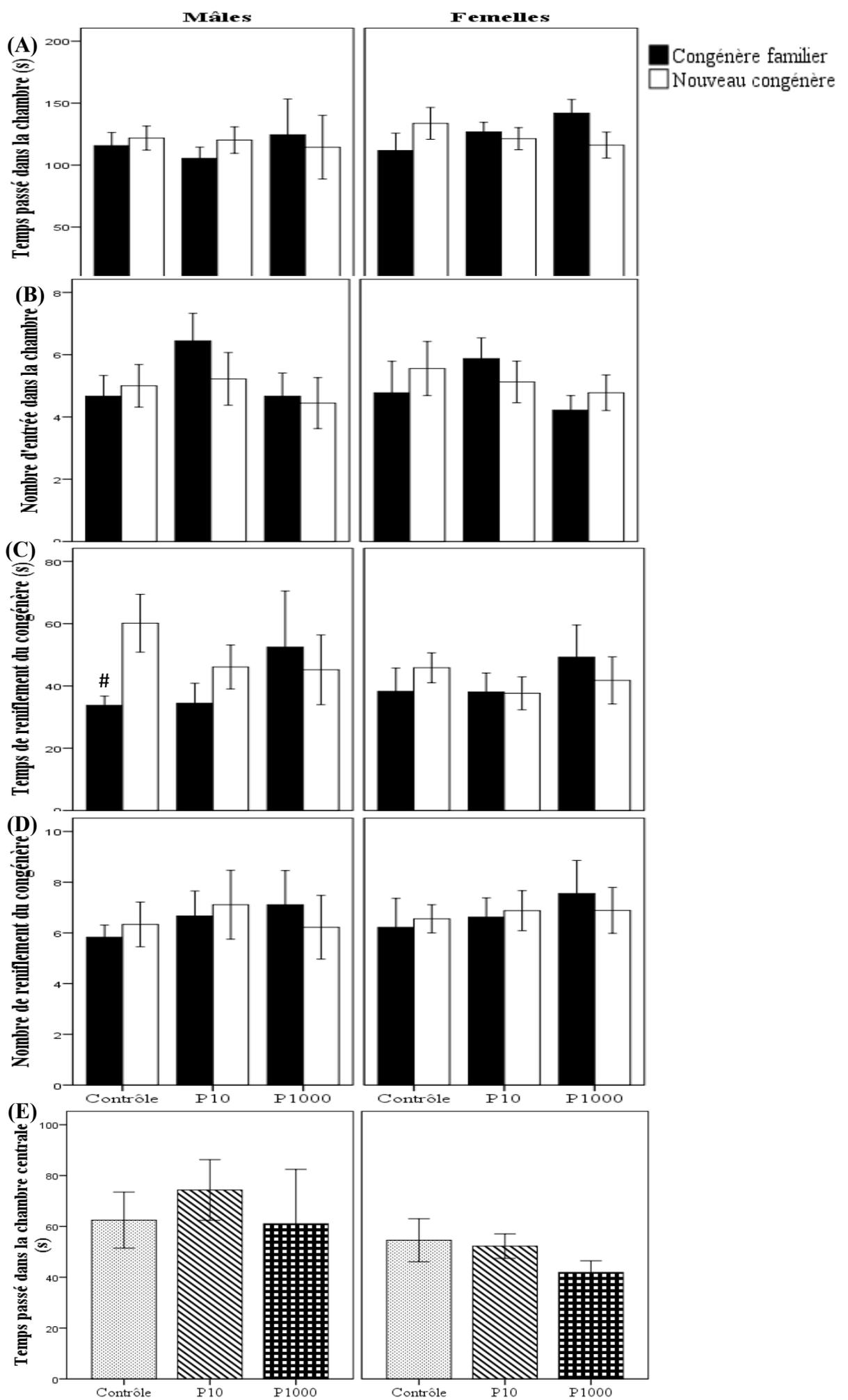


Figure 30 : la préférence pour la nouveauté chez les souris D10 et D1000 d'âge moyen de la génération F2 issues de deux parents exposés durant la période périnatale, via leurs mères F0, à la dose 10 et 1000 ng/kg de PCB-NDL<sub>i</sub>, respectivement (n =6-10/sexe/groupe). (A) Le temps passé dans la chambre (s), reflétant le choix de la souris testée entre la chambre contenant le congénère familial (chambre familière) et la chambre contenant le nouveau congénère (chambre non familière). (B) Nombre d'entrée à la chambre familière vs. la chambre non familière. (C) Temps de reniflement de congénère familial vs. le nouveau congénère(s). (D) Nombre de reniflement de congénères familial vs. Le nouveau congénère. (E) Temps passé dans la chambre centrale (s). Les données sont reportées en moyennes  $\pm$  ESM. <sup>#</sup>p < 0,05: différence significative au sein de même groupe entre la chambre familière et la chambre non familière.



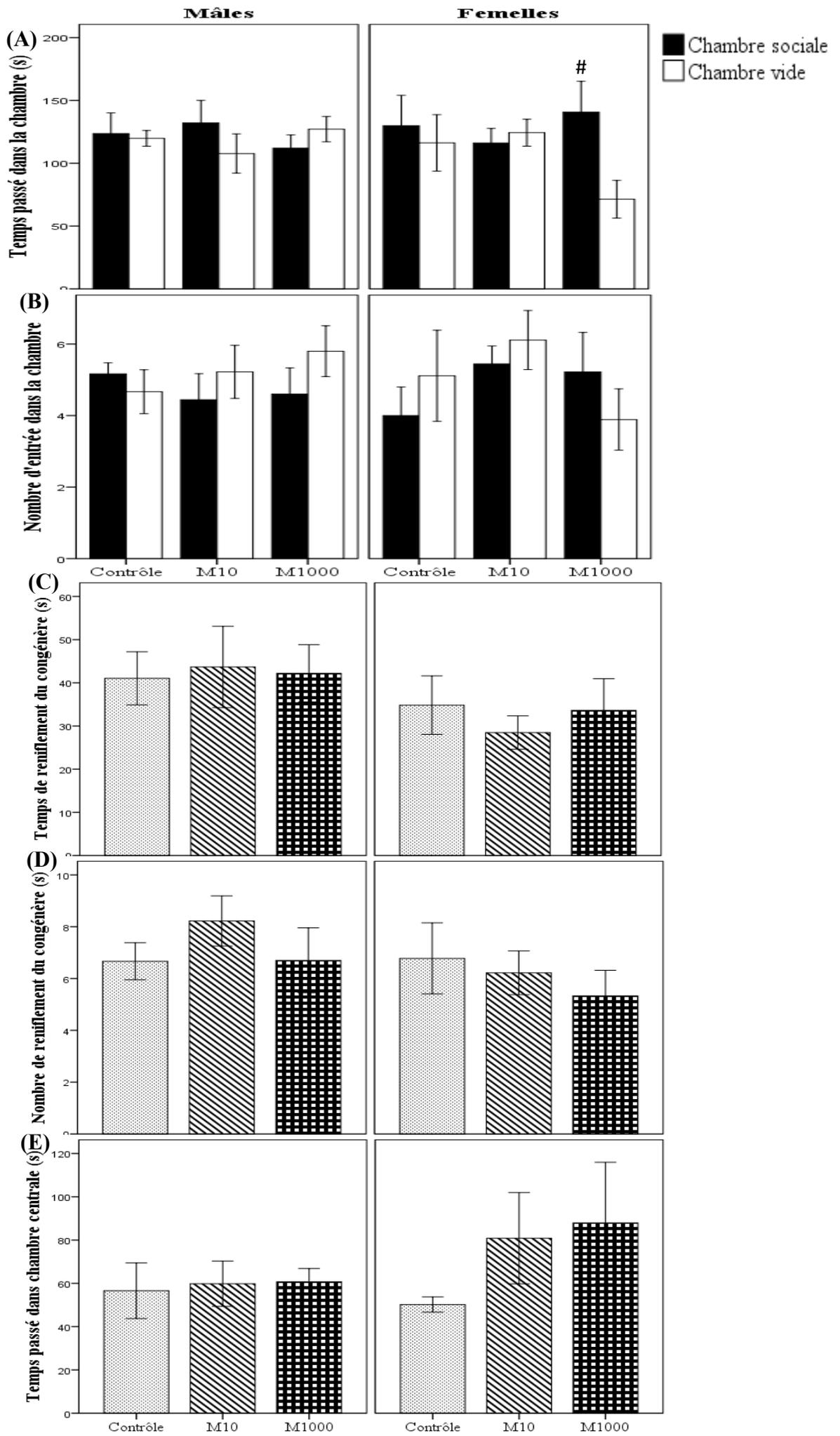
---

*Figure 31: La sociabilité des souris P10 et P1000 d'âge moyen de la génération F2 issues uniquement des pères exposés durant la période périnatale, via leurs mères F0, à la dose 10 et 1000 ng/kg de PCB-NDL<sub>i</sub>, respectivement. (n =6-9/sexe/groupe). (A) Le temps passé dans la chambre (s), reflétant le choix de la souris testée entre la chambre contenant le congénère étranger (chambre sociale) et la chambre vide (chambre non sociale). (B) Nombre d'entrée dans la chambre sociale vs. la chambre non sociale. (C) Temps de reniflement du congénère étranger (s). (D) Nombre de reniflement du congénère étranger. (E) Temps passé dans la chambre centrale (s). Les données sont reportées en moyennes  $\pm$  ESM. <sup>#</sup>p  $\leq$  0,05: différence significative au sein de même groupe entre la chambre sociale et la chambre vide.*



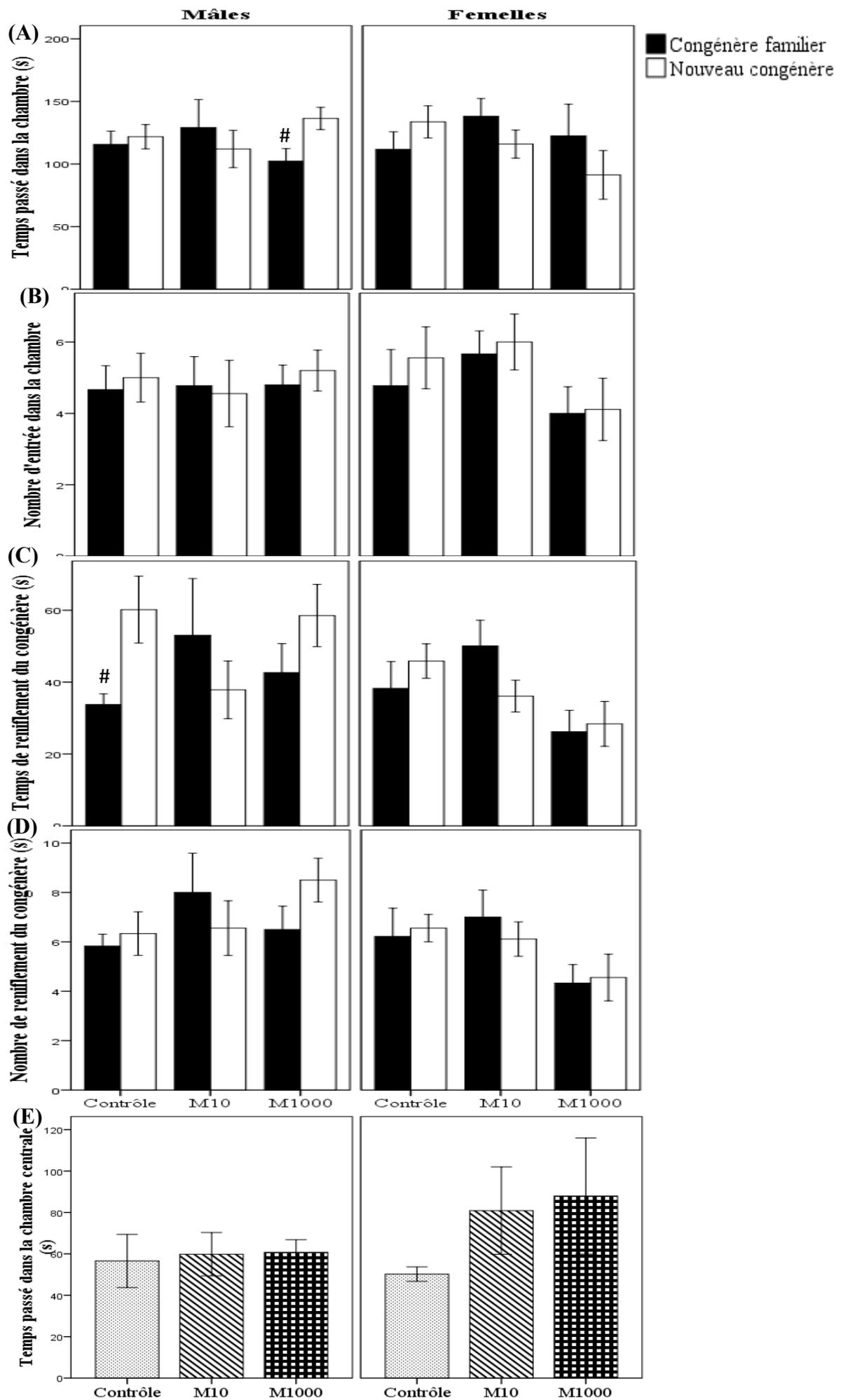
---

Figure 32 : la préférence pour la nouveauté chez les souris P10 et P1000 d'âge moyen de la génération F2 issus uniquement des pères exposés durant la période périnatale, via leurs mères F0, à la dose 10 et 1000 ng/kg de PCB-NDLi, respectivement. (n =6-9/sexe/groupe). (A) Le temps passé dans la chambre (s), reflétant le choix de la souris testée entre la chambre contenant le congénère familial (chambre familière) et la chambre contenant le nouveau congénère (chambre non familière). (B) Nombre d'entrée à la chambre familière vs. la chambre non familière. (C) Temps de reniflement de congénère familial vs. le nouveau congénère(s). (D) Nombre de reniflement de congénères familial vs. Le nouveau congénère. (E) Temps passé dans la chambre centrale (s). Les données sont reportées en moyennes  $\pm$  ESM. <sup>#</sup>p < 0,05: différence significative au sein de même groupe entre la chambre familière et la chambre non familière.



---

*Figure 33: La sociabilité des souris M10 et M1000 d'âge moyen de la génération F2 issues uniquement des mères exposées durant la période périnatale, via leurs mères F0, à la dose 10 et 1000 ng/kg de PCB-NDL<sub>i</sub>, respectivement. (n =6-10/sexe/groupe). (A) Le temps passé dans la chambre (s), reflétant le choix de la souris testée entre la chambre contenant le congénère étranger (chambre sociale) et la chambre vide (chambre non sociale). (B) Nombre d'entrée dans la chambre sociale vs. la chambre non sociale. (C) Temps de reniflement du congénère étranger (s). (D) Nombre de reniflement du congénère étranger. (E) Temps passé dans la chambre centrale (s). Les données sont reportées en moyennes  $\pm$  ESM. <sup>#</sup>p < 0,05: différence significative au sein de même groupe entre la chambre sociale et la chambre vide.*



---

Figure 34: la préférence pour la nouveauté chez les souris M10 et M1000 d'âge moyen de la génération F2 issues uniquement des mères exposés durant la période périnatale, via leurs mères F0, à la dose 10 (M10) et 1000 (M1000) ng/kg de PCB-NDLi, respectivement. (n =6-10/sexe/groupe). (A) Le temps passé dans la chambre (s), reflétant le choix de la souris testée entre la chambre contenant le congénère familial (chambre familière) et la chambre contenant le nouveau congénère (chambre non familière). (B) Nombre d'entrée à la chambre familière vs. la chambre non familière. (C) Temps de reniflement de congénère familial vs. le nouveau congénère(s). (D) Nombre de reniflement de congénères familial vs. Le nouveau congénère. (E) Temps passé dans la chambre centrale (s). Les données sont reportées en moyennes  $\pm$  ESM. <sup>#</sup>p < 0,05: différence significative au sein de même groupe entre la chambre familière et la chambre non familière.

Tableau 19 : Récapitulatif des résultats comportementaux obtenus chez les souris des deux générations F1 et F2 suite à l'exposition des souris F0 aux PCB-NDL<sub>i</sub> durant la gestation et l'allaitement

Test	Comportement	F1		F2					
		10	1000	D10	D1000	P10	P1000	M10	M1000
<b>Retournement</b> JPN 3-9	Reflexe	♂ : ↘ JPN6, 8 ♀ : ↘ JPN5, 6	♂ et ♀ : ↘ JPN6	♂ : ↘ JPN3	♂ : ↘ JPN3,5	-	-	♂ : ↘ JPN3,5	♂ : ↘ JPN3, 4
<b>Géotaxie négative</b> JPN 4-11	Coordination locomotrice/ Fonction vestibulaire	-	-	♂ : ↗ JPN5 ♀ : ↗ JPN4, 5	♂ : ↗ JPN4, 11 ♀ : ↗ JPN4, 5, 11	♀ : ↗ JPN4	♂ : ↗ JPN4 ♀ : ↗ JPN4, 5	♂ : ↗ JPN5 ♀ : ↗ JPN4, 5	♀ : ↗ JPN4,11
<b>Rotarod</b> JPN 35	Coordination locomotrice	♀ : ↘ T2	-	-	-	♂ : ↗ T1	-	♂ : ↘ T2, T3	-
<b>WESPOC</b> JPN 40	Fonction vestibulaire/ Force musculaire	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>SC</b> JPN 50	Dépression	-	♂ : ↗	-	♂ : ↘	-	-	-	-
<b>RI</b> JPN 80	Agressivité	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>LCS</b> JPN 330	Anxiété	♂ : ↗		♂ : ↗	-	-		-	-
<b>C3C</b> JPN 330	Sociabilité	♀ : ↗	♂ : ↘	♂ : ↗	♀ : ↗	-	-		♀ : ↗
<b>C3C</b> JPN 330	Préférence pour la nouveauté	♂ : ↗	-	♂ : ↗	♂ : ↗	♂ : ↘	♂ : ↘	♂ : ↘	♂ : ↘

## **IX. Effet de l'exposition des souris mères F0 aux PCB-NDL<sub>i</sub> sur le niveau des marqueurs plasmatiques chez les souris d'âge moyen de la génération F1**

Les résultats du dosage biochimique de la corticostérone, la myélopéroxydase et la sérotonine ainsi de l'activité de l'acétylcholinestérase chez les souris F1 d'âge moyen sont aussi présentés, et discutés dans l'article publié dans le journal « Hormones & Behavior » (voir annexe).

D'une façon succincte, l'exposition périnatale aux PCB (10 ng/kg et 1000 ng/kg) a produit une augmentation significative de la concentration de la corticostérone aussi bien chez les mâles que chez les femelles F1 ( $p < 0,001$ ). De même, cette l'exposition a induit une augmentation significative de l'activité de l'acétylcholinestérase chez toutes les souris F1 d'âge moyen ( $p < 0,001$ ). Cependant, l'exposition précoce aux PCB a plutôt induit une diminution significative de la sérotonine plasmatique chez toutes les souris d'âge moyen ( $p < 0,05$ ), à l'exception des mâles dont les souris mères ont été exposées à la dose 1000 ng/kg ( $p > 0,05$ ). Nos résultats ont montré aussi que l'exposition périnatale aux PCB n'a pas affecté la concentration plasmatique de la myélopéroxydase chez la progéniture F1 d'âge moyen ( $p > 0,05$ ), à l'exception des femelles dont les souris mères ont été exposées à la dose 1000 ng/kg ( $p < 0,05$ ) (figure 35).

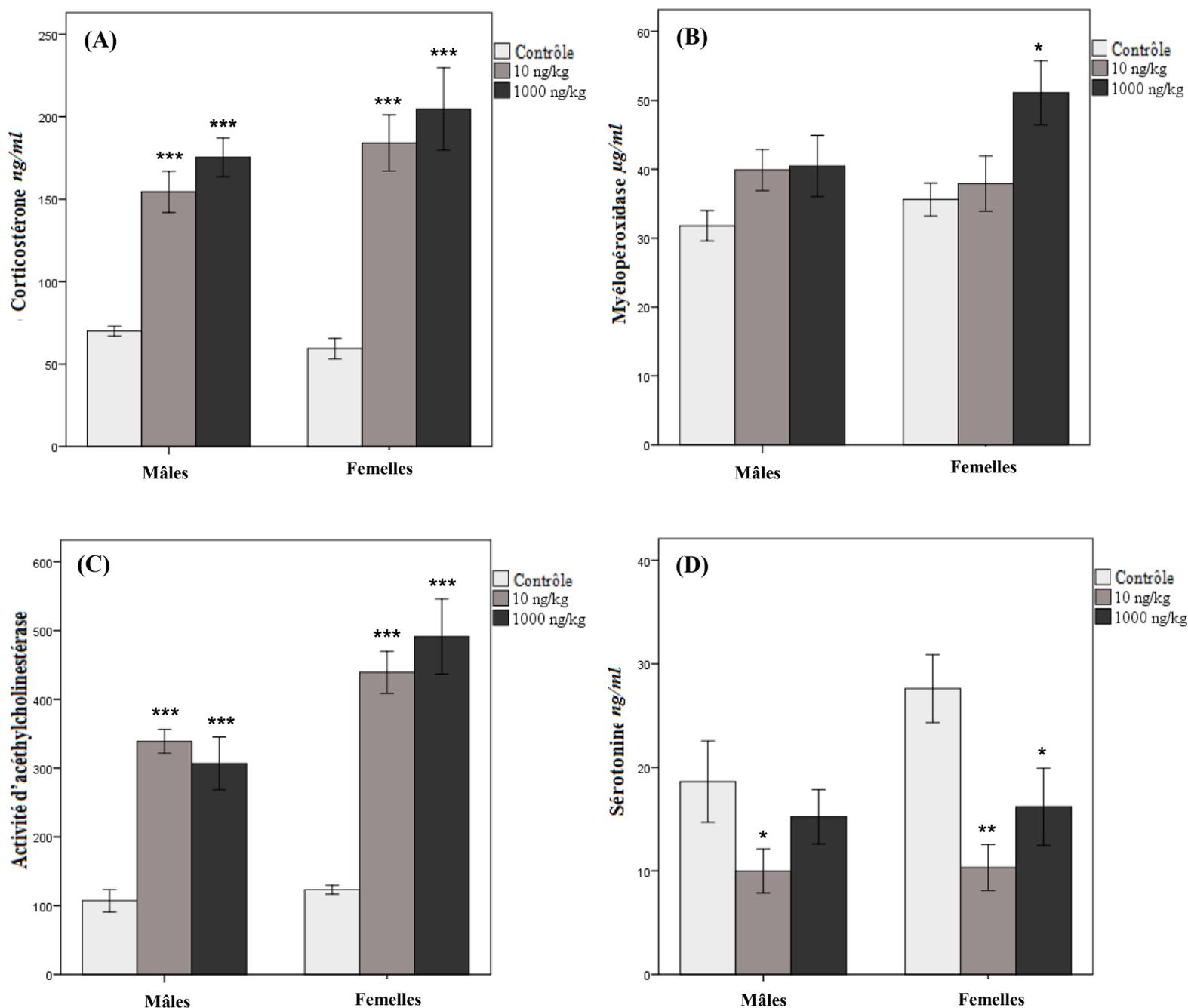


Figure 25: Effets de l'exposition périnatale aux doses 10 et 1000 ng/kg de PCB-NDL<sub>i</sub> sur la concentration des biomarqueurs plasmatiques dosés chez les souris mâles et femelles d'âge moyen de la génération F1 (n=6/groupe). (A) la corticostérone en ng/ml, (B) la myéloperoxydase (MPO) en µg/ml, (C) l'activité d'acétylcholinestérase en nmol d'acétylcholine hydrolysé/ minute/ mg de protéines, (D) la sérotonine en ng/ml. Les données sont reportées en moyennes ± ESM. \*p < 0,05. \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001: différences significatives par rapport aux témoins.

# *Discussion*

Les PCB sont des molécules neurotoxiques. De nombreuses études ont démontré la toxicité développementale, comportementale et cognitive des PCB aussi bien chez l'Homme, suite à des expositions accidentelles ou chroniques (Fein et al., 1984; Forns et al., 2012; Grandjean et al., 2001; Gray et al., 2005; Jacobson and Jacobson, 1996; Jacobson et al., 1984; Lonky et al., 1996; Sagiv et al., 2012; Stewart et al., 2003b; Vreugdenhil et al., 2004; Winneke et al., 1998), que chez le modèle animal (Boix et al., 2010; Colciago et al., 2009; Dridi et al., 2016; Elnar et al., 2012; Piedrafita et al., 2008; Soualeh et al., 2017; Sugawara et al., 2006; Tian et al., 2011b). Cependant, à notre connaissance, la transmission potentielle de la neurotoxicité des PCB à travers des générations n'est pas encore étudiée.

Au cours de ce travail de thèse, nous nous sommes fixés l'objectif de rechercher et d'évaluer les impacts neuro-développementaux et neurocomportementaux des expositions précoces aux PCB-NDL, déjà démontré au sein de notre équipe, mais chez les générations suivantes F1 et F2 issues des souris mères F0 exposées durant la période gestationnelle et l'allaitement. Ainsi cette étude multigénérationnelle a été effectuée afin d'examiner le développement et le comportement des souris mâles et femelles au cours de leur ontogenèse jusqu'à l'âge moyen (JPN 330) aussi bien pour la génération F1, exposée durant sa vie périnatale, via leur mère F0, et également pour la génération F2, obtenue par croisement des souris F1. Le mélange des 6 PCB-NDL a été utilisé à deux doses: 10 et 1000 ng/kg, et selon un profil mimant l'exposition humaine aux poissons contaminés. L'objectif final étant de vérifier si l'impact d'une exposition précoce pourrait affecter les générations suivantes même en absence d'exposition. C'est une approche comportementale et cognitive des effets épigénétiques potentiels des contaminants alimentaires et environnementaux.

Dans cette étude trois générations F2 ont été obtenues en fonction de la modalité d'exposition des parents F1 aux contaminants alimentaires « PCB-NDL ». En effet, la première, une génération F2 a été obtenue du croisement des F1 dont seuls les pères ont été exposés, en période périnatale, via leurs mères F0, au mélange des 6 PCB-NDL<sub>i</sub>. Cette génération a été désignée, dans ce mémoire, par la lettre P10 ou P1000 en fonction de la dose de l'exposition périnatale (10 ou 1000 ng/kg). Une autre génération a été obtenue du croisement des F1 dont seules les mères ont été exposées en période périnatale, via leurs mères F0, au mélange des 6 PCB-NDL<sub>i</sub>. Cette génération est désignée par la lettre M10 ou M1000 en fonction de la dose périnatale.

Finalement, une dernière génération a été obtenue du croisement des F1 dont les deux parents ont été exposés, en période périnatale, via leurs mères F0, au mélange des 6 PCB-NDL. Cette génération est désignée par la lettre D10 ou D1000 en fonction de la dose de l'exposition périnatale.

Les résultats ont montré que l'exposition des souris mères F0, gestantes et allaitantes, aux doses 10 et 1000 ng/kg de PCB-NDL<sub>i</sub> a induit des effets délétères sur le système nerveux central chez la génération F1 qui se manifestent par des troubles développementaux et comportementaux, dont certains sont transitoires mais d'autres persistants, ces troubles se sont transmis à la génération F2 bien qu'elle n'ait pas été exposée, cela signifierait que les altérations relevées s'inscriraient dans un transfert héréditaire de nature épigénétique impliquant un effet de cette exposition précoce sur les gènes des parents F0 et F1. Il apparaît également au travers ces résultats un effet variable selon le sexe de manière récurrente, cela pourrait être expliqué par un effet sexo-dépendant et probablement hormono-dépendant. Cela aurait également comme signification indirecte, l'impact de ces expositions précoces sur le système endocrinien et un effet de perturbation endocrinienne.

Durant les deux phases de développement du cerveau : la phase néonatale (JPN 3-9) et la phase de transition postnatale (JPN 9-15), le réflexe, la fonction vestibulaire et la coordination locomotrice des souris F1 et F2 ont été étudiés par des tests spécifiques, le test de la géotaxie négative et le test de retournement. Le test de la géotaxie négative n'a montré aucun impact significatif de l'exposition précoce sur le réflexe de la géotaxie chez la génération F1. Par contre, les trois générations F2 étudiées (issues des mères, des pères ou de deux parents F1 exposés durant la période périnatale, via leurs mères F0, aux doses 10 et 1000 ng/kg de PCB-NDL<sub>i</sub>) ont mis significativement plus de temps pour effectuer une rotation complète au cours de la première semaine de vie néonatale (JPN 3, 4 et 5) par rapport aux témoins. Ces résultats pourraient être expliqués, en partie, par des déficits transitoires post-générationnels qui toucheraient la coordination locomotrice de la génération F2 sans toucher la génération F1.

Les résultats de cette présente étude obtenus sur la progéniture F1 sont différents de ceux de notre précédente étude qui a montré une altération transitoire de la coordination locomotrice chez les souriceaux F1 exposés à la dose 10 ng/kg de PCB-NDL<sub>i</sub> (Elnar et al., 2012). Cependant, il faut souligner deux différences importantes, d'une part les études antérieures n'ont porté que sur

L'exposition en phase d'allaitement, d'autre part, les études antérieures ont porté sur le gavage forcé des mélanges des PCB-NDL (Elnar et al., 2012), alors que dans notre présente étude l'accès à la matrice contaminée reste libre de manière à ce que les animaux puissent prendre la dose correspondante étudiée. En effet, le gavage pourrait être considéré comme un biais expérimental suite à son potentiel d'induire du stress (Brown et al., 2000 ; Murphy et al., 2001). Par ailleurs, d'autres études ont montré une altération de la coordination locomotrice chez les souriceaux F1 suite à l'exposition périnatale, via leurs mères, à l'Aroclor 1254, contenant des PCB-NDL, aux doses 26 mg/kg (Overmann et al., 1987), 10 mg/kg (Nguon et al., 2005), 6-18 mg/kg et 54 mg/kg (Sugawara et al., 2006), ce qui montre une certaine concomitance avec nos résultats en précisant, néanmoins, que les fortes doses utilisées dans ces études pourraient aggraver les altérations observées.

En effet, lors du deuxième test développemental, le réflexe de retournement a été affecté d'une façon transitoire chez les souris mâles et femelles de la génération F1 exposées en période périnatale, via leurs mères F0, aux PCB-NDL<sub>i</sub> par rapport aux souris témoins. Une transmission maternelle et parentale de cet effet transitoire à la génération F2 a été mise en évidence. Ces résultats suggèrent différentes explications, entre autres, (i) l'exposition précoce des souris F1 aux PCB-NDL<sub>i</sub> a induit une hypersensibilité transitoire multigénérationnelle des fonctions sensori-motrices, indiquant que même si ce n'est que transitoire, cet effet observé et relevé à cet âge, dont il est difficile de confirmer la réversibilité, pourrait avoir un impact à long terme et dont les effets seraient tardifs (ii) l'exposition développementale des souris F1 aux PCB a induit une altération transitoire de niveau des différentes hormones circulantes dans le sang des souriceaux F1 durant la période précoce de vie néonatale transmissible à la génération F2 (Anderson et al., 1990; Anderson et al., 1987; Hollander et al., 2000; Insel et al., 1998 ). Cette dernière hypothèse nécessite une confirmation par des dosages des différentes hormones chez les souriceaux F1 et F2, telles que les hormones thyroïdiennes T3 et T4.

Le réflexe de retournement est un réflexe spinal qui apparaît et se mature aux premiers jours de la période post-natale à cause de la différenciation précoce des réseaux lombaires de la moelle épinière (Cabana et al., 1993). Ce réflexe est un indicateur fiable de la maturation du système nerveux central chez les nouveau-nés (Khalki et al., 2012; Vaglenova et al., 2008). Malgré la

fragilité du système nerveux central pendant la période développementale post-natale, il pourrait s'agir d'une compensation à court terme des altérations multigénérationnelles induites par les PCB-NDL<sub>i</sub> grâce à l'existence des mécanismes compensatoires précoces (Rice and Barone, 2000). Cependant, les effets nuisibles persistants de ces produits neurotoxiques à long terme pourraient être inévitables.

La coordination locomotrice a été testée à l'âge juvénile et à la péri-adolescence chez les souris F1 et F2. A l'âge juvénile, une modification multigénérationnelle transitoire de la coordination locomotrice a été observée. Chez la génération F1, les souris femelles exposées à la dose 10 ng/kg de PCB-NDL<sub>i</sub> ont chuté du rouleau en rotation plus rapidement que les souris témoins durant la phase d'entraînement du test de *Rotarod*. Cet effet a été transmis à leurs descendants mâles des générations F2 M10 indiquant l'hypothèse d'une altération de la coordination neuromusculaire et probablement de la tonicité musculaire. Cependant, dans la phase du test de *Rotarod*, les animaux F1 et F2 affectés ont récupéré leur performance normale, témoignant d'un effet transitoire mais dont la réversibilité ne peut pas être vérifiée. A la péri-adolescence, les animaux des deux générations ont montré des performances identiques aux témoins, dans le test de Wespoc, suggérant une maturation normale, à cette période l'âge, des fonctions neuro-motrices malgré les modifications détectées plus précocement et dont les conséquences tardives sont difficiles à prédire ou à écarter.

Les études épidémiologiques ont montré que l'exposition précoce aux PCB-NDL<sub>i</sub> pourrait induire des déficits développementaux majeurs, ce qui aurait des impacts sur la santé physique, mentale et comportementale à long terme (Andersen, 2003; Boucher et al., 2016; Burns et al., 2011; Jusko et al., 2014). Chez les enfants en âge scolaire, l'exposition périnatale aux PCB a induit plusieurs altérations neuropsychologiques dont des troubles de la reconnaissance visuelle, des déficits de l'attention, et des perturbations motrices (Huisman et al., 1995b; Korrick and Altshul, 1998; Walkowiak et al., 2001). Ainsi, une forte association a été montrée entre la consommation périnatale du poisson fortement contaminé en PCB et l'altération de la motricité fine chez les enfants en âge scolaire (Boucher et al., 2016). En outre, l'exposition périnatale aux PCB a provoqué chez les nourrissons une hyporéflexie, une hypotonie, des troubles du développement (Rogan et al., 1986a; Tilson et al., 1990), ainsi qu'une diminution des taux d'hormones thyroïdiennes (Brouwer et al., 1998; Koopman-Esseboom et al., 1994b; 1994a; Osius et al., 1999).

Une exposition prénatale aux PCB est souvent associée à des effets néfastes sur le développement moteur, en particulier sur la fonction de motricité globale, évaluée à l'aide de l'indice de développement psychomoteur de Bayley (Koopman-Esseboom et *al.*, 1996; Rogan and Gladen, 1991; Walkowiak et *al.*, 2001). Le suivi des enfants exposés durant la période prénatale aux PCB a mis en évidence un retard transitoire de développement psychomoteur à l'âge de 3 et 7 mois puisqu'il a disparu à l'âge de 18 mois (Koopman-Esseboom et *al.*, 1996). Burns et *al.*, (2011) ont montré que la concentration élevée des PCB dans le sang maternel, au cours de la période gestationnelle, a été associée à un retard de croissance durant la période pré-pubère, ce qui pourrait affecter la santé générale tardivement lors de l'adolescence.

D'un autre côté, l'exposition lactationnelle aux PCB a induit une réduction de la maturité neuromusculaire des nouveau-nés avec d'autres altérations telles que le retard de la maturité motrice, le développement des réflexes avec une grande fréquence des réflexes de sursaut (Fein et *al.*, 1984; Jacobson et *al.*, 1984), et des réponses moins matures du système neurovégétatif par rapport aux bébés témoins (Lonky et *al.*, 1996). Dans une étude de cohorte menée dans l'est de la Slovaquie, il a été démontré que l'exposition post-natale aux PCB est associée à une fonction cochléaire altérée chez les enfants de 45 mois, révélée par les émissions otoacoustiques des produits de distorsion (Jusko et *al.*, 2014).

Dans une étude japonaise, les taux sériques de PCB chez les mères ont été positivement corrélés aux déficits du développement moteur observés chez les nouveau-nés suivis jusqu'à l'âge de 6 mois. Ces déficits ont été transitoires puisqu'ils ont disparu à l'âge de 3 ans (Nakajima et *al.*, 2006). Aux Pays-Bas, la concentration élevée de PCB dans le lait maternel (430 µg/l) a été associée à un pourcentage élevé d'hypotonie néonatale chez les nourrissons (Huisman et *al.*, 1995b). Des études menées en Caroline du Nord ont montré que l'exposition postnatale à des niveaux élevés de PCB dès la naissance jusqu'à l'âge de 2 ans serait à l'origine des déficits psychomoteurs chez les enfants (Gladen et *al.*, 1988; Rogan et *al.*, 1987; 1986a).

Malgré l'association entre l'exposition précoce aux PCB et l'altération du développement psychomoteur pendant l'enfance (Forns et *al.*, 2012b; Koopman-Esseboom et *al.*, 1996; Rogan and Gladen, 1991; Walkowiak et *al.*, 2001), la plupart des études de la fonction motrice évaluée au-delà de l'enfance n'a pas réussi à trouver des associations significatives, même en présence d'effets cognitifs (Despres et *al.*, 2005; Forns et *al.*, 2012b; Grandjean et *al.*, 2012; Jacobson et *al.*, 1990).

Les expérimentations animales ont montré que l'exposition périnatale aux PCB induit différents types d'altérations motrices (Harada, 1976; Rogan *et al.*, 1988; Tilson *et al.*, 1979). L'exposition précoce au PCB 138 ou 180 a altéré l'activité locomotrice sans affecter la coordination motrice. Par contre, l'exposition au PCB 52 a altéré la coordination motrice mais pas l'activité locomotrice (Boix *et al.*, 2010; 2011). Les effets différentiels sur l'activité et la coordination motrice sont dus à des différents mécanismes moléculaires. Le cervelet joue un rôle important dans plusieurs aspects de la fonction motrice. Des déficits au niveau des réflexes musculaires, de la tonicité, de la motricité globale indiquent la présence des dommages cérébelleux (Ribas-Fito *et al.*, 2001; Roegge and Schantz, 2006). Par exemple, une altération de la coordination motrice est associée à une amélioration de la transmission GABAergique dans le cervelet (Boix *et al.*, 2010). Par contre, l'activité motrice réduite est associée à une modulation altérée de la dopamine extracellulaire dans le noyau accumbens du cervelet (Boix *et al.*, 2011).

L'exposition périnatale aux PCB 52 ou 153 a montré une bonne corrélation entre l'altération de la coordination motrice et l'augmentation de la concentration extracellulaire de GABA (Boix *et al.*, 2010; Cauli *et al.*, 2013). Par contre, chez les rongeurs, les PCB 138 ou 180 n'affecteraient ni la coordination locomotrice ni la concentration extracellulaire de GABA du cervelet (Boix *et al.*, 2010).

Aucune étude n'a évalué l'effet neurotoxique multigénérationnel des PCB ou d'un autre polluant ou perturbateur endocrinien sur le développement sensori-moteur.

Les résultats obtenus dans le cadre de cette thèse mettent en évidence par les effets transitoires, la plasticité du système nerveux central, en développement, exposé aux faibles doses de PCB-NDL<sub>i</sub>, mais aussi la fragilité du SNC au risque neurotoxique multigénérationnel. En effet, l'exposition des souris mères F0, gestantes et allaitantes, aux PCB-NDL<sub>i</sub> a induit des modifications multigénérationnelles sur le réflexe des animaux qui sont certes transitoires mais ne signifient pas une réversibilité d'une part et une absence d'effets tardifs, d'autre part.

Dans cette étude, le niveau d'expression de l'anxiété des souris exposées aux PCB a été aussi affecté. L'effet observé sur l'anxiété a été à la fois âge, dose et sexe-dépendant. En effet, à la péri-adolescence, un effet anxiolytique-like à la dose 10 ng/kg de PCB-NDL<sub>i</sub> a été observé chez les souris mâles de la génération F1, ce qui indique l'atteinte du statut de l'anxiété et de son expression.

Par contre, à l'âge moyen, ces mêmes souris ont manifesté un comportement anxiogène. Cette forte anxiété a été transmissible aux mâles d'âge moyen de la génération F2. Il est important de souligner que cette transmission a été uniquement d'origine parentale.

Des études récentes ont montré qu'une exposition prénatale (JG 16 et 18) à l'Aroclor 1221 (1 mg/kg) provoque une diminution significative du niveau de l'anxiété chez les souris mâles jeunes adultes F1 (Bell et al., 2016; Gillette et al., 2017). En outre, une exposition postnatale à l'Aroclor 1254, aux doses 6 et 18 mg/kg, a induit un effet anxiolytique-like chez les souris juvéniles femelles F1 (Tian et al., 2011a). Par contre, l'exposition lactationnelle aux PCB-NDL<sub>i</sub>, aux doses 10 et 100 ng/kg, ont montré une augmentation significative du niveau de l'anxiété pendant la périadolescence et à l'âge adulte des souris mâles et femelles F1 (Elnar et al., 2012). Chez les enfants Inuits à l'âge préscolaire, une corrélation a été trouvée entre la tristesse et l'anxiété, et le taux de PCB 153 dans le cordon ombilicale (Plusquellec et al., 2010). L'exposition périnatale à un mélange pur de PCB (PCB 126, 138, 153 et 180), à la dose 10 mg/kg, n'a pas d'impact sur l'anxiété chez le rat adultes (Colciago et al., 2009).

Dans notre étude, nous avons relevé un effet persistant remarquable de l'exposition gestationnelle et lactationnelle des souris femelles F0 aux PCB-NDL<sub>i</sub> sur le niveau de l'anxiété des souris mâles F1 à la périadolescence et à l'âge moyen. En effet, l'induction d'un tel effet par les PCB chez les même souris à différentes tranche d'âge a déjà été mise en évidence. Erikson et Fredriksson (1996) ont montré une hypoactivité puis une hyperactivité chez les souris mâles adultes exposées pendant la période néonatale au PCB 28 (3,6 mg/kg) ou PCB 52 (4,1 mg/kg). De même, Cauli et al. (2013) ont signalé une hypoactivité chez les souris femelles jeunes adultes (JPN 60) puis une hyperactivité à l'âge adulte (JPN 210) provoquées par une exposition précoce au PCB 126 (100 ng/kg) ou PCB 153 (1 mg/kg). Lors de l'étude du risque toxicologique des substances sur la santé, en plus de la dose, il apparait qu'il est important de considérer le sexe et l'âge des individus lors de l'évaluation.

Sur la base de la consultation des données de la littérature scientifique, il n'y a aucune étude qui a évalué l'effet neurotoxique multigénérationnel des PCB sur le niveau de l'anxiété. Cependant, une étude sur les perturbateurs endocriniens a été réalisée pour évaluer l'effet multigénérationnel de la vinclozoline, sur le niveau de l'anxiété chez le rat. L'exposition prénatale (JG 8-14) à la vinclozoline (100 mg/kg) a révélé une altération transgénérationnelle d'origine parentale, de

l'anxiété et de manière sexe dépendante. Chez la génération F3, les rattes jeunes adultes et également âgées ont développé un comportement anxieux; alors que les mâles jeunes adultes n'ont montré aucun effet. Ces altérations comportementales ont été accompagnées de modifications épigénétiques d'ADN au niveau des cellules germinales mâles (Skinner et al., 2013) ainsi que des modifications transcriptomiques au niveau de l'hippocampe et de l'amygdale chez les deux sexes. Chez les mâles, 92 gènes dans l'hippocampe et 276 gènes au niveau de l'amygdale ont été transgénérationnellement altérés (Crews et al., 2012), alors que chez les femelles, 1301 gènes dans l'hippocampe et 172 gènes au niveau de l'amygdale ont été transgénérationnellement altérés (Crews et al., 2012).

Plusieurs facteurs pourraient expliquer l'altération multigénérationnelle du niveau de l'anxiété chez les souris mâles F1 et F2 suite à l'exposition précoce à la dose 10 ng/kg de PCB-NDL<sub>i</sub>. Nous pouvons citer par exemple, (i) une altération du comportement maternel des souris F0 et F1 (Guerrero-Bosagna et al., 2010b; Skinner et al., 2013; Stouder and Paoloni-Giacobino, 2010), (ii) des modifications épigénétiques au niveau des cellules germinales des souris mâles F1 transmissibles à la génération F2 (Gapp et al., 2014), (iii) une altération multigénérationnelle des hormones des souris F1 et F2 mâles telles que l'ocytocine, la corticostérone et la vasopressine ainsi que des métabolites de la testostérone (Bitran et al., 1995; Gomez et al., 2002; Picazo and Fernandez-Guasti, 1995; Walf et al., 2008). Dans ce contexte, nos résultats issus des analyses biochimiques notamment hormonales et qui indiquent une augmentation du taux de corticostérone, hormone de stress, une diminution de la sérotonine ainsi qu'une augmentation de l'activité de l'acétylcholinestérase plasmatique chez les souris anxieuses F1 d'âge moyen mettent en évidence l'altération de certains facteurs physiologiques. Il faut souligner que les différents travaux trouvent une bonne corrélation entre les mesures plasmatiques et les mesures effectués dans le cerveau des marqueurs physiologiques dosés dans cette étude.

D'autre part, nous avons constaté que le mélange de PCB-NDL<sub>i</sub> administré à la dose 1000 ng/kg aux mères gestantes et allaitantes F0 a induit des modifications multigénérationnelles du comportement de résignation, en particulier chez les souris mâles jeunes adultes F1 et F2 dont seulement les pères ont été exposés (origine paternelle), et qui s'est manifestées par un effet *dépressif-like* chez les mâles F1 et un effet *antidépresseur-like* chez les mâles F2 jeunes adultes. Aucun effet n'a été observé à l'âge moyen chez les deux générations. Ces effets ne sembleraient pas

être liés aux mécanismes de la sérotonine, neurotransmetteur impliqué dans de nombreuses fonctions d'émotions et d'humeur et en particulier dans des expressions anxio-dépressives.

Chez l'Homme, l'effet âge dépendant des PCB a déjà été signalé dans deux études épidémiologiques qui ont révélé un effet *dépressif-like* uniquement chez les personnes âgées (Fitzgerald et al., 2008) mais pas chez les adultes (Strøm et al., 2014). Chez les rongeurs et selon les résultats de nos études, un comportement *dépressif-like* sexe dépendant a été détecté chez les souris mâles adultes F1 exposées pendant la période périnatale, via leurs mères F0, aux poissons contaminés contenant entre autres les PCB-NDL<sub>i</sub> aux doses 85, 216 et 400 ng/kg (Soualeh et al., 2017). Il faut aussi rappeler que l'effet de l'exposition périnatale aux PCB-NDL<sub>i</sub> a été dose dépendant. En effet, l'exposition périnatale à la dose 10 ng/kg de PCB-NDL<sub>i</sub> n'a pas altéré le comportement de résignation chez les souris jeunes adultes et d'âge moyen de deux générations F1 et F2. Ce résultat paraît en concordance avec nos études antérieure qui n'ont montré aucun effet sur le comportement de résignation chez les souris F1 d'âge moyen suite à l'exposition lactationnelle à la dose 10 ng/kg de PCB-NDL<sub>i</sub> (Elnar et al., 2012).

D'après l'ensemble des résultats issus de notre étude, on pourrait conclure que l'exposition précoce aux PCB pourrait induire une altération multigénérationnelle du comportement de résignation qui pourrait être dose, âge et sexe dépendant. Cependant, l'exposition précoce à la DJT (10 ng/kg) n'a pas eu un effet sur le comportement de la résignation des souris jeunes adultes et d'âge moyen F1.

Chez l'Homme, l'effet des PCB sur l'humeur a été bien étudié, cependant les résultats obtenus sont souvent en contradiction. Par exemple, Fitzgerald et al. (2008) ont trouvé une association entre la consommation du poisson contaminé aux PCB et la dépression relevée chez les personnes de 55 à 74 ans. En revanche plusieurs études épidémiologiques n'ont trouvé aucune association entre l'exposition périnatale aux PCB et la dépression (Strøm et al., 2014 ; Santiago-Rivera et al., 2007).

Il est difficile de comparer et de discuter nos résultats avec d'autres travaux puis que l'effet multigénérationnel des PCB ou celui des perturbateurs endocriniens sur l'humeur, n'aurait pas été étudié auparavant selon nos données bibliographiques.

Au niveau des tests sur les activités motrices, aucun changement n'a été détecté chez les souris F1 d'âge moyen exposées durant la période périnatale, via leurs mères F0, aux doses 10 et 1000 ng/kg PCB-NDL<sub>i</sub>. De même, leurs descendants F2 d'âge moyen n'ont montré aucun effet dans le test de l'Open field. Ainsi, tous les changements significatifs ultérieurement observés sur l'anxiété chez les souris F1 et F2 ne sont pas liés à des simples modifications au niveau de leur activité. Nous avons précédemment aussi constaté chez la progéniture jeune adulte et adulte F1 exposée via l'allaitement aux PCB-NDL<sub>i</sub> (1, 10 et 100 ng/kg) que l'activité motrice n'a pas été altérée (Elnar et *al.*, 2012). Selon d'autres travaux, il a été aussi mis en évidence qu'une exposition périnatale au mélange de PCB (PCB 126, 138, 153 et 180), à la dose 10 mg/kg, n'a pas affecté l'activité locomotrice des rats adultes F1 (Colciago et *al.*, 2009). Par contre, l'exposition gestationnelle et lactationnelle au PCB 153 (1 mg/kg) ou PCB 126 (100 ng/kg) a induit une hyperactivité chez les rats mâles et femelles adultes (Cauli et *al.*, 2013). L'exposition lactationnelle au mélange de PCB-NDL<sub>i</sub> (PCB 52, 138, 180) a induit une hyperactivité à la fois chez les mâles et les femelles adultes F1 (Boix et *al.*, 2010). Eriksson et Frederiksson (1996) ont révélé qu'une exposition postnatale aiguë (JPN 10) au PCB 28 (3,6 mg/kg) ou PCB 52 (4,1 mg/kg), a provoqué une hypoactivité puis une hyperactivité chez les souris adultes mâles. Cependant, l'exposition périnatale aux anguilles contaminées aux PCB (85, 216 et 400 ng/kg) a induit une hyperactivité sexe dépendante qui n'a touché que les souris femelles de la génération F1 vers l'âge adulte avancé (JPN 195) et l'âge moyen (JPN 305-329) (Dridi et *al.*, 2017). Le phénotype hyperactif n'a pas été détecté chez les femelles à JPN 47 (la période de préadolescence) et à JPN 90-92 (âge adulte) (Dridi et *al.*, 2017).

Par ailleurs, des études épidémiologiques ont montré que l'exposition durant la période développementale aux PCB pourrait affecter l'activité motrice. Par exemple, l'accident tragique suite à l'ingestion de l'huile de riz contaminée au PCB par des femmes japonaises enceintes a induit une hypoactivité chez leurs enfants (Harada, 1976). Alors qu'une hyperactivité a été trouvée chez les enfants issus des femmes taïwanaises exposées durant la gestation à l'huile de riz contaminée au PCB (Chen et *al.*, 1994). Chez le rat, Boix et *al.*, (2011) ont lié l'altération de l'activité motrice à l'altération de la modulation de la dopamine extracellulaire par les récepteurs métabotropiques du glutamate dans le noyau accumbens. Une autre étude de l'effet multigénérationnel des perturbateurs endocriniens sur l'activité locomotrice a été réalisée sur la vinclozoline et a montré que l'exposition prénatale (JG 8-14) de la génération F1 à la dose 100 mg/kg de la vinclozoline a provoqué une

augmentation de l'activité et de l'impulsivité des rats mâles jeunes adultes de la génération F3 (Skinner et al., 2008). Cet effet a été accompagné des modifications transgénérationnelles de l'expression génique au niveau du cerveau des rats mâles jeunes adultes (Skinner et al., 2008).

Dans le cadre de ce travail de thèse, nous avons également tenté d'étudier l'impact de l'exposition précoce aux PCB sur la sociabilité ainsi que la préférence pour la nouveauté sociale chez les deux générations F1 et F2 par le test de compartiment à trois chambres (Moy et al., 2009). Même si les effets du PCB ont été limités, nous avons relevé qu'il y a eu une altération du comportement social aussi bien chez les souris jeunes adultes que d'âge moyen de la génération F1. A l'âge moyen, cette altération a été constatée également chez la génération F2 transmissible via leurs mères et/ou leurs pères.

Chez la génération F1, une altération du niveau de la sociabilité a été démontrée chez les souris mâles jeunes adultes exposées aux doses 10 et 1000 ng/kg de PCB-NDL<sub>i</sub> ainsi que chez les souris femelles d'âge moyen exposées à la dose 10 ng/kg de PCB. Chez la génération F1 des mâles d'âge moyen, exposés aux PCB-NDL<sub>i</sub> à la dose 1000 ng/kg, nous avons constaté une réduction de la sociabilité par rapport aux souris témoins. Chez la génération F2, une altération post-générationnelle du niveau de la sociabilité a été démontrée, manifestée par une augmentation du niveau de ce comportement chez les souris femelles F2 et l'absence d'effet chez leurs mères F1, respectivement, exposés à la dose 1000 ng/kg de PCB-NDL<sub>i</sub>. Les souris mâles et femelles F2 issues des parents exposés aux doses 10 et 1000 ng/kg de PCB, respectivement, ont ainsi montré une altération significative du niveau de la sociabilité malgré que l'un de leurs parents n'ait montré aucune modification du niveau de la sociabilité. Cela pourrait être expliqué par le fait que les souris F1 exposées aux PCB et non-présentant des altérations sociales seraient porteuses par leurs cellules germinales ces altérations qui apparaissent plus tard chez la génération suivante.

Par ailleurs, une altération du niveau de la préférence pour la nouveauté sociale a été observée chez les souris mâles jeunes adultes et d'âge moyen de la génération F1 exposés à la dose 10 ng/kg de PCB ainsi que chez les souris mâles et femelles F1 d'âge moyen exposées à la dose 1000 ng/kg de PCB. Cependant, chez les générations F2, l'altération du niveau de la préférence pour la nouveauté sociale, a été sexe dépendante puisqu'elle ne touchait que les souris mâles. Une transmission multigénérationnelle de l'altération du niveau de la préférence pour la nouveauté sociale a été trouvée chez les souris mâles F2 issues de deux parents exposés à la dose 1000 ng/kg

de PCB-NDL. Ainsi, une altération multigénérationnelle du niveau de la préférence pour la nouveauté sociale a été trouvée chez les souris mâles F2 issues des mères exposées à la dose 1000 ng/kg de PCB-NDL. Cependant, une altération multigénérationnelle transmissible a été démontrée, manifestée par une augmentation du niveau de la préférence pour la nouveauté sociale chez les souris mâles F1 exposées aux doses 10 et 1000 ng/kg de PCB et une diminution du niveau de ce comportement chez leurs descendants mâles F2. Les souris mâles F2 issues des mères exposées aux doses 10 ng/kg de PCB, ont exhibé une altération post-générationnelle de la préférence pour la nouveauté sociale, qui s'est présentée par une diminution du niveau de ce comportement chez ces mâles F2 et l'absence d'effet chez leurs mères F1. Les souris mâles F2 d'âge moyen issues des parents exposés à la dose 10 ng/kg de PCB-NDL<sub>i</sub> ont montré une augmentation significative du niveau de la préférence pour la nouveauté sociale malgré que l'un de leurs parents F1 (les mères) exposés à la dose 10 ng/kg de PCB n'ait montré aucune modification du niveau de ce comportement.

Le comportement social est un composant fondamental et adaptatif de la biologie de plusieurs espèces (Kaidanovich-Beilin et *al.*, 2011). Il est essentiel à la structure et à la stabilité des relations dans la société ainsi il permet d'augmenter la chance de se reproduire et d'améliorer le taux de survie (Provenzano et *al.*, 2016). Dans un modèle animal, plusieurs tests ont été développés pour évaluer le comportement social. Le test de compartiment à trois chambres est utilisé avec succès pour évaluer plusieurs composantes sociales, entre autres, la sociabilité, la préférence pour la nouveauté sociale et la mémoire sociale (Labrie et *al.*, 2008 ; Kaidanovich-Beilin et *al.*, 2009 ; Moy et *al.*, 2004). Dans ce test, une faible sociabilité et une réduction de la préférence pour une nouveauté sociale sont interprétées souvent comme une conséquence d'une importante anxiété sociale et d'une activité exploratrice réduite (Moy et *al.*, 2004; 2008; 2007; Pobbe et *al.*, 2012; Yang et *al.*, 2011). Une perturbation du comportement social est souvent observée dans de nombreuses maladies développementales. Si les autistes sont connus par le fait qu'ils sont peu sociables (Moy et *al.*, 2004; 2007; Pobbe et *al.*, 2012); les personnes atteintes par le syndrome de l'X fragile et le syndrome de Rett sont généralement empathiques et qualifiées qu'elles sont trop sociables (Chao et *al.*, 2010; Gantois et *al.*, 2012; Schaevitz et *al.*, 2010). Ainsi, toute modification significative du comportement social par rapport à la normale est qualifiée comme étant une perturbation.

A la marge de cette présente étude, nous avons étudié la sociabilité et la préférence pour la nouveauté sociale chez les souris CD1 non exposées (témoins), comme ce type de comportement n'est pas caractérisé pour cette souche. Une faible sociabilité a été trouvée chez les souris mâles jeunes adultes témoins, manifestée par une préférence nette de la chambre vide par rapport à la chambre sociale contenant le congénère étranger. En outre, les souris mâles et femelles jeunes adultes ont montré une faible préférence pour la nouveauté sociale. Moy et *al.*, (2007) et (2008) ont réalisé des études sur 21 souches consanguines des souris adultes avec des profils génétiques différents. Ils ont montré que la sociabilité ainsi la préférence pour la nouveauté sociale sont dépendantes de la souche étudiée. Ces chercheurs ont trouvé que les souris consanguines représentant une faible sociabilité sont caractérisées par un niveau élevé du comportement anxieux ainsi une faible locomotion exploratoire (Moy et *al.*, 2007 ; 2008). Nous avons déjà signalé une importante hétérogénéité chez les souris CD1 non consanguine mâles adultes au niveau du comportement anxieux (Bouayed et *al.*, 2009b ; Rammal et *al.*, 2008 ; Rammal et *al.*, 2010). La forte agressivité chez les souris CD1 mâles (Lofgren et *al.*, 2012) constitue une grande limitation pour étudier leur sociabilité dans le test social à une seule chambre (Hsieh et *al.*, 2017). Cependant, il est important de signaler qu'une seule récente étude a évalué la préférence sociale chez les souris CD1 mâles juvéniles (JPN 25-30) en utilisant le test du compartiment à trois chambres. Il a été constaté que le comportement social des souris CD1 est dépendant des conditions de la phase d'habituation dans le test du compartiment à trois chambres. En effet, les souris n'ont pas montré une préférence sociale quand elles ont été habituées uniquement dans la chambre centrale du dispositif, alors qu'elles ont montré une préférence sociale quand elles ont été habituées à tout le dispositif (c'est-à-dire les trois chambres du test) (Hsieh et *al.*, 2017). Il a été compliqué d'expliquer ces résultats. Cependant, les auteurs ont conclu que les souris CD1 constituent un bon modèle, du fait à leur hétérogénéité (contrairement aux souches consanguines), et donc devraient être utilisées pour évaluer le comportement sociale en effectuant cette habitation spéciale à savoir dans les trois chambres du dispositif (Hsieh et *al.*, 2017). Ainsi, la faible sociabilité trouvée chez les souris témoins CD1, dans cette présente étude, pourrait être liée à notre protocole expérimental dans lequel les souris ont été habituées uniquement dans la chambre centrale. Il faut souligner que les 2 protocoles (habituation dans la chambre centrale ou dans les 3 chambres) sont deux protocoles qui sont utilisés par les chercheurs, et que c'est la première fois qu'il a été montré qu'une souche est sensible à un type d'habituation. Par exemple, le comportement social des souris de la souche

consanguine C57 dans le test du compartiment à trois chambres n'est pas dépendant de la condition de l'habitation. Notre présente étude a montré que les souris mâles témoins moyennement âgées sont plus sociables que les souris femelles. Par contre, des études sont nécessaires pour évaluer le comportement social chez les souris CD1 aux différents stades de vie. En comparant les souris témoins jeunes adultes avec celles moyennement âgées, nous n'avons pas trouvé une diminution du comportement social lié au vieillissement des souris CD1, ce qui est en accord avec les données limitées fournies sur les interactions sociales des rongeurs à l'âge moyen, qui révèlent que les interactions à cet âge (9 mois) sont semblables à celles trouvées à l'âge adultes (3 mois). Par contre les déficits sociaux liés au vieillissement n'ont été détectés que plus tard chez les rats âgés (18 et 24 mois) (Perkins *et al.*, 2016).

Peu sont les études qui ont évalué l'effet des PCB sur le comportement social. Reilly *et al.*, (2015) ont trouvé aussi des effets limités de l'exposition prénatale à l'Aroclor 1221 (0,5 mg/kg) sur le comportement social des souris adultes F1. Bell *et al.* (2016) n'ont trouvé aucun effet significatif sur le comportement social chez les rats mâles et femelles adolescents et adultes suite à l'exposition prénatale (JG 16, 18 et 20) à l'Aroclor (1 mg/kg). Par contre, l'exposition à l'Aroclor (1 mg/kg) pendant la période juvénile (JPN 24, 26 et 28) a induit une diminution du niveau de la sociabilité, d'une façon sexe et âge dépendante puisqu'elle a affecté uniquement les ratte adolescentes mais pas les adultes (Belle *et al.*, 2016). En outre, l'exposition prénatale ou juvénile à l'Aroclor (1 mg/kg) n'a pas affecté le comportement de la préférence pour la nouveauté sociale chez les rats adolescents et adultes (Belle *et al.*, 2016). Chez les enfants, des études ont trouvé une corrélation entre l'exposition prénatale aux PCB et l'altération du comportement de jeu stéréotypé aussi bien pour les garçons (une féminisation) que pour les filles (une masculinisation) (Vreugdenhil *et al.*, 2002; Winneke *et al.*, 2014).

Comme aucune étude n'a évalué l'effet neurotoxique multigénérationnel des PCB sur le comportement social, nous avons tenté de prendre comme étude référence l'effet des perturbateurs endocriniens tels que le bisphénol A (BPA). L'exposition périnatale des rats au BPA a induit des modifications transgénérationnelles de la sociabilité jusqu'à la génération F4. En effet, les rats juvéniles de la génération F1 ont exhibé une diminution significative de l'interaction sociale ; tandis que les rats juvéniles des générations F2 et F4 ont établi plus d'interaction sociale. Avec cette sociabilité, une réduction transgénérationnelle de l'expression génique des récepteurs des

œstrogènes, de l'ocytocine et de la vasopressine au niveau du cerveau a été observée (Wolstenholme et *al.*, 2012).

Dans une autre étude, Franklin et *al.*, (2011) ont montré que l'exposition précoce au stress altère le comportement social à travers des générations. En effet, une séparation imprévisible de la mère associée à un stress maternel pendant la période néonatale et postnatale (JPN 1-14) provoquent une anxiété sociale et une altération de la mémoire sociale chez les souris mâles adultes des générations F2 et F3. L'effet a été donc transgénérationnel d'origine paternel. En plus, ces souris ont présenté aussi une altération de la liaison du récepteur de la sérotonine (5HT<sub>1A</sub>) et du taux de sérotonine dans le cerveau.

Dans nos études, les résultats sexe dépendants pourraient être dus à des mécanismes de transmission spécifiques et différentielles entre les mâles et les femelles ou à la différence des fonctions cérébrales organisées, pendant la période développementale précoce, par les actions différentielles des hormones stéroïdes. L'exposition aux PCB pendant la période critique du développement cérébral perturbe la fonction organisatrice irréversible des hormones stéroïdes impliquées dans plusieurs fonctions telles que les fonctions neuroendocriniennes et comportementales, le dimorphisme sexuel dans certaines régions du cerveau, la formation synaptique et la connexion neuronale. Cependant, l'exposition aux perturbateurs endocriniens à l'âge adulte perturbe l'action activatrice réversible de ces hormones (Andersen, 2003; Gioiosa et *al.*, 2013; Palanza et *al.*, 2016), ce qui entraîne plusieurs altérations physiologiques, mécanistiques et comportementales y compris le dimorphisme sexuel ou l'élimination des différences entre les 2 sexes au cours de leurs stratégies comportementales d'adaptation au stress engendré par l'exposition.

Plusieurs facteurs pourraient expliquer la divergence entre les résultats des différentes études, en particulier par rapport aux données sur les PCB au cours de la génération F1. Par exemple, (i) la durée d'exposition aux PCB (aigue, subaigüe ou chronique). (ii) La période d'exposition aux PCB (prénatale, postnatale, périnatale, lactationnelle, gestationnelle, néonatale) pendant laquelle le système nerveux central présente des sensibilités particulières et différentes. (iii) La forme de PCB utilisé soit en congénère individuel, en mélange pur ou en mélange industriel. (iv) La toxicité et les mécanismes de toxicité des PCB, par exemple les moins chlorés (les PCB 52 et 101) ont une toxicité plus faible de celle des plus chlorés (PCB 153 et 180) ou encore les

congénères de PCB en mélange agissent d'une manière spécifique (synergie, addition ou antagonisme) qui varie en fonction de la composition du mélange. (v) La dose de PCB administrée (dose faible, environnementale ou forte) sachant que les effets aux faibles doses ne sont pas systématiquement moins sévères que les effets de fortes doses. (vi) La voie d'administration des PCB (accès libre, gavage, injection intra-péritonéale) pourrait jouer un rôle dans les différences observées. (vii) La tranche d'âge dans laquelle l'évaluation a été réalisée.

Dans le cadre de notre travail, nous avons étudié l'effet neurotoxique multigénérationnel de la dose 10 ng/kg de PCB-NDL<sub>i</sub>, une dose correspondante à la dose journalière tolérable (DJT) (10 ng/kg) chez l'Homme (AFSSA, 2007), et la dose 1000 ng/kg, qui correspond à l'exposition lactationnelle des nourissons dans 18 pays européens (EFSA, 2005b). Pour les 6 PCB-NDL, la DJT a été retenue en se basant sur celle des PCB totaux de 20 ng/kg, puisque les 6 PCB-NDL représentent environ 50 % de tous les PCB dans la matrice alimentaire (AFSSA, 2007). Ainsi, la DJT des PCB-NDL<sub>i</sub> est tout simplement une estimation qui n'est pas basée sur une étude toxicologique comme celle des PCB totaux. En revanche, nous avons bien montré, dans notre présente étude, que l'exposition précoce à la dose 10 ng/kg de PCB-NDL<sub>i</sub> a induit des effets neurodéveloppementaux et comportementaux multigénérationnels toxiques tels que l'altération transitoire de la coordination locomotrice à l'âge précoce, et également l'altération de l'anxiété, de l'humeur et du comportement social aux âges adulte et moyen à travers des générations. Par ailleurs, nous avons déjà montré dans une étude antérieure que des doses plus faibles que 10 ng/kg, telles que 1 ng/kg, a induit aussi un comportement anxieux persistant chez les souris exposées durant l'allaitement aux PCB-NDL<sub>i</sub> (Elnar et al., 2012).

L'adaptation fœtale à l'environnement maternel et intra-utérin affine la structure et la fonction d'un organe mais pourrait conduire à des altérations physiologiques tardives et permanentes à l'âge adulte et même avancé (Swanson et al., 2009). Donc, la prédisposition aux maladies à l'âge adulte pourrait être « programmée » dans l'utérus, ce qui rentre dans le concept de l'origine embryo-fœtale des maladies des adolescents, des adultes et même des personnes âgées. Des études épidémiologiques ont montré un lien entre le stress maternel et l'augmentation de risque de développer une schizophrénie tardive chez la progéniture (Huttunen and Niskanen, 1978; Khashan et al., 2008; Khashan et al., 2011; Kinney et al., 1999; Myhrman et al., 1996; Selten et al., 1999; van Os and Selten, 1998). Les mécanismes moléculaires de la programmation fœtale restent

peu connus mais il semble que les mécanismes inflammatoires jouent un rôle important dans la programmation via des modifications épigénétiques (Bolton *et al.*, 2012; Spencer, 2013).

Au cours des deux dernières décennies, les études épigénétiques sont devenues un domaine prometteur pour révéler le mystère de la programmation fœtale et surtout de l'impact des facteurs de l'environnement sur notre matériel héréditaire que nous pensions stable et constant. Beaucoup de modifications épigénétiques surviennent pendant le développement et restent stables toute la vie, ainsi il a été démontré que les influences environnementales, pendant la vie postnatale précoce, pourraient provoquer des méthylations de l'ADN dans les régions du promoteur des gènes codants aussi bien pour la synthèse des glucocorticoïdes et ses récepteurs au niveau du cerveau (McGowan *et al.*, 2009; Weaver *et al.*, 2004). Ainsi, l'exposition au stress maternel pendant la gestation pourrait influencer la densité des récepteurs des glucocorticoïdes dans certaines régions du cerveau particulièrement l'hippocampe et ensuite induire une altération permanente de la sensibilité au stress dans le cerveau de fœtus (McGowan *et al.*, 2009; Weaver *et al.*, 2004) à travers des mécanismes épigénétiques (Babenko *et al.*, 2012a; Weaver *et al.*, 2004). Par conséquent, ces modifications épigénétiques touchant l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien rendent les individus ultra-sensibles aux différents éléments stressant puisqu'ils synthétiseraient la corticostérone (cortisol chez l'Homme) d'une façon plus élevée, et aussi le cerveau exprimerait plus de récepteurs pour cette hormone de stress en lien entre autres avec l'anxiété, le comportement social et le comportement de résignation.

Les perturbateurs endocriniens, de plus en plus étudiés, s'avèrent également jouer un rôle important dans l'impact de toxicité sur le développement cérébral et l'étiologie des maladies. D'un autre côté, plusieurs études ont montré l'intervention des perturbateurs endocriniens dans la programmation transgénérationnelle et leur capacité critique à modifier la régulation épigénétique (Anway *et al.*, 2005 ; Guerrero-Bosagna *et al.*, 2010 ; Stouder et Paoloni-Giacobino, 2010 ; Skinner *et al.*, 2013 ; Wolstenholme *et al.*, 2012). Ainsi, nous émettons l'hypothèse que l'exposition aux perturbateurs endocriniens pendant la période critique de développement peut affecter la santé mentale de la progéniture tout au long de la vie ainsi pour les générations suivantes à partir des changements héréditaires épigénétiques.

Plusieurs perturbateurs endocriniens, tels que la vinclozoline et le BPA, ont été évalués dans une étude transgénérationnelle et ils ont montré leur implication dans la transmission des troubles

neuropsychiques complexes à travers des générations y compris l'anxiété, la dépression, l'évitement social et les troubles cognitifs (Anway et *al.*, 2005 ; Guerrero-Bosagna et *al.*, 2010 ; Stouder et Paoloni-Giacobino, 2010 ; Skinner et *al.*, 2013 ; Wolstenholme et *al.*, 2012).

Une seule étude a été réalisée pour évaluer la toxicité multigénérationnelle des PCB sur les fonctions reproductrices. Steinberg et *al.*, ( 2008) qui a démontré que l'exposition précoce (JG 16-18) à la dose 1 mg/kg de l'Aroclor (A1221) altère la physiologie reproductive des rats femelles de deux générations F1 et F2. Chez les femelles F1, une augmentation de la concentration sérique de l'hormone lutéinisante (LH) a été trouvée. Cependant, chez la génération F2, en plus de la LH, une altération de la progestérone et une diminution de poids de l'utérus et de l'ovaire ont été révélées (Steinberg et *al.*, 2008). Trois hypothèses pourraient expliquer les effets reprotoxiques multigénérationnels de l'A1221 trouvés chez les rats femelles F1 et F2 : (i) l'exposition à l'A1221 induirait des effets génotoxiques au niveau des cellules germinales femelles de la génération F1. (ii) l'A1221 induirait des méthylations épigénétiques des promoteurs des gènes au niveau des cellules germinales femelles de fœtus F1, qui se transmettent à la génération F2, (iii) l'exposition périnatale à l'A1221 altérerait les niveaux des hormones dans le sang durant la gestation des mères F1, ce qui expose les souris fœtus F2 à un environnement hormonal inadéquat.

# *Conclusion générale*

Le travail de la présente thèse constitue une première approche originale d'une étude épigénétique comportementale et développementale. L'objectif étant d'évaluer les effets neurotoxiques multigénérationnels, liés à l'exposition précoce et répétée des mères F0 gestantes et allaitantes à un mélange de PCB-NDL indicateur, à deux faibles doses environnementales similaires à celles trouvées naturellement dans les matrices alimentaires de type poissons contaminés, sur le neuro-développement des générations suivantes F1 et F2 n'ayant pas été directement exposées. La deuxième originalité de ce travail porte sur le choix des doses puisque nous avons opté pour évaluer la neurotoxicité de la dose 10 ng/kg correspondant à la DJT fixée chez l'Homme (AFSSA, 2007), mais dans des conditions d'une exposition précoce et chronique, surtout qu'auparavant aucune études expérimentales ni épidémiologiques n'ont été conduites dans ces mêmes conditions. La troisième originalité de cette étude est d'évaluer l'origine parentale de la transmission des effets neurotoxiques de la génération F1 à la génération F2 en établissant différentes modalités d'accouplement des souris F1 dont seuls leurs mères F0 ont été exposés aux PCB pendant la gestation et l'allaitement.

Nous avons évalué les effets neurotoxiques sur des souris F1, induits par l'exposition de souris mères F0, pendant la période gestationnelle et lactationnelle, aux PCB-NDL<sub>i</sub>, en particulier sur le développement moteur, le comportement individuel et social, l'anxiété, l'humeur dès la naissance et jusqu'à l'âge moyen des souris de deux générations F1 et F2. Nous avons prévu au début de cette étude d'explorer également les marqueurs moléculaires épigénétiques pour les corrélés aux effets sur le comportement, la cognition et le développement mais le coût et la durée plus longue de ces études nous ont contraint à opter plus pour l'approche comportementale des impacts épigénétiques, néanmoins quelques marqueurs biochimiques ont été dosés dans le sérum des souris F1 à l'âge moyen.

Il apparaît au travers cette première étude préliminaire et originale que l'exposition périnatale des souris F1 aux PCB-NDL<sub>i</sub>, au travers leurs mères F0, a induit une altération transitoire multigénérationnelle, d'origine parentale et surtout maternelle, se traduisant expérimentalement par un impact sur le réflexe de retournement chez les souriceaux des deux générations F1 et F2. A l'âge juvénile, une altération transitoire multigénérationnelle, d'origine maternelle, de la coordination locomotrice a été également relevée chez les souris F1 et F2. Cette étude a également mis en évidence une altération multigénérationnelle, d'origine parentale, du comportement de résignation,

sexe-dépendante, et affectant particulièrement les mâles de deux générations. Ces derniers effets sont qualifiés de « *dépressif-like* » chez mâles adultes F1 et « *anti-dépressif-like* » chez les mâles adultes F2. Ainsi, une altération du niveau de l'anxiété, sexe-dépendante a été, également mise en évidence chez les souris F1 mâles, à la périadolescentes et à l'âge moyen et exposées durant la période périnatale, via leurs mères, aux PCB-NDL<sub>i</sub>. Le niveau élevé de l'anxiété évaluée à l'âge moyen des souris mâles de F1 a été constaté chez les souris mâles F2 (d'âge moyen), cela indique un transfert de cette anxiété, uniquement via les pères F1.

Les souris mâles et femelles F1 exposées aux PCB-NDL<sub>i</sub> durant la période périnatale, via leurs mères, ont montré une altération du comportement social et qui a été retrouvée chez les souris de la génération F2 via l'un ou les deux parents F1. Aucun impact n'a été relevé, dans nos conditions expérimentales, sur l'activité générale et le comportement agressif des animaux F1 et F2.

Ces travaux ont aussi permis d'observer un fait très particulier et rarement rapporté et qui s'est traduit par la manifestation de plusieurs altérations sur le comportement, la coordination locomotrice et les interactions sociales relevées généralement chez la génération F2 malgré l'absence d'effets chez leurs parents F1 exposés aux PCB-NDL<sub>i</sub> via les mères F0.

Le dosage des marqueurs biochimiques dans le serum des souris F1 d'âge moyen a révélé une augmentation du niveau de corticostérone chez les mâles et les femelles exposées aux doses 10 et 1000 ng/kg de PCB-NDL<sub>i</sub>. Cela suppose une augmentation du niveau du stress psychologique et probablement physiologique tel que le stress oxydatif, suite à l'exposition aux PCB-NDL<sub>i</sub>. L'exposition aux doses 10 et 1000 ng/kg de PCB-NDL<sub>i</sub> a aussi augmenté l'activité de l'acétylcholinestérase chez les souris mâles et femelles, alors qu'une diminution du niveau de sérotonine a été révélée chez les femelles et uniquement les mâles exposés à la dose 10 ng/kg. En outre, une augmentation du niveau de myéloperoxydase a été trouvée uniquement chez les souris femelles exposées à la dose 1000 ng/kg de PCB.

Nous pouvons conclure que l'exposition précoce aux faibles doses de PCB-NDL<sub>i</sub> pourrait perturber le système endocrinien de la progéniture F1. Le dosage des marqueurs biochimiques réalisés chez la génération F1 devraient être complétés en effectuant les mêmes dosages chez la génération F2 afin de vérifier si l'altération hormonale serait aussi multigénérationnelle.

En conclusion, nous pourrions confirmer que l'exposition précoce aux PCB-NDL<sub>i</sub>, à la dose 10 ng/kg, dose correspondante à la DJT fixée chez l'Homme par AFSSA (2007) a induit des effets neurotoxiques à court et à long terme, ces effets qui se sont révélés également au niveau multigénérationnel puisqu'ils ont affecté les générations F1 et F2 issus des mères F0 exposées.

Ces différents constats très importants nous permettent à conclure que l'exposition gestationnelle et lactationnelle des souris F0 aux faibles doses de PCB-NDL<sub>i</sub> provoquerait des altérations neuro-développementales, comportementales et sociales multigénérationnelles à court et à long terme chez les souris de deux générations F1 et F2. Certaines de ces altérations n'apparaissant pas à la deuxième génération (F1), elles ne se manifestent qu'à la troisième génération (F2), ce qui nous amène à supposer un impact épigénétique s'exprimant seulement à la deuxième génération. Cette hypothèse demande à être confirmée et constitue une importante piste pour l'impact des expositions environnementale et alimentaire précoce et leur impact épigénétique sur les générations suivantes. Des études sur la génération suivante F3 couplée à des études épigénétiques moléculaires pourraient contribuer à apporter un éclairage supplémentaire sur l'impact épigénétique transgénérationnelle des expositions précoces, chronique et aux très faibles doses de contaminants alimentaires et environnementaux.

D'un point de vue pratique et concret, la consommation régulière de matrices de types poissons contaminés, entre autres par les PCB-NDL<sub>i</sub>, par des femmes gestantes et allaitantes constitue une voie principale de transfert de PCB à leur progéniture engendrant de nombreuses altérations neurologiques et psychologiques précoces et tardives aussi bien transitoires que persistants et transmissibles à travers des générations.

L'originalité de ce travail de recherche réside essentiellement dans une approche développementale, cognitive et comportementale, pour l'évaluation des effets neurotoxiques et surtout multigénérationnelles (ou épigénétique) des PCB-NDL<sub>i</sub> et également la possibilité de discrimination de l'origine parentale de ces effets.

D'autres points originaux ont composé ce travail tels que :

- La précocité et la chronicité de l'exposition et les études des impacts tardifs

- Le choix des niveaux d'exposition environnementales qui miment étroitement l'exposition humaine aux PCB-NDL<sub>i</sub> dans les matrices alimentaires de type poissons contaminés.

- Le choix de la dose journalière tolérable (10 ng/kg) chez l'Homme fixée par AFSSA en 2007.

- La mise en évidence de la sensibilité et la vulnérabilité particulière du système nerveux central à l'action des PCB-NDL<sub>i</sub> pendant la période périnatale (gestation et allaitement).

Comme nous l'avons indiqué dans le paragraphe d'avant, les résultats de cette étude soulèvent plusieurs interrogations et ouvrent de nouvelles perspectives de travail, telles que la pertinence de rechercher les mécanismes d'action moléculaire potentiels par lesquels les PCB-NDL pourraient exercer leur neurotoxicité à travers les générations et en absence des expositions des générations suivantes (multigénérationnelle), tels que l'identification du profil de méthylation des séquences ADN, impliquées dans les altérations neuro-comportementales observées chez les souris F1 et F2, au niveau de leurs cellules germinales mâles et femelles, ainsi, la détermination des modifications épigénétiques des histones associées à des séquences d'ADN impliquées dans les altérations neuro-développementales et comportementales, trouvées chez les souris de deux générations F1 et F2, au niveau des leurs cellules germinales mâles et femelles.

Le nombre de questions et d'hypothèses issues de cette thèse témoignent de l'intérêt que suscite la question de l'impact épigénétique des expositions précoces et chroniques aux faibles doses qui n'est qu'à ses débuts.

## *Références bibliographiques*

- Abballe, A., et al., 2008. Persistent environmental contaminants in human milk: concentrations and time trends in Italy. *Chemosphere*. 73, S220-S227.
- AFSSA, 2002. Données récentes sur l'évaluation des dangers liées à la présence de PCB dans l'alimentation.
- AFSSA, 2003. Avis du 8 avril 2003 sur l'existence éventuelle d'une corrélation significative entre les teneurs des différents congénères de PCB et le rapport cité dans l'avis intitulé „Données récentes sur l'évaluation des dangers liés à la présence de PCB dans l'alimentation, J.P. Cravedi and J.F. Narbonne, Décembre 2002”. Available from: [www.anses.fr](http://www.anses.fr) .
- AFSSA, 2006a. Avis de l'afssa du 9 janvier 2006 relatif à l'exposition de la population française aux Dioxines, furannes et PCB de type dioxine (saisine n° 2005-SA-0372).
- AFSSA, 2007. Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à l'établissement de teneurs maximales pertinentes en polychlorobiphényles qui ne sont pas de type dioxine (PCB « non dioxin-like », PCB-NDL) dans divers aliments. Maisons-Alfort, Saisine n° 2006-SA 0305. Available from: [www.anses.fr](http://www.anses.fr) .
- AFSSA, 2008. Appui scientifique et technique de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relative au plan d'échantillonnage national des PCBs dans les poissons de rivière: proposition de méthodologie. Maisons-Alfort, 05 février 2008. Available from: [www.anses.fr](http://www.anses.fr).
- Albro, P. W., Fishbein, L., 1972. Intestinal absorption of polychlorinated biphenyls in rats. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 8, 26-31.
- Altman, J., Sudarshan, K., 1975. Postnatal development of locomotion in the laboratory rat. *Animal Behaviour* 23, 896-920.
- AMAP, 2000. PCB in the Russian Federation: Inventory and Proposals for Priority Remedial Actions. Published by: Centre For International Projects (CIP), Moscow. .
- AMAP, 2009. Assessment 2007: Oil and Gas Activities in the Arctic - Effects and Potential Effects. Arctic Monitoring and Assessment Programme, Oslo, Norway.
- Andersen, W. L., 2003. Harbour porpoise (*Phocoena phocoena*) in the North Atlantic: distribution and genetic population structure. In: *Harbour Porpoises in the North Atlantic*. NAMMCO Scientific publications. 5, 11-29.
- Anderson, D. M., et al., 1990. Molecular cloning of mast cell growth factor, a hematopoietin that is active in both membrane bound and soluble forms. *Cell*. 63, 235-243.
- Anderson, J. F., et al., 1987. Seasonal prevalence of *Borrelia burgdorferi* in natural populations of white-footed mice, *Peromyscus leucopus*. *Journal of Clinical Microbiology*. 25, 1564-1566.

- Arnich, N., et al., 2009a. Dietary intake of non-dioxin-like PCBs (NDL-PCBs) in France, impact of maximum levels in some foodstuffs. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 54, 287-293.
- Arnich, N., et al., 2009b. Dietary intake of nondioxin-like PCBs in France, impact on maximum levels in some foodstuffs. *Regulatory Pharmacology and Toxicology.* 54, 287-293.
- Arnold, D. L., et al., 1995. Toxicological consequences of Aroclor 1254 ingestion by female rhesus (*Macaca mulatta*) monkeys. Part 2. Reproduction and infant findings. *Food and Chemical Toxicology.* 33, 457-474.
- Arnold, D. L., et al., 1999. Toxicological consequences of feeding PCB congeners to infant rhesus (*Macaca mulatta*) and cynomolgus (*Macaca fascicularis*) monkeys. *Food and Chemical Toxicology.* 37, 153-167.
- Arnold, R., et al., 1998. Alimentary intake of selected pollutants and nitrate--results of a duplicate study in Bavarian homes for youth and seniors [Article en allemand]. *Z Ernährungswiss.* 37, 328-35.
- Asante, K. A., et al., 2011. Human exposure to PCBs, PBDEs and HBCDs in Ghana: temporal variation, sources of exposure and estimation of daily intakes by infants. *Environment International* 37, 921-928.
- Atladóttir, H. O., et al., 2007. Time trends in reported diagnoses of childhood neuropsychiatric disorders: a danish cohort study. *Archives Of Pediatrics & Adolescent Medicine.* 161, 193-8.
- ATSDR, 2000. Toxicological profile for polychlorinated biphenyls (PCBs). Atlanta, GA, US Department of Health and Human Services, Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 765.
- Aylward, L. L., et al., 2014. "Intrinsic" elimination rate and dietary intake estimates for selected indicator PCBs: Toxicokinetic modeling using serial sampling data in US subjects, 2005-2010. *Chemosphere.* 110, 48-52.
- Ayotte, P., et al., 2003. Assessment of pre- and postnatal exposure to polychlorinated biphenyls: lessons from the Inuit Cohort Study. *Environmental Health Perspectives.* 111, 1253-1258.
- Baars, A. J., et al., 2004a. Dioxins, dioxin-like PCBs and non-dioxin-like PCBs in foodstuffs: occurrence and dietary intake un The Netherlands. *Toxicology letters.* 151, 51-61.
- Baars, A. J., et al., 2004b. Dioxins, dioxin-like PCBs and non-dioxin-like PCBs in foodstuffs: occurrence and dietary intake in The Netherlands. *Toxicology Letters.* 151, 51-61.
- Baars, A. J., et al., 2001. Re-evaluation of human-toxicological. maximum permissible risk levels RIVM, Rijsinstituut voor volksgezondheid en milieu. Report. 711 701 025.
- Bakker, M., et al., 2003. Indicator PCBs in foodstuffs: Occurrence and dietary intake in The Netherlands at the end of the 20th century. Bilthoven, The Netherlands: RIVM and RIKILT.

- Bang, Y., et al., 2011. Aroclor1254 interferes with estrogen receptor-mediated neuroprotection against beta-amyloid toxicity in cholinergic SN56 cells. *Neurochemistry International*. 59, 582-590.
- Bell, M. R., et al., 2016. Two-hit exposure to polychlorinated biphenyls at gestational and juvenile life stages: 1. Sexually dimorphic effects on social and anxiety-like behaviors. *Hormones and Behavior*. 78, 168-177.
- Benarroch, E. E., 2013. Oxytocin and vasopressin: social neuropeptides with complex neuromodulatory functions. *Neurology*. 80, 1521-1528.
- Berghuis, S. A., et al., 2013. Prenatal exposure to polychlorinated biphenyls and their hydroxylated metabolites is associated with motor development of three-month-old infants. *Neurotoxicology* 38, 124-130.
- Bergkvist, C., et al., 2010. A probabilistic approach for estimating infant exposure to environmental pollutants in human breast milk. *Journal of Environmental Monitoring*. 12, 1029-1036.
- Bergman, Å., et al., 1994. Selective retention of hydroxylated PCB metabolites in blood. *Environmental Health Perspectives*. 102, 464-469.
- Bergonzi, R., et al., 2009. Distribution of persistent organochlorine pollutants in maternal and foetal tissues: data from an Italian polluted urban area. *Chemosphere* 76, 747-754.
- Bhavsar, S. P., et al., 2007. Are PCB levels in fish from the Canadian Great Lakes still declining? . *Journal of Great Lakes Research*. 33, 592-605.
- Bignall, K. E., 1974. Ontogeny of levels of neural organization: the righting reflex as a model. *Experimental Neurology*. 3, 566-573.
- Bitran, D., et al., 1995. Anxiolytic effect of progesterone is mediated by the neurosteroid allopregnanolone at brain GABAA receptors. *Journal of Neuroendocrinology*. 7, 171-177.
- Boissy, A., et al., 2007. Assessment of positive emotions in animals to improve their welfare. *Physiology & Behavior*. 92, 375-39.
- Boix, J., et al., 2010. Developmental exposure to polychlorinated biphenyls 52, 138 or 180 affects differentially learning or motor coordination in adult rats. *Mechanisms involved Neuroscience* 167, 994 - 1003.
- Boix, J., et al., 2011. Differential long-term effects of developmental exposure to polychlorinated biphenyls 52, 138 or 180 on motor activity and neurotransmission. *Gender dependence and mechanisms involved*. 58, 69-77.
- Bolton, J. L., et al., 2012. Prenatal air pollution exposure induces neuroinflammation and predisposes offspring to weight gain in adulthood in a sex-specific manner. *The FASEB Journal*. 26, 4743-4754.

- Bonefeld-Jørgensen, E. C., et al., 2001. Effect of highly bioaccumulated poly-chlorinated biphenyl congeners on estrogen and androgen receptor activity. *Toxicology*. 158, 141-153.
- Bouchard, M. F., et al., 2011. Prenatal exposure to organophosphate pesticides and IQ in 7-year-old children. *Environmental Health Perspectives*. 119, 1189-95.
- Boucher, O., et al., 2016. Altered fine motor function at school age in Inuit children exposed to PCBs, methylmercury, and lead. *Environment International*. 95, 144-151.
- Breivik, K., et al., 2007. Towards a global historical emission inventory for selected PCB congeners - a mass balance approach. *The Science of the Total Environment* 377, 296-307.
- Brouwer, A., et al., 1998. Interactions of persistent environmental organohalogenes with the thyroid hormone system: mechanisms and possible consequences for animal and human health. *Environmental Health Perspectives*. 14, 79-84.
- Brown, J., et al., 1989. Persistence of PCB congeners in capacitor workers and Yusho patients. *Chemosphere*. 19, 829-34.
- Brunelli, L., et al., 2012. Insight into the neuroproteomics effects of the food-contaminant non-dioxin like polychlorinated biphenyls. *Journal of Proteomics* 75, 2417-2430.
- Burns, J. S., et al., 2011. Serum dioxins and polychlorinated biphenyls are associated with growth among Russian boys. *Pediatrics*. 127, e59-e68.
- Byczkowski, J. Z., et al., 1994. Occupational exposure of infants to toxic chemicals via breastmilk. *Nutrition*. 10, 43-48.
- Byrnes, E. M., 2005. Transgenerational consequences of adolescent morphine exposure in female rats: effects on anxiety-like behaviors and morphine sensitization in adult offspring. *Psychopharmacology*. 182, 537-544.
- Cabana, T., et al., 1993. Prenatal and postnatal growth and allometry of stature, head circumference, and brain weight in Que´bec children. *American Journal of Human Biology*. 5, 93-99.
- Calderón-Garcidueñas, L., et al., 2008. Air pollution, cognitive deficits and brain abnormalities: a pilot study with children and dogs. *Brain and Cognition*. 68, 117-127.
- Campagna, R., et al., 2011. Cerebellum proteomics addressing the cognitive deficit of rats exposed to the food-relevant polychlorinated biphenyl 138. *Toxicological Sciences*. 123, 170-179.
- Carter, R. J., et al., 2001. Motor coordination and balance in rodents. *Current Protocols in Neuroscience*. 8.
- Caudle, W. M., et al., 2006. Polychlorinated biphenyl-induced reduction of dopamine transporter expression as a precursor to Parkinson's disease-associated dopamine toxicity. *Toxicological Sciences*. 92, 490-499.

- Cauli, O., et al., 2013. Gender differential effects of developmental exposure to methyl-mercury, polychlorinated biphenyls 126 or 153, or its combinations on motor activity and coordination. *Toxicology*. 311, 61-68.
- Cerna, M., et al., 2010. Exposure assessment of breast-fed infants in the Czech Republic to indicator PCBs and selected chlorinated pesticides: area-related differences. *Chemosphere*. 78, 160-168.
- Chen, P., et al., 1982. Comparative rates of elimination of some individual polychlorinated biphenyls from the blood of PCB-poisoned patients in Taiwan. *Food and Chemical Toxicology*. 20, 417-25.
- Chen, Y. C., et al., 1994. A 6-year follow-up of behavior and activity disorders in the Taiwan Yu-cheng children. *American Journal of Public Health*. 84, 415-21.
- Chu, I., et al., 1996a. Toxicity of 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl in rats: effects following 90-day oral exposure. *Journal of Applied Toxicology*. 16, 121-8.
- Chu, I., et al., 1996b. Toxicity of 2,4,4'-trichlorobiphenyl in rats following 90-day dietary exposure. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. 49, 301-18.
- Cimenci, O., et al., 2013. Dietary exposure of the Belgian adult population to non-dioxinlike PCBs. *Food and Chemical Toxicology*. 59, 670-679.
- CITEPA, 2006. Emissions dans l'air en France: substances impliquées dans les phénomènes d'acidification, d'eutrophisation et de pollution photochimique.
- Cogliano, V. J., 1998. Assessing the cancer risk from environmental PCBs. *Environmental Health Perspectives*. 106, 317-23.
- Cogliano, V. J., 2001. Considerations for setting Reference Values for environmental PCBs. *Press of Kentucky*. 429-435.
- Cohn, B. A., et al., 2011. Polychlorinated biphenyl (PCB) exposure in mothers and time to pregnancy in daughters. *Reproductive Toxicology*. 31, 290-296.
- Cok, I., et al., 2012. Analysis of human milk to assess exposure to PAHs, PCBs and organochlorine pesticides in the vicinity Mediterranean city Mersin, Turkey. *Environment International*. 40, 63-69.
- Colciago, A., et al., 2009. Chronic treatment with polychlorinated biphenyls (PCB) during pregnancy and lactation in the rat: Part 2: Effects on reproductive parameters, on sex behavior, on memory retention and on hypothalamic expression of aromatase and 5 $\alpha$ -reductases in the offspring. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 239, 46-54.
- Colciago, A., et al., 2006. Prenatal Aroclor 1254 exposure and brain sexual differentiation: effect on the expression of testosterone metabolizing enzymes and androgen receptors in the hypothalamus of male and female rats. *Reproductive Toxicology* 22, 738-745.

- Costa, R. M., et al., 2004. Differential corticostriatal plasticity during fast and slow motor skill learning in mice. *Current Biology*. 14, 1124-1134.
- Covaci, A., et al., 2002b. Distribution of PCBs and organochlorine pesticides in umbilical cord and maternal serum. *Science of the Total Environment*. 298, 45-53.
- Covaci, A., et al., 2008. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) in human liver and adipose tissue samples from Belgium. *Chemosphere*. 73, 170-175.
- Crews, D., et al., 2012. Epigenetic transgenerational inheritance of altered stress responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 109, 9143-9148.
- Crews, D., et al., 2007. Transgenerational epigenetic imprints on mate preference. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 104, 5942-5946.
- Crinnion, W. J., 2009. Chlorinated pesticides: threats to health and importance of detection. *Alternative Medicine Review*. 14, 347-59.
- Crisp, T. M., et al., 1998. Environmental endocrine disruption: an effects assessment and analysis. *Environmental Health Perspectives*. 106, 11-56.
- Darnerud, P. O., et al., 2011. Levels of brominated flame retardants and other persistent organic pollutants in breast milk samples from Limpopo province. South Africa. *Science of The Total Environment*. 409, 4048-4053.
- De Boever, P., et al., 2010. Effects of developmental exposure to non-dioxin like PCBs on gene expression in brain and blood. 6th International PCB Workshop , Visby, Sweden , May 30-June 2, 2010.
- De Boever, P., et al., 2013. Perinatal Exposure to Purity-Controlled Polychlorinated Biphenyl 52, 138, or 180 Alters Toxicogenomic Profiles in Peripheral Blood of Rats after 4 Months. *Chemical Research in Toxicology*. 26 1159–1167.
- De Voogt, P., Brinkman, U., 1989. Production, properties and usage of polychlorinated biphenyls. In Kimbrough, Jensen, eds, *Halogenated biphenyls, terphenyls, naphthalenes, dibenzodioxins and related products*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands. 3-43.
- DeKoning, E. P., Karmaus, W., 2000. PCB exposure in utero and via breast milk. A review. *Journal of Exposure Analysis and Environmental Epidemiology*. 10, 285-293.
- Deng, Y. Y., et al., 2011. Levels of PCDD/Fs in agricultural soils near two municipal waste incinerators in Shanghai, China. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 86, 65-70.
- Despres, C., et al., 2005. Neuromotor functions in Inuit preschool children exposed to Pb, PCBs, and Hg. *Neurotoxicology and Teratology*. 27, 245-57.

- Devanathan, G., et al., 2009. Persistent organochlorines in human breast milk from major metropolitan cities in India. *Environmental Pollution*. 157, 148 - 154.
- Devanathan, J., Ramanathan, N., 2012. Pigment production from *Spirulina platensis* using seawater supplemented with dry poultry manure. *Journal of Algal Biomass Utilization*. 3, 66-73.
- Dewailly, E., et al., 1993b. Breast milk contamination by PCBs and PCDDs/PCDFs in arctic Quebec: preliminary results on the immune status of Inuit infants. In: *Dioxin'93*. 13th International Symposium on Chlorinated Dioxins and Related Compounds; Vienna, Austria. 403-6.
- Diamanti-Kandarakis, E., et al., 2009. *Endocrine Reviews*. Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. 30, 293-342
- Dickerson, S. M., et al., 2011. Endocrine Disruption of Brain Sexual Differentiation by Developmental PCB Exposure. *Endocrinology*. 152, 581-594.
- Dietert, R. R., et al., 2011. Environmental risk factors for autism. *Emerging Health Threats*. 4, 7111.
- DIREN, 2009. Programme d'actions "Pollution PCB" du bassin Rhone-Méditerranée. Rapport d'état 2009.
- Dobbing, J., 1975. Maternal nutrition and neurological development. *Modern Problems in Paediatrics*. 14, 83-88.
- Dorman, J. S., et al., 2001. Menopause in type 1 diabetic women: is it premature? *Diabetes*. 50, 1857-1862.
- Dridi, I., et al., 2016. Chemically contaminated eel fed to pregnant and lactating mouse dams causes hyperactivity in their offspring. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*. <http://dx.doi.org/10.1024/0300-9837/a000288>.
- Duarte-Davidson, R., Jones, K. C., 1994. Polychlorinated biphenyls (PCBs) in the UK population: estimated intake, exposure and body burden. *Science of The Total Environment*. 151, 131-152.
- EFSA, 2005a. Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to the presence of non dioxin-like polychlorinated biphenyls (PCB) in feed and food. *EFSA* 284, 1-137.
- EFSA, 2005b. Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to the presence of non dioxin-like polychlorinated biphenyls (PCB) in feed and food. *EFSA*. 1-137.
- EFSA, 2010. Results of the monitoring of non dioxin-like PCBs in food and feed. *EFSA* 8, 1701. Available online: [www.efsa.europa.eu](http://www.efsa.europa.eu) .

- Eik Anda, E., et al., 2007. Intra- and intercompartmental associations between levels of organochlorines in maternal plasma, cord plasma and breast milk, and lead and cadmium in whole blood, for indigenous peoples of Chukotka, Russia. *Journal of Environmental Monitoring*. 9, 884-893.
- Elnar, A. A., et al., 2012. Neurodevelopmental and behavioral toxicity via lactational exposure to the sum of six indicator nondioxin-like-polychlorinated biphenyls ( $\Sigma 6$  NDL-PCBs) in mice. *Toxicology*. 299, 44-54.
- Ennaceur, S., et al., 2008. Distribution of polychlorinated biphenyl levels measured in delivering women from different location in Tunisia. Levels of contamination, influencing factors, and infant risk assessment. *Environmental Research*. 108, 86-93.
- Essman, W. B., Jarvik, M. E., 1961. A water escape test for mice. *Psychological Reports*. 8, 58.
- Eubig, P. A., et al., 2010. Lead and PCBs as risk factors for attention deficit/hyperactivity disorder. *Environmental Health Perspectives*. 118, 1654-1666.
- Everett, C. J., et al., 2011. Relationship of polychlorinated biphenyls with type 2 diabetes and hypertension. *Journal of Environmental Monitoring*. 13, 241-251.
- Falandysz, J., et al., 2000. Composition of chloronaphthalene isomers and congeners in technical PCN formulations of the Halowax series. *J Environ Sci Health* 35, 281-298.
- Fattore, E., et al., 2008. Assessment of the dietary exposure to non-dioxin-like PCBs of the Italian general population. *Chemosphere*. 78, 278-283.
- Fein, G. G., et al., 1984. Prenatal exposure to polychlorinated biphenyls: effects on birth size and gestational age. *The Journal of Pediatrics*. 105, 315-320.
- Feldman, R., 2012. Oxytocin and social affiliation in humans. *Hormones and Behavior*. 61, 380-391.
- Fernandes, E. C., et al., 2010. Potentiation of the human GABA(A) receptor as a novel mode of action of lower-chlorinated non-dioxinlike PCBs. *Environmental Science & Technology*. 44, 2864-2869.
- Fernández, P., Grimalt, J. O., 2003. On the Global Distribution of Persistent Organic Pollutants. *Chimia*. 57, 514-521.
- Ferrante, M. C., et al., 2011. Effects of non-dioxin-like polychlorinated biphenyl congeners (PCB 101, PCB 153 and PCB 180) alone or mixed on J774A.1 macrophage cell line: modification of apoptotic pathway. *Toxicology Letters* 202, 61-68.
- Fitzgerald, E. F., et al., 2008. Polychlorinated biphenyl exposure and neuropsychological status among older residents of upper Hudson River communities. *Environmental Health Perspectives*. 116, 209-215.

- Flurkey, K., et al., 2007. "The Mouse in Aging Research," in *The Mouse in Biomedical Research*, 2nd Edition. Fox JG et al. (eds). American College Laboratory Animal Medicine. American College Laboratory Animal Medicine. Academic Press.
- Forns, J., et al., 2012. Prenatal exposure to polychlorinated biphenyls and child neuropsychological development in 4-year-olds: An analysis per congener and specific cognitive domain. *Science of the Total Environment* 432, 338-343.
- Forns, J., et al., 2012b. Prenatal exposure to polychlorinated biphenyls and child neuropsychological development in 4-year-olds: an analysis per congener and specific cognitive domain. *Science of the Total Environment*. 432, 338-343.
- Fox, M., 1965. Reflex-ontogeny and behavioral development of the mouse. *Animal behavior*. 13, 234-241.
- Franklin, T. B., Mansuy, I. M., 2011. The involvement of epigenetic defects in mental retardation. *Neurobiology of Learning and Memory*. 96, 61-67.
- Fromberg, A., et al., 2005. Food monitoring, 1998-2003. Chemical contaminants
- Fromme, H., et al., 2009. Dietary intake of non-dioxin-like polychlorinated biphenyls (PCB) in Bavaria, Germany. Results from the Integrated Exposure Assessment Survey (INES). *Gesundheitswesen*. 71, 275-80.
- Fukata, H., et al., 2005. Necessity to measure PCBs and organochlorine pesticide concentrations in human umbilical cords for fetal exposure assessment. *Environmental Health Perspectives*. 113, 297-303.
- Fürst, P., 2006. Dioxins, polychlorinated biphenyls and other organohalogen compounds in human milk. Levels, correlations, trends and exposure through breastfeeding. *Molecular Nutrition & Food Research*. 50, 922-33.
- Gapp, K., et al., 2014. Implication of sperm RNAs in transgenerational inheritance of the effects of early trauma in mice. *Nature Neuroscience*. 17, 667-669.
- Giannini, G., et al., 1995. The ryanodine receptor/calcium channel genes are widely and differentially expressed in murine brain and peripheral tissues. *Journal of Cell Biology*. 128, 893-904.
- Gillette, R., et al., 2017. Anxiety-like behaviors in adulthood are altered in male but not female rats exposed to low dosages of polychlorinated biphenyls in utero. *Hormones and Behavior*. 87, 8-15.
- Gioiosa, L., et al., 2013. The effects of bisphenol A on emotional behavior depend upon the timing of exposure, age and gender in mice. *Hormones and Behavior*. 63, 598-605.
- Giordano, G., Costa, L., 2012. Developmental neurotoxicity: some old and new issues. *ISRN Toxicology*. 2012:814795. 10.5402/2012/814795.

- Gladen, B. C., et al., 1988. Development after exposure to polychlorinated biphenyls and dichlorodiphenyl dichloroethene transplacentally and through human milk. *Journal of Pediatrics*. 113, 991-995.
- Glynn, A., et al., 2011. Changes in serum concentrations of polychlorinated biphenyls (PCBs), hydroxylated PCB metabolites and pentachlorophenol during pregnancy. *Chemosphere*. 83, 144-151.
- Gomez, F., et al., 2002. Marked regulatory shifts in gonadal, adrenal, and metabolic system responses to repeated restraint stress occur within a 3-week period in prepubertal male rats. *Endocrinology*. 143, 2852-2862.
- Goncharov, A., et al., 2011. Blood pressure in relation to concentrations of PCB congeners and chlorinated pesticides. *Environ. Health Perspect*. 119, 319-325.
- Goncharov, A., et al., 2009. Lower serum testosterone associated with elevated polychlorinated biphenyl concentrations in Native American men. *Environmental Health Perspectives*. 117, 1454-1460.
- Grandjean, P., et al., 2012. Serum vaccine antibody concentrations in children exposed to perfluorinated compounds. *Journal of the American Medical Association*. 307, 391-397.
- Grandjean, P., Landrigan, P. J., 2014. Neurobehavioural effects of developmental toxicity. *The Lancet Neurology*. 13, 330-338.
- Grandjean, P., Landrigan, P. L., 2006. Developmental neurotoxicity of industrial chemicals. *Lancet*. 368, 2167-2178.
- Grandjean, P., et al., 2001. Neurobehavioral deficits associated with PCB in 7-year-old children prenatally exposed to seafood neurotoxicants. *Neurotoxicology and Teratology*. 23, 305-317.
- Gray, K. A., et al., 2005. In utero exposure to background levels of polychlorinated biphenyls and cognitive functioning among school-age children. *American Journal of Epidemiology*. 162, 17-26.
- Gray, L. E. J., et al., 1999. Environmental antiandrogens: low doses of the fungicide vinclozolin alter sexual differentiation of the male rat. *Toxicology and Industrial Health*. 15, 48-64.
- Guerrero-Bosagna, C., et al., 2012. Epigenetic Transgenerational Inheritance of Vinclozolin Induced Mouse Adult Onset Disease and Associated Sperm Epigenome Biomarkers. *Reproductive Toxicology*. 34, 694-707.
- Guerrero-Bosagna, C., et al., 2013. Environmentally induced epigenetic transgenerational inheritance of altered Sertoli cell transcriptome and epigenome: molecular etiology of male infertility. *PLoS One*. 8, e59922.

- Guerrero-Bosagna, C., et al., 2010a. Epigenetic transgenerational actions of vinclozolin on promoter regions of the sperm epigenome. *PLoS ONE*. 5, e13100.
- Guerrero-Bosagna, C., et al., 2010b. Epigenetic transgenerational actions of vinclozolin on promoter regions of the sperm epigenome. *PLoS One*. 5, e13100.
- Gustavsson, P., Hogstedt, C. A., 1997. A cohort study of Swedish capacitor manufacturing workers exposed to polychlorinated biphenyls (PCBs). *American Journal of Industrial Medicine*. 32, 234-239.
- Guvenius, D. M., et al., 2003. Human prenatal and postnatal exposure to polybrominated diphenyl ethers, polychlorinated biphenyls, polychlorobiphenyls, and pentachlorophenol. *Environmental Health Perspectives*. 111, 1235-1241.
- Hall, C. S., Ballechey, E. L. A., 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.
- Hamers, T., et al., 2011. In vitro toxicity profiling of ultrapure non-dioxin-like polychlorinated biphenyl congeners and their relative toxic contribution to PCB mixtures in humans. *Toxicol Sci*. 121, 88-100.
- Handley, S. L., Mithani, S., 1984. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of „fear“-motivated behaviour. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 327, 1-5.
- Hara, I., 1985. Health status and PCBs in blood of workers exposed to PCBs and of their children. *Environmental Health Perspectives*. 59, 85-90.
- Harada, M., 1976. Intra-uterine poisoning: Clinical and epidemiological studies and significance of the problem. *Bulletin of the New York Academy of Medicine*. Kumamoto University. 25, 1-69.
- Haraguchi, K., et al., 2009. Levels and regional trends of persistent organochlorines and polybrominated diphenyl ethers in Asian breast milk demonstrate POPs signatures unique to individual countries. 35, 1072-9.
- Heimeier, R., et al., 2010. Genome-wide analysis of murine liver toxicity profiles reveal gender specific changes following exposure to individual PCB congeners. 6th International PCB Workshop Visby , Sweden , May 30-June 2, 2010.
- Herbstman, J., et al., 2007. Determinants of Prenatal Exposure to Polychlorinated Biphenyls (PCBs) and Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs) in an Urban Population. *Environmental Health Perspectives*. 115, 1794–1800.
- Hertz-Picciotto, I., et al., 2006. The CHARGE study: an epidemiologic investigation of genetic and environmental factors contributing to autism. *Environmental Health Perspectives*. 114, 1119-1125.

- Himwich, W. A., 1962. Biochemical and neurophysiological development of the brain in the neonatal period. *International Review of Neurobiology*. 4, 117-158.
- Hogg, S., 1996. A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 54, 21-30.
- Hollander, E., et al., 2000. A randomized double-blind fluvoxamine/placebo crossover trial in pathological gambling. *Biological Psychiatry*. 47, 813-817.
- Hooker, D., 1952. *The Pre-Natal Origin of Behaviour*. Lawrence: University of Kansas Press.
- Hooper, K., et al., 2007. Duration of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) in breast milk from California first-time mothers (primiparae). *Environmental Health Perspectives*. 115, 1271-1275.
- Houlihan, J., et al., 2005. *Body Burden: the Pollution in Newborns*. Environmental Working Group.
- Hsu, C. C., et al., 1994. The Yu-Cheng rice oil poisoning incident. In: Schecter, A. (Ed.), *Dioxin and Health*. Plenum. 661-684.
- Hsu, S. T., et al., 1985. Discovery and epidemiology of PCB poisoning in Taiwan: a four-year followup *Environ. Health Perspect*. 59, 5-10.
- Huang, Y. W., et al., 1998. Induction of cytochrome P450-associated monooxygenases in northern leopard frogs, *Rana pipiens*, by 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB 126). *Environmental Toxicology and Chemistry*. 17, 1564-1569.
- Huisman, M., et al., 1995b. Neurological condition in 18-month-old children perinatally exposed to polychlorinated biphenyls and dioxins. *Early Human Development*. 43, 165-176.
- Huttunen, M. O., Niskanen, P., 1978. Prenatal loss of father and psychiatric disorders. *Archives of General Psychiatry*. 35, 429-431.
- IARC, 1987. Overall evaluations of carcinogenicity: an updating of IARC Monographs. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum Suppl*. 1-42, 1-440.
- INERIS, 2012. *Données technico-économiques sur les substances chimiques en France : Les polyChloroBiphenyles (PCB) DRC-11-118962-11081A*, 89 p.
- INRS, 2007. *Biphényles chlorés- FT 194*. Fiche Toxicologique ft194.
- Insel, T. R., et al., 1998. Oxytocin, vasopressin, and the neuroendocrine basis of pair bond formation. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 449, 215-224.
- Jacobson, J., Jacobson, S., 1996. Intellectual impairment in children exposed to polychlorinated biphenyls in utero. *The New England Journal of Medicine*. 335, 783-789.

- Jacobson, J. L., et al., 1990. Effects of in utero exposure to polychlorinated biphenyls and related contaminants on cognitive functioning in young children. *Journal of Pediatrics*. 116, 38-45.
- Jacobson, N. S., et al., 1984. Variability in outcome and clinical significance of behavioral marital therapy: A reanalysis of outcome data. *Journal of Consulting and Clinical Psychology*. 52, 497-504.
- Jamon, M., Clarac, F., 1998. Early walking in the neonatal rat: A kinematic study. *Behavioral Neuroscience*. 112, 1218-1228.
- Jang, Y. J., et al., 2012. High dose bisphenol A impairs hippocampal neurogenesis in female mice across generations. *Toxicology*. 296, 73-82.
- Jehring, H., et al., 1989. Polarographic Behavior of Pesticides With Carbon-Halogen Bonds. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*. 332, 890-897.
- Jiang, K., et al., 1997. Determination of PCDD/Fs and dioxin-like PCBs in Chinese commercial PCBs and emission from a testing PCB incinerator[J]. *Chemosphere*. 34, 941-950.
- Jiang, L., et al., 2013. Sperm, but not oocyte, DNA methylome is inherited by zebrafish early embryos. *Cell* 153, 773-784.
- Johansen, E. B., et al., 2011. Postnatal exposure to PCB 153 and PCB 180, but not to PCB 52, produces changes in activity level and stimulus control in outbred male Wistar Kyoto rats. *Behavioral and Brain Functions*. 7, 18.
- Johnston, M. V., et al., 2009. Plasticity and injury in the developing brain. *Brain & Development*. 31, 1-10.
- Juan, C. Y., et al., 2002. An input-output balance study for PCBs in humans. *Environment International*. 28, 203-214.
- Juárez de Ku, L. M., Meserve, L. A., 1994. Perinatal intake of polychlorinated biphenyl (PCB): alteration of endocrine and neurochemical parameters related to Alzheimer's disease. In: M.L. Woodruff and A.I. Noneman (eds). *Toxin-induced Models of Neurological Disorders*. 281-299.
- Jusko, T. A., et al., 2014. Prenatal and Postnatal Serum PCB Concentrations and Cochlear Function in Children at 45 Months of Age. *Environmental Health Perspectives*. 122, 1246-52.
- Kaati, G., et al., 2002. Cardiovascular and diabetes mortality determined by nutrition during parents' and grandparents' slow growth period. *European Journal of Human Genetics*. 10, 682-688.
- Karl, H., et al., 2010. Temporal trends of PCDD, PCDF and PCB levels in muscle meat of herring from different fishing grounds of the Baltic Sea and actual data of different fish species from the Western Baltic Sea. *Chemosphere*. 78, 106-12.

- Kelce, W. R., et al., 1997. Vinclozolin and p,p'-DDE alter androgen-dependent gene expression: In vivo confirmation of an androgen receptor-mediated mechanism. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 142, 192-200.
- Khalki, L., et al., 2012. The developmental neurobehavioral effects of fenugreek seeds on prenatally exposed mice. *Journal of Ethnopharmacology*. 139, 672-7.
- Khashan, A. S., et al., 2008. Higher risk of offspring schizophrenia following antenatal maternal exposure to severe adverse life events. *Archives of General Psychiatry*. 65, 146-152.
- Khashan, A. S., et al., 2011. Risk of affective disorders following prenatal exposure to severe life events: a Danish population-based cohort study. *Journal of Psychiatric Research*. 45, 879-885.
- Kimura-Kuroda, J., et al., 2007. Disrupting effects of hydroxy-polychlorinated biphenyl (PCB) congeners on neuronal development of cerebellar Purkinje cells: a possible causal factor for developmental brain disorders? *Chemosphere*. 67, 412-420.
- Kinney, K. S., et al., 1999. Catecholamine enhancement of *Aeromonas hydrophila* growth. *Microbial Pathogenesis*. 26, 85-91.
- Kiviranta, H., et al., 2004. Market basket study on dietary intake of PCDD/Fs, PCBs, and PBDEs in Finland. *Environment International*. 30, 923-932.
- Klaric, T. S., et al., 2017. Alterations in anxiety and social behaviour in *Npas4* deficient mice following photochemically-induced focal cortical stroke. *Behavioural Brain Research* 316, 29-37.
- Knerr, S., Schrenk, D., 2006. Carcinogenicity of "non-dioxinlike" polychlorinated biphenyls. *Critical Reviews in Toxicology*. 36, 663-694.
- Koolhaas, J. M., et al., 2013. The Resident-intruder Paradigm: A Standardized Test for Aggression, Violence and Social Stress. *Journal of Visualized Experiments*. 77, e4367.
- Koopman-Esseboom, C., et al., 1994b. PCB and dioxin levels in plasma and human milk of 418 Dutch women and their infants. Predictive value of PCB congener levels in maternal plasma for fetal and infant's exposure to PCBs and dioxins. *Chemosphere*. 28, 1721-1732.
- Koopman-Esseboom, C., et al., 1996. Effects of polychlorinated biphenyl/dioxin exposure and feeding type on infants' mental and psychomotor development. *Pediatrics*. 97, 700-706.
- Koopman-Esseboom, C., et al., 1994a. Dioxin and PCB levels in blood and human milk in relation to living areas in the Netherlands. *Chemosphere*. 29, 2327-2338.
- Korrick, S. A., Altshul, L., 1998. High breast milk levels of polychlorinated biphenyls (PCBs) among four women living adjacent to a PCB-contaminated waste site. *Environ Health Perspect*. 106, 513-518.

- Kouzu, Y., et al., 2000. Mutant mice lacking ryanodine receptor type 3 exhibit deficits of contextual fear conditioning and activation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in the hippocampus. *Molecular Brain Research*. 76, 142-150.
- Krishnan, D., et al., 2014. Effects of Polychlorinated Biphenyl (PCB) exposure on response perseveration and ultrasonic vocalizations emission in rat during development. *Endocrine Disruptors*. 2.
- Kuratsune, M., et al., 1972. Epidemiological study of Yusho, a poisoning caused by ingestion of rice oil contaminated with a commercial brand of polychlorinated biphenyls. *Environ Health Perspect*. 1, 119-122.
- Kuroda, Y., 2003. Effects of endocrine disruptors on brain development – development of novel assay systems for risk assessment. *Journal of Environmental Sciences*. 10, 023-033.
- Kvalem, H. E., et al., 2009. Role of dietary patterns for dioxin and PCB exposure. *Molecular Nutrition & Food Research*. 53, 1438-1451.
- La Rocca, C., Mantovani, A., 2006. From environment to food: the case of PCB. *Ann Ist Super Sanita*. 42, 410-416.
- Labie, D., 2007. Neurotoxicité des produits industriels et développement cérébral. *Medecine/Sciences*. 23, 868-72.
- Landrigan, P. J., et al., 2005. Early environmental origins of neurodegenerative disease in later life. *Environmental Health Perspectives*. 113, 1230-1233.
- Langer, P., Kocan, A., 2003. Possible effects of polychlorinated biphenyls and organochlorinated pesticides on the thyroid after long-term exposure to heavy environmental pollution. *Occupational and Environmental Medicine*. 45, 526-532.
- Langer, P., et al., 2007. Fish from industrially polluted freshwater as the main source of organochlorinated pollutants and increased frequency of thyroid disorders and dysglycemia. *Chemosphere*. 67, S379-385.
- Langer, P., et al., 2003. Possible effects of polychlorinated biphenyls and organochlorinated pesticides on the thyroid after long-term exposure to heavy environmental pollution. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*. 45, 526-32.
- Langeveld, W. T., et al., 2012. Differential effects of 20 non-dioxin-like PCBs on basal and depolarization-evoked intracellular calcium levels in PC12 cells  
*Toxicological Sciences*. 126, 487-496.
- Lecavalier, P., et al., 1997. Subchronic toxicity of 2,2',3,3',4,4'-hexachlorobiphenyl in rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. 51, 265-77.

- Lee, D., et al., 2007. Association between serum concentrations of persistent organic pollutants and insulin resistance among nondiabetic adults: results from the National Health and Nutrition Examination Survey 1999-2002. *Diabetes Care*. 30, 622-628.
- Lees, P. S., et al., 1987. Evidence for dermal absorption as the major route of body entry during exposure of transformer maintenance and repairmen to PCBs. *American Industrial Hygiene Association Journal*. 48, 257-264.
- Lilienthal, H., et al., 2011. Auditory effects of developmental exposure to purity-controlled polychlorinated biphenyls (PCB52 and PCB180) in rats. *Toxicological Sciences*. 122, 100-111.
- Lilienthal, H., et al., 2009. Effects of purity-controlled PCB52 and PCB180 on dopamine-dependent behavior in rat offspring after maternal exposure. *Toxicology Letters*. 189, 229-30.
- Lilienthal, H., et al., 2010. Auditory effects of developmental exposure to purity controlled PCB74 or PCB95 in rats . 6th International PCB Workshop Visby , Sweden , May 30-June 2, 2010.
- Lind, Y., et al., 2002. Exponering för organiska miljökontaminanter via livsmedel-inkostberäkningar av  $\Sigma$ PCB, PCB-153,  $\Sigma$ DDT, p,p'-DDE, PCDD/F, dioxinlika PCB, PBDE och HBCD baserade på konsumtionsdata från Riksmaten 1997-98. Sweden National Food Authority.
- Linden, J., et al., 2010. Dioxins, the aryl hydrocarbon receptor and the central regulation of energy balance. *Front Neuroendocrinol*. 31, 452-478.
- Lister, R. G., 1990. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. *Pharmacology & Therapeutics*. 46, 321-340.
- Liu, H., et al., 2003. Nerve growth factor induces anti-apoptotic heme oxygenase-1 in rat pheochromocytoma PC12 cells. *Journal of Neurochemistry* 86, 1553-1563.
- Llansola, M., et al., 2010. Polychlorinated biphenyls PCB 52, PCB 180, and PCB 138 impair the glutamate-nitric oxide-cGMP pathway in cerebellar neurons in culture by different mechanisms. *Chemical Research in Toxicology*. 23, 813-820.
- Llansola, M., et al., 2009. Polychlorinated biphenyls PCB 153 and PCB 126 impair the glutamate-nitric oxide-cGMP pathway in cerebellar neurons in culture by different mechanisms. *Neurotoxicity Research*. 16 97-105.
- Llop, S., et al., 2010. Concentrations and determinants of organochlorine levels among pregnant women in eastern Spain. *Science of the Total Environment*. 408, 5758-5767.
- Lonky, E., et al., 1996. Neonatal Behavioral Assessment Scale performance in humans influenced by maternal consumption of environmentally contaminated Lake Ontario fish. *Journal of Great Lakes Research*. 22, 98-212.

- Loomis, D., et al., 1997. Cancer mortality among electric utility workers exposed to polychlorinated biphenyls. *Occupational and Environmental Medicine*. 54, 720-728.
- Loutfy, N., et al., 2009. Pesticide and non-dioxin-like polychlorinated biphenyls (NDL-PCBs) residues in foodstuffs from Ismailia city, Egypt. *Food Additives & Contaminants*. 1, 32-40.
- Luatamo, M., et al., 1991. Assessment of exposure to polychlorinated biphenyls: analysis of selected isomers in blood and adipose tissue. *Environmental Research*. 54, 121-34
- Manikkam, M., et al., 2012. Transgenerational actions of environmental compounds on reproductive disease and identification of epigenetic biomarkers of ancestral exposures. *PLoS One*. 7, e31901.
- Manikkam, M., et al., 2013. Plastics derived endocrine disruptors (BPA, DEHP and DBP) induce epigenetic transgenerational inheritance of obesity, reproductive disease and sperm epimutations. *PLoS ONE*. 8, e55387.
- Marabini, L., et al., 2011. Genotoxic effects of polychlorinated biphenyls (PCB 153, 138, 101, 118) in a fish cell line (RTG-2). *Toxicology in Vitro*. 25, 1045-1052.
- Matthews, H. B., Dedrick, R. L., 1984. Pharmacokinetics of PCBs. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 24, 85-103.
- McCall, C., Singer, T., 2012. The animal and human neuroendocrinology of social cognition, motivation and behavior. *Nature Neuroscience*. 15, 681-688.
- McFarland, V. A., Clarke, J. U., 1989. Environmental occurrence, abundance, and potential toxicity of polychlorinated biphenyl congeners: considerations for a congener-specific analysis. *Environ Health Perspect*. 81, 225-39.
- McGowan, P. O., et al., 2009. Epigenetic regulation of the glucocorticoid receptor in human brain associates with childhood abuse. *Nature Neuroscience*. 12, 342-348.
- Meerts, I. A., et al., 2004. Effects of in utero exposure to 4-hydroxy-2,3,3',4',5-pentachlorobiphenyl (4-OH-CB107) on developmental landmarks, steroid hormone levels, and female estrous cyclicity in rats. *Toxicological Sciences*. 82, 259-267.
- Meironyte-Guvenius, D., et al., 2001. Polybrominated diphenyl ethers in Swedish human liver and adipose tissue. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 40, 564 -570.
- Mendola, P., et al., 1997. Consumption of PCB-contaminated freshwater fish and shortened menstrual cycle length. *American Journal of Epidemiology*. 146, 955-960.
- Mes, J., et al., 1994. Determination of polychlorinated biphenyls in postpartum blood, adipose tissue, and milk from female rhesus monkeys and their offspring after prolonged dosing with Aroclor® 1254. *Journal of Analytical Toxicology*. 18, 29-35.

- Mes, J., et al., 1995a. The elimination and estimated half-lives of specific polychlorinated biphenyl congeners from the blood of female monkeys after discontinuation of daily dosing with Aroclor 1254. *Chemosphere*. 30, 789-800.
- Monosson, E., et al., 1999. Peripubertal exposure to the antiandrogenic fungicide, vinclozolin, delays puberty, inhibits the development of androgen-dependent tissues and alters receptor function in the male rat. *Toxicology and Industrial Health*. 15, 65-79.
- Montgomery, K. C., 1955. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*. 48, 254-260.
- Moon, H. B., et al., 2009. Human health risk of polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides resulting from seafood consumption in South Korea, 2005-2007. *Food and Chemical Toxicology*. 47, 1819-1825.
- Moy, S. S., et al., 2004. Sociability and preference for social novelty in five inbred strains: an approach to assess autistic-like behavior in mice. *Genes Brain Behav*. 3, 287-302.
- Moy, S. S., et al., 2009. Social approach in genetically engineered mouse lines relevant to autism. *Genes Brain Behav*. 8, 129-42.
- Moy, S. S., et al., 2008. Social approach and repetitive behavior in eleven inbred mouse strains. *Behav Brain Res*. 191, 118-29.
- Moy, S. S., et al., 2007. Mouse behavioral tasks relevant to autism: phenotypes of 10 inbred strains. *Behav Brain Res*. 176, 4-20.
- Myhrman, A., et al., 1996. Unwantedness of a pregnancy and schizophrenia in the child. *The British Journal of Psychiatry*. 169, 637-640.
- Nakajima, S., et al., 2006. Effects of prenatal exposure to polychlorinated biphenyls and dioxins on mental and motor development in Japanese children at 6 months of age. *Environmental Health Perspectives*. 114, 773-778.
- Naso, B., et al., 2005. Persistent organic pollutants in edible marine species from the Gulf of Naples, Southern Italy. *Sci Total Environ*. 343, 83-95.
- National Research Council, 2000. *Ecological Indicators for the Nation*. Washington, DC: The National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/9720>.
- Nellemann, C., et al., 2003. The combined effects of vinclozolin and procymidone do not deviate from expected additivity in vitro and in vivo. *Toxicological Sciences*. 71, 251-262.
- Neumann, I. D., Landgraf, R., 2012. Balance of brain oxytocin and vasopressin: implications for anxiety, depression, and social behaviors. *Trends in neurosciences*. 35, 649-659.
- Newbold, R. R., 2004. Lessons learned from perinatal exposure to diethylstilbestrol. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 199, 142-150.

- Newbold, R. R., et al., 2000. Proliferative lesions and reproductive tract tumors in male descendants of mice exposed developmentally to diethylstilbestrol. *Carcinogenesis*. 21, 1355-1363.
- Nilsson, E. E., et al., 2008a. Transgenerational epigenetic effects of the endocrine disruptor vinclozolin on pregnancies and female adult onset disease. 2008. 135, 713-721.
- Nilsson, E. E., et al., 2008b. Transgenerational epigenetic effects of the endocrine disruptor vinclozolin on pregnancies and female adult onset disease. *Reproduction*. 135, 713-721.
- Noirot-Cosson, C., 2010. Les polychlorobiphényles dans l'environnement: Rapport de l'analyse des deux premières étapes à l'évaluation des risques sanitaires. Paris, France: Université Paris Descartes.
- NTP, 2006. NTP technical report on the toxicology and carcinogenesis studies of 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl (PCB 153) (CAS No. 35065-27-1) in female Harlan Sprague-Dawley rats (Gavage studies). Publication No. 06-4465, NIH, Public Health Service, U.S. Department of Health and Human Services. 4-168.
- Oberg, M., et al., 2002. Tissue distribution and half-lives of individual polychlorinated biphenyls and serum levels of 4-hydroxy-2,3,3',4',5-pentachlorobiphenyl in the rat. *Toxicological Sciences*. 70, 171-182.
- OCDE, 2007. Comprendre le cerveau : naissance d'une science de l'apprentissage. Paris.
- Ogren, S. O., et al., 2008. The role of 5-HT1A receptors in learning and memory. *Behavioural Brain Research*. 195, 54-77.
- Ohl, F., 2003. Testing for anxiety. *Clinical and Neuroscience Research*. 3, 233-238.
- OMS, 2000. WHO Regional Office for Europe, Copenhagen, Denmark, 2000. Chapter 5.10 PCBs Air Quality Guidelines Second Edition.
- OMS, 2004. Bureau régional pour l'Europe. Substances chimiques dangereuses : les principaux risques pour les enfants. Copenhague, Rome, La Valette, aide-mémoire EURO/02/04, 5.
- ORS, 2008. Les PCB. Les dossiers santé environnement de l'ORS. 2.
- Osius, N., et al., 1999. Exposure to polychlorinated biphenyls and levels of thyroid hormones in children. *Environmental Health Perspectives*. 107, 843-849
- Palanza, P., et al., 2016. Perinatal exposure to endocrine disruptors: sex, timing and behavioral endpoints. *Current Opinion in Behavioral Sciences*. 7, 69-75.
- Parham, F., Portier, C. J., 1998. Using structural information to create physiologically based pharmacokinetic models for all polychlorinated biphenyls. II. Rates of metabolism. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 151, 110-116.

- Park, H. Y., et al., 2010. Neurodevelopmental toxicity of prenatal polychlorinated biphenyls (PCBs) by chemical structure and activity: a birth cohort study. *Environmental Health*. 9, 51.
- Park, J. S., et al., 2008. Placental transfer of polychlorinated biphenyls, their hydroxylated metabolites and pentachlorophenol in pregnant women from eastern Slovakia. *Chemosphere*. 70, 1676-1684.
- Park, M. J., et al., 2005. Distribution of organochlorines and PCB congeners in Korean human tissues. *Archives of Pharmacal Research*. 28, 829 - 38.
- Pavuk, M., Cerhan, J. R., 2004. Environmental exposure to PCBs and cancer incidence in eastern Slovaki. *Chemosphere*. 54, 1509-1520.
- Pellet, M., et al., 1993. Contamination du milieu naturel par les polychlorobiphényles (PCB) : connaissance du polluant et techniques de dépollution. . BRGM.
- Pellow, S., et al., 1985. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*. 14, 149-167.
- Pessah, I. N., et al., 2010. Minding the calcium store: Ryanodine receptor activation as a convergent mechanism of PCB toxicity. *Pharmacology & Therapeutics*. 125, 260-285.
- Pessah, I. N., et al., 2008. Enantiomeric specificity of (-)-2,2',3,3',6,6'-hexachlorobiphenyl toward ryanodine receptor types 1 and 2. *Chemical Research in Toxicology* 22, 201-207.
- Picazo, O., Fernandez-Guasti, A., 1995. Anti-anxiety effects of progesterone and some of its reduced metabolites: an evaluation using the burying behavior test. *Brain Research*. 680, 135-141.
- Piedrafita, B., et al., 2008. Developmental exposure to polychlorinated biphenyls PCB153 or PCB126 impairs learning ability in young but not in adult rats. *European Journal of Neuroscience*. 27, 177-182.
- Plusquellec, P., et al., 2010. Neurotoxicology. The relation of environmental contaminants exposure to behavioral indicators in Inuit preschoolers in Arctic Quebec. 31, 17-25.
- PNUE, 2001. Manuel de formation visant la préparation d'un Plan National pour la Gestion Ecologiquement Rationnelle des PCBs et des équipements contaminés aux PCBs dans le cadre de la mise en oeuvre de la convention de Bale 2001.
- Pobbe, R. L., et al., 2012. Oxytocin receptor and Mecp2 308/Y knockout mice exhibit altered expression of autism-related social behaviors. *Physiol Behav*. 107, 641-8.
- Polder, A., et al., 2009. chlorinated pesticides and polychlorinated biphenyls in Norwegian breast milk (2002-2006), and factors that may predict the level of contamination. *Science of The Total Environment*. 407, 4584-4590.

- Porta, M., et al., 2008. PANKRAS II Study Group. Differences in serum concentrations of organochlorine compounds by occupational social class in pancreatic cancer. *Environmental Research*. 108, 370-379.
- Porta, M., et al., 2002. Correlations among serum concentrations of highly prevalent organochlorine compounds in patients with exocrine pancreatic cancer. *Organohalogen Compounds*. 55, 307-310.
- Porterfield, S. P., 2000. Thyroidal dysfunction and environmental chemicals - potential impact on brain development. *Environmental Health Perspectives*. 108, 433-438.
- Potok, M. E., et al., 2013. Reprogramming the maternal zebrafish genome after fertilization to match the paternal methylation pattern. *Cell*. 153, 759-772.
- PSEA, 2002 Programme de surveillance et d'évaluation de l'Arctique. Norvège.
- Raab, U., et al., 2008. Concentrations of polybrominated diphenyl ethers, organochlorine compounds and nitro musks in mother's milk from Germany (Bavaria) *Chemosphere*. 72, 87-94.
- Ribas-Fito, N., et al., 2001. Poly-chlorinated biphenyls (PCBs) and neurological development in children: A systematic review. *Journal of Epidemiology and Community Health*. 55, 537-546.
- Rice, D., Barone, S., 2000. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. *Environmental Health Perspectives*. 108, 511-533.
- Rice, D. C., 1997. Effect of postnatal exposure to a PCB mixture in monkeys on multiple fixed interval-fixed ratio performance. *Neurotoxicology and Teratology*. 19, 429-434.
- Rice, D. C., 1998. Effects of postnatal exposure of monkeys to a PCB mixture on spatial discrimination reversal and DRL performance. *Neurotoxicology and Teratology*. 20, 391-400.
- Rice, D. C., 1999. Behavioral impairment produced by low-level postnatal PCB exposure in monkeys. *Environmental Research*. 80, S113-S121.
- Rice, D. C., Hayward, S., 1997. Effects of postnatal exposure to a PCB mixture in monkeys on nonspatial discrimination reversal and delayed alternation performance. *Neurotoxicology*. 18, 479-494.
- Rice, D. C., Hayward, S., 1999. Effects of postnatal exposure of monkeys to a PCB mixture on concurrent random interval-random interval and progressive ratio performance. *Neurotoxicology and Teratology*. 21, 47-58.
- Rigét, F., et al., 2010. Temporal trends of legacy POPs in Arctic biota, an update. *Science of the Total Environment*. 408, 2874-2884.

- Ritchie, J. M., et al., 2005. Comparison of proposed frameworks for grouping polychlorinated biphenyl congener data applied to a case-control pilot study of prostate cancer. *Environmental Research*. 98, 104-113.
- Roberts, D. C. S., et al., 2007. How to make a rat addicted to cocaine. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*. 31, 1614-1624.
- Robertson, L. W., Hansen, L. G., 2001. *Recent Advances in the Environmental Toxicology and Health Effects of PCBs*. Lexington: University Press of Kentucky
- Rodríguez-Dozal, S., et al., 2012. Persistent organic pollutant concentrations in first birth mothers across Mexico. *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology*. 22, 60-69.
- Roegge, C. S., Schantz, S. L., 2006. Motor function following developmental exposure to PCBs and/or MEHG. *NeuroToxicology*. 28, 260.
- Rogan, W. J., Gladen, B. C., 1991. PCBs, DDE, child development at 18 24 months. *Annals of Epidemiology*. 1, 407-413.
- Rogan, W. J., et al., 1988. Congenital poisoning by polychlorinated biphenyls and their contaminants in Taiwan. *Science*. 241, 334-33.
- Rogan, W. J., et al., 1987. Polychlorinated biphenyls (PCBs) and dichlorodiphenyl dichloroethene (DDE) in human milk: effects on growth, morbidity, and duration of lactation. *American Journal of Public Health*. 77, 1294-1297.
- Rogan, W. J., et al., 1986a. Neonatal effects of transplacental exposure to PCBs and DDE. *Journal of Pediatrics*. 109, 335-341.
- Roos, R., et al., 2012 Toxicological profiles of two abundant PCBs in rat offspring. Eurotox 2012, Stockholm, Sweden. *Toxicology Letters*. 211, S85-S86.
- Rosen, J. B., et al., 1998. Immediate-early gene expression in the amygdala following footshock stress and contextual fear conditioning. *Brain Research*. 796, 132-142.
- Rubin, M. M., 2007. Antenatal exposure to DES: lessons learned...future concerns. *Obstetrical & Gynecological Survey*. 62, 548-55.
- Ruden, D. M., et al., 2005. Hsp90 and environmental impacts on epigenetic states: A model for the trans-generational effects of diethylstilbestrol on uterine development and cancer. *Human Molecular Genetics*. 1, R149-R155.
- Ruelle, P., et al., 1993. Application of the mobile order theory to the prediction of aqueous solubility of chlorinated benzenes and biphenyls. *Environmental science & technology*. 27, 266-270

- Ryan, J. J., et al., 1993. Elimination of polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) from human blood in the Yusho and Yu-Cheng rice oil poisonings. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 24, 504-12.
- Safe, S., 1990. Polychlorinated biphenyls (PCBs), dibenzo-p-dioxins (PCDDs), dibenzofurans (PCDFs), and related compounds: environmental and mechanistic considerations which support the development of toxic equivalency factors (TEFs). *Crit Rev Toxicol*. 21, 51-88.
- Sagiv, S. K., et al., 2012. Neuropsychological measures of attention and impulse control among 8-year-old children exposed prenatally to organochlorines. *Environmental Health Perspectives*. 120, 904-9.
- Salum, C., et al., 2003. Conflict as a determinant of rat behavior in three types of elevated plus-maze. *Behavioural Processes*. 63, 87-93.
- Santora, A., et al., 2013. The effects of chronic taurine supplementation on motor learning. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 775, 177-185.
- Schechter, A., et al., 1989. Polychlorinated dioxin and dibenzofuran levels from human milk from several locations in the United States, Germany, and Vietnam. *Chemosphere*. 19, 979-984.
- Schlosserova, J., 1994. 'Kontrolle ausgewählter Boden in der Tschechischen und Slowakischen Republik auf ihre Kontamination mit chlorierten Kohlenwasserstoffen. In: Heinisch E, Kettrup A, Wenzel-Klein S, editors. *Schadstoffatlas Osteuropa*. 54 -59.
- Schlummer, M., et al., 1998. Digestive tract absorption of PCDD/Fs, PCBs, and HCB in humans: mass balances and mechanistic considerations. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 152, 128-137.
- Schmitz, H. J., et al., 1995. Potency of mixtures of polychlorinated-biphenyls as inducers of dioxin receptor-regulated CYP1A activity in rat hepatocytes and H4IIE cells. *Toxicology*. 99, 47-54.
- Schulkin, J., et al., 2005. A neuroendocrine mechanism for sustaining fear. *Trends in Neurosciences*. 28, 629-635.
- Scudato, R. J., et al., 1999. Remediation of PCB-contaminated sediments : volatility and solubility consideration. *Remediation Journal*. 9, 7-21.
- Seelbach, M., et al., 2010. Polychlorinated Biphenyls Disrupt Blood–Brain Barrier Integrity and Promote Brain Metastasis Formation. *Environmental Health Perspectives*. 118, 479-484.
- Selten, J. P., et al., 1999. Psychotic illness after prenatal exposure to the 1953 Dutch Flood Disaster. *Schizophrenia Research*. 35, 243-24.
- Semple, B. D., et al., 2013. Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. *Progress in Neurobiology*. 106–107, 1-16.

- Sinks, T., et al., 1992. Mortality among workers exposed to polychlorinated biphenyls. *American Journal of Epidemiology* 136, 389-398.
- Skinner, M. K., 2011. Environmental epigenetic transgenerational inheritance and somatic epigenetic mitotic stability. *Epigenetics*. 6, 838-842.
- Skinner, M. K., et al., 2010. Epigenetic transgenerational actions of environmental factors in disease etiology. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 21, 214-222.
- Skinner, M. K., et al., 2013. Ancestral DDT exposures promote epigenetic transgenerational inheritance of obesity. *BMC Medicine*. 11, 228-10.
- Slikker, W., Bowyer, J. F., 2005. Biomarkers of adult and developmental neurotoxicology. *Toxicology and Applied Pharmacology* 206, 255-260.
- Slikker, W., et al., 2005. Application of a systems biology approach to developmental neurotoxicology. *Reproductive Toxicology*. 19, 305-319.
- Smith, A. B., et al., 1982. Metabolic and health consequences of occupational exposure to polychlorinated biphenyls. *British Journal of Industrial Medicine*. 39, 361-369.
- Smith, Z. D., et al., 2012. A unique regulatory phase of DNAmethylation in the early mammalian embryo. *Nature*. 484, 339-344.
- Sonchik, S. M., 1983. Environmental applications of capillary GC columns. *Chromatogr. Sci.* 21, 106-110.
- Soualeh, N., et al., 2017. Perinatal programming of depressive-like behavior by inflammation in adult offspring mice whose mothers were fed polluted eels: Gender selective effects. *Brain, Behavior, and Immunity*. 63, 137-147.
- Spencer, S. J., 2013. Perinatal programming of neuroendocrine mechanisms connecting feeding behavior and stress. *Frontiers in Neuroscience*. 7, 109.
- Steinberg, R. M., et al., 2008. Effects of perinatal polychlorinated biphenyls on adult female rat reproduction: development, reproductive physiology, and second generational effects. *Biology of Reproduction*. 6 1091-1101.
- Stellman, S. D., et al., 1998. Relative abundance of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in adipose tissue and serum of women in Long Island, New York. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 7, 489-96.
- Stenberg, M., Andersson, P. L., 2008. Selection of non-dioxin-like PCBs for in vitro testing on the basis of environmental abundance and molecular structure. *Chemosphere*. 71, 1909-1915.
- Stenberg, M., et al., 2011. Multivariate toxicity profiles and QSAR modeling of non-dioxin-like PCBs-An investigation of in vitro screening data from ultra-pure congeners. *Chemosphere*. 85, 1423 - 9.

- Steru, L., et al., 1985. Tail suspension test: A new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology*. 85, 367-370.
- Stewart, P., et al., 2003b. Cognitive development in preschool children prenatally exposed to PCBs and MeHg. *Neurotoxicology and Teratology* 25, 11-22.
- Storgaard, L., et al., 2006 Male reproductive disorders in humans and prenatal indicators of estrogen exposure. A review of published epidemiological studies. *Reproductive Toxicology*. 21, 4-15.
- Stouder, C., Paoloni-Giacobino, A., 2010. Transgenerational effects of the endocrine disruptor vinclozolin on the methylation pattern of imprinted genes in the mouse sperm. *Reproduction*. 139, 373-379.
- Strathmann, J., et al., 2006. PCB 153, a non-dioxin-like tumor promoter, selects for beta-catenin (Catnb)-mutated mouse liver tumors. *Toxicological Sciences*. 93, 34-40.
- Sugawara, N., et al., 2006. Developmental and neurobehavioral effects of perinatal exposure to polychlorinated biphenyls in mice. *Archives of Toxicology*. 80, 286-292.
- Svensson, B. G., et al., 1995. Mortality and cancer incidence among Swedish fishermen with a high dietary intake of persistent organochlorine compounds. *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health*. 21, 106-115.
- Swanson, J. M., et al., 2009. Developmental origins of health and disease: environmental exposures. *Seminars in Reproductive Medicine*. 27, 391-402.
- Szlinder-Richert, J., et al., 2009a. PCBs in fish from the southern Baltic Sea: Levels, bioaccumulation features, and temporal trends during the period from 1997 to 2006. *Marine Pollution Bulletin*. 58, 85-92.
- Szlinder-Richert, J., et al., 2009b. PCBs in fish from the southern Baltic Sea: levels, bioaccumulation features, and temporal trends during the period from 1997 to 2006. *Mar Pollut Bull*. 58, 85-92.
- Tanabe, S., et al., 1981. Ecology and bioaccumulation of *Stenella coeruleoalba* Elimination of chlorinated hydrocarbons from mother striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) through parturition and lactation. In: Fugiyama T, editor. *Studies on the Levels of Organochlorine Compounds and Heavy Metals in the Marine Organisms*. Okynawa7 University of the Ryukyus. 15 - 21.
- Tanaka, T., 2004. Effects of litter size on behavioural development in mice. *Mammal Study*. 29, 147-153.
- Tard , A., et al., 2007. Dioxins, furans and dioxin-like PCBs: Occurrence in food and dietary intake in France. *Food Additives & Contaminants* 24, 1007-1017

- Tatsukawa, R., 1976. PCB pollution of the Japanese environment. In: Higuchi K, editor. editor. PCB poisoning and pollution. Tokyo, Japan: Kodensha Ltd. 147-79.
- Tian, W., et al., 2011a. Mercury hair concentrations and dietary exposure among Inuit preschool children in Nunavut, Canada. *Environment International*. 37, 42-48.
- Tian, Y. H., et al., 2011b. Lactational and postnatal exposure to polychlorinated biphenyls induces sex-specific anxiolytic behavior and cognitive deficit in mice offspring. *Synapse*. 65, 1032-1041.
- Tilson, H. A., et al., 1979. The effects of polychlorinated biphenyls given prenatally on the neurobehavioral development of mice. *Environmental Research*. 18, 466-474.
- Tilson, H. A., et al., 1990. Polychlorinated biphenyls and the developing nervous system: cross-species comparisons. *Neurotoxicology and Teratology*. 12, 239-248.
- Tornkvist, A., et al., 2011. PCDD/F, PCB, PBDE, PBCD and chlorinated pesticides in a Swedish market basket from 2005 - levels and dietary intake estimations. *Chemosphere*. 83, 193-199.
- Tryphonas, H., Feely, M., 2001. Polychlorinated biphenyl-induced immunomodulation and human health effects. In *PCB, recent advances in environmental toxicology and health effects*. Univ. Press of Kentucky, Lexington, USA. 193-209.
- Tryphonas, H., et al., 1991. Effect of chronic exposure of PCB (Aroclor 1254) on specific and non specific immune parameters in the rhesus (*Macaca mulatta*) monkey. *Fundamental and Applied Toxicology*. 16, 773-786.
- U.S.EPA, 1988a. Drinking water criteria document for polychlorinated biphenyls (PCBs). Cincinnati: U.S. EPA, ECAO-CIN-414.
- Ulaszewska, M. M., et al., 2011. PCDD/Fs and dioxin-like PCBs in human milk and estimation of infants' daily intake: a review. *Chemosphere*. 83, 774-782.
- UNEP, 2001. Report on the Eighteenth Session of the Technical Working Group. Technical Working Group of the Basel Convention on the Control of Transboundary Movement of Hazardous Wastes and Their Disposal. 19th Session. Geneva. June.
- UNEP, 2009. Stockholm convention on persistent organic pollutants (POPs) press release: governments unite to step-up reduction on global DDT reliance and add nine new chemicals under international treaty.
- Vaglenova, J., et al., 2008. Long-lasting teratogenic effects of nicotine on cognition: gender specificity and role of AMPA receptor function. *Neurobiology of Learning and Memory*. 90, 527-536.
- Van den Berg, M., et al., 1998. Toxic equivalency factors TEFs for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife. *Environ Health. Perspect*. 106, 775-792.

- Van Oostdam, J., et al., 2005. Human health implications of environmental contaminants in Arctic Canada: a review. *Science of the Total Environment*. 351-352 165-246.
- van Os, J., Selten, J. P., 1998. Prenatal exposure to maternal stress and subsequent schizophrenia—the May 1940 invasion of The Netherlands. *The British Journal of Psychiatry*. 172, 324-326.
- Vandegheuchte, M. B., et al., 2010. Direct and transgenerational impact on *Daphnia magna* of chemicals with a known effect on DNA methylation. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 151C, 278-285.
- Vandenberg, L. N., et al., 2012. Hormones and Endocrine-Disrupting Chemicals: Low-Dose Effects and Nonmonotonic Dose Responses. *Endocrine Reviews* 33, 378-455.
- Vandenberg, L. N., et al., 2009. Bisphenol-A and the great divide: a review of controversies in the field of endocrine disruption. *Endocrine Reviews*. 30, 75-95.
- Viluksela, M., et al., 2014. Toxicological Profile of Ultrapure 2,2',3,4,4',5,5'-Heptachlorbiphenyl (PCB 180) in Adult Rats. *PLoS ONE* 9(8): e104639. doi:10.1371/journal.pone.0104639.
- Vizcaino, E., et al., 2011. Assessment of prenatal exposure to persistent organohalogen compounds from cord blood serum analysis in two Mediterranean populations (Valencia and Menorca). *Journal of Environmental Monitoring*. 13, 422-432.
- VKM, 2008. Opinion of the Panel on Contaminants of the Norwegian Scientific Committee for Food Safety. Risk Assessment of Non Dioxin-like PCBs in Norwegian Food.
- Vreugdenhil, H. J. I., et al., 2004. Effects of perinatal PCBs on neuropsychological functions in the Rotterdam cohort at 9 years of age. *Neuropsychology*. 18, 185-193.
- Walf, A., et al., 2008. Estradiol or diarylpropionitrile administration to wild type, but not estrogen receptor beta knockout, mice enhances performance in the object recognition and object placement tasks. *Neurobiology of Learning and Memory*. 89, 513-521.
- Walker, B. E., Haven, M. I., 1997. Intensity of multigenerational carcinogenesis from diethylstilbestrol in mice. *Carcinogenesis*. 18, 791-3.
- Walkowiak, J., et al., 2001. Environmental exposure to polychlorinated biphenyls and quality of the home environment: effects on psychodevelopment in early childhood. *Lancet*. 358, 1602-1607.
- Wang, S., et al., 2015. Genomic characterization of *Dehalococcoides mccartyi* strains JNA that reductively dechlorinates tetrachloroethene and polychlorinated biphenyls. *Environmental Science & Technology*. 49, 14319-14325.
- Weaver, I. C., et al., 2004. Epigenetic programming by maternal behavior. *Nature Neuroscience*. 7, 847-854.

- Weisglas-Kuperus, N., et al., 1995. Immunologic effects of background prenatal and postnatal exposure to dioxins and polychlorinated biphenyls in Dutch infants. *Pediatric Research*. 38, 404-410.
- Weisglas-Kuperus, N., et al., 2004. Immunological effects of environmental exposure to polychlorinated biphenyls and dioxins in Dutch school children. *Toxicology Letters* 149, 281-285.
- Welshons, W. V., et al., 2003. Large Effects from Small Exposures. I. Mechanisms for Endocrine Disrupting Chemicals with Estrogenic Activity. *Environmental Health Perspectives*. 111, 994-1006.
- Wigstrand, M. B., et al., 2013. Non-dioxin-like PCBs inhibit [3H]WIN-35,428 binding to the dopamine transporter: A structure–activity relationship study. *NeuroToxicology*. 39, 18-24.
- Williams, J. H. G., Ross, L., 2007. Consequences of prenatal toxin exposure for mental health in children and adolescents. *European Child & Adolescent Psychiatry*. 16, 243-253.
- Wilson, N. K., et al., 2001. Levels of persistent organic pollutants in several child day care centers. *Exposure Analysis and Environmental Epidemiology*. 11, 449-458.
- Windle, W. F., Fish, M. W., 1932. *Journal of Comparative Neurology* 54, 85-96.
- Winneke, G., et al., 1998. Developmental neurotoxicity of polychlorinated biphenyls (PCBs): cognitive and psychomotor functions in 7-month old children. *Toxicology Letters*. 102-103, 423-428.
- Wolf, C. J., et al., 2000. Characterization of the period of sensitivity of fetal male sexual development to vinclozolin. 55, 152-161.
- Wolf, M. S., 1985. Occupational Exposure to Polychlorinated Byphenyls (PCBs). *Environmental Health Perspectives*. 60, 133-138.
- Wolff, M. S., et al., 1992. Changes in PCB serum concentrations among capacitor manufacturing workers. *Environmental Research*. 59, 202-216.
- Wolff, M. S., Schechter, A., 1991. Accidental exposure of children to polychlorinated biphenyls. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 20, 449-53.
- Wolff, M. S., et al., 2007. Pilot study of urinary biomarkers of phytoestrogens, phthalates, and phenols in girls. *Environmental Health Perspectives*. 115, 116-121.
- Wolstenholme, J. T., et al., 2012. Gestational exposure to bisphenol a produces transgenerational changes in behaviors and gene expression. *Endocrinology*. 153, 3828-3838.
- Wolstenholme, J. T., et al., 2013. Transgenerational effects of prenatal bisphenol A on social recognition. *Hormones and Behavior*. 64, 833-839.

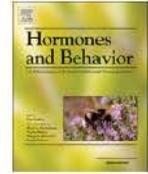
- Xing, T., et al., 2010. Effects of decabrominated diphenyl ether (pbde 209) on voltage-gated sodium channels in primary cultured rat hippocampal neurons. *Environmental toxicology*. 25, 400-408.
- Yakushiji, T., et al., 1984. Rate of decrease and half-life of polychlorinated biphenyls (PCBs) in the blood of mothers and their children occupationally exposed to PCBs. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 13, 341-5
- Yang, M., et al., 2011. Automated three-chambered social approach task for mice. *Curr Protoc Neurosci*. Chapter 8, Unit 8 26.
- Yang, Y. G., et al., 1994. Effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on pulmonary influenza virus titer and natural killer (NK) activity in rats. *Fundamental and Applied Toxicology*. 23, 125.
- Yeargin-Allsopp, M., et al., 1992. A multiple-source method for studying the prevalence of developmental disabilities in children: the Metropolitan Atlanta Developmental Disabilities Study. *Pediatrics*. 89, 624-630.
- Zietz, J., et al., 2008. Determinants of house prices: a quantile regression approach. *The Journal of Real Estate Finance and Economics*, Springer. 37, 317-333.
- Zuccato, E., et al., 1999. Level, sources and toxicity of polychlorinated biphenyls in the Italian diet. *Chemosphere*. 38, 2753-2765.

# *Annexes*



Contents lists available at ScienceDirect

## Hormones and Behavior

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/yhbeh](http://www.elsevier.com/locate/yhbeh)

## Perinatal effects of exposure to PCBs on social preferences in young adult and middle-aged offspring mice



Alaa Karkaba, Nidhal Soualeh, Rachid Soulimani, Jaouad Bouayed\*

Université de Lorraine, Neurotoxicologie Alimentaire et Bioactivité, Rue du Général Delestraint, Campus Bridoux, 57070 Metz, France

## ARTICLE INFO

## Keywords:

Acetylcholinesterase  
Corticosterone  
Polychlorinated biphenyls (PCBs)  
Social behavior  
Sociability  
Social novelty

## ABSTRACT

In social species, social interactions between conspecifics constitute a fundamental component to establish relations, provide best chances to reproduce, and even improve survival rates. In this study, a three-chambered social approach test was used to estimate the level of sociability and level of preference for social novelty in both male and female young adult (postnatal day (PND) 50) and middle-aged (PND 330) offspring mice ( $n = 10$  per group) that were perinatally exposed to a mixture of six polychlorinated biphenyls (PCBs), 28, 52, 101, 138, 153, and 180, at environmentally low doses (10 and 1000 ng/kg b.w. for dams during gestation and lactation), a profile that closely mimics human exposure to contaminated fish. Our results showed that PCBs bidirectionally modulated social preferences in offspring mice, and the effects were sex and age dependent. However, increased levels of social interactions were rather frequently detected in both assays of the three-chambered test. Reduced social interaction was only induced in 1000 ng/kg PCB-exposed middle-aged males, which exhibited similar preferences to social and non-social stimuli when compared to middle-aged controls. Furthermore, results showed that plasma levels of both corticosterone and acetylcholinesterase activity were higher in all PCB-exposed middle-aged males and females than in their control counterparts. In summary, although the effects of PCBs were only of moderate magnitude, our results suggest that a PCB mixture can act as an endocrine disruptor in offspring mice, disturbing the formation of normal social habits.

## 1. Introduction

Several lines of evidence indicate that early-life exposure to polychlorinated biphenyls (PCBs) alters behavior and cognitive function in later life (Boix et al., 2011; Cauli et al., 2012; Schantz et al., 1991; Soualeh et al., 2017; Tian et al., 2011). In addition, both behavioral and cognitive toxicity of PCBs has been shown on the offspring, in both human studies (Chen et al., 1994; Harada, 1976; Jacobson et al., 1985; Sagiv et al., 2012, 2010) and animal models (Eriksson and Fredriksson, 1996; Kuriyama and Chahoud, 2004; Schantz et al., 1991; Tian et al., 2011). Interestingly, effects on offspring through maternal exposure to PCBs can be both permanent (Dridi et al., 2017; Elnar et al., 2012) and transient (Cauli et al., 2012; Sugawara et al., 2006). Moreover, PCBs may act as endocrine disrupting chemicals, often having sexually dimorphic effects (Cauli et al., 2012; Dridi et al., 2017; Kavlock et al., 1996; Lesmana et al., 2014; Li et al., 2008; Soualeh et al., 2017).

However, less work has been focused on studying the effects of perinatal exposure to PCBs on social behavior. Investigations on humans have reported that prenatal exposure to PCBs modified gender-typical playing behavior expressed in school-age children recruited in

both the Dutch and Duisburg cohorts (Vreugdenhil et al., 2002; Winneke et al., 2014). In rodent models, it has been stressed that early-life exposure to PCBs reduced socio-sexual interactions in rats including reduced lordosis behavior in females (Wang et al., 2002) and increased latency of sexual behavior in males (Colciago et al., 2009). Perinatal exposure to PCB 77 resulted in impaired partner preference in adult female rats (Cummings et al., 2008). Interestingly, alterations in these social behaviors could be related, at least to a lesser extent, to impairments in social memory and appetitive social investigation (Lee et al., 2008; Wang et al., 1999). In this regard, it has been shown that perinatal exposure to PCBs altered social behaviors in rats, including juvenile social recognition and adult social investigation (Jolous-Jamshidi et al., 2010). PCBs could further affect social interactions through their ability to cause sensory deficits in auditory, visual, and olfactory functions (Apfelbach et al., 1998; Bell, 2014), which are important in receiving and encoding social signals. In addition, social interactions could be affected by increased anxiety, which in turn leads to social avoidance, as demonstrated in rats prenatally exposed to PCB 126 displaying both anxiogenic behavior in an open field test and reduced interactive behavior in the social interaction test (Orito et al.,

\* Corresponding author at: Université de Lorraine, Rue du Général Delestraint, Campus Bridoux, 57070 Metz, France.  
E-mail address: [jaouad.bouayed@univ-lorraine.fr](mailto:jaouad.bouayed@univ-lorraine.fr) (J. Bouayed).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.yhbeh.2017.09.002>

Received 11 May 2017; Received in revised form 5 September 2017; Accepted 9 September 2017  
0018-506X/ © 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

2007). In adult preschoolers, prenatal exposure to PCB 153 was correlated with anxiety and reduced positive affect (Plusquellec et al., 2010). Nevertheless, anxiolytic-like effects of developmental exposure to PCBs were also reported in animal models (Bell et al., 2015; Gillette et al., 2016), and thus, low levels of anxiety could facilitate social interactions in PCB-exposed animals. In this regard, sexually dimorphic effects on social and anxiety-like behavior were observed in rats following developmental exposure to PCBs (Aroclor 1221), as alterations have concerned only adolescent females, displaying an increase in pro-social and reduction in anxiety-related behavior (Bell et al., 2016). However, males have exhibited small but significant changes in socio sexual preferences in adulthood (Bell et al., 2016). Discrepancies between findings from different studies could be related to several factors including differences in (i) the behavioral tests and/or the protocols employed, (ii) the study design, including the duration of exposure (e.g., gestational, lactational, or gestational plus lactational exposure), (iii) the type of PCB congeners or mixtures administered, (iv) PCB dose, (v) the age of rodents at which the parameters were assessed, (vi) the sex of rodent studied, and (vii) the species (or the strain) of rodent used.

To the best of our knowledge, there is only one investigation that has evaluated the effect of gestational exposure to PCBs (Aroclor 1221 at 0.5 and 1 mg/kg) on sociability and preference for social novelty of male and female adult offspring rats, revealing a limited impact of prenatal PCB exposure on later adult social behavior in rats (Reilly et al., 2015). In the current study, the effects of gestational plus lactational exposure to PCBs at environmental low doses (10 and 1000 ng/kg) on social preferences in a three chambered social approach test were evaluated in male and female young adult and middle-aged offspring mice. These two age populations were selected because in developmental studies assessing the neurotoxicity of chemicals, the life stages of offspring (e.g., juvenile, adult, middle age, old age) at which the evaluation is performed may be critical, and some alterations may be manifested only later in life. Moreover, markers related to social aspects including concentrations of the stress marker corticosterone, inflammatory enzyme myeloperoxidase (MPO), acetylcholinesterase activity and serotonin levels, were assessed in the plasma of middle aged mice. A mixture of six PCBs, 28, 52, 101, 138, 153, and 180, was used at environmentally low doses and with a profile that closely mimics human exposure to contaminated fish (for further details, see the next section, Materials and methods). We have chosen this mixture as these six PCB congeners are the most commonly found in food matrices, and they account for around 50% of all congeners present. The strength of this study is that the effects of the six PCBs on offspring social behavior are evaluated at both 10 and 1000 ng/kg to assess the estimated tolerable daily intake (TDI) and a more pronounced yet relevant environmental dose. A TDI of 10 ng/kg b.w./day was adopted for this group of six PCB congeners through a simple estimation from a reference dose of 20 µg/kg b.w./day for all 209 congeners (AFSSA, 2007).

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals

Thirty pregnant CD1 mice (Charles River, France), obtained after a mating session in our laboratory as detailed in our previous studies (Bouayed et al., 2009a; Dridi et al., 2014, 2017; Elme et al., 2012), were used in this study. They were housed individually in standard cages with ad libitum access to water and food pellets free of phytoestrogens (SDS Diets, St Gaudens, France) and were maintained on standard 12-h light/dark cycles (lights “on” starting at 8:00 pm), temperature controlled conditions ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ), and a relative humidity of  $55 \pm 10\%$ . The parturition day was considered to be postnatal day (PND) 1. All litters were randomly equalized to have  $n = 10$  pups/litter, 5 pups/sex to prevent litter size bias. On PND 21 (i.e., at weaning), male and female offspring mice were separated from their

mothers and housed in two different rooms ( $n = 5$  per cage) to exclude the effects of sexual pheromones on behavior at adult age. Efforts were made to have a relevant number of females ( $> 150$ ) in the same room in order to develop a prolonged estrous cycle, which is a phenomenon observed by the effects of the all female environment (crowded females) leading to the suppression of estrus due to a prolonged diestrus (Mason and Fessenden, 1965; Whitton, 1959). This method allowed us to obtain synchronized females, which removed the bias on their behavior originating from the different phases of estrous cycling. In addition to the three experimental offspring groups we employed offspring (other than unexposed controls) originating from the breeding of unexposed mice to be used as the stronger conspecifics in the three-chambered test.

During the dark phase (1 h after lights “off”) of the light/dark cycle, tests on animals were performed in a silent and isolated room under dim red lighting for a maximum of 9 h per day of experimentation (i.e., experiments were finished at 5 h after lights “off” to avoid circadian cycle bias). The test mice were socially isolated for 24 h prior to experiments to induce an increase in the amount of social interactions in the three chamber test. All animal procedures were performed in accordance with the relevant European Union regulations (Directive 2010/63/EU) and were approved by the institutional ethics committee of the University of Louvain (authorization number CEMEA 2013 0010).

### 2.2. Animals diet manipulation

#### 2.2.1. Preparation of the six-PCB mixture

The six indicator NDL-PCBs (28, 52, 101, 138, 153, and 180) were purchased from Sigma-Aldrich Co. (St. Quentin Fallavier, France, purity  $> 99\%$ ). The profile of the PCBs in contaminated fish predominantly includes NDL-PCBs, in which the six NDL-PCBs indicators constitute around 56%, whereas DL-PCBs represent only 9% (Bhassan et al., 2007; Elme et al., 2012). Of the six NDL-PCBs, PCBs 153 and 138 are the most abundant congeners, constituting approximately 37% and 32%, respectively, followed by PCB 101 (12%), PCB 180 (11%), PCB 52 (6%), and PCB 28 (2%) (Elme et al., 2012; Karl et al., 2010; Nasso et al., 2005; Szlinder-Richert et al., 2009).

A stock solution of the six NDL PCBs (30 mg NDL PCB mixture in 30 ml of rapeseed oil) was prepared depending on the occurrence of each congener in the contaminated fish matrices as mentioned above. To ensure perfect solubility and homogenization of the six PCBs in the rapeseed oil, we first dissolved 80 mg (30 mg) in 3 ml of the ethyl acetate. Then, we added 30 ml of rapeseed oil to the mixture obtained. After magnetic agitation (1 h), the solvent was removed using a rotary evaporator at  $40^\circ\text{C}$ .

#### 2.2.2. PCB paste preparation

The contaminated food (paste consisting of PCBs and chow) was prepared daily for a group of mothers ( $n = 10$ ) by mixing 10 g of powdered food pellets free of phytoestrogens with 10 ml of water, 0.5 ml of sweet syrup, and 1 ml of rapeseed oil diluted PCB solution (at 10 or 1000 ng/ml) with a household kitchen blender (Robot multifonction Seb Velen in 8553, France). Vigorous mixing was employed to ensure complete mixing, following protocols that were established in earlier investigations (Soustiel et al., 2017; Dridi et al., 2014). The obtained homogeneous paste was heated at  $37^\circ\text{C}$  for 24 h in an oven. On the following day, the paste was cut into smaller pieces depending on the weight of the pregnant and nursing females (40–70 g) in order to be delivered at 10 and 1000 ng of PCBs/kg b.w./day to the mice. For example, a dam weighing 45 g received 0.9 g of low (10 ng/kg) or highly (1000 ng/kg) polluted paste with PCBs. For control pregnant and lactating mice ( $n = 10$ ), the paste was prepared with the same ingredients mentioned above but without adding PCBs.

### 2.2.3. Perinatal exposure to six PCB mixture

Pregnant females were allocated to the three experimental groups by stratified randomization; each group of dams ( $n = 10$ ) ingested the standard diet (food pellets) plus paste with or without PCBs (i.e., paste spiked with 0, 10, or 1000 ng of PCBs/kg b.w.) on a daily basis from gestational day (GD) 6 onward until PND 21 (i.e., weaning). The appropriate pastes were placed into each female's cage on a daily basis during the exposure period. The paste was completely consumed by each female, and no residual paste was found in the cages. Thus, in addition to control mice receiving the standard diet plus paste without PCBs, two groups of female mice ( $n = 10$  per group) ingested PCBs at doses of 10 and 1000 ng/kg b.w., which corresponded to the sum of the six selected indicators.

## 2.3. Social behavior

A three-chamber social apparatus (60 cm  $\times$  40 cm  $\times$  25 cm) was used. All parts of the apparatus were made of dark polystyrene plastic, including walls that permitted its division into three equal chambers (left, center, and right each of dimensions 40 cm  $\times$  20 cm  $\times$  25 cm). The subject mouse was placed in the central chamber for 1 min of habituation.

To test sociability during the first session of the task, a stranger mouse of the same age and sex as the subject mouse but with no previous interaction was placed into the wire cup in one of the side chambers; the other side chamber contained an empty wire cup. In this session of the social test, sliding doors were opened and the test mouse could freely explore all three chambers. The behavioral performances of the subject mouse with regard to the social chamber (containing an unfamiliar/stranger mouse) and non-social chamber (containing the wire cup alone) were assessed for 5 min (Klaric et al., 2017; Wang et al., 2016).

To test social novelty preference of the subject mouse, a second stranger mouse was placed in the remaining wire cup, while the first stranger mouse (now familiar) stayed in its wire cage, and the doors were opened so that the test mouse could freely explore all three chambers for a second session of 5 min (Klaric et al., 2017). In both sessions, the following parameters were recorded and measured by a researcher in a blinded manner: the time spent in each chamber, the transitions between each chamber, and the number and time of sniffs toward familiar and novel congeners. Tests were conducted in one male and one female mouse (randomly selected from each litter (there were 10 litters per group) in a silent, isolated room under dim red light. At young adult (i.e., PND 50) and middle age (i.e., PND 330) stage, the social behavior of the randomly chosen male and female offspring mice (i.e., one animal/sex/litter at each age) was assessed. Thus, 10 young adults/sex/group and 10 middle aged/sex/group were selected. The stranger mouse, which had the same age and sex as the subject mouse (for further details see Section 2.1 above) was also randomly selected.

All behavioral experiments were recorded and behavioral performances were evaluated by a human observer in a blinded fashion.

### 2.4. Middle aged offspring biochemical analysis

For the biochemical analyses, a total of six middle aged mice (off spring) per sex and group were randomly selected from 10 U/group (one mouse/litter), anesthetized with isoflurane, and decapitated. Blood samples were taken within 20 s of the middle aged animals being first handled.

#### 2.4.1. Corticosterone level

Total plasma corticosterone levels were assayed in the blood of middle-aged offspring mice using the ELISA kit purchased from Enzo Life Sciences (sensitivity: 27 pg/ml, Farmingdale, NY, USA), according to the manufacturer's instructions.

#### 2.4.2. Myeloperoxidase (MPO) level

MPO levels were evaluated in plasma collected from whole heparinized blood of middle-aged offspring mice using a mouse ELISA kit (Catalog #ab133458; Abcam, Cambridge, UK) according to the manufacturer's instructions.

#### 2.4.3. Acetylcholinesterase activity assay

Acetylcholinesterase activity was spectrophotometrically determined (DU 720 UV/Visible spectrophotometer, Beckman Coulter, Palo Alto, CA) in middle-aged offspring mouse plasma according to Ullman et al. (1961); in brief, 0.05 ml of phosphate buffer (0.1 M, pH 7.5) was mixed with 0.05 ml of 8 mM 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) and 0.05 ml of plasma. After 5 min at ambient temperature, the reaction was started by adding 0.05 ml of acetylthiocholine (0.25 mM) to the mixture. Acetylcholinesterase activity was assessed at 412 nm (at 20 °C) by kinetic measurement using the molar extinction coefficient [ $\epsilon$ ]  $13,600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . The results were expressed as nanomoles acetylthiocholine hydrolyzed per minute per milligram protein.

#### 2.4.4. Serotonin level

Plasma serotonin levels were assayed in the blood of middle-aged offspring mice using the ELISA kit purchased from Abcam (sensitivity: 0.293 ng/ml, Catalog # ab133053) according to the manufacturer's instructions.

## 2.5. Statistical analyses

Behavioral measurements were analyzed using three way ANOVA, considering perinatal exposure to PCBs, sex, and age as independent between-subject fixed factors to compare experimental groups. Biochemical measurements were analyzed using two way ANOVA with perinatal exposure to PCBs and sex as the main fixed factors. The significant effects of the exposure were further assessed using Fisher's protected LSD test when ANOVA results suggested significant differences. For within-group comparisons, independent Student's *t*-tests (normal distribution) and Mann-Whitney *U* tests (non-normal distribution) were used to compare side preferences (i.e., stranger side vs. empty side and familiar side vs. novel stranger side). For intergroup offspring mice, performances in the social test were compared according to the sex (males vs. females) and age (young adult vs. middle age) using Student's *t* test or Mann-Whitney *U* tests. The results are reported as the mean  $\pm$  SEM.

Effect size comparisons were performed for ANOVA (partial eta squared,  $\eta_p^2$ ) and post hoc tests (Cohen's *d*, *d*) (eta squared represents the proportion of variance that is accounted for by the tested factor. A  $\eta_p^2 > 0.06$  is considered medium and  $\eta_p^2 > 0.14$  is considered large of effect size. A Cohen's *d* of 0.8 is considered a large effect size and represents a difference in means that equals 0.8 standard deviations. For all statistical evaluations, the level of significance was set at  $p < 0.05$  (two-sided). All statistical analyses were performed using SPSS 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL).

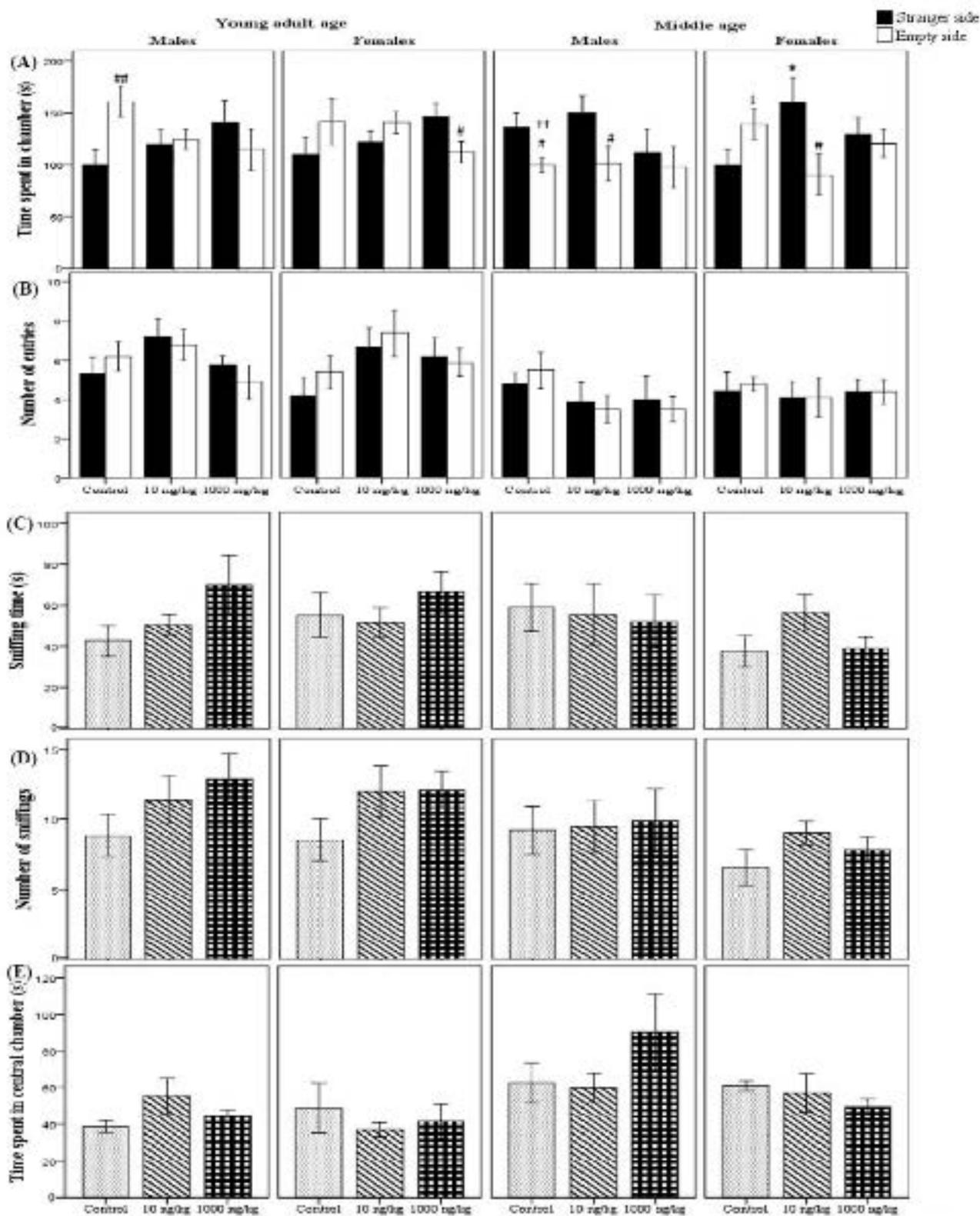
## 3. Results

### 3.1. Social behavior

#### 3.1.1. Sociability assay

Two-way ANOVA revealed that the effects of exposure to PCBs on the number of entries into the empty side [exposure  $\times$  age:  $F(2, 104) = 3.32, p < 0.05, \eta_p^2 = 0.06$ ] and the time spent on the stranger side depended on the age of mice [exposure  $\times$  age:  $F(2, 104) = 2.02, p \leq 0.05, \eta_p^2 = 0.05$ ].

Post hoc comparisons demonstrated that only middle aged females perinatally exposed to PCBs at the 10 ng/kg dose spent significantly more time in the social chamber than their control counterparts ( $p < 0.05, d = 0.96$ ) (Fig. 1A).



(continued on next page)

**Fig. 1.** Effects of perinatal exposure to PCBs at 10 and 1000 ng/kg b.w. on the behavioral performance of young adult and middle-aged male and female offspring mice ( $n = 3-10$ ) in the test of sociability. (A) Time spent in chamber reflecting the choice of the subject mouse for a chamber containing a stranger mouse vs. an empty chamber. (B) Number of entries into each side (i.e., stranger side vs. empty side). (C) Time spent sniffing a stranger, an unfamiliar conspecific. (D) Number of sniffings of stranger conspecific. (E) Time spent in the central chamber of the social test apparatus. Data are reported as mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ ; significantly different from the control (between-group comparison); \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$ ; significantly different within-group comparison between stranger side and empty side;  $\dagger p < 0.05$ ; significantly different between middle-aged males and female counterparts;  $\ddagger p < 0.01$ ; significantly different between young adult males and middle-aged males.

In addition, concerning the 10 ng/kg dose, within-group comparisons showed that perinatally PCB-exposed male ( $t = 2.07$ ,  $p < 0.05$ ,  $d = 0.92$ ) and female ( $t = 2.22$ ,  $p < 0.05$ ,  $d = 0.99$ ) middle-aged offspring mice demonstrated a preference for sociability by spending more time in the social side than the empty side (Fig. 1A). Concerning the 1000 ng/kg dose, only perinatally PCB-exposed young adult female offspring showed a preference for spending more time investigating the stranger conspecific than the empty side, as detected in the sociability test ( $t = 2.09$ ,  $p < 0.05$ ,  $d = 0.93$ ) (Fig. 1A).

No significant effects of perinatal PCB exposure on both activity and social anxiety were found when considering the number of entries (Fig. 1B) into the empty side and the time spent in the central chamber (Fig. 1E) as behavioral indicators.

While within group comparisons showed that male young adult control mice spent significantly more time in the non social chamber than the social chamber ( $t = -2.97$ ,  $p < 0.01$ ,  $d = 1.33$ ), middle-aged adult control male mice showed a significant preference for the social stimulus over an empty chamber ( $t = 2.36$ ,  $p < 0.05$ ,  $d = 1.04$ ) (Fig. 1A).

Sex comparisons showed a significant difference only between unexposed middle aged males and their female counterparts with regard to time spent in the non-social chamber ( $t = 2.55$ ,  $p < 0.05$ ,  $d = 1.15$ ) (Fig. 1A). Age comparisons showed that unexposed young adult males spent significantly more time in the non social chamber than their middle-aged counterparts ( $t = 3.68$ ,  $p < 0.01$ ,  $d = 2.21$ ) (Fig. 1A).

### 3.1.2. Social novelty assay

With respect to the preference for social novelty assay (i.e., the second session), three way ANOVA revealed main effects of early life exposure to PCBs only on the time spent in the familiar side animal and the sniffing time of the familiar conspecific animal [both  $F(2, 104) = 3.54$ , both  $p < 0.05$ ,  $\eta_p^2 = 0.06$  and  $\eta_p^2 = 0.07$ ]. Three way ANOVA revealed significant interactions between the exposure and sex on the time spent on the familiar side [ $F(2, 104) = 4.17$ ,  $p < 0.05$ ,  $\eta_p^2 = 0.07$ ], the number of sniffings [ $F(2, 104) = 4.57$ ,  $p < 0.05$ ,  $\eta_p^2 = 0.09$ ], and time spent sniffing the familiar mouse [ $F(2, 104) = 6.68$ ,  $p < 0.01$ ,  $\eta_p^2 = 0.12$ ]. In addition, the sniffing time of the familiar conspecific was significantly affected by the interactions between exposure, sex, and age [ $F(2, 104) = 3.29$ ,  $p < 0.05$ ,  $\eta_p^2 = 0.07$ ].

Post hoc comparisons showed that perinatal exposure to PCBs at the 10 ng/kg dose significantly decreased the sniffing time of the familiar conspecific animal for both young adult females ( $p \leq 0.05$ ,  $d = -0.75$ ) and middle aged males ( $p < 0.05$ ,  $d = -1.27$ ) relative to their respective controls (Fig. 2C).

Comparisons within groups of mice perinatally exposed to 10 ng/kg PCB revealed that only young adult and middle aged males exhibited a significant preference for social novelty, revealed by both the increased sniffing time and time spent with the novel stranger, as compared to spending time ( $t = -5.46$ ,  $p < 0.001$ ,  $d = 2.44$ ;  $t = -3.15$ ,  $p < 0.01$ ,  $d = 0.92$  respectively) (Fig. 2A) and sniffing time ( $t = -2.27$ ,  $p < 0.05$ ,  $d = 1.01$ ;  $t = -3.35$ ,  $p < 0.01$ ,  $d = 1.5$  respectively) (Fig. 2C) with the familiar conspecific.

Post hoc analyses demonstrated the 1000 ng/kg dose significantly decreased both the time spent on the familiar side ( $p < 0.05$ ,  $d = -0.99$ ) and the sniffing time of the familiar conspecific ( $p < 0.01$ ,  $d = -1.28$ ) in the young adult females compared to controls (Fig. 2A and C, respectively). Within group comparisons showed

that 1000 ng/kg PCB-exposed female young adult mice showed a preference for spending more time exploring a novel stranger conspecific than the familiar conspecific ( $t = 2.49$ ,  $p < 0.05$ ,  $d = 1.11$ ) (Fig. 2A). Young adult males perinatally exposed to 1000 ng/kg PCBs showed a significant preference for spending more time sniffing at a novel stranger conspecific than the familiar congeners ( $t = 2.04$ ,  $p < 0.05$ ,  $d = 0.93$ ) (Fig. 2C).

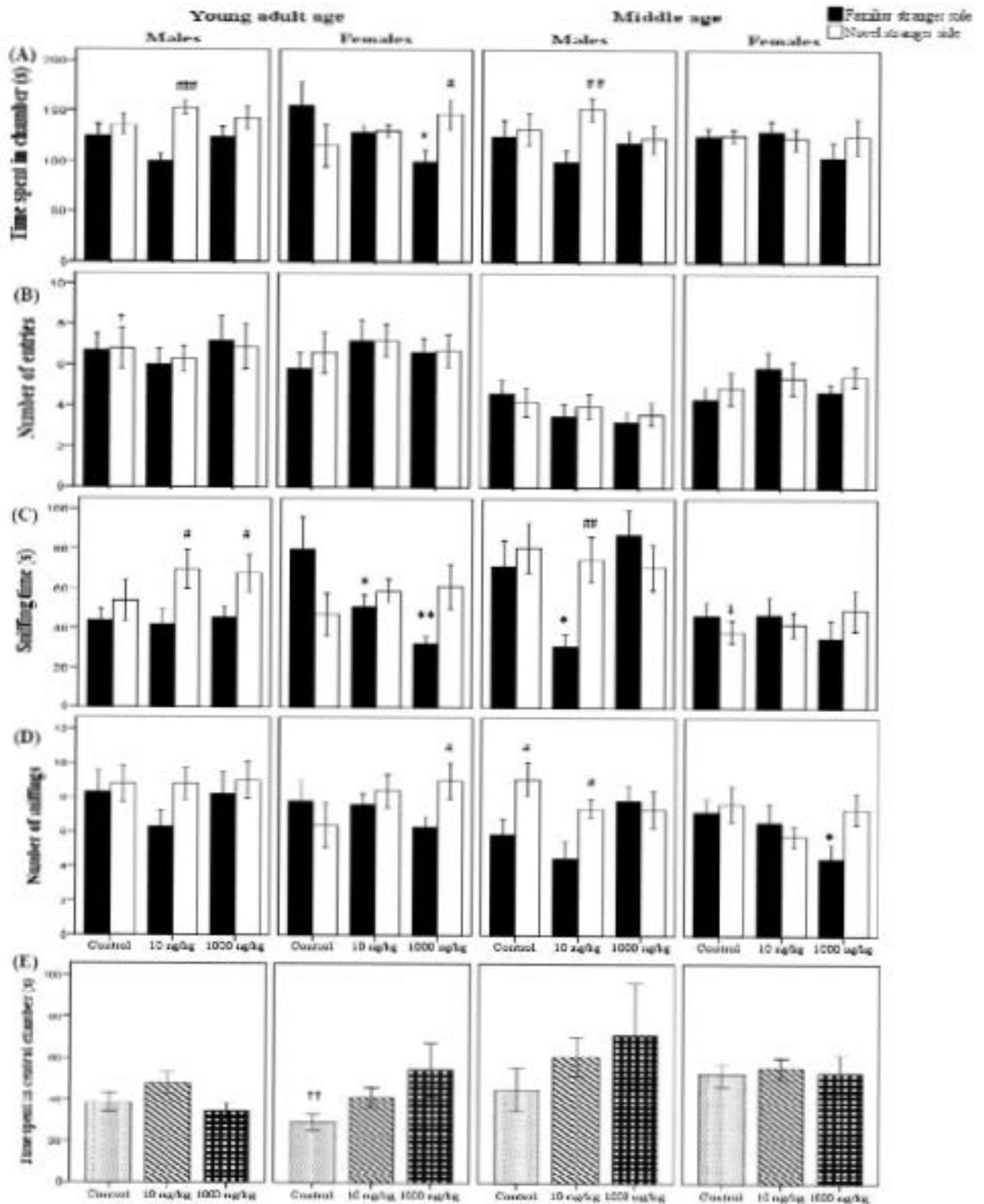
Post hoc analyses demonstrated that middle aged females perinatally exposed to PCBs at 1000 ng/kg showed a significant decrease in the sniffing frequency of the familiar conspecific relative to controls ( $p < 0.05$ ,  $d = -1.09$ ) (Fig. 2D). Within group comparisons demonstrated a significant increase in the sniffing frequency of the novel stranger over the familiar conspecific in middle-aged male control mice ( $t = -3.42$ ,  $p < 0.05$ ,  $d = 1.08$ ) (Fig. 2D). Middle aged male mice exposed to 10 ng/kg performed more sniffings of the novel stranger conspecific ( $t = 2.50$ ,  $p < 0.05$ ,  $d = 1.12$ ) compared to the familiar congeners (Fig. 2D). Additionally, young adult females perinatally exposed to 1000 ng/kg PCBs performed more sniffings of the novel stranger conspecific ( $t = 2.21$ ,  $p < 0.05$ ,  $d = 0.86$ ) compared to the familiar conspecific (Fig. 2D).

Similar to the results obtained in the first session, our data confirmed that all PCB-exposed mice (both sexes and ages) did not display social anxiety-related behavior as their time spent in the central chamber was not significantly different from that spent by controls (Fig. 2E).

For age comparisons of unexposed mice (controls), Student's *t*-tests revealed that unexposed young adult females spent significantly less time in the central chamber than their middle-aged counterparts ( $t = 3.53$ ,  $p < 0.01$ ,  $d = 1.60$ ) (Fig. 2E). In addition, Student's *t*-tests showed that unexposed young adult males performed significantly more entries into the novel stranger's chamber than their middle-aged counterparts ( $t = 2.15$ ,  $p < 0.05$ ,  $d = 0.97$ ) (Fig. 2E). However, sex comparisons for mice controls revealed a significant difference only between unexposed middle aged males and their female counterparts with regard to sniffing time of a novel stranger ( $t = 2.92$ ,  $p < 0.05$ ,  $d = -1.37$ ) (Fig. 2C).

### 3.2. Middle aged offspring plasma measurements

Two way ANOVA revealed main effects of early life exposure to PCBs on all the studied plasma markers: corticosterone [ $F(2, 30) = 43.33$ ,  $p < 0.001$ ,  $\eta_p^2 = 0.74$ ], MPO [ $F(2, 30) = 5.73$ ,  $p < 0.01$ ,  $\eta_p^2 = 0.28$ ], acetylcholinesterase [ $F(2, 30) = 51.73$ ,  $p < 0.001$ ,  $\eta_p^2 = 0.77$ ], and serotonin [ $F(2, 30) = 8.98$ ,  $p < 0.01$ ,  $\eta_p^2 = 0.37$ ]. The effect of sex was only found for acetylcholinesterase activity [ $F(1, 30) = 15.09$ ,  $p < 0.01$ ,  $\eta_p^2 = 0.33$ ], which was also influenced by perinatal exposure to PCBs [exposure  $\times$  sex  $F(2, 30) = 3.54$ ,  $p < 0.05$ ,  $\eta_p^2 = 0.19$ ]. Thus, post hoc comparisons showed a significant increase in plasma levels of corticosterone in 10 and 1000 ng/kg PCB exposed males (both  $p < 0.001$ ,  $d = 6.65$ ,  $d = 5.04$ ) and in 10 and 1000 ng/kg PCB exposed females (both  $p < 0.001$ ,  $d = 3.98$ ,  $d = 3.23$ ) (Fig. 3A). Moreover, perinatal exposure to PCBs (10 and 1000 ng/kg) increased acetylcholinesterase activity in males (both  $p < 0.001$ ,  $d = 7.55$ ,  $d = 2.76$ ) and females (both  $p < 0.001$ ,  $d = 5.80$ ,  $d = 3.86$ ) in comparison to controls (Fig. 3C). In addition, in middle aged females, subsequent analyses demonstrated a significant increase in plasma levels of MPO only at the 1000 ng/kg dose ( $p < 0.05$ ,  $d = 1.71$ ) (Fig. 3B) and a significant decrease in plasma levels of serotonin at both



(Continued on next page)

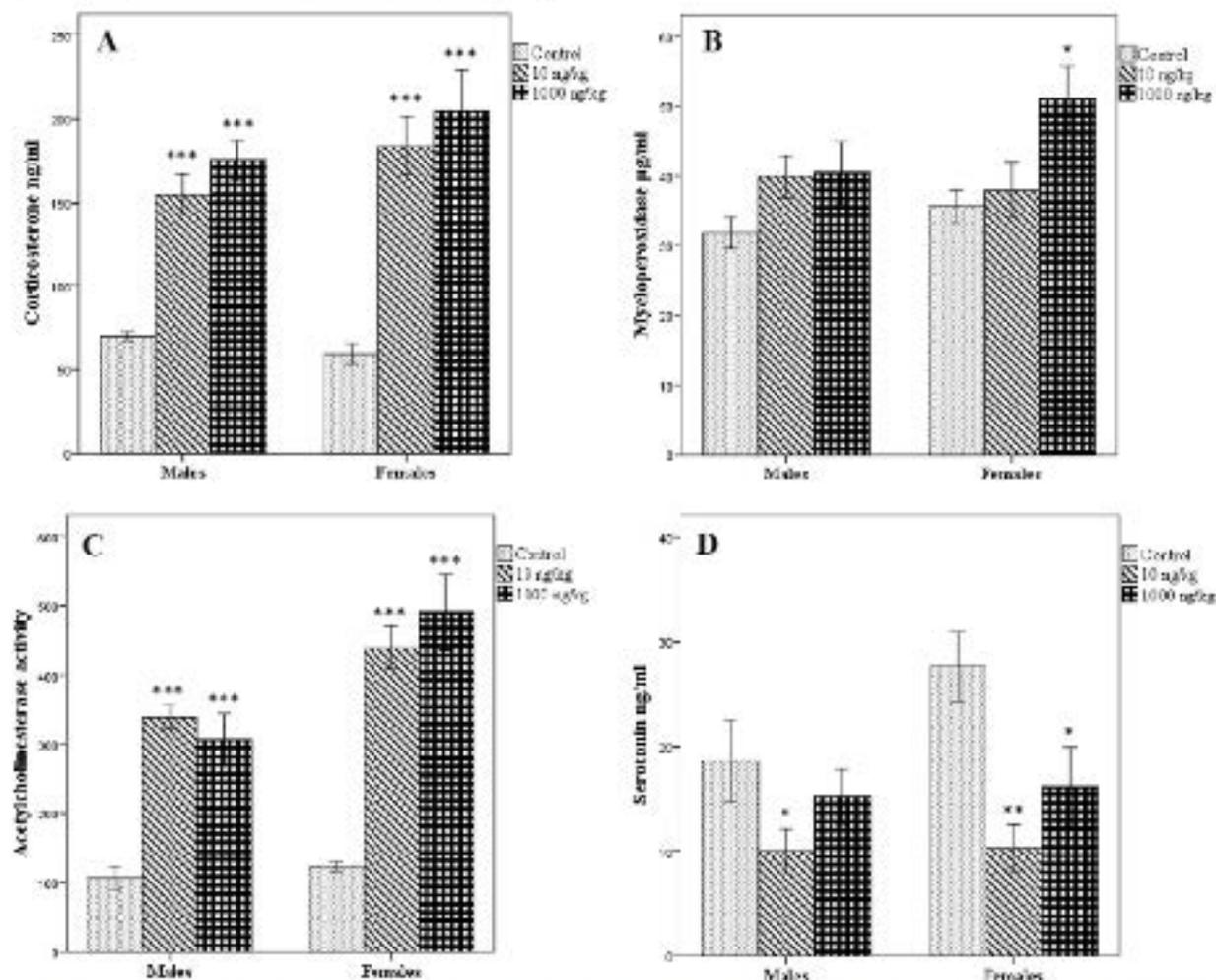
**Fig. 2.** Effects of perinatal exposure to PCBs at 10 and 1000 ng/kg on the behavioral performances of young adult and middle-aged male and female offspring mice ( $n = 6-10$ ) in the test of preference for social novelty. (A) Time spent in chamber reflecting the choice of the subject mouse for a familiar conspecific vs. novel stranger mouse, newly introduced unfamiliar conspecific. (B) Number of entries into each side (i.e., familiar side vs. novel stranger side). (C) Number of sniffings at familiar conspecific vs. novel stranger mouse. (D) Time spent sniffing at familiar conspecific vs. novel stranger mouse. (E) Time spent in the central chamber of the social nest apparatus. Data are reported as mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$ : significantly different from the control (between-group comparison); <sup>†</sup> $p < 0.05$ , <sup>††</sup> $p < 0.01$  and <sup>†††</sup> $p < 0.001$ : significantly different within-group comparison between familiar side and novel stranger side; <sup>‡</sup> $p < 0.05$  and <sup>‡‡</sup> $p < 0.01$ : significantly different between middle-aged males and female counterparts; <sup>§</sup> $p < 0.05$  and <sup>§§</sup> $p < 0.01$ : significantly different between young adult males and middle-aged males.

the doses (10 ng/kg;  $p < 0.01$ ,  $d = -2.51$  and 1000 ng/kg;  $p < 0.05$ ,  $d = -1.32$ ) (Fig. 3D) in comparison to controls. Serotonin levels also decreased in 10 ng/kg PCB-exposed middle-aged males compared to controls ( $p \leq 0.05$ ,  $d = -1.12$ ) (Fig. 3D).

#### 4. Discussion

In this study, social preferences of offspring mice perinatally exposed to low doses of six PCB-NDEs were studied in both the sociability assay, which evaluates mouse preferences between an unfamiliar conspecific and an empty wire cage, and social novelty assay, which assesses mouse preferences between the now familiar conspecific animal and a novel unfamiliar conspecific. It has been argued that the sociability and

social novelty assays evaluate two different components of social behavior in the three-chambered social test (Moy et al., 2009). Although the observed effects of PCBs were to an extent limited in this study, our results showed that exposed male and female offspring mice at both the ages, i.e., young adult (PND 90) and middle (PND 330) ages, exhibited altered sociability levels and impaired levels of preference for social novelty, compared to unexposed controls. In addition, biochemical results targeting markers related to social aspects were also investigated. Results showed that plasma levels of both corticosterone and acetylcholinesterase activity were higher in all PCB exposed middle aged mice than in controls.



**Fig. 3.** Effects of perinatal exposure to PCBs at 10 and 1000 ng/kg on the plasma markers assessed in male and female middle-aged offspring mice ( $n = 6$ ). (A) Corticosterone, expressed as ng/ml. (B) Myeloperoxidase (MPO), expressed as µg/ml. (C) Acetylcholinesterase activity, expressed as nmol acetylcholine hydrolyzed per minute per milligram protein. (D) Serotonin, expressed as ng/ml. Data are reported as mean  $\pm$  SEM.

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$ : significantly different from the control.

#### 4.1. Social behavior of unexposed CD1 mice

Social behavior, including reciprocal interactions, provides conspecifics with greater chances to reproduce and improve their survival rates (Kaidanovich-Beilin et al., 2011; Provenzano et al., 2016). The time spent in the chambers, sniffing time, and number of sniffings are valid markers to quantify the level of social preferences in both the assays of the three-chamber test (Moy et al., 2004; Pearson et al., 2010; Pobbe et al., 2012; Wang et al., 2016). The mouse is accepted as a highly social species, and thus, it is novelty-seeking (Moy et al., 2004, 2007; Provenzano et al., 2016). However, in this study, the low sociability detected in unexposed male young adult offspring reflected by significant preference for spending time on the side containing an empty wire cage, which has no social valence, compared to the side containing an unfamiliar (stranger) conspecific mouse may account for increased social anxiety (Fig. 1A). Furthermore, unexposed male and female young adults showed low levels of preference for social novelty (Fig. 2). In young male mice, Moy et al. (2007) and (2008), investigating 21 mouse inbred strains of divergent genetic backgrounds, demonstrated that the levels of both sociability and preference for social novelty in the three-chambered social test were mouse strain-dependent responses. Interestingly, inbred mouse strains exhibiting low social approach were also characterized by high levels of anxiety behavior and low exploratory locomotion (Moy et al., 2007, 2008). We have previously reported an important heterogeneity regarding the anxiety of adult outbred CD1 male mice (Bouayed et al., 2009b; Rammal et al., 2010; Rammal et al., 2008). The increased aggressiveness in CD1 males (Lofgren et al., 2012) has been considered as a strong limitation for studying the sociability in the one-chamber social test (Hsieh et al., 2017). However, it is interesting to point out that, to our knowledge, there is only one recent study that has investigated social preferences in juvenile CD1 male mice (4–5 weeks of age) by means of the well-accepted three-chambered social test (Hsieh et al., 2017). Interestingly, it has been found that the social behavior of CD1 mice is dependent on the acclimation conditions in the three-chambered test. CD1 mice did not show social preference when the habituation was only in the middle chamber, while they displayed social preference when the habituation was in all the three chambers (Hsieh et al., 2017). Although it was complicated to interpret the lack of social preference while using only the habituation condition in the middle chamber, the authors concluded that outbred CD1 mice are suitable for social testing in the three-chambered test when employing the habituation condition that involves all three chambers (Hsieh et al., 2017). Although it is easier to achieve statistical significance with C57 (an inbred strain) than with CD1 mice, it is debated that CD1 mice display larger variability, which is more representative of the human population (outbred mice reflect genetic diversity better in human population than in inbred mice strains). Therefore, it has been suggested that outbred CD1 mice be preferentially used for social testing whenever possible, using the specific acclimation condition in the three-chambered test (Hsieh et al., 2017). Thus, the low social approach displayed by Swiss albino CD1 mice in this study could be related to our experimental protocol, using the habituation only in the middle chamber. However, more studies are needed to characterize the social behavior of both male and female CD1 mice at different stages of life. In middle-aged mice, our results showed that unexposed males exhibited a higher level of sociability than their female counterparts (Fig. 1A). Comparing unexposed young adult and middle-aged offspring, our results excluded any aging-related loss of social behavior in mice CD1 strain (Figs. 1A, 2A). Our findings are consistent with the limited data available on rodent social behavior in middle age, revealing that social interactions in middle-aged rats (9 months old) were found similar to the ones obtained in adult rats (3 months old); however, aging-related social deficits were detected later in old-aged rats (18 and 24 months old), with greater changes in females (Perkins et al., 2016).

#### 4.2. Effects of PCBs on social behavior of CD1 mice

Our previous studies have demonstrated that exposure of CD1 mice to dietary contaminants, including PCBs, may often result in sexually dimorphic effects (Dridi et al., 2017; Soualeh et al., 2017). In this study, our results showed that PCB-exposed male and female offspring, at 10 ng/kg and 1000 ng/kg and at young adult and middle ages in both the assays of the three-chambered test, displayed social interaction patterns different from those exhibited by unexposed offspring (controls). While male young adult offspring perinatally exposed to PCBs at 10 and 1000 ng/kg displayed a low level of sociability, their control counterparts displayed the lowest level of sociability (Fig. 1A). Moreover, 10 ng/kg PCB-exposed middle-aged females exhibited a higher level of sociability by preferring the stranger mouse over the empty wire cage compared to their control counterparts (Fig. 1A). In the social novelty assay, perinatal exposure to 10 ng/kg PCBs resulted in an enhanced social behavioral approach in young adult and middle-aged males relative to controls as they displayed preferences for the novel stranger mouse over the familiar conspecific mouse (Fig. 1A and C). Perinatal exposure to PCBs at 1000 ng/kg induced a reduced social interaction in middle-aged males, which exhibited similar preferences to the social and non-social stimuli compared to middle-aged controls, which displayed a high level of sociability (Fig. 1A). In the social novelty assay, compared to controls, perinatal exposure to PCBs at the dose 1000 ng/kg induced enhanced social interaction patterns in young adult males and females, both of which exhibited a strong novelty preference by choosing interactions with the novel stranger mouse over the familiar mouse (Fig. 2A, C and D). Overall, our results suggest that perinatal exposure to PCB-NDLs (10 and 1000 ng/kg) bidirectionally modulated social preferences in offspring mice in the three-chambered test. However, increased levels of social approach were rather frequently detected in the three-chambered test. Interestingly, it has been found that gestational exposure to PCBs (Aroclor 1221, 0.5 mg/kg) resulted in relatively limited effects on adult social behavior, with higher sensitivity being detected for male offspring (Reilly et al., 2015).

#### 4.3. Effects of PCBs on markers in plasma of middle-aged mice

In this study, we have found elevated corticosterone levels in PCB-exposed middle-aged male and female offspring (Fig. 3A). This stress-adaptive corticosterone production was already associated with altered social behavior in previous studies (Reilly et al., 2015; Veenit et al., 2013). However, it appears that the relationship between corticosterone, the major stress hormone, and social behavior is rather bidirectional, as previously highlighted by the decreased levels of social exploration and increased aggression in corticosterone-injected male rats (Veenit et al., 2013) and enhanced levels of corticosterone in mice submitted to chronic social stress in an enriched environment (Mesa-Gresa et al., 2016). Moreover, our results have demonstrated high levels of acetylcholinesterase activity in the plasma of both PCB-exposed middle-aged males and females (Fig. 3C). Several reports have linked the activity of blood and brain acetylcholinesterase in rodents (Habiba et al., 2012a, 2012b), and the impairment of the activity of this enzyme has been linked to neuropsychological dysfunction such as delirium (Flacker and Lipsitz, 1999; Mussi et al., 1999). However, to the best of our knowledge, this is the first reported data relating impaired social behavior to enhanced acetylcholinesterase activity. In PCB-exposed middle-aged females, a further decrease in the plasma level of serotonin was found (Fig. 3D). Serotonin is a key neurotransmitter that is involved in many integrative functions of the nervous system including mood, anxiety, stress, and social behavior such as aggression and sexual behavior (Olivier, 2015). Although in this study, serotonin evaluation was carried out in blood, it has been suggested that the serotonin level in blood is a reliable indicator of that in brain (Collins et al., 2013). Thus, serotonin might play a role in the observed effects in PCB-exposed females and 10 ng/kg PCB-exposed males, at least in the middle-age, at

which the evaluation was conducted. In addition, the levels of MPO, an inflammatory enzyme produced by activated leukocytes, were found higher only in 1000 ng/kg PCB-exposed middle-aged females (Fig. 5B), suggesting that altered social behavior in 10 and 1000 ng/kg PCB-exposed males and females at both age phases might not be, to a large extent, due to systemic inflammation.

#### 4.4. PCBs: endocrine disruptors and safe dose

PCBs, like other endocrine disrupting chemicals, might disturb either the organizational effects of gonadal hormones on the developing brain during the perinatal period and/or the activational effects of these sex hormones on the brain later in life (Andersen, 2003; Geisler et al., 2013; Palanza et al., 2016), which result in either sexual dimorphism or the elimination of sex differences during the adaptive behavioral strategies adopted by males and females following exposure to hormonally active agents. Yet, it is not clear how early-life chemical insult intersects with sex and gonadal hormones (Andersen, 2003). It is postulated that early insult alters gonadal hormone expression or function (Andersen, 2003; Edwards et al., 2000; McGivern and Flaws, 1996). Alternatively, hormones do alter the nature of the insult (Allen et al., 1998; Andersen, 2003).

It should be noted that in this study, the maternal dose of 10 ng/kg is presumed safe as it was adopted as TDI for the six PCBs NDL in dioxins, representing approximately 50% of all PCBs in the food matrix (AFSSA, 2007). However, this predicted safe dose was only estimated on the basis of the reference dose of all PCBs, i.e., 20 ng/kg h.w. (AFSSA, 2007). Nevertheless, we have already shown that this presumed safe dose or lower concentrations (1 ng/kg) can induce neurodevelopmental and behavioral toxicity, including persistent anxious behavior through lactational exposure (Elnar et al., 2012). In a previous study, we have shown that lactational exposure to six PCBsNDL at 10 ng/kg induced p53 dependent responses to cellular stress and a decrease in the expression of proteins involved in the generation, conduction, and transmission of electrical signals in neurons in postnatal 14-day-old male offspring (Elnar et al., 2015). In the current study, our results showed that PCBs at 10 ng/kg induced increased (although small) levels of social interactions in offspring mice, suggesting a perturbation of social behavior as it was displayed in an atypical manner compared to controls. Toxicological studies are therefore warranted to predict the safe dose of the six PCB-NDLs in humans, e.g., by determining the dose corresponding to the No Observed Adverse Effect Level (NOAEL) in animal models and applying the uncertainty factors (i.e., the inter- and intraspecies safety factors) to extrapolate results from animals to humans.

#### 5. Conclusion

In summary, despite the limitations of our mouse model, our results demonstrated that perinatal exposure to PCBs, at environmentally low doses (10 and 1000 ng/kg), influences social behavior in both male and female young adult and middle-aged offspring mice. Although PCBs in the three-chambered social test produced small changes in a bidirectional manner, high social preferences were rather frequently detected in exposed offspring mice in a sex- and age-dependent manner. Additionally, PCBs altered several biochemical markers including corticosterone, revealing that PCB exposed offspring males and females suffered from increased stress. Our results suggest that regular consumption of PCB contaminated fish by pregnant and lactating women could disturb the formation of normal social habits in their offspring.

#### Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

#### Acknowledgments

This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche (ANR-11-CESA-000) and the European Regional Development Fund (ERDF). We gratefully acknowledge assistance from Dr. Julie Pfeiffer during the development of the three-chambered test and Dr. Torsten Bohn for corrections in the English language.

#### References

- AFSSA, 2007. Opinion of the French Food Safety Agency (Afssa) on the Establishment of Reference Maximum Levels for Nonionizable Polychlorinated Biphenyls (PCBs-NILs) in Food. *Food Safety*, Afssa - Boqueux No. 2006-SA-0028 1–27.
- Allen, S.B., Lawrence, P.M., Sclay, J.B., 1998. Perinatal and perinatal influences on risk for psychopathology in childhood and adolescence. *Dev. Psychopathol.* 10, 513–529.
- Anderson, S.L., 2003. Trajectories of brain development: point of vulnerability or window of opportunity? *Neurosci. Biobehav. Rev.* 27, 3–15.
- Appelhart, R., Peggibon, A., DeWolfe, P., Hagenwiler, H., 1995. The olfactory system as a portal of entry for airborne polychlorinated biphenyls (PCBs) to the brain? *Toxicol. Toxicol.* 72, 204–207.
- Bell, M.R., 2014. Endocrine-disrupting actions of PCBs on brain development and social and reproductive behavior. *Curr. Opin. Pharmacol.* 15, 134–144.
- Bell, M.R., Maronpot, J.M., Rodriguez, R., Rice, A.C., 2010. Neonatal exposure to polychlorinated biphenyls at gestational and juvenile life stages 1. Sexually disruptive effects on social and anxiety-like behaviors. *Horm. Behav.* 78, 168–177.
- Bhavsar, N.P., Finkler, B., Hoyler, A., Ruster, E.J., Jackson, D.A., 2007. Comparison of dioxin-like PCBs in fish: an application for risk assessment. *Environ. Sci. Technol.* 41, 2026–2032.
- Bibi, J., Coll, O., Ledi, H., Felipo, V., 2011. Differential long-term effects of developmental exposure to polychlorinated biphenyl 52, 138 or 153 on motor activity and neuroanatomical gender-dependent and mechanism involved. *Neurochem. Int.* 58, 69–77.
- Bouayed, J., Desre, F., Rymann, H., Klener, A.K., Tyhl, K., Schneider, H., Eychen, G., Soulez, H., 2009a. Effects of lactational exposure to hexachlorobiphenyl 01 (alpha) on postnatal neurodevelopment, neuronal receptor gene expression and behavior in mice. *Toxicology* 259, 97–106.
- Bouayed, J., Hamad, H., Soulez, H., 2009b. Oxidative stress and anxiety: relationship and cellular pathways. *Oxidative Med. Cell. Longev.* 2, 63–67.
- Coll, O., Rodriguez, R., Urzola, M., Felipo, V., 2012. Gender differential effects of developmental exposure to methyl-mercury, polychlorinated biphenyl 156 or 153, or its combinations on motor activity and coordination. *Toxicology* 311, 61–68.
- Chan, Y.-L., Yu, M.-L., Hagan, W.J., Chiu, S.-C., Hsu, C.-L., 1994. A 6-year follow-up of behavior and activity disorders in the Taiwan Yucheng children. *Am. J. Public Health* 84, 415–421.
- Chahgo, A., Lodi, L., Narnetti, G., Vergoni, A.V., Santolucito, A., Ghetti, P., Negri, C., 2009. Chronic treatment with polychlorinated biphenyl (PCB) during pregnancy and lactation in the rat part 2: effects on reproductive parameters, on sex behavior, on mammary secretion and on hypothalamic expression of artemin and BDNF-molecules in the offspring. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 239, 46–54.
- Collin, C.M., Klein, J., Eilam, J.M., 2013. Fetal changes in serotonin levels in brain and blood following acute administration of MDMA. *J. Psychopharmacol.* 37, 109–112.
- Cummings, J.A., Okumu, L.O., Nater, A.A., 2008. Exposure to PCB 77 affects partner preference but not social behavior in the female rat. *Physiol. Behav.* 95, 471–475.
- Deld, I., Leoy, D., Gulguzd, C., Schell, S., Rehr, T., Lantoni, A., Thoma, J.F., Ege, G., Soulez, H., Bouayed, J., 2014. Dietary early-life exposure to contaminated milk does not impact spatial cognitive performance in adult offspring mice as assessed in the Y-maze and the Morris water maze. *Nutr. Res.* 34, 1075–1084.
- Deld, I., Soulez, H., Rehr, T., Soulez, H., Bouayed, J., 2017. Chemically contaminated milk fed to pregnant and lactating mouse dams causes hyperactivity in their offspring. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 1–12. [http://dx.doi.org/10.1006/1439-4917\(2007\)085](http://dx.doi.org/10.1006/1439-4917(2007)085).
- Edwards, H.K., Macthocy, N.J., Barbara, W.M., 2000. The effect of estrus and bleeding on reproductive hormones in the rat. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 24, 783–788.
- Elman, G.L., Courtney, K.D., Andra Jr., V., Pasha-Starr, K.S., 1981. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88–89.
- Elnar, A.A., Desre, F., Desre, F., Felipo, V., Bouayed, J., Klener, A.K., Soulez, H., 2012. Neurodevelopmental and behavioral toxicity via lactational exposure to the sum of six selected non-dioxin-like polychlorinated biphenyl (26-NDL-PCBs) in mice. *Toxicology* 299, 44–54.
- Elnar, A.A., Desre, F., Mery, F., Soulez, H., Nemer, C., 2015. Lactational exposure to low levels of the six non-dioxin-like polychlorinated biphenyls induces gene damage and repression of neuronal activity in juvenile male mice. *Toxicology* 338, 57–65.
- Erksson, P., Fredriksson, A., 1996. Developmental neurotoxicity of four ortho-substituted polychlorinated biphenyls in the neonatal mouse. *Toxicol. Pharmacol.* 1, 157–167.
- Flaxen, J.M., Upton, L.A., 1999. Serum zinc/homocysteine activity changes with acute illness in elderly medical patients. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 54, M12–15.
- Gilks, R., Kelly, M.P., Tappin, S.S., Thompson, I.M., Lewis, D., Cox, A.G., 2015. Anxiety-like behaviors in adulthood are altered in male but not female rats exposed to low doses of polychlorinated biphenyls in utero. *Horm. Behav.* 57, 8–15.

- Clozsa, L., Farnigliani, S., Vom Saal, F.S., Palermo, P., 2013. The effects of bisphenol A on emotional behavior depend upon the timing of exposure, age and gender in mice. *Behav. Behav.* 62, 200–205.
- Hahla, N., Franco, H.M., Albrecht, T.A., Ladd, G.J., Checker, D.G., Olovsky, I.A., 2012a. Correlation of acetylcholinesterase activity in the brain and blood of wild rat varies inversely with *Trypanosoma congolense*. *J. Agric. Dis.* 26–30.
- Hahla, N., Franco, H.M., Albrecht, T.A., Ladd, G.J., Mohammed, A., Olovsky, I.A., Williams, L.S., 2012b. Acetylcholinesterase Activity in the Brain and Blood of Rats Infected With *Trypanosoma Congolense*. *Biological Research* 45, 1848–1858.
- Harada, M., 1975. Intrauterine poisoning: clinical and epidemiological studies and significance of the problem. *Dall. Inst. Cont. Med.* 25 (Suppl.), 1–20.
- Hadi, L.S., Wan, J.H., Miyama, I., Lombardi, P.J., Borley, A., 2017. Cultural GM mice are as capable as inbred C57BL/6J mice in performing social tasks. *Neurosci. Lett.* 537, 143–147.
- Jacobson, S.W., Dean, C.G., Jacobson, J.L., Schwarcz, P.R., Dowler, J.K., 1982. The effect of brominated PCB exposure on visual recognition memory. *Chid Dev.* 55, 873–880.
- Johua-Janzakulic, E., Greenwood, H.C., Mohrland, A.M., Moore, L.A., 2010. Perinatal exposure to polychlorinated biphenyls alters social behaviors in rats. *Toxicol. Lett.* 199, 138–142.
- Kadashynich-Bukacina, O., Lipina, I., Yakovleva, I., Kozlov, I., Wenzel, J.R., 2011. Assessment of social interaction behavior. *J. Vis. Exp.*
- Karl, H., Bladt, A., Rimpler, H., Ludwig, R., Wirthner, W., 2010. Temporal trends of PCB, PCDF and PCB levels in muscle meat of herring from different fishing grounds of the Baltic Sea and annual data of different fish species from the Western Baltic Sea. *Chemosphere* 78, 106–112.
- Kerkela, R. J., Bayne, G.P., DeFava, C., Benson-Craig, P., Gray, L.E., Korman, S., Taylor, D., Luster, M., Mac, M.J., Macko, C., Miller, K., Moore, J., Rolland, K., Scott, G., Shuchman, D.M., Sinks, T., Tibon, H.A., 1996. Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. *Environ. Health Perspect.* 104 (Suppl. 4), 715–740.
- Kivik, T.S., Debra, E.J., Kober, S.A., Ryan, D.T., Lewis, M.D., 2017. Aberrant in-vitro and social behavior in *Mytilus* deficient mice following pharmacologically-induced focal cortical stroke. *Behav. Brain Res.* 316, 29–37.
- Kiripantz, S.M., Chahand, F., 2014. In utero exposure to low-dose 2,2',4,4'-tetrachlorobiphenyl (PCB 118) impairs male fertility and alters acetylcholinesterase in rat offspring. *Toxicology* 222, 188–197.
- Lee, H.J., Caldwell, H.K., Madadi, A.H., Tola, S.G., Young, S.J., W.S., 2005. A conditional knockout mouse line of the oxytocin receptor. *Endocrinology* 146, 3256–3263.
- Lechner, R., Shirokawa, N., Tsubota, Y., Kozeki, T., Kishimoto, M., 2014. Perinatal exposure to hydroxylated polychlorinated biphenyl (OH-PCB 100) causes hyperactivity in male rat pups by altering brain dopamine levels and its receptor. *Toxicol. Environ. Health* 92, 870–883.
- Li, J.A., Braun, M.J., Nishitani, L.J., Day, M., Liu, F., Gray Jr., L.E., 2003. Building a scientific framework for studying hormonal effects on behavior and on the development of the sexually dimorphic nervous system. *Neuroendocrinology* 23, 504–519.
- Loftain, J.L., Brennan, S.E., Harvey, C., Wong, C., King, R., Chavarría, T.E., Dhawan, A.S., Fox, J.A., Mazer, S.J., 2012. Unintentional chemical exposures in group-housed C57BL/6J male surveillance mice (*Mus musculus*). *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 51, 744–749.
- Mandel, H.M., Hinton, F.H., 1960. The sexuality of oestrogen in mice relative to that of the male and female environments. *J. Endocrinol.* 22, 313–319.
- Mattarone, R.P., Bardo, D.J., 1998. Perinatal exposure to diethylstilbestrol: neurobiological considerations and effects on sexual differentiation. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 22, 104–124.
- Miao-Cheun, P., Ramos-Gomez, N., Rodenas, J., 2010. Gonadotropin levels and behavioral changes induced by androgenic exposure to chronic social stress and enriched environment in NMRI male mice. *Physiol. Behav.* 159, 6–17.
- Miy, S.S., Nadler, J.J., Prewé, A., Berkson, E.P., Johns, J.M., Magnuson, T.R., Prewé, J., Crowley, J.N., 2004. Sociability and preference for social novelty in the inbred strain: an approach to assess autistic-like behavior in mice. *Genes Brain Behav.* 3, 897–909.
- Miy, S.S., Nadler, J.J., Young, N.B., Pertz, A., Holloway, L.P., Barbano, B.F., Barbano, D.H., Wilson, M., Oberholtzer, D.W., Lander, J.M., Magnuson, T.R., Crowley, J.N., 2007. Mouse behavioral traits relevant to autism: phenotypes of 10 inbred strains. *Behav. Brain Res.* 176, 4–20.
- Miy, S.S., Nadler, J.J., Young, N.B., Semonson, R.J., Fogel, K.K., Andrade, C.M., Crowley, J.N., Magnuson, T.R., 2008. Social approach and repetitive behavior in slow inbred mouse strains. *Behav. Brain Res.* 181, 118–129.
- Miy, S.S., Nadler, J.J., Young, N.B., Semonson, R.J., Greenwood, A.W., Murphy, D.L., Berezuk, A.J., Crowley, J.N., Magnuson, T.R., Lander, J.M., 2005. Social approach in genetically engineered mouse lines relevant to autism. *Curr. Brain Behav.* 5, 129–142.
- Nandi, L., Patten, B., Anwar, S., Salvaik, G., 1999. Importance of stress autochthonic activity in the assessment of clinical patients with depression. *J. Geniatr. Psychiatry Neurol.* 12, 61–65.
- Raso, B., Pizzoni, D., Ferrarini, M.G., Blascione, R., Lucchini, A., 2002. Perinatal organochlorine pollution in adult marine species from the Gulf of Naples, Southern Italy. *Sci. Total Environ.* 243, 81–95.
- Ohler, D., 2011. Genotype a never-ending story. *Eur. J. Pharmacol.* 755, 2–10.
- Okita, K., Uematsu, N., Mamiya, M., Ikada, J., Egashira, H., Miolana, K., Duwama, N., 2007. Perinatal exposure to 2,2',4,4'-tetrachlorobiphenyl (PCB118) promotes autistic behavior in mice. *Toxicol. J. Exp. Med.* 219, 171–177.
- Palanza, P., Nagel, S.C., Farnigliani, S., Vom Saal, F.S., 2016. Perinatal exposure to endocrine disruptors: sex, timing and behavioral endpoints. *Curr. Opin. Behav. Sci.* 7, 60–78.
- Parsons, B.L., DeFamer, E.B., Blumhard, D.C., Blumhard, B.L., 2000. C57BL/6J mice fail to exhibit preference for social novelty in the three-chamber apparatus. *Behav. Brain Res.* 215, 189–194.
- Parize, A.E., Deonias-Ferreira, T.L., Spasson, R.L., Vantakaya, E.I., Conti, M.M., Ribeiro, C., Dak, Y., 2015. A working model for the assessment of disruptions in social behavior among aged rats: the role of sex differences, social recognition, and working memory. *Exp. Gerontol.* 70, 46–57.
- Pisagalka, P., Macko, G., Donally, B., Ayala, P., Bayar, G., Bernasconi, C., Dagnas, C., Sahn-Amar, B., Fehrer, K., 2010. The relation of environmental contaminants exposure to behavioral indicators in adult perchlarobin in Arctic Quebec. *Neurotoxicology* 31, 17–25.
- Polito, M.L., Pearson, S.L., Blumhard, D.C., Blumhard, B.L., 2012. Oxytocin receptor and *Mopk1* 305/31 knockout mice exhibit altered expressions of autism-related social behavior. *Psychol. Behav.* 107, 641–648.
- Poncinazzo, G., Cellini, G., Buzzi, V., 2016. Genetic control of social behavior: lessons from mouse mice. *Behav. Brain Res.*
- Ravert, H., Bouquet, J., Yonon, C., Sautelot, E., 2005. The impact of high anxiety level on the oxidative status of mouse peripheral blood lymphocytes, granulocytes and monocytes. *Eur. J. Pharmacol.* 524, 173–175.
- Rennel, H., Bouquet, J., Palla, J., Boujedani, N., Souliman, K., 2005. The impact of high anxiety level on cellular and humoral immunity in mice. *Neuroimmunomodulation* 17, 1–5.
- Ridley, M.F., Wank, C.D., Lepper, V.Y., Hannon, L.N., Uney, D., Carr, A.C., 2015. The effect of perinatal PCBs on adult social behavior in rats. *Hum. Behav.* 73, 47–55.
- Sagie, S.V., Thomas, S.W., Bellinger, D.C., Talbot, P.H., Arnold, L.M., Dorick, S.A., 2010. Perinatal organochlorine exposure and behavior associated with attention deficit hyperactivity disorder in school-age children. *Am. J. Epidemiol.* 171, 505–501.
- Sagy, N.A., Tharion, S.W., Edinger, D.L., Akshof, L.N., Jensen, S.A., 2012. Neuropsychological measures of attention and impulse control among 8-year-old children: parental proximity to organochlorines. *Environ. Health Perspect.* 120, 904–909.
- Schwarz, S.L., Leck, E.D., Bowman, R.E., 1991. Long-term neurodevelopmental effects of perinatal polychlorinated biphenyl (PCB) exposure in monkeys. *Environ. Toxicol. Chem.* 10, 21–26.
- Schuch, N., Dadi, I., Eppe, C., Parnas, C., Souliman, K., Bouquet, J., 2017. Perinatal programming of depression-like behaviors by inflammation in adult offspring mice: stressors and effects on social behavior. *Brain Behav. Immun.* 65, 137–147.
- Sugawara, N., Nakai, K., Nakamura, I., Ohba, Y., Suzuki, K., Kameo, S., Ishii, C., Sakai, H., 2006. Developmental and neurochemical effects of perinatal exposure to polychlorinated biphenyls in mice. *Arch. Toxicol.* 80, 265–270.
- Szabo-Belich, J., Kozeki, I., Wawrzynski, J., Dwyer, K., 2008. PCBs in fish from the southern Baltic Sea: levels, Mxycumultaribin patterns, and temporal trends during the period from 1997 to 2008. *Mar. Pollut. Bull.* 56, 98–101.
- Tan, Y.H., Hwan Kim, S., Lee, Y.Y., Jung, C.G., 2011. Maternal and perinatal exposure to polychlorinated biphenyls induces sex-specific anxiety behavior and cognitive deficit in mice offspring. *Synapse* 65, 1022–1031.
- Vasak, V., Cordeiro, M.L., Travençolo, S., Saad, C., 2013. Increased corticosterone in periparturient rats leads to long-lasting alterations in social exploration and aggression. *Brain. Behav. Neurosci.* 7, 26.
- Vreugdenhil, H.J., Loring, C.T., Klister, P.G., Koozma, F.R., Wetigo-Kyponk, M., 2002. Effects of perinatal PCB and dioxin background exposure on cognitive and motor abilities in Dutch children at school age. *J. Polut.* 143, 48–56.
- Wang, J., Xu, G., Guo, C., Liu, X., Longshu, J., Jiao, T.R., 1999. Dexamethasone receptor-mediated regulation of partner preference in female prairie voles (*Microtus ochrogaster*): a mechanism for pair bonding? *Behav. Neurosci.* 113, 602–611.
- Wang, X.Q., Pang, J., Numan, A.A., Chen, L.C., 2002. Developmental exposure to polychlorinated biphenyls affects social behavior of rats. *Psychol. Behav.* 75, 689–696.
- Wang, H., Xu, X., Zhu, Q., 2014. Perinatal exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate influences social behavior and dopamine receptor D2 of adult female mice. *Chemosphere* 144, 1771–1779.
- Whelan, W.K., 1989. Occurrence of anorexia in mice cages in groups. *J. Endocrinol.* 103, 102–107.
- Witacka, G., Hanik, B., Wilińska, J., Kasper-Sommerberg, M., Furd, F., Kramar, D., Schner, G., Wlodek, M., 2014. Behavioral sexual dysregulation in school-age children and early developmental exposure to dioxin and PCBs: a follow-up study of the Salzburg Cohort. *Environ. Health Perspect.* 122, 543–548.

## Résumé

Dans ce travail de thèse, nous avons évalué les effets neurotoxiques multigénérationnels de l'exposition des mères F0 gestantes et allaitantes aux polychlorobiphényles non-dioxin-like indicateurs (PCB-NDL<sub>i</sub>), à un profil mimant l'exposition humaine à partir de poissons contaminés, sur le développement et le comportement, y compris les réponses émotionnelles et les interactions sociales, des deux générations F1 et F2 des souris mâles et femelles, à différentes phases de leur ontogenèse. Deux faibles doses des PCB-NDL<sub>i</sub> : (i) la DJT, qui est de 10 ng/kg/j, et (ii) une dose environnementale de 1000 ng/kg/j, ont été administrés par accès libre aux souris mères F0. En fonction de la modalité d'exposition des parents F1 aux PCB, 4 groupes de génération F2 ont été obtenus, en croisant (i) des pères F1 exposés à des mères F1 non exposées, (ii) des mères F1 exposées à des pères F1 non exposés, (iii) des deux parents F1 exposés, ou (iv) des deux parents F1 non exposés (témoins), aux PCB en période périnatale. Nos résultats ont montré que les mâles adultes de la génération F1 ont manifesté un comportement *dépressif-like* ; alors que les mâles F2, issus uniquement des pères F1 exposés aux PCB, ont exhibé un comportement *anti-dépressif-like*, ce que suggère que l'exposition périnatale des souris F1 aux PCB-NDL<sub>i</sub> a induit une altération multigénérationnelle d'origine parentale du comportement de la résignation, et ce d'une façon sexe dépendante. De même, une altération sexe-dépendante de l'anxiété, a été détectée chez la génération F1 exposées durant la période périnatale aux PCB-NDL<sub>i</sub> comme uniquement les souris mâles d'âge moyen F1 ont développé un phénotype anxieux qui a été transmis aux souris mâles d'âge moyen F2, via leurs pères F1. En outre, une altération multigénérationnelle du comportement social a été détectée chez les souris mâles et femelles F1 et F2. D'une façon remarquable, chez la génération F2, des altérations comportementales dépendantes à la fois du sexe et de la dose, ont été trouvées, malgré l'absence d'effets chez leurs parents F1, effets qui dépendaient également de l'origine parentale, tels que la diminution significative du niveau de la préférence pour la nouveauté sociale chez les souris mâles F2, issues uniquement des mères F1 périnatalement exposées à la dose 10 ng/kg de PCB. Le dosage des biomarqueurs chez les souris d'âge moyen de la génération F1 a révélé une altération de nombreux paramètres biochimiques, y compris une augmentation du niveau de corticostérone et de l'activité de l'acétylcholinestérase.

**Mots clés :** PCB-NDL<sub>i</sub>, effets multigénérationnels, exposition périnatale, anxiété, humeur, comportement social, DJT, biomarqueurs, effet sexe, effet âge.

## Abstract

In this study, we evaluated the multigenerational neurotoxic effects of gestational and lactational exposure of F0 female mice to a representative mixture of the six indicator non-dioxin-like-polychlorinated biphenyls (NDL-PCBs) at environmentally low doses, a profile that closely mimics human exposure to contaminated fish. The tolerable day intake (TDI) of 10 ng/kg/day and a higher environmental dose of 1000 ng/kg/day were administered by free access to F0 mothers during pregnancy and lactation. Afterwards, the development and behavior, including emotional responses and social interactions, of the two F1 and F2 generations of Swiss male and female mice at different phases of their ontogenesis, were assessed. Depending on the mode of exposure of F1 parents to PCBs, four F2 generation groups were obtained by crossing (i) F1 fathers perinatally exposed with unexposed F1 mothers, (ii) F1 mothers perinatally exposed with unexposed F1 fathers, (iii) both F1 parents perinatally exposed, or (iv) both F1 parents perinatally unexposed (controls), to PCBs. Our results showed that F1 adult males showed depressive-like behavior whereas F2 adult males, coming from F1 mothers, perinatally exposed to PCBs, exhibited anti-depressive-like behavior. This result suggested an induction of a multigenerational alteration that was of parental origin, on the resignation behavior in a sex-dependent manner. Similarly, sex-selective anxious behavior was detected in F1 middle-aged males perinatally exposed to PCBs, which was transmissible to F2 middle-aged males, via their F1 fathers. Furthermore, a multigenerational alteration of social behavior was found in F1 and F2 male and female mice. Remarkably, some behavioral alterations in F2 generation were found, despite of the absence of effects in their F1 parents, such as a significant decrease in the level of preference for social novelty in F2 male mice, coming from F1 mothers perinatally exposed to 10 ng/kg of NDL-PCBs. The biomarker assays in F1 middle-aged mice revealed an alteration in many biochemical markers, including increased corticosterone levels and acetylcholinesterase activity in male as well as females.

**Keywords:** NDL-PCBs, multigenerational effects, perinatal exposure, anxiety-like behavior, mood, social behavior, TDI, biomarkers, sex effects, age effects.