



AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

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

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

Université de Lorraine
École Doctorale Sciences et Ingénierie
RESSOURCES PROCÉDÉS PRODUITS ENVIRONNEMENT

Thèse de doctorat pour l'obtention du grade de
Docteur de l'Université de Lorraine
Mention : Ecotoxicologie, Biodiversité, Ecosystèmes

Présentée par :
Nidhal Soualeh

*Evaluation des effets neuro-inflammatoires de l'exposition périnatale aux
anguilles (*Anguilla anguilla* L.) contaminées naturellement
aux polluants organiques persistants
sur le comportement et les fonctions cognitives dans un modèle murin.*

Soutenue publiquement le 14/12/2017

Composition du Jury :

Mme Gisèle Kanny	Pr. Centre Hospitalier Universitaire, Nancy	Présidente
M. Jean-Pierre Cravedi	Directeur de Recherche, AlimH, INRA, Toulouse	Rapporteur
Mme Meherzia Mokni	MCF, HDR, Université de Jendouba, Tunisie	Rapporteur
M. Pascal Vaudin	MCF, HDR, Université François-Rabelais, Tours	Rapporteur
M. Rachid Soulimani	Pr. Université de Lorraine, Metz	Directeur de thèse
M. Jaouad Bouayed	MCF, HDR, Université de Lorraine, Metz	Co-directeur

Remerciements

*Ce travail de thèse a été réalisé au sein de l'équipe de Neurotoxicologie Alimentaire, Développement et Bioactivité de l'Université de Lorraine, à Metz sous la direction du **Professeur Rachid Soulimani** à qui j'exprime ma profonde gratitude d'avoir dirigé mes travaux dans les meilleures conditions possibles. Je tiens à le remercier chaleureusement de m'avoir encadré et soutenu durant ces années enrichissantes passées au laboratoire. Il a su faire preuve de qualités humaines et professionnelles indispensables à mon accompagnement. J'ai particulièrement apprécié toutes nos discussions scientifiques qui m'ont beaucoup apportée. Merci **Professeur Rachid Soulimani** de m'avoir permis de mûrir scientifiquement à mon rythme, de m'avoir guidé quand c'était nécessaire et de m'avoir laissé suffisamment d'autonomie pour faire mes propres choix.*

*Je tiens à exprimer ma reconnaissance et mes sincères remerciements au **Docteur Jaouad Bouayed, Maître de conférences HDR**, pour son encadrement, pour nos échanges scientifiques pertinents, pour son aide précieuse, pour sa disponibilité, ses encouragements, ses conseils et sa rigueur scientifique. Je le remercie pour la confiance et le temps qu'il m'a accordé. J'ai fortement apprécié sa présence dans les moments difficiles et son soutien.*

*Mes sincères remerciements vont également au **Professeur Jean-Pierre Cravedi** d'être le rapporteur de mes travaux de thèse. Je lui exprime toute ma gratitude pour sa pertinence scientifique et pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail.*

*Je suis très honoré que le **Docteur Meherzia Mokni**, soit rapporteur de mon travail de thèse et qu'elle siège dans ce jury. Qu'elle trouve ici l'expression de ma gratitude.*

*Je remercie le **Docteur Pascal Vaudin** d'avoir examiné mon travail de thèse et de faire partie de ce jury. Qu'il trouve ici l'expression de mes sincères remerciements.*

*Je remercie vivement le **Professeur Gisèle Kanny** d'avoir accepté d'examiner mon travail de thèse et de faire partie de ce jury. Qu'elle trouve ici l'expression de ma gratitude.*

*Je tiens également à remercier l'école doctorale **RP2E** « Ressources Procédés Produits Environnement » de m'avoir soutenu lors de la réalisation de ma thèse.*

*Mes sincères remerciements vont également à tous les membres du Consortium **Extrapole** pour les expériences professionnelles enrichissantes que nous avons partagées.*

*Un grand merci au **Professeur Chafique Younos** pour sa sympathie, sa gentillesse et ses encouragements.*

*Un grand merci à mes collègues **Imen Dridi** et **Alaa Karkaba** pour leurs encouragements.*

*Je remercie l'ensemble de mes collaborateurs antérieurs ou éloignés qui m'auront permis d'évoluer professionnellement et d'atteindre mes objectifs : **LRSBC, ATT, ISBM, Université de Carthage, lycée professionnel Simon Lazard à Sarreguemines...***

*Je remercie mes parents, **Ammar Soualeh** et **Dalila Hadji** pour leurs sacrifices immesurables, leur amour inconditionnel et leur bienveillance à mon égard. Je leur témoigne ici toute ma reconnaissance et toute mon affection.*

Je remercie mes proches qui me soutiennent et m'accompagnent depuis toujours ;
*-A mes frères **Mohamed, Hassen et Aymen** pour leur amour et leurs encouragements.*
*-A **Maud** pour son amour, sa confiance et son soutien ainsi qu'à **Anouk et Francine** pour leur gentillesse et leurs encouragements.*
*-A mes amis éternels malgré l'éloignement, **Mohamed Bjaoui, Aimen Abassi et Marwen Khechini.***
*-A mon cousin **Faycel Meskini** et son épouse **Ichraf** ainsi que leurs enfants **Youcef et Sarah.***

Avant-propos

Les résultats rapportés dans ce mémoire ont donné lieu à des publications dans des revues scientifiques internationales ainsi qu'à des communications scientifiques dans des congrès nationaux et internationaux.

Publications:

-**Soualeh N.**, Dridi I, Eppe G, Nemos C, Soulimani R, Bouayed J.

Perinatal programming of depressive-like behavior by inflammation in adult offspring mice whose mothers were fed polluted eels: Gender selective effects. *Brain Behav Immun* 63 (2017) 137–147. (IF: 5,96/ Q1).

-Dridi I, **Soualeh N.**, Bohn T, Soulimani R, Bouayed J. Chemically contaminated eel fed to pregnant and lactating mouse dams causes hyperactivity in their offspring *Int J Vitam Nutr Res* (2017), 1–12. (IF: 1,5/Q2).

-**Soualeh N.**, Soulimani R, Bouayed J. Hippocampal-dependent memory deficit induced by perinatal exposure to polluted eels in middle-aged offspring mice: Sex differential effects. *Toxicol Lett* 280 (2017), 247-258. (IF: 3,85/ Q1).

Communications orales:

- Ardzivian, A., **Soualeh, N.**, Desor, F., Soulimani, R. Oxidative stress and cell death induction in cerebral cells of juvenile mice following perinatal exposure to eel matrix contaminated with the 6 ndl-pcbs. The 15th international neurotoxicology association meeting, 28 juin - 03 juillet 2015, Montreal, Canada.

- **Soualeh, N.**, Ardzivian, A., Peiffer, J., Desor, F., Bacha, H., Bouayed, J., Soulimani, R. Evaluation of immunotoxic and neuro-inflammatory effects induced by perinatal exposure to environmental contaminants (6 pcb-ndl) in murine model. 5èmes journées scientifiques de l'ATT « processus toxiques et sécurité sanitaire », 21-23 mars, Monastir, Tunisie, 2015.

Communications par affiches:

-**Soualeh, N.**, Peiffer, J., Ardzivian, A., Desor, F., Soulimani, R. Perinatal exposure to ndl-pcbs at environmental level induced changes in inflammatory status in brain mice. “2nd workshop on endocrine disruptor's effects on wildlife and human health”, 21-22 janvier 2016, Paris, France.

-**Soualeh, N.**, Bouayed, J, Soulimani, R. Evaluation des effets immunotoxiques, au niveau cérébral et systémique, induits par la consommation de l'anguille (*Anguilla anguilla* L.) essentiellement contaminée en polychlorobiphényles (Σ 6 PCBs-NDLi), chez une première génération issue de mères exposées en période gestationnelle et lactationnelle dans un modèle murin. Séminaire Annuel RP2E, le 15 janvier 2015, Nancy, France.

Autres publications et communications non développées dans ce mémoire :

Publication dans des revues internationales:

- Soualeh N**, Stiévenard A, Baudelaire E, Soulimani R, Bouayed J. Improvement of cytoprotective and antioxidant activity of *Rosa canina* L. and *Salix alba* L. by controlled differential sieving process against H₂O₂-induced oxidative stress in mouse primary splenocytes. *Int J Vitam Nutr Res* (Article accepté 2018) (IF : 1,5/Q2).
- Karkaba A, **Soualeh N**, Soulimani R, Bouayed J. Perinatal effects of exposure to PCBs on social preferences in young adult and middle-aged offspring mice. *Hormones and Behavior*, (2017) 96, 137-146. (IF : 3,37/Q1) (voir annexe)
- Mellouk K, **Soualeh N**, Meziani S, Linder I, Boughrara B, Soulimani R, and Legseir B. Evaluation of the biological activity of plant extracts of Algerian *Solanum elaeagnifolium*. *RJPBCS (Q3) Volume 8, Issue 1, 2017*.
- Rjiba-Touati K, Ayed-Boussema I, **Soualeh N**, Achour A, Bacha H, Abid S. Antioxidant and antigenotoxic role of recombinant human erythropoietin against alkylating agents: cisplatin and mitomycin C in cultured Vero cells. *Exp Biol Med* (IF : 2,6/Q1). 2013 Aug 1;238(8):943-50. doi: 10.1177/1535370213494643.

Publication dans des revues nationales:

- Soualeh N**, Soulimani R. Plant essential oils and volatile organic compounds: roles and interests. *Phytothérapie* 2016.

Publications soumises ou en cours de préparation:

- Soualeh N**, Stiévenard A, Baudelaire E, Bouayed J, Soulimani R. Effects of powder particle size on preventive antioxidant activity of *Hedera helix* and *Scrophularia nodosa* against H₂O₂-induced oxidative stress in mouse primary spleen cells. *Int J Vitam Nutr Res* Article soumis.
- Soualeh N**, Baudelaire E, Soulimani R, Bouayed J. Effects of powder particle size on anti-inflammatory preventive activity of five medicinal plants in lipopolysaccharide-stimulated primary mouse peripheral blood mononuclear cells. Article en cours de rédaction.

Communications orales:

- Ardzivian, A., **Soualeh N**, Peiffer, J., Marchionni, S., Baudelaire, E., Bouayed, J., Soulimani, R. Comparaison des activités cytotoxique, anti-inflammatoire et anti-oxydante des extraits végétaux issus d'un procédé écologique de tamisage contrôlé à une méthode d'extraction hydroéthanolique. 22nd International Scientific Conference of the Lebanese Association for the Advancement of Science (LAAS) Liban 2016.

Communications par affiche:

- N. Soualeh**, A. Stievenard, A. Dicko, E. Baudelaire, J. Bouayed, R. Soulimani. Evaluation of toxicity and pharmacological properties of *Urtica dioica* leaf preparations obtained from hydroalcoholic extraction and differential controlled sieving process. 3rd Global Summit on Herbs & Traditional Medicine. October 18-20, 2017 Osaka, Japan.
- N. Soualeh**, A. Stievenard, A. Dicko, E. Baudelaire, J. Bouayed, R. Soulimani. Evaluation of the impact of "Differential Controlled Sieving" process on cytoprotective and antioxidant activities of ivy (*Hedera helix*) and figwort (*Scrophularia nodosa*). 3rd Global Summit on Herbs & Traditional Medicine. October 18-20, 2017 Osaka, Japan.

Liste des principales Abréviations

5-HT: 5-hydroxytryptamine	ERK: Extracellular signal-regulated kinases
AA: Acide archidonique	ERO: Espèces réactives de l'oxygène
AChE : Acétylcholinestérase	FC500: flow cytometer
ACTH: Adrénocorticotrophine	GABA : Acide gaba-amino-butérique
ANOVA: ANalysis Of VAriance	HAP : les hydrocarbures aromatiques polycycliques
ARC: Activity-regulated cytoskeleton associated protein	HPA : Axe hypothalamique pituitaire surrénalien
ASC: Apoptosis-associated speck-like protein	HRMS : Spectrométrie de masse à haute résolution
ATP : Adénosine tri phosphate	ICAM : Intercellular Adhesion Molecule
ATPR : Récepteurs adénosine tri phosphate	IFNγ : Interferon gamma
BDE : les polybromodiphényléthers	IL : Interleukine
BDNF: Brain-derived neurotrophic factor	iNOS : Oxyde nitrique synthase
BHE: Barrière Hémato-encéphalique	JG: Jour gestationnel
C5a: Composant 5a du complément	JPN: Jour postnatal
CARD: Caspase recruitment domain	LPS: Lipolysaccharide
CART: Centre de recherche analytique et technologique du liège	MAPK: Mitogen-activated protein kinases
CCL2/MCP1: Chemokine ligand 2/ monocyte chemoattractant protein 1	MPO: Myéloperoxidase
CD: Cluster de différenciation	NF-κB: Nuclear factor-kappa B
CORT: Corticosterone	NO: Monoxyde d'azote
CRP: C-reactive protein	OCDE: Organisation de coopération et de développement économiques
CXCL: chemokine (C-X-C motif) ligand	PAMP: Pathogen associated molecular patterns
DAMP: Damage-associated molecular pattern	PBDE: Polybromodiphényléthers
DLPFC: Dorsolateral prefrontal cortex	PCB: Polychlorobiphényles
DMEM/F12: Dulbecco's modified eagle medium: nutrient mixture F-12	PCB-NDL: Polychlorobiphényles non dioxine-like
ELISA: Enzyme-linked immuno assay	PCDD/F: Polychlorodibenzo dioxine/dibenzofuranes

PLT : Potentialisation à long terme

SNC: Système nerveux central

TGFβ: Transforming growth factor beta

TLR : Toll-like receptors

TNFα : Facteur de nécrose tumorale alpha

UDP : Uridine diphosphate,

VTA : Aire tegmentale ventrale

Ym : Chitinase-like proteins

Sommaire

Introduction	1
Contexte Bibliographique	5
I. L'inflammation	5
I.1. Généralité.....	5
I.2. Les cytokines.....	7
I.2.1. Les cytokines pro-inflammatoires	8
I.2.1.1. L'interleukine 1 β (IL-1 β).....	8
I.2.1.2. Le facteur de nécrose tumorale α (TNF- α).....	9
I.2.1.3. L'interleukine 6 (IL-6).....	10
I.2.2. Les cytokines anti-inflammatoires.....	11
I.2.2.1. L'interleukine-10 (IL-10).....	11
I.2.2.2. L'interleukine-4 (IL-4).....	11
I.3. La neuroinflammation	12
I.4. Les cellules microgliales.....	15
I.4.1. Morphologie et phénotypes des cellules microgliales	17
I.4.2. Les fonctions des cellules microgliales.....	22
I.4.2.1. En conditions physiologiques	22
I.4.2.2. En conditions pathologiques : <i>neurotoxicité vs. neuroprotection</i>	25
I.4.2.3. La signalisation "on"/ "off" : activation et fonctions microgliales	29
I.5. Inflammation prénatale	30
I.6. Inflammation postnatale.....	37
II. Inflammation, comportement et cognition : ménage à trois	39
Matériels & Méthodes	49
I. Animaux	49
I.1. Mise en reproduction des souris	50
II. Exposition aux anguilles.....	51
II.1. Les anguilles.....	51
II.2. Préparation de la diète maternelle et conception des groupes d'exposition	53
III. Etude comportementale	54
III.1 Evaluation du comportement maternel des souris gestantes et allaitantes exposées aux anguilles polluées	54
III.1.1. Test de construction du nid ou "Nest building activity".....	54

III.1.2. Test du ramassage des jeunes ou «Retrieving test».....	56
III.2. Evaluation du comportement des souris adultes et d'âge moyen de la génération F1	56
III.2.1. Evaluation de l'activité.....	56
III.2.1.1. Test de l'open field	56
III.2.1.2. Test de l'actimètre	57
III.3. Evaluation du comportement de resignation ou " Dépressif-like "	59
III.3.1. Test de la suspension caudale.....	59
III.3.1. Test de la nage forcée	60
III.4. Evaluation des fonctions cognitives (l'apprentissage et la mémoire) chez les souris d'âge moyen de la génération F1	61
III.4.1. Test du labyrinthe en « Y »	61
III.4.2. Test de la piscine de Morris (JPN 120-123).....	62
IV. Etudes cellulaires, moléculaires et fonctionnelles	64
IV.1. Prélèvements tissulaires et sanguins	65
IV.2. Isolement des cellules microgliales	65
IV.4. Quantification des interleukines pro et anti-inflammatoires.....	67
IV.5. Dosage du monoxyde d'azote (NO)	67
IV.6. Evaluation de l'expression des protéines activées de la voie NF-κB	67
IV.7. Evaluation de l'expression des protéines activées de la voie des MAP kinases	67
IV.8. Dosage de l'acetylcholine (ACh) au niveau de l'hippocampe des souris d'âge moyen.....	68
IV.9. Dosage de la myéloperoxidase (MPO)	68
IV.10. Dosage des corticostéroïdes	68
V. Analyses statistiques	68
Résultats & Discussions	70
Schéma récapitulatif des effets inflammatoires, comportementaux et cognitifs induits chez la progéniture mâle (A) et femelle (B) à des stades de vie distincts	71
Article 1:	73
"Perinatal programming of depressive-like behavior by inflammation in adult offspring mice whose mothers were fed polluted eels: Gender selective effects	73
Article 2:	110
"Chemically contaminated eel fed to pregnant and lactating mouse dams causes hyperactivity in their offspring"	110
Article 3:	146

“Hippocampal-dependent memory deficit induced by perinatal exposure to polluted eels in middle-aged offspring mice: Sex differential effects”	146
<i>Discussion Générale</i>	189
1. Rôle de l’exposition périnatale aux anguilles contaminées dans l’induction de l’inflammation	191
1.1. Le statut inflammatoire au niveau cérébral	191
1.2. Le statut inflammatoire au niveau des cellules microgliales.....	194
1.3. Le statut inflammatoire au niveau de l’hippocampe	196
1.4. Le statut inflammatoire au niveau périphérique.....	196
2. Programmation périnatale du comportement “dépressif-like ” à l’âge adulte par l’inflammation	197
3. Impact de l’exposition périnatale aux anguilles contaminées dans l’induction d’un déficit de la mémoire à long terme chez les souris femelles d’âge moyen : Rôle potentiel de l’inflammation induite au niveau de l’hippocampe	200
<i>Conclusion Générale</i>	206
<i>Références Bibliographiques</i>	209

Introduction

Au cours de la période périnatale, le cerveau en développement présente des fenêtres de sensibilité durant lesquelles cet organe vital est particulièrement vulnérable aux stressseurs aussi bien environnementaux, tels que les xénobiotiques, que psychologiques, tels que les traumatismes (Andersen, 2003; Arain et al., 2013; Hale et al., 2014; Ingber and Pohl, 2016; Marques et al., 2013; Viggiano, 2008). L'interaction d'un événement stressant précoce avec ces fenêtres temporaires pourrait avoir des conséquences sanitaires aussi bien immédiates que tardives à la fois sur le cerveau, le comportement, la cognition et bien d'autres fonctions (Bolton and Bilbo, 2014). L'origine fœtale des maladies de l'adulte a été proposée pour la première fois par Barker en 1992 (Barker, 1995a, b, 1998; Hales and Barker, 1992; Hales et al., 1991). L'hypothèse de Barker connue aussi par le phénotype économe “ the thrifty phenotype ” a été basée sur l'étude d'une cohorte des descendants de la famine subie par la ville d'Amsterdam pendant l'hiver 1944-1945 lors de la seconde guerre mondiale. En effet, la cohorte d'Amsterdam, qui a subi cette restriction calorique *in utero*, a appris à conserver les calories afin de préserver les organes vitaux, en particulier le cerveau, au détriment de la croissance. Cependant, la stratégie d'économiser les calories constitue un risque accru de développer des maladies métaboliques au cours de l'ontogenèse du fœtus même si elle est bénéfique à court terme (Eriksson, 2005). D'une façon paradoxale, le risque d'obésité à long terme est associé aussi bien à une malnutrition périnatale qu'à une surnutrition périnatale, dont l'alimentation hypercalorique riche en graisses constitue, pour les chercheurs, un exemple classique de la programmation périnatale (Bolton and Bilbo, 2014; Canani et al., 2011; Stein et al., 2007; Sullivan et al., 2010). En effet, la programmation périnatale, selon Bolton et Bilbo (2014), est considérée comme étant la capacité des événements rencontrés lors de la vie périnatale d'altérer ou de “ reprogrammer ” la trajectoire normale du développement, tout en conduisant à des modifications significatives incluses sur le plan comportemental, et le plus souvent d'une façon permanentes chez l'adulte. De ce fait, les fœtus d'Amsterdam ont été programmés

d'emmagasiner l'énergie tout au long de leur vie même en cas d'exposition à des apports alimentaires excessifs ou simplement normaux, ce qui fut le cas pour cette cohorte à l'âge adulte. Les modifications épigénétiques y compris celles des voies inflammatoires induites lors de la vie précoce jouent un rôle crucial dans la programmation périnatale, ce qui provoque des changements persistants au niveau des fonctions biologiques telles que les fonctions cérébrales et métaboliques (Bolton and Bilbo, 2014; Canani et al., 2011; Grissom et al., 2014; Grissom and Reyes, 2013; Heerwagen et al., 2010; Heijmans et al., 2008; Junien et al., 2005; Schwarz et al., 2011; Wang et al., 2003). Dans ce contexte, des études transgénérationnelles ont montré que certains effets, comme le surpoids, ont été observés dans la deuxième génération issue de cette famine, à la fois chez les petits-enfants issus des mères touchées par la famine (Painter et al., 2008) mais aussi des pères (Veenendaal et al., 2013).

Durant la période périnatale, la date de la survenue d'un événement stressant tel que l'exposition aux polluants est cruciale pour la programmation développementale compte tenu de la présence de nombreuses fenêtres temporaires de sensibilité. Même si de nombreuses recherches ont démontré la relation causale de la période d'exposition, au cours de la vie précoce, sur les effets contractés à long terme (Barker et al., 1993; Mi et al., 2000; Stein et al., 1996), les études sur la cohorte d'Amsterdam demeurent un parfait exemple pour illustrer cette relation conditionnelle. Les individus qui ont été exposés à la famine en début de grossesse ont eu un risque plus accru pour développer, à l'âge adulte, les maladies coronariennes et l'obésité par rapport aux individus qui ont subi la famine au milieu ou en fin de grossesse (Eriksson, 2005; Ravelli et al., 1999; Ravelli et al., 1976; Singhal and Lucas, 2004). Ces derniers n'ont pas été affectés de la même façon en présentant donc un moindre risque d'obésité et des maladies cardiovasculaires, mais ils ont présenté en plus un taux plus important d'anomalies de la tolérance au glucose (Hale et al., 2014; Painter et al., 2005; Ravelli et al., 1998; Singhal and Lucas, 2004).

Au cours de la période périnatale, en plus de la vulnérabilité, la résilience, la flexibilité et la plasticité constituent également des stratégies d'adaptation pour le cerveau face aux différents stressseurs (Barker, 1995b; Hales et al., 1991; Hanson and Gluckman, 2013; Malabou, 2009). En effet, la résilience signifie la capacité de résister à des défis sans qu'il y ait un effet péjoratif. La résilience n'est pas une simple adaptation "coping" qui correspond plutôt à des efforts mis en place en termes cognitifs ou comportementaux par un individu pour maîtriser ce qui peut le dépasser, la résilience va plus loin en se donnant la capacité de bien fonctionner malgré les situations critiques adverses ou traumatiques . Quant à la flexibilité, elle correspond à la capacité de "se plier" face à un défi puis revenir à l'état initial après la disparition de ce défi (Barker, 1995b; Hanson and Gluckman, 2013; Malabou, 2009). Enfin, pour un individu vivant dans un environnement évoluant continuellement, la plasticité constitue également une réponse adaptative. La plasticité est un processus dynamique qui consiste à une adaptation et à un changement du répertoire structural et fonctionnel du système nerveux en réponses à des altérations (Gluckman and Hanson, 2004; Gluckman et al., 2009). Bien que la plasticité neuronale est absolument nécessaire, en réponse à des stimuli externes et/ou internes, pour un fonctionnement adéquat relevant des adaptations significatives vitales pour le cerveau en développement y compris sa réparation; ses adaptations ne sont pas toujours bénéfiques comme le cas des différentes modifications structurelles et fonctionnelles relevées, par exemple, dans le cerveau des patients dépressifs (Calabrese et al., 2016a; Hales et al., 1991). En effet, chez ces patients, une atrophie de l'hippocampe ainsi qu'une réduction aussi bien du métabolisme que du volume ont été constatées au niveau de certaines régions cérébrales y compris le cortex préfrontal et le cortex cingulaire (Fuchs et al., 2004).

Ce travail de thèse rentre dans le concept de l'origine développementale des troubles à l'âge adulte voire à un âge plus avancé. En effet, durant la période gestationnelle et lactationnelle, les souris mères ont été exposées au poisson pollué. Nous avons choisi

l'anguille de l'Europe (*Anguilla anguilla* L.) compte tenu de ses teneurs élevées en polluants tels que les polychlorobiphényles (PCB). Dans notre étude, trois matrices différentes d'anguille ont été utilisées : l'anguille de la rivière (fortement polluée), l'anguille de l'élevage (faiblement polluée), et une matrice moyennement polluée (correspondant à un mélange artificiel des deux premières matrices). Notre travail a consisté à évaluer au niveau de la progéniture les effets tardifs d'une exposition précoce aux polluants de l'anguille sur le comportement, la cognition ainsi que les facteurs biochimiques et à vérifier l'hypothèse de l'origine inflammatoire des effets comportementaux et cognitifs relevés par rapport au groupe témoin dont les mères n'ont consommé que la diète standard du laboratoire (les croquettes). Ainsi, les 3 groupes de souris mères exposées aux poissons naturellement contaminés ont absorbé trois types de régimes alimentaires composés par la diète standard enrichie avec une des trois matrices d'anguille. Dans cette étude, les effets périnataux de l'exposition aux anguilles contaminées sur le comportement et les fonctions cognitives ont été évalués à l'âge adulte et à l'âge moyen. Etant donné que les processus inflammatoires constituent des mécanismes cruciaux de la programmation périnatale, un intérêt particulier a été porté lors de ce travail de thèse aux mécanismes de ces processus inflammatoires aussi bien au niveau cérébral que périphérique.

Contexte Bibliographique

I. L'inflammation

I.1. Généralité

L'inflammation est une réponse biologique normale contre toute agression de notre organisme y compris les radiations ou brûlures, les infections microbiennes et l'exposition aux produits chimiques. Le foyer inflammé est caractérisé par quatre signes cliniques à savoir la rougeur, l'œdème, l'élévation de la température et la douleur (Scott et al., 2004a; Scott et al., 2004b). L'inflammation fait partie du système de défense immunitaire inné de notre organisme mais aussi du système de rétablissement de l'homéostasie des organes. La réaction inflammatoire est un processus dynamique qui se déroule généralement en 4 phases successives. (i) Une phase d'initiation qui fait suite à un signal de danger d'origine exogène ou endogène. (ii) Une phase de recrutement qui met en jeu des cellules immunocompétantes (effecteurs primaires) telles que les cellules endothéliales, les lymphocytes, les monocytes, les macrophages, les cellules microgliales et les mastocytes. (iii) Une phase d'amplification et de propagation de la réaction inflammatoire qui met en jeu les effecteurs secondaires y compris les médiateurs cytokiniques et lipidiques tels que les interleukines, et les enzymes de dégradations incluant les collagénases, les gélatinases, les stromélysine, cathepsines et les sérines protéases afin d'éliminer l'agent initiateur. Enfin (iv) une phase de résolution qui tend vers un retour à l'homéostasie tissulaire ou à restaurer l'intégrité du tissu agressé. Cependant, en cas d'échec de la résolution, le processus inflammatoire évolue vers une chronicité qui pourrait être pathologique (Libby, 2007; Roifman et al., 2011; Scott et al., 2004a; Wilson, 2008).

La réaction inflammatoire est un des processus nécessaires pour la régénération normale des tissus, comme en cas d'implantation. L'inflammation est une réponse protectrice qui permet d'éliminer les causes de lésions cellulaires, souvent microbiennes, ainsi que leurs conséquences telles que l'élimination des cellules et des tissus morts afin de réparer les tissus

lésés. Ce processus pourtant bénéfique et essentiel pour l'organisme pourrait devenir délétère si la réaction inflammatoire mise en place est inappropriée, inadaptée ou mal contrôlée.

L'inflammation est fondamentalement répartie en deux types de réaction: aigue et chronique. L'inflammation aigue implique généralement les neutrophiles, les éosinophiles ou les basophiles, et dure plusieurs minutes voire plusieurs jours. Cependant, l'inflammation chronique recrute généralement les lymphocytes et/ou les macrophages et peut persister plusieurs semaines ou des mois voire des années. Les deux types d'inflammation peuvent coexister dans le même tissu suite à deux causes différentes (Takeuchi and Akira, 2010). Par exemple, la réaction inflammatoire aigue sera enclenchée suite au recrutement des neutrophiles activés par les antigènes microbiens; alors que l'inflammation chronique sera initiée plutôt dans les parties tissulaires présentant des lésions oxydatives. Généralement, après un épisode inflammatoire aigue, les mécanismes de réparations s'activent. Cependant, la réparation implique généralement le remplacement des tissus lésés par des tissus non-fonctionnels dans les organes endommagés comme le cas de la fibrose pulmonaire. Par conséquent, il est important que la réaction inflammatoire ne compromette pas l'intégrité des tissus hôtes. Ainsi, une inflammation appropriée et efficace devrait à la fois (i) recruter aussi bien les bonnes cellules immunes innées que les médiateurs parmi tout l'éventail des réponses possibles, (ii) être dirigée vers le point focal du défi au niveau du tissu hôte pour minimiser les dégâts, (iii) être de l'intensité nécessaire pour relever le défi (et donc pas excessive), et (iv) résoudre le défi au profit du tissu hôte (Dietert, 2011, 2012).

Par conséquent, une inflammation inappropriée ou disproportionnée survient quand au moins une de ces quatre erreurs se produit : (i) la réponse cellulaire de l'immunité innée n'est pas appropriée par rapport au défi, (ii) la réponse n'est pas dirigée vers le point focal du défi, (iii) la réponse est excessive, et/ou (iv) la réponse ne résout pas le défi au profit du tissu hôte (Dietert, 2012). La régulation de l'inflammation est complexe et implique différents types de

cellules, de cytokines, de chémokines, de molécules d'adhésion, de facteurs de signalisations, et de métabolites (Scott et al., 2004). Une myriade de signaux d'origine pathogène (ou autres) peut activer un complexe multiprotéique appelé l'inflammasome (Calabrese et al., 2016b; Gicquel et al., 2016) qui contient une multitude de copies de récepteurs des ligands PAMP (motifs moléculaires associés aux pathogènes) ou des ligands DAMP (motifs moléculaires associés aux dégâts). L'inflammasome est une macromolécule protéique intracytoplasmique très exprimée dans les cellules myéloïdes comme les monocytes, les macrophages et les cellules microgliales ayant pour fonction de défendre l'organisme contre une large panoplie d'agressions en produisant des cytokines inflammatoires telles que l'interleukine (IL) 1 (Connat, 2011). L'inflammasome joue aussi un rôle dans l'activation des caspases 1 et 8, comme il contient une protéine adaptatrice nommée ASC (apoptosis-associated speck-like protein) contenant un domaine CARD (caspase recruitment domain). Ces caspases peuvent entraîner la mort cellulaire par apoptose ou par pyroptose. Une fois activé, la caspase 1 clive rapidement les formes immatures de l'IL-1 β et l'IL18 en permettant ainsi d'obtenir les formes matures de ces cytokines inflammatoires. Par exemple, une fois mature, l'IL-1 β cause la prolifération des macrophages et des cellules neuroinflammatoires telles que la microglie et les astrocytes (Calabrese et al., 2016b).

I.2. Les cytokines

Les cytokines sont des médiateurs glycoprotéiques de faible masse moléculaire, inférieure à 60 kDa, produites par différents types cellulaires inclus les cellules microgliales, les neurones, les astrocytes, en réponse à divers stimuli y compris d'ordre immunitaire afin de jouer un rôle majeur dans la communication entre les cellules impliquées dans les réponses immunes et inflammatoires. Les cytokines, représentent un langage universel dans le "dialogue" mené entre les différentes cellules de l'organisme. Les cytokines, substances solubles de signalisation cellulaire, assurent une fonction dite autocrine (sur la cellule productrice), dite

paracrine (sur les cellules voisines) ou dite endocrine (sur des cellules ou tissus lointains), en agissant à distance comme de véritables hormones, afin de réguler l'activité et la fonction cellulaire et/ou tissulaire. Les cytokines exercent leur activité biologique à très faible concentration, par liaison à des récepteurs membranaires spécifiques (Cavaillon, 1993a, b, 1994, 1995, 2001; Cavaillon and Haeffner-Cavaillon, 1993; Cavaillon et al., 1997; Cavaillon et al., 1992; Marie et al., 1997; Marie et al., 1996; Tetta et al., 1998). Cette activité a pour finalité l'induction, le contrôle ou l'inhibition de la réponse inflammatoire en jouant sur sa durée et son intensité (Cavaillon, 1995, 2001). Il existe deux grandes classes, les cytokines pro-inflammatoires et les cytokines anti-inflammatoires. Selon leur structure, nous distinguons les interleukines, les chimiokines, les interférons et la famille du facteur de nécrose tumorale (TNF). Seulement, quelques interleukines et le TNF- α seront développés ci-après suite à l'intérêt porté à ces molécules au cours de ce travail de thèse.

I.2.1. Les cytokines pro-inflammatoires

L'IL-1 β , l'IL-6 et le TNF- α sont les cytokines qui jouent vraisemblablement un rôle majeur dans l'initiation et la propagation de l'inflammation.

I.2.1.1. L'interleukine 1 β (IL-1 β)

L'interleukine IL-1 est une cytokine majeure de l'immunité innée et de l'inflammation. La famille de l'IL-1 est constituée, principalement, de 3 cytokines inflammatoires (deux agonistes, l'IL-1 α et l'IL-1 β , et un antagoniste, l'IL-1ra), (Dinarello, 1986, 1998, 2009).

L'IL-1 β est synthétisée sous la forme d'un précurseur inactif (Jeru and Amselem, 2011; Mosley et al., 1987) qui devient biologiquement active par l'action de l'enzyme de conversion ICE (interleukin convertase enzyme) (Thornberry et al., 1992). Dans le SNC, l'IL-1 β est majoritairement produite par les cellules microgliales (Chauvet et al., 2001; Van Dam et al., 2000), les cellules périvasculaires de type macrophagiques (Konsman et al., 1999) et les astrocytes (Dong and Benveniste, 2001). En conditions physiologiques, l'IL-1 β est exprimée

constitutivement à un niveau bas. Son niveau d'expression augmente considérablement par exemple lors de l'apparition de lésions cérébrales. En conditions pathologiques, l'IL-1 β aurait par conséquent des effets délétères et neurotoxiques, en aggravant les dommages cellulaires présents (Stroemer and Rothwell, 1998).

Cette interleukine est capable d'effectuer la transduction d'un signal intracellulaire grâce à la présence du domaine intracellulaire Toll/IL-1 Receptor, ce qui active les voies de signalisation telles que NF κ B (Nuclear Factor-KappaB) et MAPkinases (MAPK). Ces voies cellulaires activées vont conduire à la transcription de gènes codant pour la plupart des protéines de l'immunité innée, telles que les cytokines inflammatoires (IL-1 β , IL-6 et le TNF- α), les chimiokines (MCP-1, IL-8), et des enzymes telles que la cyclooxygénase-2 (COX-2), productrices des prostaglandines, et l'inductible NO synthase (iNOS), productrice de monoxyde d'azote (NO) (Glezer et al., 2007a; Glezer et al., 2007b).

I.2.1.2. Le facteur de nécrose tumorale α (TNF- α)

Le TNF- α est une cytokine qui joue un rôle important dans les réactions pro-inflammatoires. Elle pourrait induire des effets multiples y compris apoptotique, nécrotique, prolifératif, et hématopoïétique aussi bien dans le système nerveux qu'immunitaire (Dempsey et al., 2003; McCoy et al., 2008; McCoy and Tansey, 2008)(McCoy and Tansey, 2008, Dempsey et al., 2003). Les récepteurs du TNF- α jouent un rôle primordial dans la défense de l'hôte contre les pathogènes, et également dans l'apoptose (Dempsey et al., 2003). Le TNF- α est un important modulateur de la thermorégulation et aussi de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien, impliqué dans les réponses au stress (Perry et al., 2002).

Dans le SNC, cette cytokine présente deux types de récepteurs: (i) le TNFR1 qui est exprimé dans la majorité des types cellulaires et (ii) le TNFR2 qui est exprimé sélectivement dans les cellules des cellules microgliales et les astrocytes. La fixation du TNF- α sur ses récepteurs TNFR induit l'activation des voies NF κ B et MAPK. Le TNF- α active les cellules

microgliales via son récepteur TNFR1 d'une façon autocrine (Kuno et al., 2005). Cette activation induit l'expression de médiateurs inflammatoires y compris le NO, ROS, IL-1 β et IL-6 et stimule la capacité phagocytaire de la cellules microgliales (Von Zahn et al., 1997).

L'expression du TNF- α augmente lors des défis adverses inclus ceux de l'immunité et les traumatismes cérébraux. De même, il est souvent observé la production de cette cytokine pro-inflammatoire lors des réactions neurotoxiques par exemple en cas d'exposition aux polluants alimentaires. De même, des concentrations élevées du TNF- α ont été relevées lors des états physiopathologiques associés aux maladies neurodégénératives telles que la sclérose en plaque, les maladies d'Alzheimer et de Parkinson (Kraft et al., 2009; Nishimura et al., 2005) et aussi les troubles émotionnels et comportementaux telle que la dépression (Postal and Appenzeller, 2015).

I.2.1.3. L'interleukine 6 (IL-6)

L'IL-6 a été initialement identifiée comme un facteur de différenciation des lymphocytes B en plasmocytes, cellules productrices d'anticorps (Scheller et al., 2006; Scheller and Rose-John, 2006).

L'IL-6 est une interleukine multifonctionnelle du fait qu'elle est impliquée dans différents processus biologiques comme la survie neuronale, la neurogénèse, la réponse immunitaire ainsi que les réactions systémiques induites par un traumatisme, une infection ou un choc septique (Erta et al., 2012; Quintana et al., 2013; Rose-John et al., 2006). La production d'IL-6 n'est pas constitutive mais elle est inductible. En effet, elle est exprimée rapidement lors de lésion des systèmes nerveux central et périphérique afin d'initier la réponse immunitaire, de stimuler les astrocytes, de recruter les leucocytes et de favoriser la survie des neurones lésés. Ainsi, des niveaux élevés d'IL6 ont été trouvés dans plusieurs maladies telles que la sclérose en plaque, la maladie d'Alzheimer, les traumatismes, les méningites (Gruol and Nelson, 1997; Hunter and Jones, 2015).

Au niveau, cérébral, son récepteur IL-6R est détecté essentiellement dans les neurones et les cellules microgliales de l'hippocampe, l'hypothalamus et le cortex (Oitzl et al., 1993; Schobitz et al., 1993a; Schobitz et al., 1992a; Schobitz et al., 1993b; Schobitz et al., 1992b). La principale voie activée par cette cytokine est la JAK-STAT (Janus Kinase-Signal transducer and activator of transcription) (Duhe et al., 1998; Duhe and Farrar, 1998).

I.2.2. Les cytokines anti-inflammatoires

I.2.2.1. L'interleukine-10 (IL-10)

IL-10 a été initialement appelé CSIF (cytokine synthesis inhibitory factor). Il existerait un seul récepteur de l'IL-10 : l'IL-10R. La réponse cellulaire de l'IL-10 empreinte essentiellement la voie de signalisation JAK-STAT; cependant d'autres voies de signalisation peuvent être concernée, en inhibant notamment la voie des MAPKs ou celle de la NFκB, activées par les cytokines pro-inflammatoires (Geng et al., 1994; Niho et al., 1998; Niino et al., 1998; Wang et al., 1995). Ainsi, le principal effet anti-inflammatoire de l'IL-10 est de bloquer la synthèse des cytokines pro-inflammatoires dans les lymphocytes T, les macrophages et les cellules microgliales (Bogdan and Nathan, 1993; Bogdan et al., 1991; Haddad et al., 2003; Sawada et al., 1999). L'IL-10 inhibe également la libération de NO par la régulation de l'activité de leur enzyme de synthèse iNOS et COX-2 (Bogdan and Nathan, 1993; Lodge and Sriram, 1996; Minghetti et al., 1998). Des études *in vivo* ont montré que l'IL-10 pourrait induire l'inhibition de la prolifération microgliale (Balasingam et al., 1996; Balasingam and Yong, 1996; Kloss et al., 1997).

I.2.2.2. L'interleukine-4 (IL-4)

L'IL-4 présente un seul récepteur : l'IL-4R. La voie de signalisation induite par la fixation de l'IL-4 à son récepteur est la voie JAK-STAT (Keegan et al., 1995; Malabarba et al., 1995; Taylor et al., 1997). Concernant la réponse inflammatoire, elle est capable de limiter l'action pro-inflammatoire de l'IL-1β en inhibant à la fois sa synthèse, et en induisant

l'expression de son récepteur antagoniste l'IL-1Ra (Vannier et al., 1992; Jenkins and Arend, 1993; Wong et al., 1993).

I.3. La neuroinflammation

La terminologie de la "neuroinflammation" est employée actuellement dès qu'on décrit l'inflammation localisée au niveau du cerveau ou d'une façon générale au niveau du système nerveux central (SNC). Paradoxalement, le SNC a longtemps été considéré comme un système immunoprivilégié, et donc imperméable aux différents médiateurs cellulaires et moléculaires du système immunitaire périphérique, suite à la présence de la barrière hémato-encéphalique (BHE) et ses jonctions serrées (Galea et al., 2007; Harry and Kraft, 2012). Ce concept a été revu suite à l'avalanche des données produites au cours de cette décennie, en considérant la neuroinflammation comme une cause voire une conséquence pour les maladies neurologiques telles que les maladies neurodégénératives, les maladies autoimmunes, les troubles épileptiques (Graeber et al., 2011; Hanisch and Kettenmann, 2007) et récemment les troubles psychiatriques (Calcia et al., 2016; Miller and Raison, 2016; Najjar et al., 2013; Rossi et al., 2017). Traditionnellement, la neuroinflammation a été employée pour décrire le processus inflammatoire dans la physiopathologie des maladies neurodégénératives (Amor et al., 2010; Graeber et al., 2011). Cependant, le champ de l'utilisation de la neuroinflammation est devenu plus vaste, et ainsi cette terminologie est utilisée dès que le SNC est la cible d'une inflammation même en dehors d'une pathologie, comme ça été démontré par Glass et al. (2010). Par conséquent, la neuroinflammation pourrait être définie comme étant les réactions inflammatoires qui se développent dans le cerveau (ou le SNC) en réponse à une agression étrangère, à une perturbation interne ou tout changement du microenvironnement cérébral. Ces réactions mettent en place des réponses cellulaires en cascade comprenant tout d'abord (i) l'activation des cellules microgliales, qui sont les macrophages résidents du SNC, ainsi que

la modification de l'activité des astrocytes. Après la prolifération et la migration de ces deux types de cellules gliales vers le site de l'inflammation, (ii) elles libèrent des facteurs cytotoxiques et inflammatoires tels que les cytokines et des prostaglandines. Dans le cas où l'intégrité du SNC est affectée, il y aurait (iii) l'infiltration des cellules immunitaires périphériques (Ladeby et al., 2005). La neuroinflammation est une réponse plastique qui repose essentiellement sur la sensibilité des cellules microgliales à détecter aussi bien la nature précise de l'agression que son intensité. Par conséquent, les cellules microgliales, qui présentent le principal protagoniste cellulaire de l'inflammation cérébrale, adaptent leur activation par rapport au défi rencontré, ce qui conditionne le type des facteurs inflammatoires synthétisés ainsi que leurs quantités (Gomez-Nicola and Perry, 2015; Graeber et al., 2011; Hanisch and Kettenmann, 2007; Perry et al., 2007).

L'immunité cérébrale innée pourrait donc être activée vis-à-vis de toute agression étrangère incluant celle des agents pathogènes et des polluants au niveau du système périphérique. Ces xénobiotiques tels que les bactéries circulantes pourraient être reconnues par leurs signatures moléculaires de classes de pathogènes PAMP (Pathogen Associated Molecular Patterns); cependant, les éléments non infectieux tels que les polluants sont reconnus par leurs signatures moléculaires DAMP (Damage-Associated Molecular Patterns), générées au cours du stress cellulaire (Renaud et al., 2015). Ainsi, la réaction immunitaire innée cérébrale s'amorce ou s'initie au niveau des cellules endothéliales ou péri-vasculaires qui expriment des récepteurs PRR (Pattern-Recognition Receptors), tels que les TLR (Toll-Like Receptors) (Renaud et al., 2015). Ces cellules, situées au niveau de l'espace périvasculaire, dès qu'elles reconnaissent les PAMP ou les DAMP produisent des facteurs inflammatoires tels que les cytokines et les espèces réactives de l'oxygène (ERO) (Galic et al., 2012; Lee et al., 2013). Le signal inflammatoire se propage pour atteindre les cellules microgliales (les macrophages du cerveau) et les astrocytes qui induisent alors une cascade de

signalisation, en aboutissant, au final, à l'activation de facteurs de transcription. Ces derniers modifient de façon drastique le phénotype cellulaire des cellules microgliales et celui des astrocytes, en induisant la production d'un éventail de cytokines et de chimiokines (figure 1). L'activation des cellules microgliales dépendrait du temps de l'exposition, de la nature du défi et de son intensité et/ou de l'état pathologique (Perry et al., 2007; Perry and Holmes, 2014; Perry et al., 2010; Perry and O'Connor, 2010). Suite au rôle crucial des cellules microgliales dans l'inflammation du cerveau, Graeber et al., (2011) ont proposé de substituer le terme de la "neuroinflammation" par celui de "l'activation des cellules microgliales".

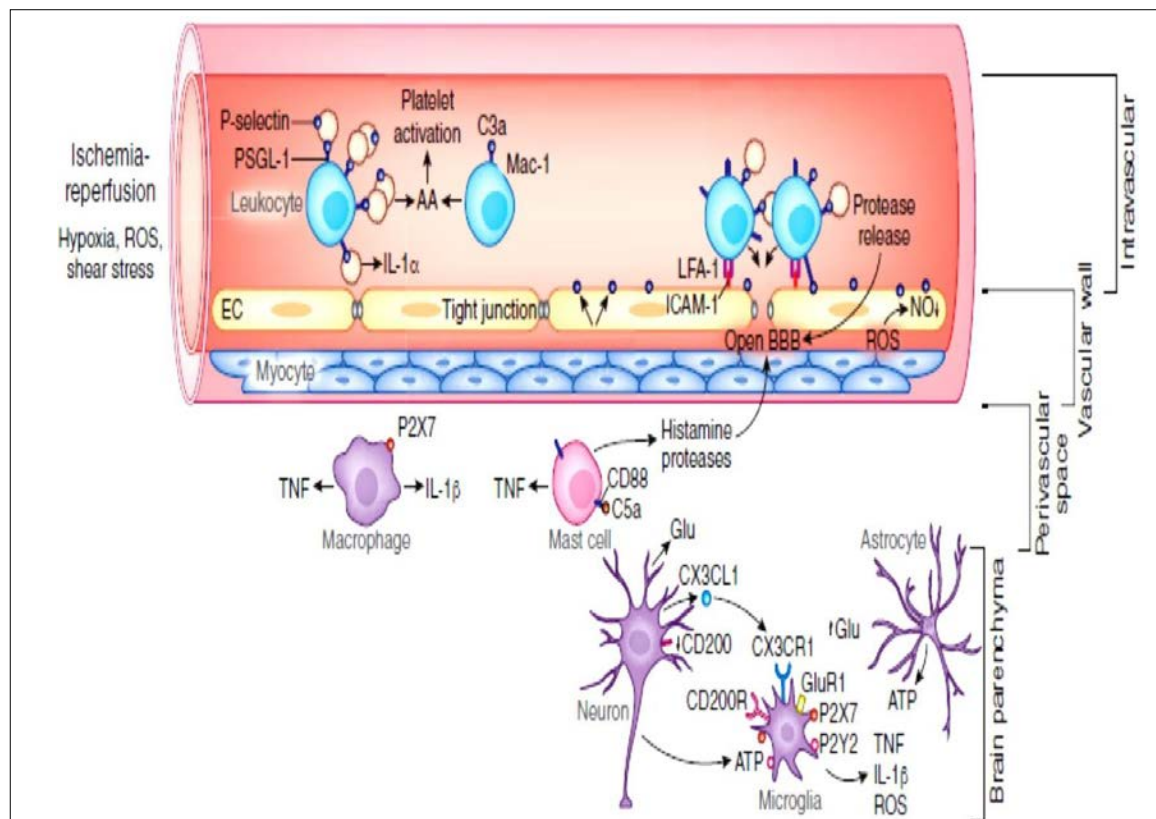


Figure 1 Événements vasculaires, perivasculaires et parenchymateux précoces déclenchés par l'ischémie et la reperfusion (Iadecola and Anrather, 2011).

L'hypoxie, les espèces réactives de l'oxygène (ERO) et les modifications dues au stress du cisaillement exercé sur la surface endothéliale de la paroi vasculaire initient des changements cellulaires caractérisés par l'aggrégation des plaquettes, l'activation du complément ainsi que la libération de la cytokine IL-1 α , des métabolites secondaires de l'acide arachidique (AA), des protéases, du NO et de la protéine transmembranaire ICAM-1. Ces changements augmentent l'affinité de la paroi vasculaire et fragilisent la barrière hémato-encéphalique

(BHE) en facilitant ainsi l'infiltration des leucocytes et également la protéolyse de la matrice cellulaire. Au niveau de l'espace périvasculaire, la sous unité du complément (C5a) agit sur les récepteurs CD88 des mastocytes qui contribuent à la fragilisation de la BHE. Ensuite, les cytokines (TNF, IL-1 α) sont produites par les mastocytes et les macrophages périvasculaires induisant ainsi la migration des leucocytes à travers la BHE. Au niveau du parenchyme cérébral, les cellules agressées libèrent des purines (ATP) qui agissent comme des signaux pro-inflammatoires précoces responsable de la production ultérieure des cytokines et des chimiokines. La perturbation de l'interaction neurone-cellules microgliales par la libération du CX3CL1 et du CD200 ainsi que la production extracellulaire du glutamate favorise l'inflammation au niveau cérébral par l'action de ces molécules neuronales libérées sur les cellules microgliales.

I.4. Les cellules microgliales

Les cellules de la microglie est le principal protagoniste clé de l'immunité innée cérébrale. Il s'agit des cellules immunocompétentes résidentes du SNC, appartenant au groupe des macrophages. Les cellules microgliales constituent en moyenne 10% de l'ensemble des cellules gliales (Lullman-Rauch, 2008), et de 10 à 15 % de toutes les cellules du SNC (Joseph and José Luis, 2013). Le rôle des cellules microgliales et ses changements aussi bien morphologiques que fonctionnels ont été bien décrits dans l'article de Hughes (2012) apparu dans le revue *Nature*, et ils ont été bien résumés par une métaphore dans son blog, en considérant les cellules microgliales comme "des soldats et des policiers", "des caméléons et des araignées", "des femmes de ménage", "des jardiniers", "des électriciens" et "des éboueurs", et qu'elles peuvent être "actives ou en repos", "ramifiées ou non", "nocives ou protectrices" (<http://phenomena.nationalgeographic.com/2013/01/11/best-cells-ever/>).

L'origine des cellules microgliales a été une source de débats pendant plusieurs années. Les premières descriptions histologiques de ces cellules ont été caractérisées par Nissl (1899) (Joseph and José Luis, 2013) qui les nomma "cellule bâton" ("Stabchenzellen"). Ensuite, Robertson (1900) les identifia comme la "mésoglie" en référence à sa provenance du mésoderme afin de marquer son origine, qui est différente de celle provenant du neuro-ectoderme comme les neurones, les oligodendrocytes et les astrocytes (Ginhoux et al., 2013). En 1919, Rio-

Hortega a été le premier à la nommer cellule microgliale. Il a été surnommé le “père de la cellule microgliale”, et il affirme dès cette époque que les cellules microgliales résidentes ont pour origine le mésoderme (Ginhoux et al., 2013). Rio-Hortega affina ce concept et insista sur leurs différences morphologiques et fonctionnelles avec les autres types cellulaires du SNC (Joseph and José Luis, 2013). Les cellules microgliales ont donc une origine embryonnaire mésodermale du sac vitellin à partir d’un précurseur érythro-myéloïde $CSF1R^+$ (colony stimulating factor 1 receptor) commun aux macrophages résidents (Perdiguero et al., 2015) (figure 2).

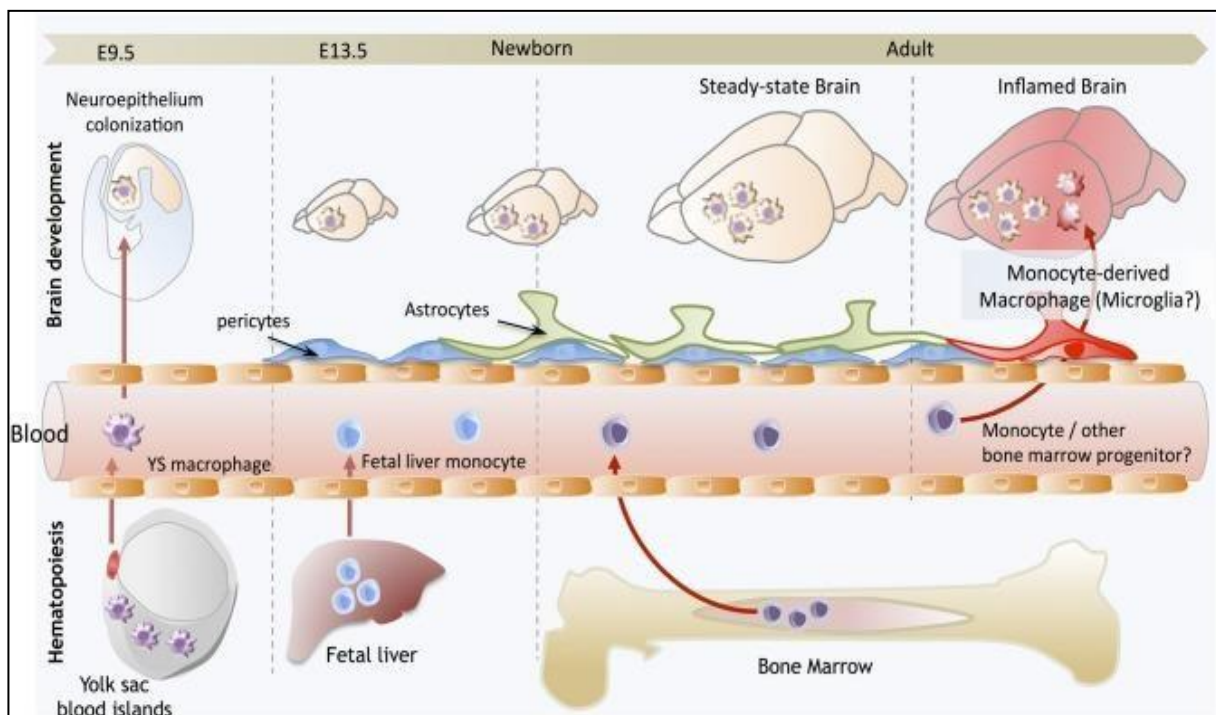


Figure 2 origine développemental des cellules microgliales (Ginhoux et al., 2013).

Les macrophages primitifs provenant du sac vitellin à E9.5 colonisent le neuroépithélium. A E13.5, la barrière hémato-encéphalique se met en place en limitant l'accès des macrophages provenant du foie fœtal au SNC. Les cellules microgliales embryonnaires se développent et colonisent entièrement le cerveau jusqu'à l'âge adulte. En conditions physiologiques, les cellules microgliales présentes dans le cerveau adulte dérivent toutes du sac vitellin embryonnaire. Cependant, en conditions pathologiques inflammatoires chez l'adulte, des monocytes ou des cellules progénitrices de la moelle osseuse peuvent être recrutées dans le cerveau pour renforcer la population de cellules microgliales déjà existantes.

Les cellules microgliales atteignent très tôt le parenchyme cérébral ou le neuroépithélium, et elles envahissent donc le cerveau en développement, en utilisant plusieurs voies. En effet, cette colonisation est très facilitée par migration via une BHE inachevée jusqu'à leur arrivée à des sites fontaines au niveau du cerveau immature qui déterminent leur destination finale où elles prolifèrent (Verney et al., 2010). Dès l'atteinte de leur emplacement définitif, les cellules microgliales sous leur forme amiboïde se transforment en une forme ramifiée par la présence des prolongements. Cette forme est caractéristique des cellules microgliales matures. Après la naissance ou encore dans des circonstances particulières, telles que l'absence complète des cellules microgliales embryonnaires, une origine hématopoïétique de la cellule microgliale par infiltration de monocytes (figure. 2) dans le parenchyme a été aussi suggérée mais il semble qu'il s'agit d'une voie minoritaire par rapport à la voie mésodermique (Chen et al., 2010; Ginhoux et al., 2013).

I.4.1. Morphologie et phénotypes des cellules microgliales

Les cellules microgliales ont été initialement considérées dormantes ou latentes ne s'activant qu'en réponse à des changements physiopathologiques dans le cerveau (Kreutzberg, 1996). Néanmoins, l'avalanche des résultats obtenus en neurobiologie a démontré que les cellules microgliales adultes sont en réalité des cellules hautement dynamiques voire en activité permanente qui est indispensable pour la maintenance de l'homéostasie du cerveau.

A l'âge adulte, la majorité des cellules microgliales acquièrent une morphologie fortement ramifiée caractérisée par des prolongements cytoplasmiques longs et fins (Vilhardt, 2005). Ces cellules microgliales ramifiées sont dites "quiescentes" ou en repos "resting cells"; cependant, cette désignation serait néanmoins réductrice voire mal-adaptée dans le sens où les cellules microgliales sont en réalité loin d'être inactives en situation physiologique (Nimmerjahn et al., 2005). En effet, les prolongements des cellules microgliales sont en perpétuel mouvement et sont en contact avec les neurones, les synapses, les astrocytes et les vaisseaux sanguins sans

pour autant que leur propre corps cellulaire ne migre. Ainsi, les cellules microgliales sondent leur environnement grâce à la protraction et à la rétraction constante de leurs prolongements (Nimmerjahn et al., 2005; Ransohoff and Cardona, 2010; Ransohoff and Engelhardt, 2012). Les cellules microgliales assurent des fonctions importantes dans le fonctionnement des réseaux neuronaux, et ceci dès la phase développementale (Schafer et al., 2012). En effet, les cellules microgliales ont un rôle au cours du développement dans la mise en place des réseaux, en éliminant les contacts synaptiques adhérents et non utiles (Schafer and Stevens, 2010). Les cellules microgliales participent donc à la formation et la maturation des connexions synaptiques et donc des réseaux neuronaux (Schafer et al., 2012; Tremblay et al., 2010). A l'âge adulte, en étant capable de sonder l'activité neuronale au niveau des synapses, elles assurent également un rôle dans le fonctionnement et la plasticité des réseaux neuronaux (Schafer et al., 2013). Elles représentent par exemple une source de libération de la glycine, un co-agoniste indispensable à l'activation des récepteurs au glutamate (Hayashi et al., 2006). Bien évidemment, les cellules microgliales assurent la fonction d'immunosurveillance via la mobilité de leurs prolongements, et aussi via leur proximité du parenchyme cérébral avec une activation potentielle au moindre changement homéostatique de ce dernier.

L'activation des cellules microgliales est un processus cellulaire complexe qui modifie rapidement leur propriétés structurales et fonctionnelles suite à des changements dans leur environnement cérébral tels que la survenue d'une lésion, d'un changement de concentration des composants du milieu extracellulaire, d'une entrée directe d'un pathogène (Mantovani et al., 2002). Il faut aussi souligner que l'activation des cellules microgliales est tout à fait possible via le système immunitaire périphérique, ce qui a été parfaitement observée par exemple dans le cas du "sickness behavior" que nous allons développer ultérieurement. L'activation des cellules microgliales se caractérise généralement par un changement morphologique y compris la rétraction des prolongements les plus fins et l'augmentation de la taille du soma, l'expression

de nouvelles protéines en particulier les récepteurs surfaciques tels que les TLR, d'autres récepteurs aux cytokines comme ceux de l'IL6, les intégrines comme le CD11b. De même, l'activation des cellules microgliales se caractérise par des changements fonctionnels telles que la sécrétion de facteurs pro- et anti-inflammatoires inclus l'IL-1 β , IL-6, TNF- α , INF- γ , IL-10, l'IL-4 et CCL2 (MCP1), leur prolifération, éventuellement leur migration vers les sites lésés ou inflammés. Enfin, les cellules microgliales activées peuvent mettre en place une activité phagocytaire pour éliminer, par exemple, les débris cellulaires ou les cellules mortes. Une nomenclature des formes d'activation microgliale a été proposée en se basant sur celle déjà existante pour les macrophages périphériques à savoir l'activation classique ou de type M1, et l'activation alternative ou de type M2 (Eggen et al., 2013; Hanisch and Kettenmann, 2007; Mantovani et al., 2002). Les phénotypes macrophagiques de type M1 ou M2 sont reconnaissables par l'expression des marqueurs spécifiques à la surface des cellules microgliales, et aussi par la nature des molécules inflammatoires produites (Belarbi and Rosi, 2013; Suzumura, 2013), comme mentionnée dans la figure 3.

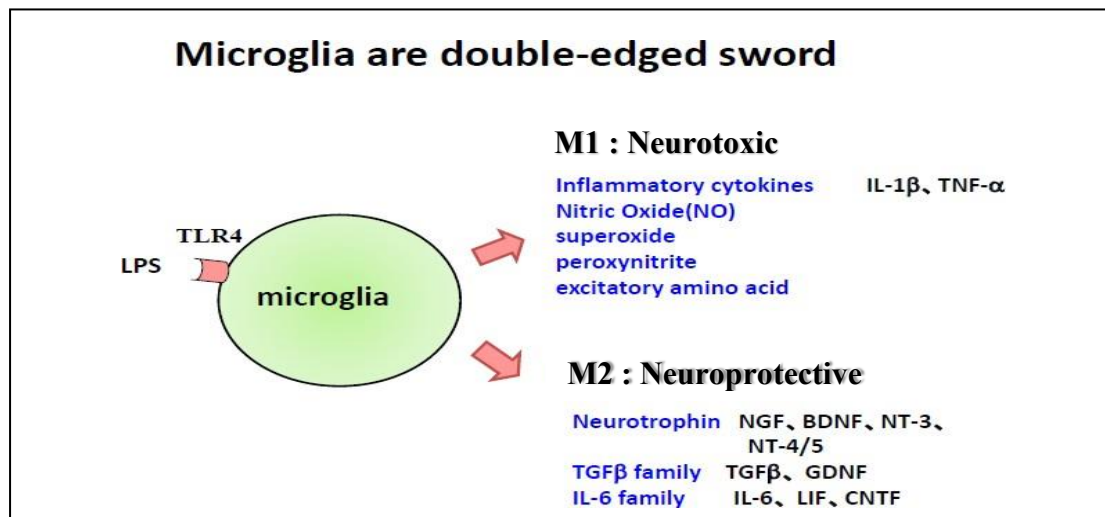


Figure 3. Facteurs produits par les cellules microgliales activées (Suzumura, 2013).

Les cellules microgliales libèrent à la fois des facteurs neurotoxiques et neuroprotecteurs suite à l'activation par LPS à travers les récepteurs TLR4. Ainsi, les cellules microgliales sont connues par leur effet à double tranchant. NT: facteurs neurotrophiques ou neurotrophines, TGF: Facteur de croissance transformant, GDNF : facteurs neurotrophiques dérivés des cellules gliales, LIF : facteur d'inhibition leucémique, leukemia inhibitory factor, CNTF : Facteur neurotrophique ciliaire

Cependant les phénotypes ne sont pas figés mais sont dynamiques en suivant un continuum d'activation pour établir une réponse inflammatoire. Il a été proposé qu'il y ait même des phénotypes intermédiaires soi-disant des pseudo-M1 (M1a, M1b...) et des pseudo-M2 (M2a, M2b...) qui sont moins réactives et moins productrices de cytokines en comparaison avec les formes extrêmes M1 et M2 (Gordon, 2003; Ward et al., 2015) (Figure 4).

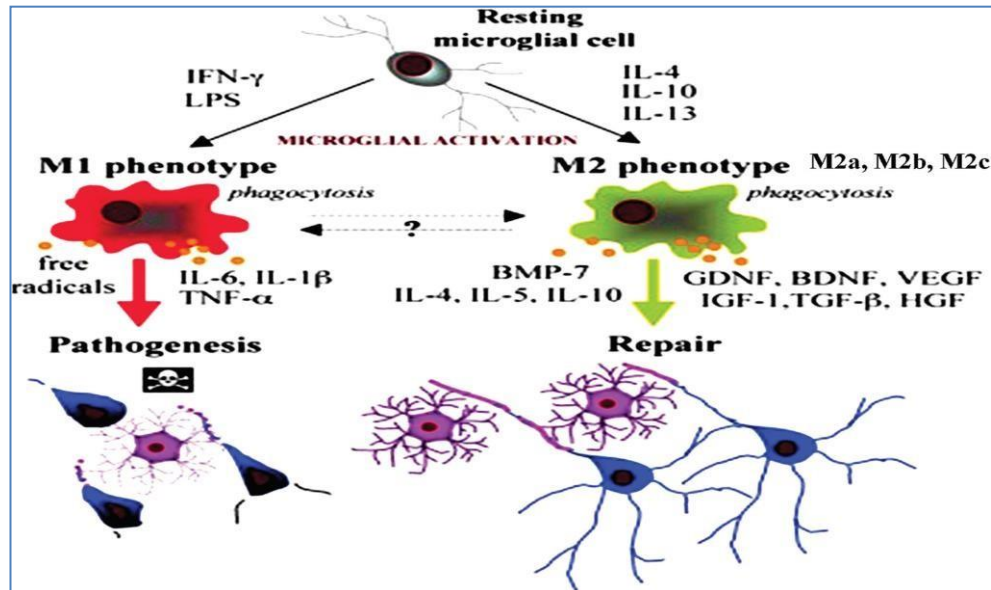


Figure 4. Phénotypes M1/M2 et leur intermédiaires (Ward et al., 2015).
Fonctions cytotoxiques des cellules microgliales M1 vs. fonctions neuroprotectrices et réparatrices des cellules microgliales M2.

En outre, l'idée qui prédomine chez les scientifiques est le fait que l'activation des cellules microgliales engendrerait tout d'abord le phénotype M1. Ce dernier pourrait se transformer en phénotype M2 via un passage alternatif (Gordon, 2003; Hu et al., 2015) (Figure 5).

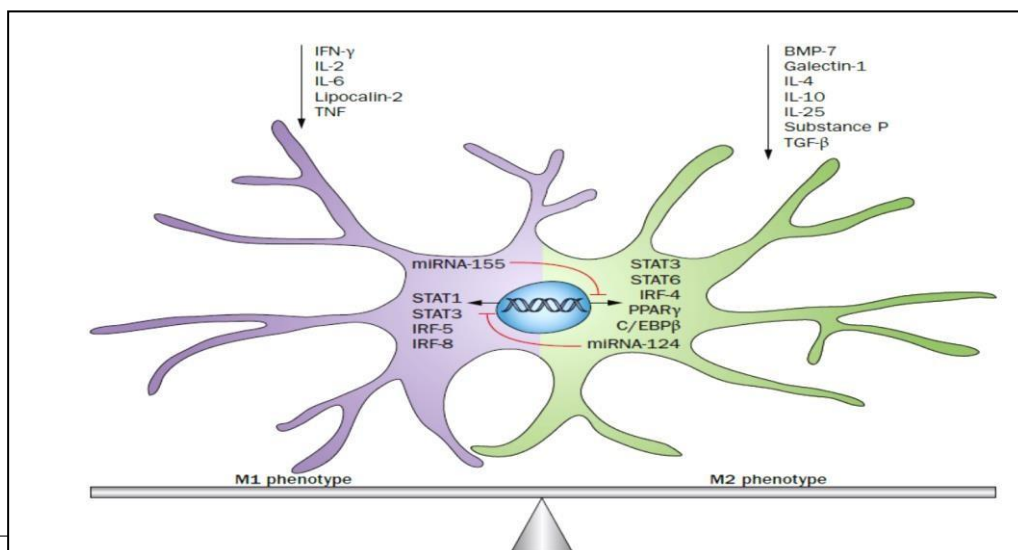


Figure 5 Les facteurs permettant le passage alternatif M1/M2 (Hu et al., 2015).

Les signaux extracellulaires et intracellulaires contrôlent la conversion des cellules microgliales activées d'un phénotype à l'autre. Abréviations: BMP-7: bone morphogenetic protein 7, C/EBP β : CCAAT/enhancer-binding protein β ; IRF: interferon regulatory factor; miRNA: microRNA, PPAR γ : peroxisome proliferator-activated receptor γ ; STAT: signal transducer and activator of transcription, TGF- β : transforming growth factor β ; TNF: tumour necrosis factor.

Cependant, la polarisation en M2 pourrait se faire directement à partir des cellules microgliales en "repos". L'effet neurotoxique/neuroprotecteur qui en résulte dépendrait de la balance M1/M2 (Hu et al., 2015) (Figures 5 et 6).

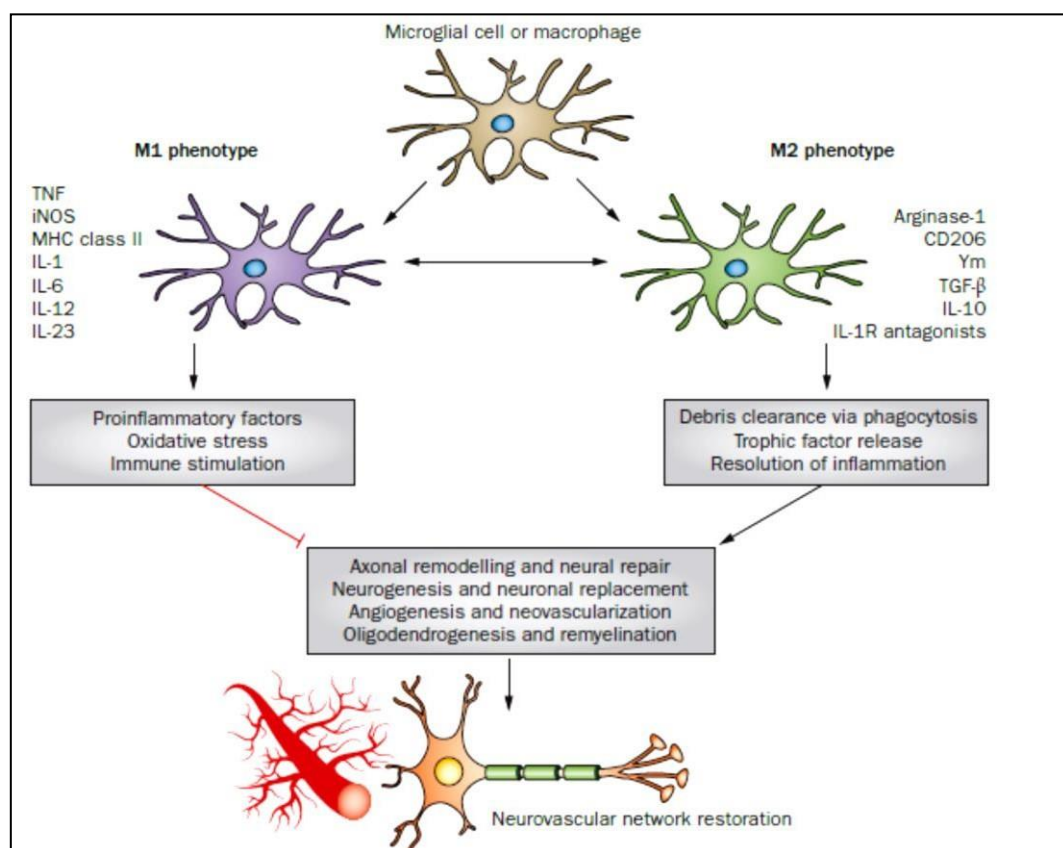


Figure 6. Le changement phénotypique des cellules microgliales (Hu et al., 2015).

Les cellules microgliales adoptent un phénotype M1 ou un phénotype M2, suite à une agression du SNC, qui possèdent des rôles différents dans la restauration du réseau neurovasculaire. Les cellules M1 sont caractérisées par l'expression d'une signature protéique proinflammatoire incluant TNF, iNOS et IL6. Par contre, la population M2 est caractérisée par l'expression d'une signature protéique telle que le CD206 et IL-10, anti-inflammatoire. La population M2 facilite la réparation du cerveau et la régénération en augmentant la phagocytose, et en libérant les facteurs trophiques et en permettant la résolution de l'inflammation centrale.

Abréviations: IL-1R: IL-1 receptor, iNOS: inducible nitric oxide synthase, TGF- β : transforming growth factor β , TNF: tumour necrosis factor, Ym: chitinase-like proteins.

Le phénotype M1 (dit également Th1) est un phénotype caractéristique de l'orientation des cellules microgliales pour défendre l'hôte, en produisant des cytokines pro-inflammatoires et des facteurs cytotoxiques (Gordon, 2007; Mackaness, 1964). Tant dis que le phénotype M2 (dit également Th2) pourrait être induit par les cytokines anti-inflammatoires comme il pourrait les produire. Ainsi, le phénotype M2 joue un rôle clé dans la résolution de l'inflammation. En outre, le phénotype M2 est généralement impliqué dans la phagocytose et dans la réparation tissulaire (Gordon, 2003; Mosser, 2003; Mosser and Edwards, 2008).

On distingue donc deux phénotypes microgliaux : (i) le phénotype M1 résultant de l'activation classique (la défense tissulaire et l'action pro-inflammatoire) et (ii) le phénotype M2 résultant de l'activation alternative (la réparation tissulaire, l'action anti-inflammatoire, la fibrose et la reconstruction de la matrice extracellulaire) (Eggen et al., 2013; Hanisch and Kettenmann, 2007; Hu et al., 2015).

I.4.2. Les fonctions des cellules microgliales

I.4.2.1. En conditions physiologiques

En conditions physiologiques, les cellules microgliales, sous leur forme hautement ramifiée leur permettant en mouvement continue de rétraction/expansion, assurent continuellement la surveillance de leur microenvironnement cérébral. Cette immunosurveillance permet de déceler tous les changements anormaux y compris les lésions, les infections, une activité cellulaire importantes au sein du SNC, ce qui pourrait les mettre en mode activé. Mise à part cette surveillance continue et l'attente permanente d'un signal d'activation, les cellules microgliales dans leur état ramifié pourraient jouer le rôle d'éboueur, en éliminant les métabolites secondaires générés par l'activité neuronale et accumulés dans les tissus cérébraux tels que les ERO. Ainsi, les cellules microgliales renforcent le système antioxydant du SNC (Derecki et al., 2013; Gomez-Nicola and Perry, 2015) (Figure 7).

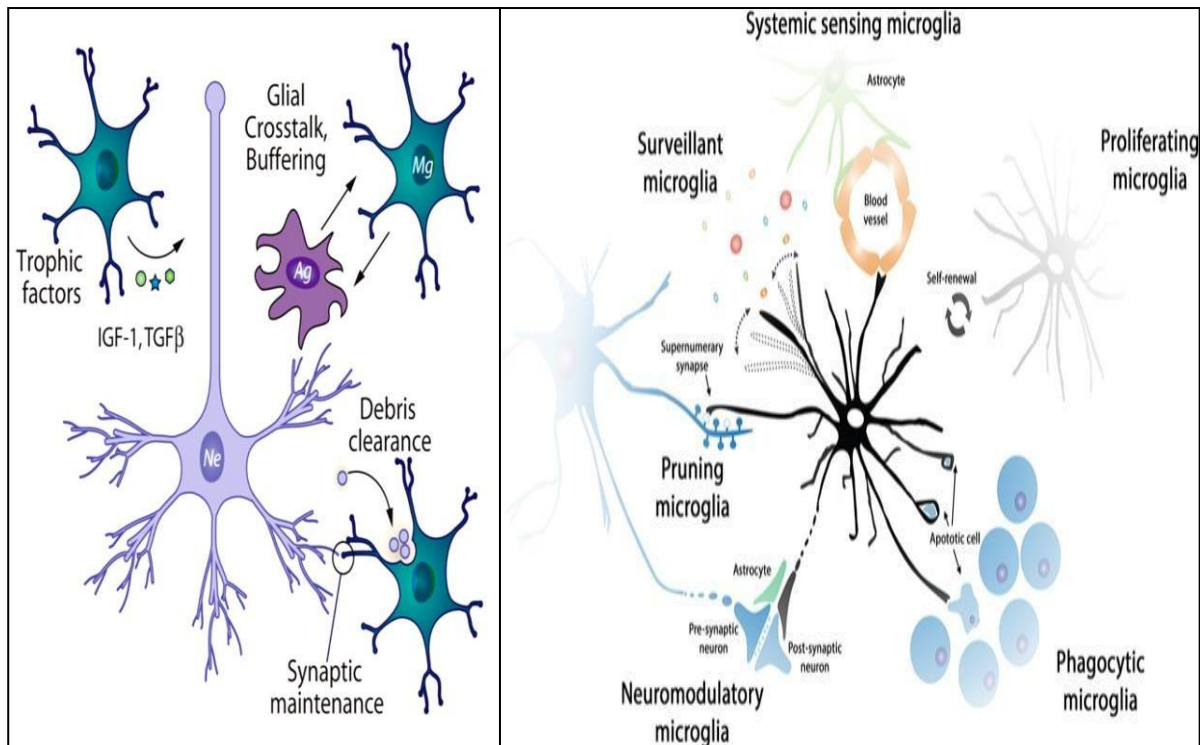


Figure 7. En conditions physiologiques, les cellules microgliales en repos assurent de nombreuses fonctions dans le SNC (y compris celui en développement) incluant la phagocytose des débris apoptotiques, la sécrétion des facteurs trophiques y compris IGF-1 et TGFβ et la maintenance synaptique (Derecki et al., 2013; Gomez-Nicola and Perry, 2015). Mg= Les cellules microgliales, Ag= astrocyte, Ne=neurone, IGF-1=insulin-like growth factor 1, TGFβ=transforming growth factor beta.

Comme expliqué précédemment, les cellules microgliales vérifient l'état de tout type cellulaire formant l'environnement cérébral ainsi que les connections synaptiques (Nimmerjahn et al., 2005; Wake et al., 2009). En effet, les cellules microgliales pourraient communiquer avec les neurones à l'aide de leurs prolongements en se connectant au niveau des synapses afin de contrôler l'activité synaptique et son état fonctionnel (Damani et al., 2011; Fontainhas et al., 2011). La modulation de l'état fonctionnel des synapses s'effectue essentiellement par le contrôle de la neurotransmission et la régulation de la potentialisation à long terme (PLT). La PLT est un processus de renforcement synaptique qui reflète une grande plasticité synaptique, ce qu'elle lui a valu d'être très étudiée pour son rôle dans les processus d'apprentissage et de consolidation mnésique (figure 8) (Bechade et al., 2013; Hayashi et al., 2006; Moriguchi et al., 2003; Zamanian et al., 2012).

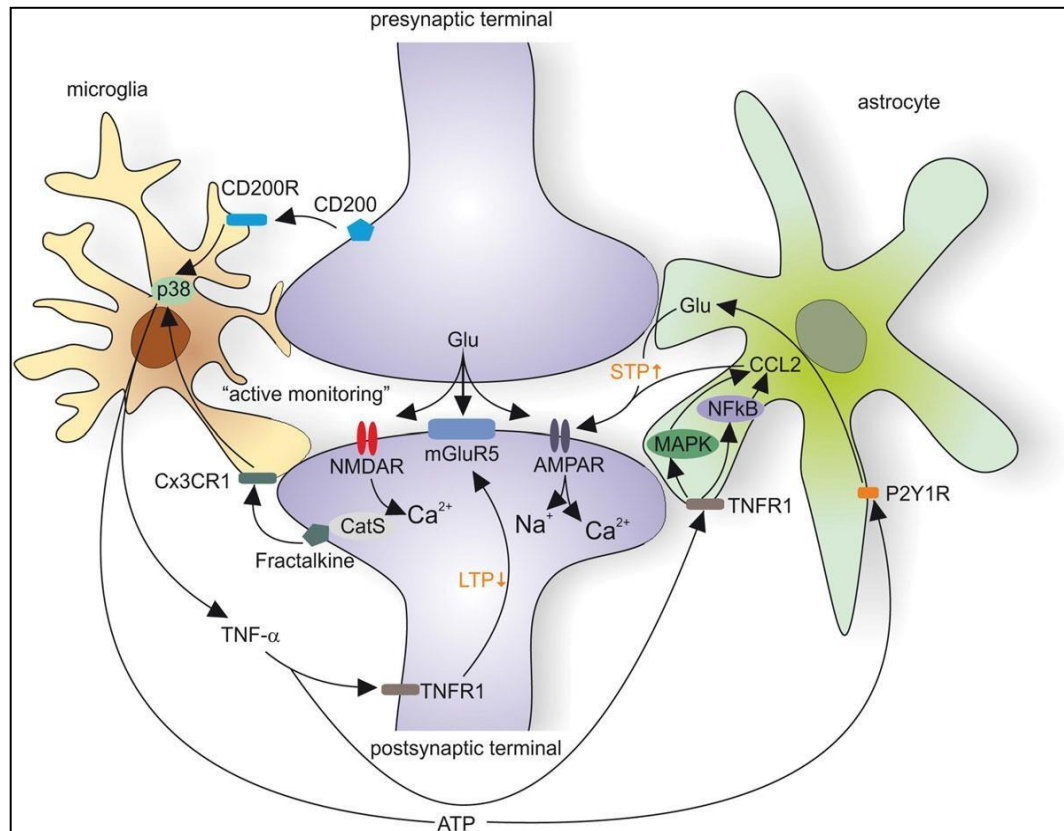


Figure 8. Les interactions cellules microgliales-neurone dans le cerveau (Blank and Prinz, 2013)

Les cellules microgliales réalisent plusieurs fonctions parmi lesquelles la surveillance des synapses d'une manière activité-dépendante. CD200 sont exprimés par les neurones et les astrocytes activées alors que leur récepteur (CD200R) est exprimé au niveau microgliale. Un dysfonctionnement de la signalisation CD200-CD200R est associé à une surproduction de la TNF- α qui inhibe la PLT suite à une activation combinée du TNFR1 et mGluR5. La libération du TNF- α par les cellules microgliales stimule aussi la libération de la CCL2 par les astrocytes, ce qui affecte l'activité des récepteurs postsynaptiques NMDAR et AMPAR. En outre, la communication entre les cellules microgliales et les astrocytes pourrait se produire par l'intermédiaire de la libération de l'ATP des cellules microgliales et de sa liaison au P2Y1R astrocytaires adjacents. Le glutamate astrocytaire se lie alors aux récepteurs neuronaux ionotropes et métabotropes du glutamate, et favorise ainsi la potentialisation à court terme (en anglais, STP).

Dans le cerveau mature adulte, il a été mis en évidence que les cellules microgliales participeraient à la régulation de la neurogénèse, un phénomène biologique qui n'a été découvert que récemment. Par exemple, une mort neuronale par apoptose serait détectée par les cellules microgliales qui activeraient la différenciation de certaines cellules souches pour

assurer un certain équilibre (élimination des cellules neuronales apoptotiques par phagocytose et différenciation des cellules souches) (Hu et al., 2015; Sierra et al., 2010; Vilhardt, 2005). Ainsi, l'idée que toute perte neuronale survenant à l'âge adulte était irréversible, et que les neurones étaient produits exclusivement lors de la période embryonnaire a été rejetée. Cette neurogénèse se déroule essentiellement dans deux régions du cerveau : le gyrus dentatus de l'hippocampe et la zone sous ventriculaire du télencéphale. Les cellules microgliales permettent dans un premier temps de réguler la prolifération des cellules souches et ensuite promouvoir la différenciation des neurones nouvellement produits ainsi que leur migration en libérant des médiateurs tels que TGF- β et l'IL-4 (Aarum et al., 2003; Kohman and Rhodes, 2013; Maggi et al., 2011).

I.4.2.2. En conditions pathologiques : neurotoxicité vs. neuroprotection

Toute perturbation de l'homéostasie cérébrale d'ordre pathologique est détectée d'une façon précoce et précise par les cellules microgliales. Ces dernières s'activent et adoptent un phénotype particulier pour faire face aux changements survenus (Eggen et al., 2013; Kreutzberg, 1996; Ladeby et al., 2005; Perry and Holmes, 2014; Perry et al., 2010; Ransohoff and Engelhardt, 2012; Ransohoff and Perry, 2009). En effet, cette activation oriente les cellules microgliales soit vers (i) un phénotype qui amplifie et propage l'inflammation, et donc induit une neurotoxicité, soit vers (ii) un autre phénotype qui protège l'environnement cérébral et donc assure une neuroprotection (Nakagawa and Chiba, 2014, 2015) (figure 9).

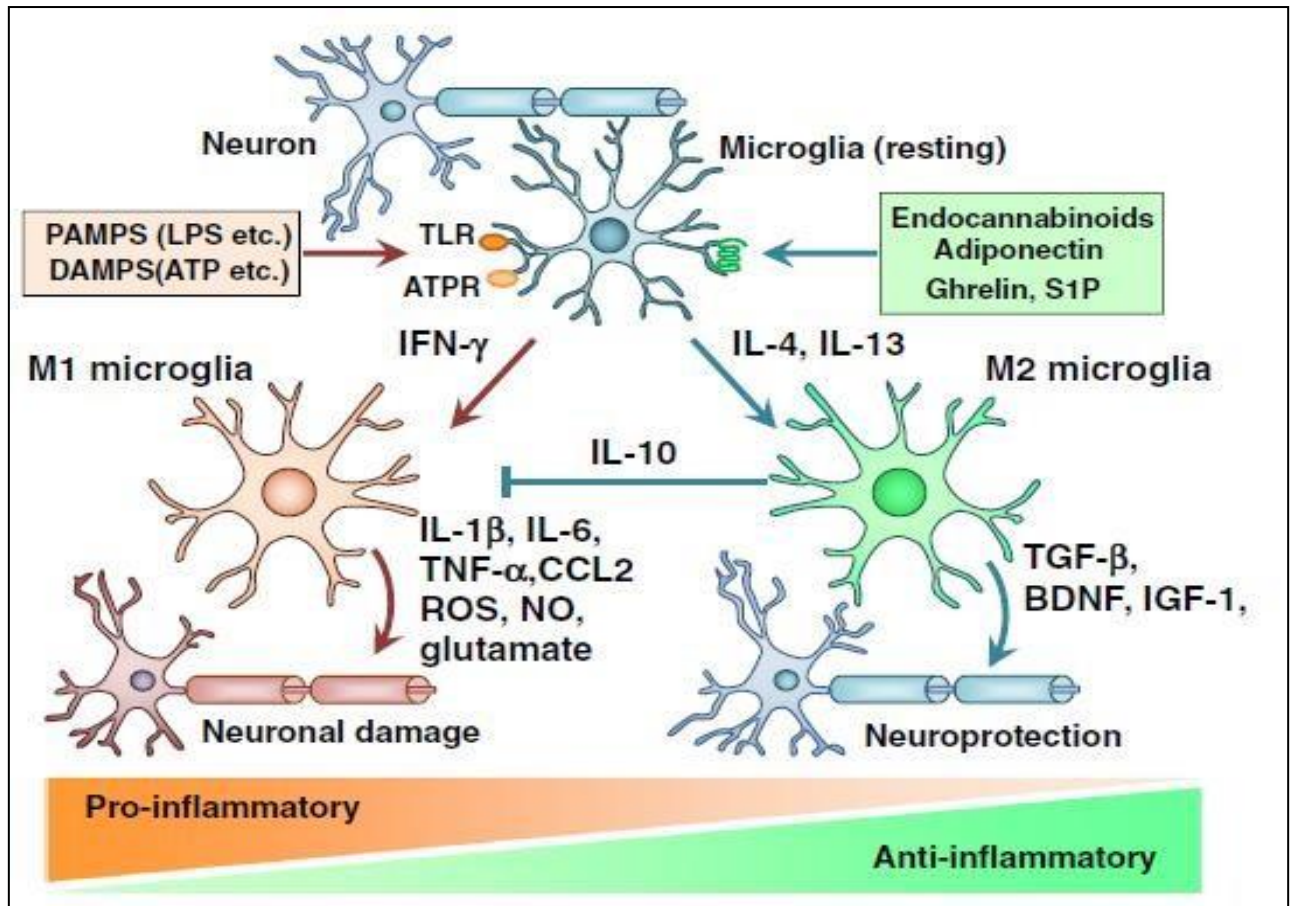


Figure 9. Les phénotypes M1/M2 microgliales et leurs fonctions immunorégulatrices (Nakagawa and Chiba, 2015). La pré-activation “priming” des cellules microgliales est observée dès la stimulation de ces cellules à l’état “quiescent” ou en repos “resting cells” par les PAMP ou les DAMP via les récepteurs TLR ou les récepteurs adénosines triphosphates (ATPR). En présence de l’IFN- γ , les cellules microgliales adoptent le phénotype M1, et produisent alors les cytokines et les médiateurs pro-inflammatoires tels que l’IL-1 β , IL-6, TNF- α , CCL2, glutamate, ERO, et le NO. Cependant, IL-4 et IL-13 induisent une activation alternative des cellules microgliales vers le phénotype M2 qui va sous-réguler les fonctions des cellules microgliales M1 par l’action de la cytokine anti-inflammatoire IL-10. En plus, les cellules microgliales M2 peuvent faciliter le remodelage tissulaire en produisant des facteurs neuroprotecteurs : TGF- β , BDNF, IGF-1 et le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF).

Quelque soit le phénotype adopté, les cellules microgliales activées vont déclencher une série d’évènements qui commence tout d’abord par l’augmentation de leur motilité grâce à leurs prolongements et ensuite leur migration très rapide vers le site affecté ou lésé. La migration concerne en particulier les cellules microgliales environnantes du site affecté afin de le contourner et mettre à l’abri les cellules saines (Bolmont et al., 2008; Davalos et al., 2005; Dibaj

et al., 2010; Nimmerjahn et al., 2005). Dans une autre étape ultérieure, les cellules microgliales, si leur activation est orientée vers un phénotype classique M1, libèrent des médiateurs pro-inflammatoires neurotoxiques, ce qui pourrait donc amplifier l'inflammation et accentuer les dommages cellulaires initialement induits (Combs et al., 2001; Grommes et al., 2008; Hernandez-Ontiveros et al., 2013; Jack et al., 2005a; Jack et al., 2005b; Ji and Suter, 2007; Weinstein et al., 2010). La persistance du phénotype M1 dépend étroitement du type de la pathologie ou de la nature du stimulus, ce qui pourrait conditionner aussi bien la chronicité de l'inflammation que la nature des molécules inflammatoires (Perry et al., 2007) (figure 10).

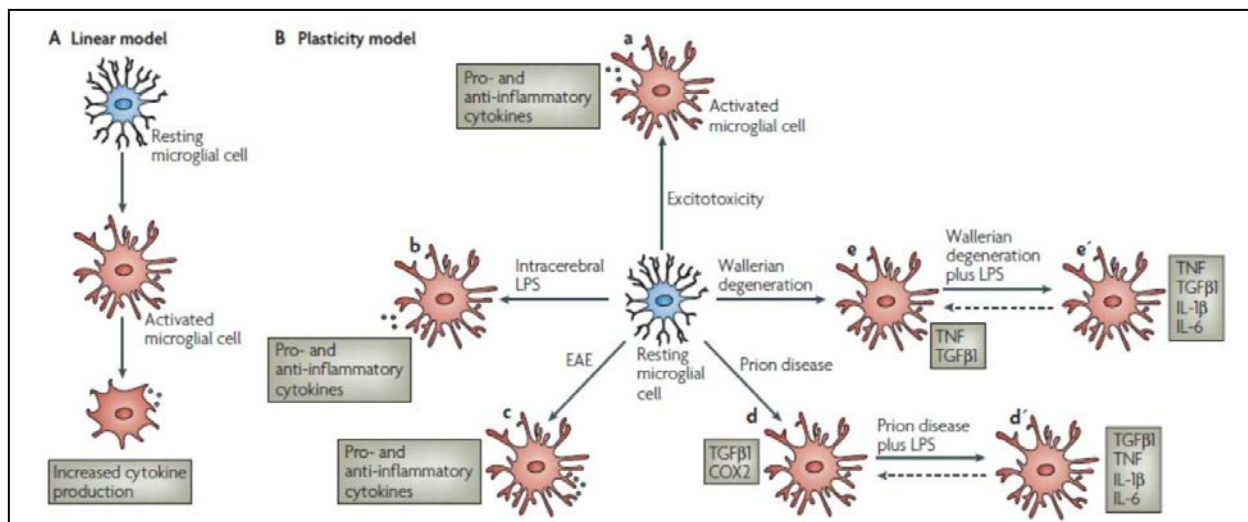


Figure 10 Modèles de l'activation des cellules microgliales (Perry et al., 2007).

En conditions physiologiques, les cellules microgliales présentent une morphologie hautement ramifiée et un phénotype sous régulé. En réponse à une agression ou une maladie, les cellules microgliales changent rapidement de morphologie et expriment une myriade d'antigènes surfaciques et intracellulaires. Ainsi, ces cellules microgliales sont désignées par le fait qu'elles sont activées.

(A) Le modèle linéaire de l'activation propose que les cellules microgliales « en repos » soient activées par un stimulus dont le degré de l'agression détermine aussi bien le niveau du changement morphologique que celui de la production des médiateurs pro-inflammatoires.

(B) Le second modèle de plasticité propose que les cellules microgliales soient sensibles entre autres à la nature précise du stimulus, à son intensité et à la durée d'exposition. Par conséquent, selon l'état pathologique, les cellules microgliales activées pourraient synthétiser une gamme de cytokines différentes. Les cellules microgliales libèrent aussi d'autres médiateurs et molécules inflammatoires tels que les protéases.

Les profils du modèle de plasticité présentés dans la figure, correspondent à : (Ba) un modèle d'excitotoxicité, (Bb) une exposition intracérébrale au LPS, (Bc) une encéphalomyélite allergique expérimentale, (Bd) la maladie du prion et (Be) une dégénérescence wallérienne. Il est important de noter que ces états ne sont pas figés mais peuvent parfaitement passer d'un profil à un autre par une stimulation additionnelle (par exemple, du Bd au Bd2 et du Be au Be2).

Dans certains cas, le phénotype M1 est transitoire et les cellules microgliales pourraient adopter un phénotype alternatif dit M2 connu par son action anti-inflammatoire et donc neuroprotectrice. La neuroprotection est assurée essentiellement par la production des cytokines anti-inflammatoires tels que l'IL4 et l'IL10 et des facteurs neurotrophiques comme le TGF β (Czeh et al., 2011). Il est à noter aussi que certaines cytokines pro-inflammatoires dès lors qu'elles sont produites à des faibles concentrations telles que le TNF α , pourraient induire également une neuroprotection (Bruce et al., 1996; Lambertsen et al., 2009). Ce qui permet de déduire que l'activité des cellules microgliales activée est finement régulée et conditionnée par la balance des cytokines proinflammatoire/antiinflammatoire traduisant par conséquent le rapport des effets neurotoxiques versus les effets neuroprotecteurs induits. Au cours de leur intervention, les cellules microgliales assurent la phagocytose des cellules ou les composants cellulaires endommagés. En effet, le matériel cellulaire endommagé (ou la cellule morte) produit des signaux appelés "find me" et "eat me" reconnus par les phagocytes pour les éliminer (Chekeni et al., 2010; Derecki et al., 2013; Ravichandran, 2010; Sierra et al., 2013). Ces signaux "find me" et « eat me » sont reconnus par des récepteurs comme les TLRs ce qui induit les cytokines proinflammatoires (par exemple pour l'élimination des pathogènes) et également les phosphatidylsérines (PS) : protéines permettant à la fois l'ingestion du corps apoptotique (ou du matériel endommagé) et l'induction des cytokines antiinflammatoires (Ravichandran, 2010; Sierra et al., 2013) (figure 11).

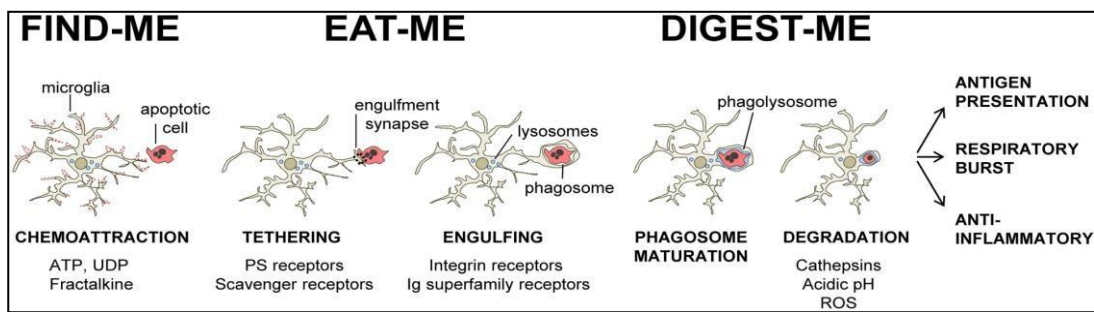


Figure 11. Le modèle en trois étapes de la phagocytose microgliale (Sierra et al., 2013).

En conditions physiologiques, les cellules microgliales sont extrêmement mobiles et reconnaissent les molécules chémoattractantes tels que la fractalkine et les nucléotides extracellulaires (ATP et UDP) libérées par les cellules endommagées ou apoptotiques. Ces molécules constituent les signaux « find me ». Grâce à cette première étape reconnaissance des signaux « find me » les cellules microgliales établissent un contact membranaire avec leur cible afin de déclencher une phagocytose. Dans une deuxième étape, ces phagocytes (les cellules microgliales) expriment, à leur tour, plusieurs récepteurs complémentaires aux signaux « find me » afin de reconnaître leur cible (d'où le signal « eat me ») et de les différencier des cellules vivantes (qui expriment les signaux « do not eat me »). Les récepteurs « eat me » des cellules microgliales forment une zone d'interaction avec leur cible appelée « synapse phagocytaire ». Dans cette espace, les phagocytes englobent la cible pour l'éliminer. La dernière étape, « digest me », consiste à dégrader la cible par la formation du phagosome qui, une fois mature, se transforme en phagolysosome. Les phagolysosomes digèrent la cible grâce à leurs enzymes et leur pH acide.

I.4.2.3. La signalisation « On »/ « Off » : activation et fonctions microgliales

Les cellules microgliales suivent plusieurs voies de communication dans leur dialogue avec leur environnement notamment cérébral. Leur capacité de percevoir tout signal d'alerte leur permettent la transition d'un état de surveillance vers celui d'activation afin d'exercer une fonction bien déterminée et adaptée au défi identifié. Ces fonctions sont régulées par un ensemble de signaux dits « On » et « Off » (Biber et al., 2007; Biber et al., 2008; de Haas et al., 2007). En conditions physiologiques, les signaux « Off » sont présents d'une façon constitutive dans le cerveau, exprimés par les neurones, et accompagnent les cellules microgliales non activées dans leur fonction de surveillance. La perturbation des cellules microgliales ainsi que la disparition des signaux « Off » alertent les cellules microgliales qui s'activent immédiatement, tant dis que les signaux « On » sont inductibles et initient donc l'activation des cellules microgliales. L'ensemble de ces signaux « On » ou « Off » sont résumés dans le tableau 1.

Tableau 1. Les signaux «On» /«Off» régulant l'activation des cellules microgliales (Biber et al., 2007)

Description	Exemples	Signal
Les neurotransmetteurs	Glutamate, GABA	Off
Les cytokines	CCL2/MCP1	On
	CCL21, CXCL10	Off
	CXCL12 et CX3CL1/fractaline	Off
signaux membranaires	CD200	Off
	CD22	Off
	CD47	Off
	MMP3	On
	le ligand TREM2	On
Les purines	ATP, UTP	On
Autres signaux immuns solubles	TGFB	Off
	NGF	Off
	BDNF	Off
	NT-3	Off

I.5. Inflammation prénatale

L'origine développementale de nombreuses maladies inclut certains troubles psychiatriques tels que la dépression et les maladies neurodéveloppementales, y compris l'autisme et la schizophrénie, a été discutée, et mise en évidence par de nombreux travaux de recherche (Allen et al., 1998; Barker, 1995a; Bilbo and Schwarz, 2009; Bolton and Bilbo, 2014; Dietert, 2011, 2012; Eriksson, 2005). Il a été suggéré que les mécanismes inflammatoires jouent un rôle crucial aussi bien dans l'étiologie que dans le maintien du dysfonctionnement neuronal de ces pathologies ; les conséquences de l'inflammation développementale peuvent être sexe-dépendantes (Bolton and Bilbo, 2014) (figure 12).

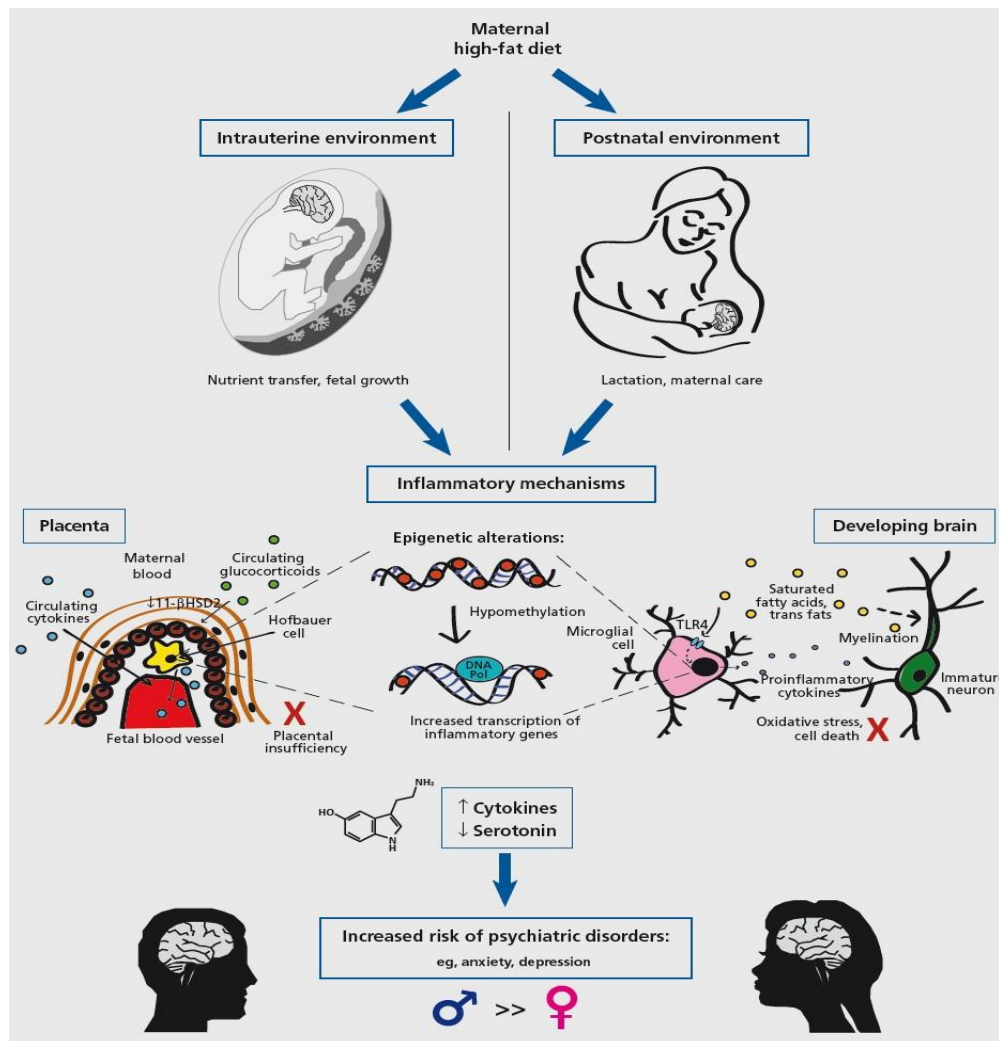


Figure 12. La programmation périnatale du cerveau et du comportement par l'alimentation maternelle riche en graisses implique les voies inflammatoires qui interagissent à la fois avec l'environnement intra-utérin et postnatal (Bolton and Bilbo, 2014).

Au niveau du placenta, les mécanismes inflammatoires incluent le passage à la circulation foetale des cytokines maternelles via la barrière placentaire, la production des cytokines proinflammatoires par les macrophages foetales placentaires (les cellules Hofbauer), et le passage des glucocorticoïdes maternels via la barrière placentaire. Ces conditions inflammatoires sont associées aussi bien à une insuffisance placentaire (voire à une diminution de la perfusion placentaire) qu'au retard de la croissance intra-utérin. Dans le cerveau en développement, les mécanismes inflammatoires comprennent la production microgliale des cytokines proinflammatoires (résultat de l'activation de la cascade de signalisation initiée par le récepteur TLR4 par les acides gras saturés, et de l'incorporation de ces acides gras dans la myéline des neurones en cours de développement). Par conséquent, ces événements aboutissent à la création d'un microenvironnement neuroinflammatoire, ce qui pourrait entraîner le stress oxydatif, la mort cellulaire, et l'altération de la trajectoire normale du développement du cerveau. Les mécanismes inflammatoires aussi bien au niveau du placenta qu'au niveau du cerveau conduiraient à des altérations épigénétiques telles que l'hypométhylation des gènes inflammatoires, ce qui aurait comme conséquence l'augmentation de leur transcription. Dans l'ensemble, l'augmentation de la quantité des cytokines proinflammatoires entraînerait une diminution de la synthèse de la sérotonine par le placenta durant le développement foetal, et par le cerveau lui-même durant le développement postnatal, ce qui pourrait engendrer le dysfonctionnement du neurodéveloppement ainsi que l'augmentation du risque des maladies psychiatriques à l'âge adulte. Un risque qui serait sexe-dépendant puisqu'il est plus élevé chez les hommes (et les mâles) par rapport aux femmes (et les femelles, dans le modèle animal).

Les cellules microgliales sont des cellules immunocompétantes primaires du système nerveux central et sont impliquées dans tous les aspects majeurs du développement et du fonctionnement cérébral, y compris, la synaptogenèse, l'apoptose et l'angiogenèse (Blank and Prinz, 2013; Tremblay et al., 2011; Wake and Fields, 2011; Wake et al., 2009; Wake et al., 2011). De nombreuses cytokines jouent un rôle important dans le maintien, la prolifération, la différenciation ainsi que la migration des cellules progénitrices (Bilbo and Schwarz, 2009; Cavaillon, 1995; Cavaillon and Haeflner-Cavaillon, 1993; Miller et al., 2009; Reichenberg et al., 2001; Spencer et al., 2006; Tofoli et al., 2011). Au cours de la grossesse, l'inflammation pourrait être considérée comme une arme à double tranchant (Dietert, 2011, 2012; Dietert, 2015; Hagberg et al., 2015; Hale et al., 2014; Spencer, 2013a; Spencer et al., 2007; Spencer and Tilbrook, 2009). Elle pourrait être bénéfique pour faire face à des agressions comme les infections qui peuvent altérer le développement du fœtus. Cependant, l'inflammation en elle-même, et spécialement lorsqu'elle est chronique, pourrait altérer la trajectoire normale du développement foetal y compris celle du cerveau, en induisant, par exemple, des changements cérébraux fonctionnels et comportementaux à long-terme (figure 12). L'inflammation chronique est souvent associée à certaines conditions maternelles dont une alimentation maternelle riche en graisses, une sous-nutrition maternelle et une exposition aux xénobiotiques (Dietert, 2011, 2012; Dietert, 2015; Hagberg et al., 2015; Hale et al., 2014; Spencer, 2013a; Spencer et al., 2007; Spencer and Tilbrook, 2009). Par exemple, il a été démontré qu'il y a une association entre les femmes obèses enceintes et l'exposition fœtale à des taux élevés d'une variété de cytokines inflammatoires telles que l'IL-1 β , IL-6, TNF- α , INF- γ , IL-10 et CCL2 (MCP1) (Catalano et al., 2009; Madan et al., 2009). La majorité de cytokines produites sont pro-inflammatoires, à l'exception de l'IL-10 qui est anti-inflammatoire et l'INF- γ qui est considérée comme régulateur (ni pro-inflammatoire ni anti-inflammatoire) (Desai et al., 2013; Dietert, 2011, 2012; Dietert, 2015; Hagberg et al., 2015; Hale et al., 2014; Spencer, 2013a;

Spencer et al., 2007; Spencer and Tilbrook, 2009). Dans le modèle animal, plusieurs conditions favorisant l'inflammation précoce ont été suggérées jouer un rôle fondamental aussi bien dans la programmation prénatale que la programmation néonatale (De Luca et al., 2016; Hale et al., 2014) (figure 13). En effet, la sous-nutrition maternelle a provoqué chez la progéniture une inflammation précoce, et à l'âge adulte, des modifications aussi bien physiologiques et métaboliques (exemple, l'altération de la morphologie des adipocytes) que comportementales (exemple, l'hyperactivité). D'une façon intéressante, la restriction calorique à l'âge adulte porterait plutôt des effets bénéfiques. Une induction du système immunitaire de ces animaux par les LPS a engendré un «sickness behavior» très atténué (De Luca et al., 2016; Hale et al., 2014). En plus de l'inflammation précoce, l'exposition prénatale à une alimentation maternelle riche en graisses a programmé d'autres altérations physiologiques et métaboliques chez les rats à l'âge adulte telles que l'hyperlipémie, l'hyperinsulinémie et l'intolérance au glucose. Sur le plan comportemental, l'anxiété et des déficits d'apprentissage ont été relevés chez la progéniture de ces rats à l'âge adulte (De Luca et al., 2016; Hale et al., 2014). Même si la programmation prénatale a été observée chez les deux modèles d'exposition (la sous-nutrition maternelle et l'alimentation maternelle riche en graisses), la réponse immunitaire à l'induction par les LPS a été biphasique, au moins concernant la production de l'IL-1 β et IL-6 (De Luca et al., 2016; Hale et al., 2014) (figure 13).

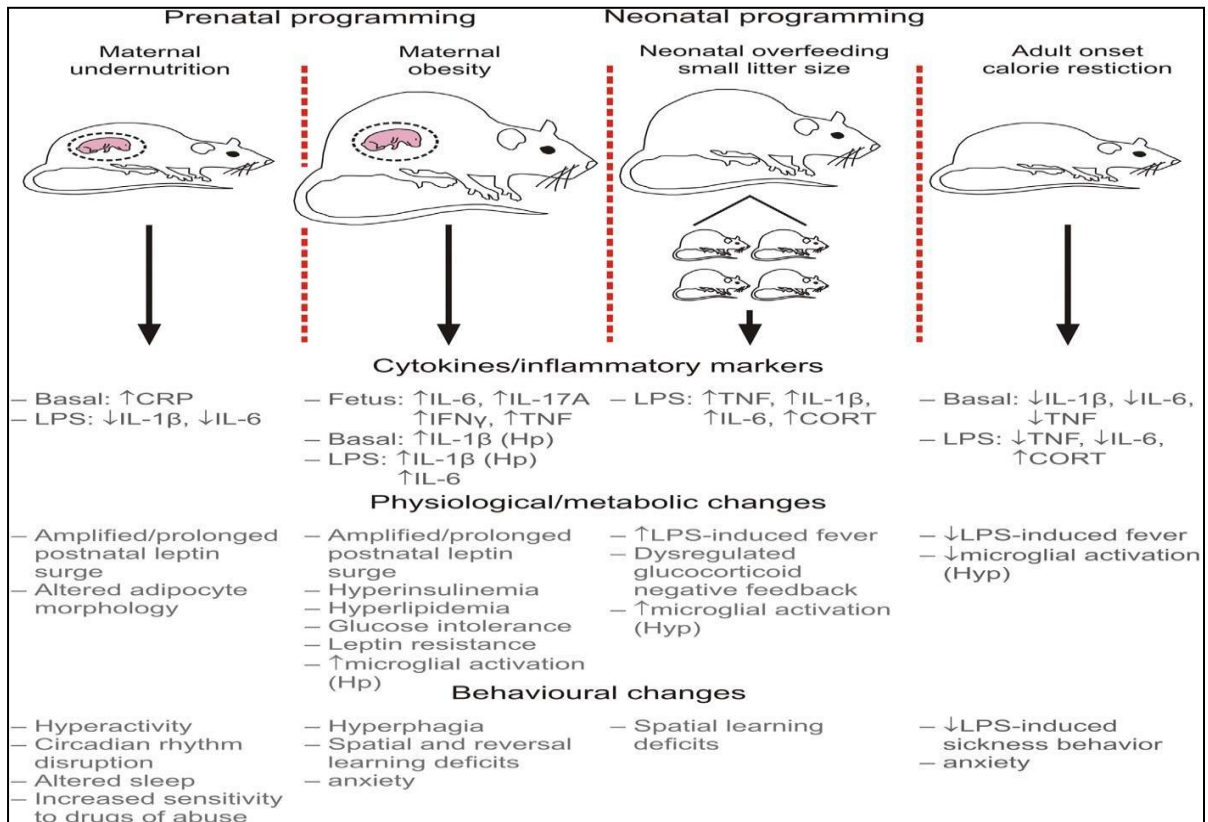


Figure 13. L'exposition à la sous ou la sur-nutrition durant la gestation ou à une sur-alimentation précoce pourrait avoir des conséquences à vie sur le fonctionnement du système immunitaire, le métabolisme et le comportement (Hale et al., 2014). Le schéma illustre deux modèles de rongeurs de la programmation prénatale : la sous-nutrition maternelle et l'obésité maternelle, et aussi un modèle de la programmation néonatale basée sur le différentiel d'allaitement des rats élevés dans des litières de petite taille ($n = 3$ à 4) comparés aux rats témoins élevés dans des litières de taille normale ($n = 12$), en présentant des exemples des altérations physiologiques, métaboliques et comportementales provoqués par la programmation. Le schéma illustre également un modèle adulte de la restriction calorique présentant des modifications bénéfiques sur la santé. Abbreviations: CORT, corticostérone; CRP, C-reactive-protein; Hp, hippocampe; Hyp, hypothalamus; LPS, lipopolysaccharide; TNF, facteur de nécrose tumorale.

Les molécules inflammatoires circulantes dans le sang maternel pourraient passer à l'embryon et/ou au fœtus, en induisant, chez ces derniers, des réponses cellulaires (Catalano et al., 2009; Hale et al., 2014; Madan et al., 2009). Dans ce contexte, chez le modèle animal, il a été démontré que l'injection des IL-6 et TNF chez les ratte gestantes (aux jours gestationnels, JG : 8, 10 et 12) a eu comme conséquence la naissance d'une progéniture avec un surpoids, une adiposité et une diminution de la sensibilité à l'insuline (Dahlgren et al., 2006; Samuelsson et al., 2004). L'injection de l'IL-1β chez les ratte gestantes (JG 17-21) a

produit des effets à long-terme chez la progéniture en altérant sa réponse au stress, et en induisant des déficits d'apprentissage (Gotz et al., 1993). Le transfert direct de l'IL-6 de la ratte à son foetus a été démontré à l'aide d'un radiomarquage de l'IL-6 (Dahlgren et al., 2006). Des essais *in vitro* impliquant des membranes foetales humaines ont démontré le transfert bidirectionnel des cytokines (Kent et al., 1994) ; cependant des études *ex-vivo* impliquant le placenta ont infirmé le passage des ces cytokines (Aaltonen et al., 2005). Ces divergences pourraient être expliquées, entre autres, par les différences aussi bien au niveau des préparations qu'au niveau des protocoles expérimentaux. En plus de la production maternelle des cytokines, le placenta pourrait aussi en produire des quantités importantes comme le cas de celui des femmes enceintes obèses (Hauguel-de Mouzon and Guerre-Millo, 2006; Radaelli et al., 2006; Challier et al., 2008; Zhu et al., 2010a; Heerwagen et al., 2013; Kim et al., 2014). Il a été suggéré que le placenta pourrait amplifier voire amortir l'inflammation maternelle, ce qui détermine l'environnement inflammatoire auquel le foetus sera exposé (Zaretsky et al., 2004; Aaltonen et al., 2005; Dahlgren et al., 2006; Hauguel-de Mouzon and Guerre-Millo, 2006; Challier et al., 2008; Zhu et al., 2010b). En concordance avec cette hypothèse, il a été reporté que le taux des marqueurs inflammatoires dans la circulation foetale n'a pas changé jusqu'à la fin de la gestation chez la souris malgré une inflammation maternelle élevée (Kim et al., 2014). Ceci pourrait mettre en évidence le rôle protecteur du placenta contre l'inflammation maternelle (Lenz, 1997; Houser, 2012). Cependant, l'efficacité de la barrière placentaire pourrait être significativement diminuée dans le cas d'une mauvaise alimentation maternelle. En effet, une réponse placentaire pro-inflammatoire pourrait être induite dans le cas d'une malnutrition ou aussi chez les femmes enceintes obèses. La réponse pro-inflammatoire placentaire pourrait être également due, entre autres, à des changements épigénétiques significatifs par exemple via une hypométhylation des gènes de cytokines du placenta (Bolton and Bilbo, 2014). En plus du phénomène de la pré-activation "priming" des

cellules microgliales (figure 14), les modifications comportementales par la programmation développementale pourraient aussi être expliquées par les changements épigénétiques qui sont souvent induits par une inflammation précoce (Calcia *et al.*, 2016).

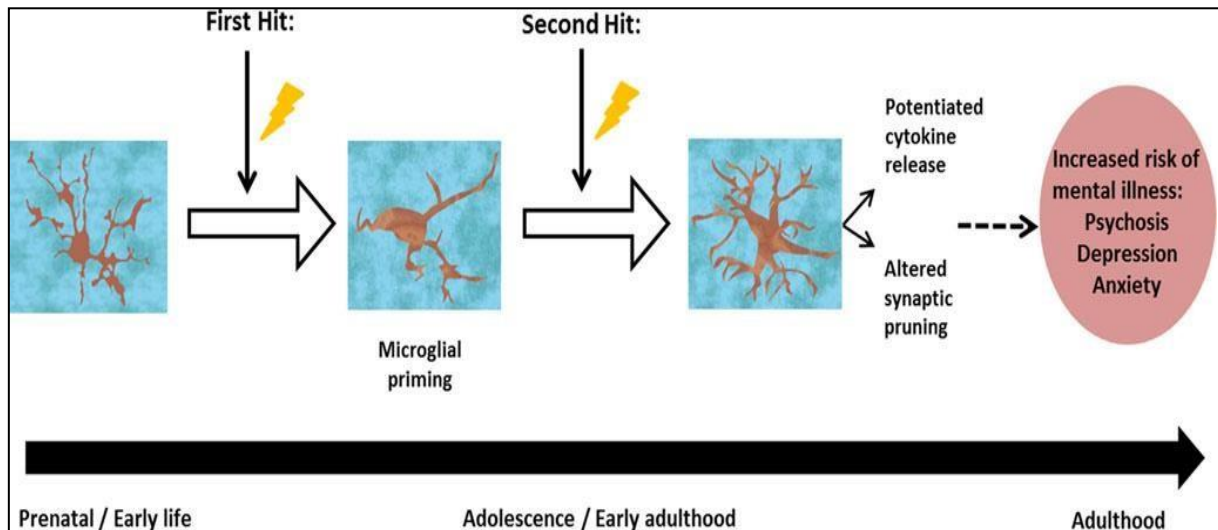


Figure 14. L'hypothèse de « deux coups » (en anglais, The 'two-hit' hypothesis") (Calcia *et al.*, 2016).

L'exposition à un stress prénatal/précoce (le premier coup, first hit) pourrait pré-activer (prime) les cellules microgliales au sein du SNC ainsi un défi survenant plus tard dans la vie (le second coup, second hit), soit à l'adolescence ou à l'âge adulte, engendre une réponse microgliale potentialisée, entraînant un risque accru de développer une maladie mentale.

Ainsi, pour les maladies à l'âge adulte liées au stress, les modifications épigénétiques de l'axe hypothalamique pituitaire surrénalien (HPA) à l'âge précoce, représente l'altération majeure hypersensibilisante aux stressseurs rencontrées à l'âge adulte (Cai *et al.*, 2016; Spencer, 2013a, b; Spencer and Tilbrook, 2009; Tofoli *et al.*, 2011). En effet, la programmation de l'axe HPA surviendrait suite à l'exposition à un stress précoce ou par l'alimentation maternelle, ce qui conduirait à une augmentation de l'expression des récepteurs des glucocorticoides dans le cerveau ainsi qu'un dysfonctionnement de cet axe qui deviendrait hyperactif. A l'âge adulte, une exposition à un stress conduirait à une libération exagérée de la corticostérone (cortisol, chez l'Homme), et également à une réponse amplifiée au niveau du cerveau dans lequel il y a une surexpression des récepteurs de cette hormone du stress. Ainsi,

les événements de stress interagissant avec un axe HPA hypersensible pourraient conduire à des maladies neuropsychiatriques telles que l'anxiété et la dépression (Cai et al., 2016; Spencer, 2013a, b; Spencer and Tilbrook, 2009; Tofoli et al., 2011). Par conséquent, la programmation de l'axe du stress est tout simplement une programmation de la façon dont l'individu devrait répondre aux stressseurs.

I.6. Inflammation postnatale

En cas d'allaitement, les facteurs maternels en particulier l'alimentation pourrait affecter le développement de l'individu après sa naissance (De Luca *et al.*, 2016; Hale *et al.*, 2014) (Figure 12). D'autres facteurs environnementaux peuvent influencer la trajectoire normale du développement du cerveau tel que l'exposition aux polluants (Dietert, 2012). Il est important de souligner que les polluants y compris les contaminants alimentaires représentent un défi majeur pour la santé du cerveau immature du fait qu'ils (ou leurs métabolites) sont généralement neurotoxiques, et ont la capacité de traverser les barrières placentaire et hématoencéphalique, dans le cas d'exposition prénatale, voire aussi dans le cas d'exposition postnatale, être véhiculés, par exemple, par le lait maternel. L'exposition précoce aux polluants y compris les polychloropiphényles (PCB), les métaux lourds, les pesticides, les dioxines, les furanes, les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) pourrait induire l'inflammation (Dietert, 2012). Plusieurs voies cellulaires ont été identifiées comme étant les voies d'induction de l'inflammation par ces xénobiotiques incluant la voie des facteurs nucléaires NF- κ B (nuclear factor-kappa B), la voie des protéines kinases MAPK (mitogen-activated protein kinases) et la voie d'induction de l'expression de la cyclooxygénase-2 et de l'oxyde nitrique synthase (Cardenas-Gonzalez *et al.*, 2013; Dietert, 2015; Kim et al., 2002; Liu et al., 2015; Osgood et al., 2013; Sipka et al., 2008).

La programmation néonatale a été parfaitement mise en évidence dans le modèle rongeur (rat et souris), en manipulant la taille de la litière (De Luca et al., 2016; Hale et al., 2014) .

Ainsi, comme illustré dans la figure 13, les rats élevés dans des litières de petites tailles (n= 3 à 4), donc sujets à une sur-nutrition, ont eu, à l'âge adulte, de nombreuses altérations physiologiques, métaboliques et comportementales par rapport aux rats témoins élevés dans des litières de tailles normales (n=12). En plus, les rats élevés dans des litières de petites tailles ont eu une croissance accélérée et une importante prise de poids du fait qu'ils ont un plus grand accès au lait maternel, et un lait beaucoup plus riche en matière grasse. Ces animaux, une fois adultes, les études ont montré qu'ils ont une grande sensibilité aux défis immunitaires, tels que les LPS, du fait de la production exagérée des cytokines pro-inflammatoires (Hale et al., 2014). Des effets sexe dépendants ont été aussi observés chez ce modèle de la programmation néonatale. En effet, à l'âge adulte, l'axe HPA des femelles a été hyperactif face à un stress psychologique (le stress de contention) par rapport aux mâles (Spencer, 2013b; Spencer and Tilbrook, 2009). D'une façon succincte, les effets sexe-dépendants sont attribués aux stratégies adaptatives différentes entre les mâles et les femelles, ce qui conditionne l'ampleur et l'amplitude de la réponse inflammatoire. De même, les hormones sexuelles peuvent être à l'origine du dimorphisme sexuel. En effet, ces hormones jouent un rôle organisationnel sur le cerveau en développement, et ont un effet activateur, à partir de la puberté, sur le cerveau. Ainsi, le dimorphisme sexuel pourrait être expliqué par la perturbation de l'effet organisationnel des hormones sexuelles et/ou de leur effet activationnel. Il serait aussi possible que les événements précoces provoquent d'abord des lésions au niveau du cerveau, et ensuite les hormones sexuelles via leurs effets organisationnels et activationnels changent la nature de la lésion, ce qui induirait des réponses dépendantes du sexe selon les hormones sexuelles mises en jeu (Nguon et al., 2005a; Nguon et al., 2005b).

Il a été aussi suggéré que la sur-nutrition néonatale pré-active les cellules microgliales hypothalamiques, ce qui altère le niveau basal de l'inflammation centrale, et rend ces cellules

macrophagiques hypersensibles aux défis immunitaires rencontrés à travers la vie (Ziko et al., 2014). Le stress postnatal a été aussi suggéré comme un facteur de programmation chez l'être humain. En effet, les enfants issus des familles vivant dans des niveaux de stress élevés ont un risque significatif de devenir obèses par rapport aux enfants vivants dans des familles sans stress. Chez le rongeur, le stress de la séparation maternelle a des impacts sur le développement des nouveaux-nés, et également il est responsable des effets psychologiques tardifs. A l'âge adulte, ces animaux ont développé une anxiété élevée. Le taux basal plasmatique aussi bien de la corticostérone que de l'adrénocorticotrophine (ACTH) a été altéré. En outre, l'expression cérébrale des récepteurs des glucocorticoïdes a été également affectée. Il a été aussi mis en évidence que la production de la corticostérone a été exagérée en réponse au stress (Spencer, 2013b; Spencer and Tilbrook, 2009).

II. Inflammation, comportement et cognition : ménage à trois

On a longtemps cru que le cerveau bénéficiait, contrairement aux autres organes, d'un privilège immunitaire et qu'il échappait largement à la surveillance immunitaire grâce au rôle protecteur de la barrière hémato-encéphalique. Cependant, au cours de la dernière décennie, les recherches ont bien démontré que le cerveau n'est pas un organe immunoprivilégié, et donc il n'est pas à l'abri de la majorité des effets dévastateurs de la réaction inflammatoire (Renaud et al., 2015). Ainsi, il est actuellement bien admis que le système nerveux et l'immunité communiquent entre eux, et d'une façon bidirectionnelle (Pacheco et al., 2012) (figure 15).

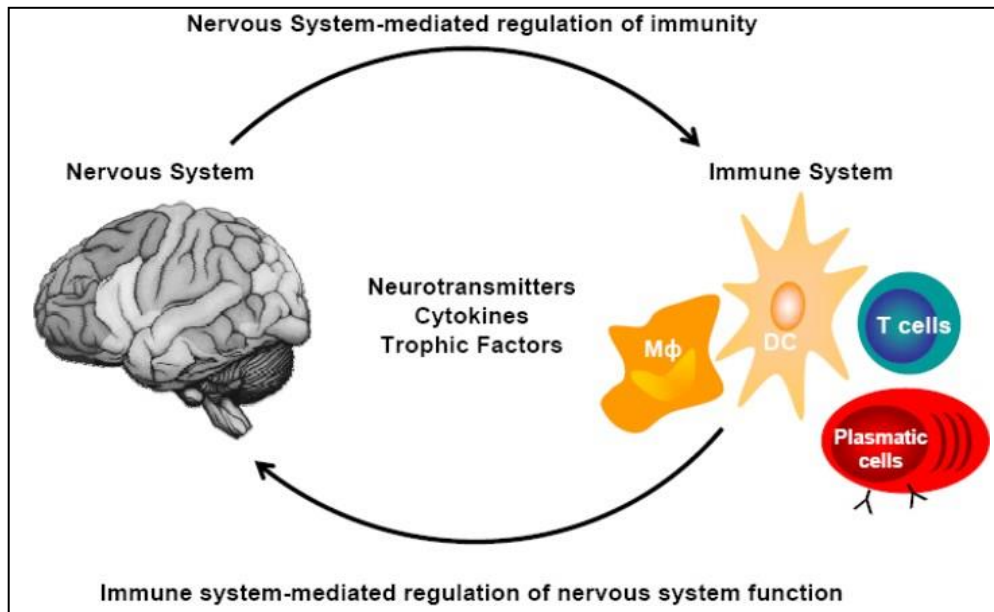


Figure 15. Les interactions neuroimmunes (Pacheco et al., 2012). Une communication bidirectionnelle entre le SNC et le système immunitaire est admise aussi bien en conditions physiologiques que physiopathologiques. Les mêmes molécules y compris les cytokines, les neurotransmetteurs et les facteurs trophiques participent comme médiateurs dans les deux directions.

Les voies de communication entre ces deux systèmes régulateurs impliquent le système nerveux autonome (SNA), l'activation de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien, ainsi que les cytokines, et les leucocytes qui traversent la barrière hématoencéphalique (Dilger and Johnson, 2008). Bien que le système nerveux et l'immunité soient constamment en communication, le transfert des informations entre les deux systèmes croît durant une infection périphérique. Lors de l'activation du système immunitaire inné, les cellules microgliales du cerveau réagissent aux signaux de la périphérie et produisent les cytokines inflammatoires dans le but de coordonner une réponse comportementale complémentaire qui correspond normalement à une réponse adaptative (Dantzer et al., 1999; Dantzer et al., 2008). Cependant, une production excessive des cytokines inflammatoires dans le cerveau peut produire plusieurs déficits comportementaux sévères et favorise une réponse neurotoxique (Godbout et al., 2005; Huang et al., 2008). L'interaction entre le système immunitaire et le

cerveau est très explicite dans le syndrome de “sickness behavior” : le comportement de la maladie (Dantzer et al., 2008; Dilger and Johnson, 2008). En effet, quand un individu fait une réaction inflammatoire suite à une infection virale ou bactérienne, il se produit ce que l’on appelle le “sickness behavior” (figure 16). En général, l’individu développe de la fièvre, se sent fatigué et triste, se replie sur lui-même, se désintéresse de tout, perd sa libido et parfois l’individu peut même manifester des troubles cognitifs et de la confusion. Ces symptômes sont finalement très proches de ceux de la dépression (Dilger and Johnson, 2008; Postal and Appenzeller, 2015). Tous ces changements incluent ceux qui touchent les habitudes de la prise alimentaire et de l’eau, le sommeil, l’exploration et les interactions sociales ne sont en réalité pas médiés par l’infection en elle-même mais plutôt par le système immunitaire qui implique les voies inflammatoires du système nerveux central (Dinel et al., 2014; Postal and Appenzeller, 2015). En effet, par le biais des cytokines spécifiques, le cerveau déclenche une réponse comportementale adaptative afin de mettre en place un mécanisme efficace de défense immunitaire.

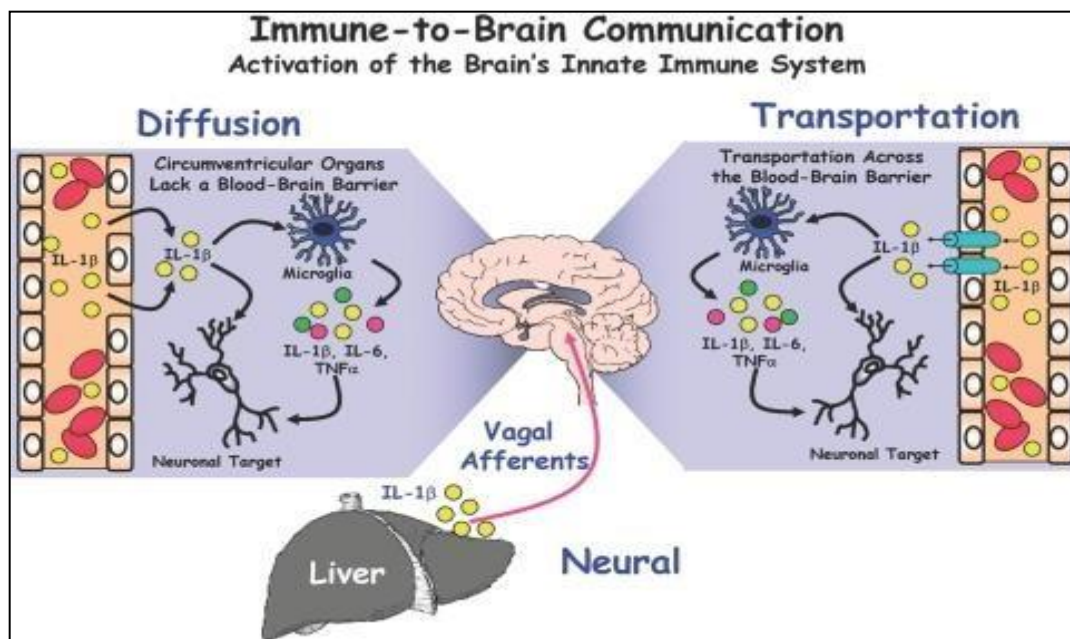


Figure. 16. Communication du système immunitaire avec le cerveau (Dilger and Johnson, 2008).

La voie neuronale implique une communication rapide des signaux immunitaires via les nerfs primaires afférents. Par exemple, les cytokines périphériques produites stimulent directement le nerf vagal afférent du foie pour induire des réponses centrales. De même, les cytokines peuvent traverser passivement la barrière hémato-encéphalique. Il a aussi été suggéré que les cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique pourraient être impliquées dans la transduction du signal au SNC. Les cytokines se fixeraient sur les récepteurs endothéliaux pour provoquer directement dans les régions du cerveau le relargage des molécules immunes telles que les cytokines, NOS, etc. Indépendamment de la voie empreintée, les médiateurs inflammatoires libérés dans le SNC activent les cellules microgliales du cerveau pour libérer des cytokines inflammatoires, qui occupent ensuite les récepteurs neuronaux dans des régions spécifiques du cerveau (par exemple, l'hippocampe) pour initier le syndrome du comportement de la maladie "sickness behavior".

Une fois le danger éliminé, le "sickness behavior" et l'inflammation disparaissent alors, en réponse à des cytokines anti-inflammatoires. Contrairement aux jeunes, chez les personnes âgées le syndrome du "sickness behavior" pourrait correspondre à une réaction mal-adaptative due à sa grande sévérité et à sa plus grande durée, ce qui augmente le risque d'hospitalisation et de mortalité chez cette catégorie de personne d'âge avancé. Cette dichotomie est due à la réponse inflammatoire disproportionnée, impliquant essentiellement les cytokines IL-1 β , IL-6 et TNF- α , au niveau central chez les personnes âgées en réponse à une infection périphérique (Dilger and Johnson, 2008; Postal and Appenzeller, 2015). Il a été suggéré que l'état de la réactivité des cellules microgliales dans le cerveau âgé est à l'origine de cette production accrue des cytokines pro-inflammatoires. En effet, le vieillissement a été considéré comme un facteur qui pré-active "en anglais, prime" ou sensibilise les cellules microgliales. Une fois les cellules microgliales pré-activées «primed microglia» ou sensibilisées «sensitized microglia» sont en présence d'une stimulation secondaire avec un stimulus de déclenchement (c'est-à-dire des signaux périphériques d'une infection), elles s'activent (cellules microgliales activées) en libérant des quantités excessives de cytokines pro-inflammatoires (l'hypothèse de deux coups, figure 14), ce qui induit alors un mal-adaptatif "sickness behavior" (Dilger and Johnson, 2008) (Figure 17).

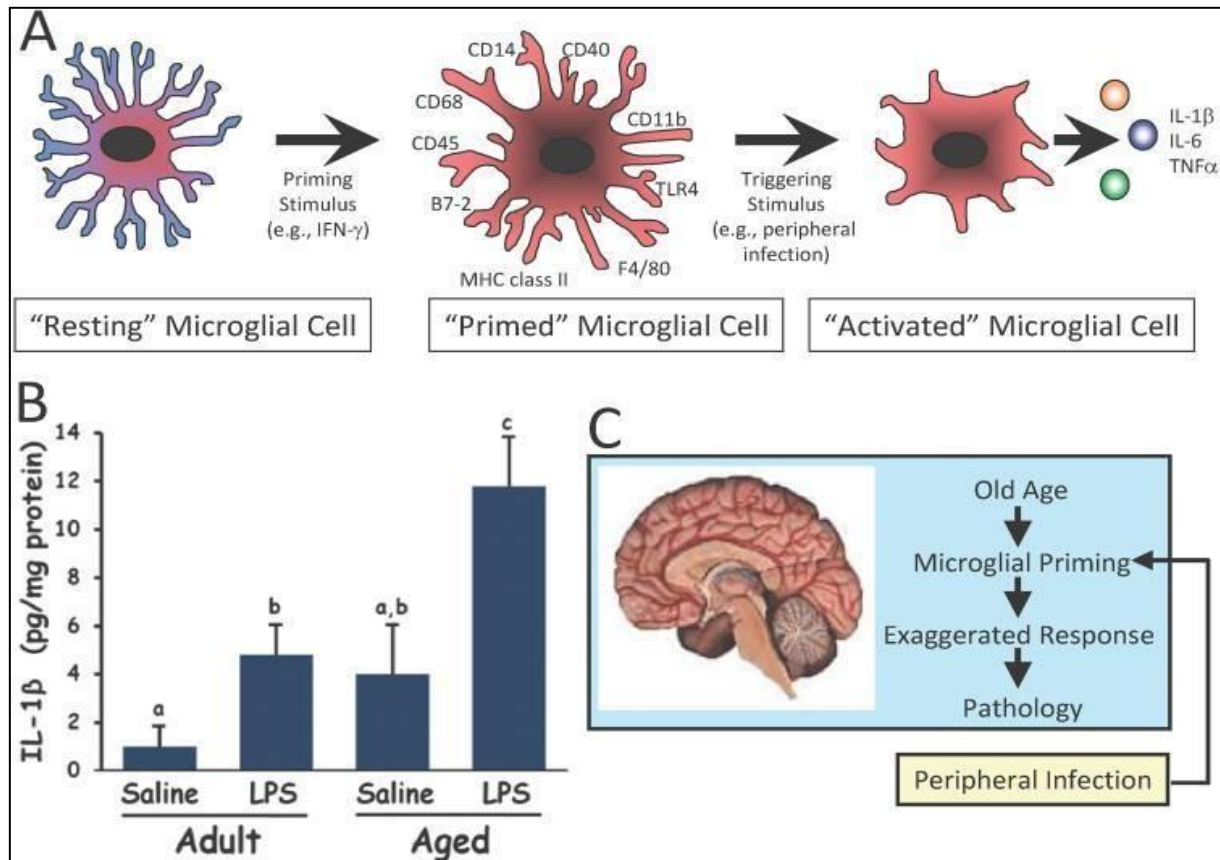


Figure. 17. Les cellules microgliales du cerveau âgé provoquent une réponse inflammatoire disproportionnée suite à leur activation par le système périphérique (Dilger and Johnson, 2008). Analogiquement au processus d'activation des macrophages, les cellules microgliales du cerveau âgé pourraient être aussi pré-activées « primed » comme elles sont caractérisées par des altérations phénotypiques telles que l'augmentation de l'expression des marqueurs cellulaires surfaciques. Après avoir reçu un stimulus déclencheur, les cellules microgliales pré-activées libèrent des concentrations excessives de cytokines inflammatoires dans le SNC. (B) Les données montrent une production exagérée des cytokines dans le cerveau âgé par rapport à celui de l'adulte, chez le modèle souris. En cas de stimulation de système immunitaire périphérique par des lipopolysaccharides (LPS), la production de l'IL-1 β est beaucoup plus élevée dans le cerveau murin âgé comparé à celui de l'adulte. (C) À la fois la pré-activation et les stimuli déclencheurs seraient nécessaires pour induire une réponse inappropriée des cellules microgliales du cerveau âgé. Le syndrome du comportement de la maladie « sickness behavior », un comportement adaptatif, est initié par les cytokines libérées par les cellules microgliales activées. Cependant, chez les animaux âgés, la libération excessive des cytokines par l'activation des cellules microgliales pré-activées provoque un syndrome mal-adaptatif du « sickness behavior ».

Ainsi, de nombreuses maladies psychiatriques telles que la dépression et les troubles de l'anxiété peuvent s'accompagner d'une dérégulation de la fonction immunitaire même en absence d'un défi immunitaire tel que l'infection. Les molécules inflammatoires telles que les cytokines peuvent interagir avec de nombreux mécanismes du cerveau dont en dépendent le

comportement et les fonctions cognitives (figures 21 et 13). Cette interaction peut conduire dans certains cas à des changements drastiques par exemple au niveau du taux de l'un des neurotransmetteurs y compris la sérotonine, la noradrénaline, l'acétylcholine, glutamate, l'acide γ -aminobutyrique (GABA) et la dopamine.

En plus de l'hypersensibilité de l'axe HPA (comme indiqué précédemment) et/ou le dérèglement de la neurotransmission, l'hyperactivation de l'amygdale (impliqué dans la perception des émotions notamment la peur et l'anxiété) a été aussi considérée comme un facteur étiologique plausible pour l'apparition des maladies neuropsychiatriques (Nakagawa and Chiba, 2014, 2015), en particulier pour la genèse de la dépression majeure, le trouble bipolaire et la schizophrénie, comme il est parfaitement illustré dans la figure 18. Là aussi, les cellules microgliales M1 jouent un rôle clef dans la physiopathologie de ces maladies. En effet, il a été suggéré que le dysfonctionnement de l'amygdale (qui traite les stimuli aversifs) induirait une polarisation M1. Si l'activité pro-inflammatoire des M1 n'est pas contrebalancer par l'action anti-inflammatoire des M2, la neurotoxicité qui en résulte engendrerait un dysfonctionnement du cortex préfrontal (le siège de décision, et de la régulation émotionnelle), ce qui favoriserait un débordement émotionnel et in fine la genèse de ces maladies mentales.

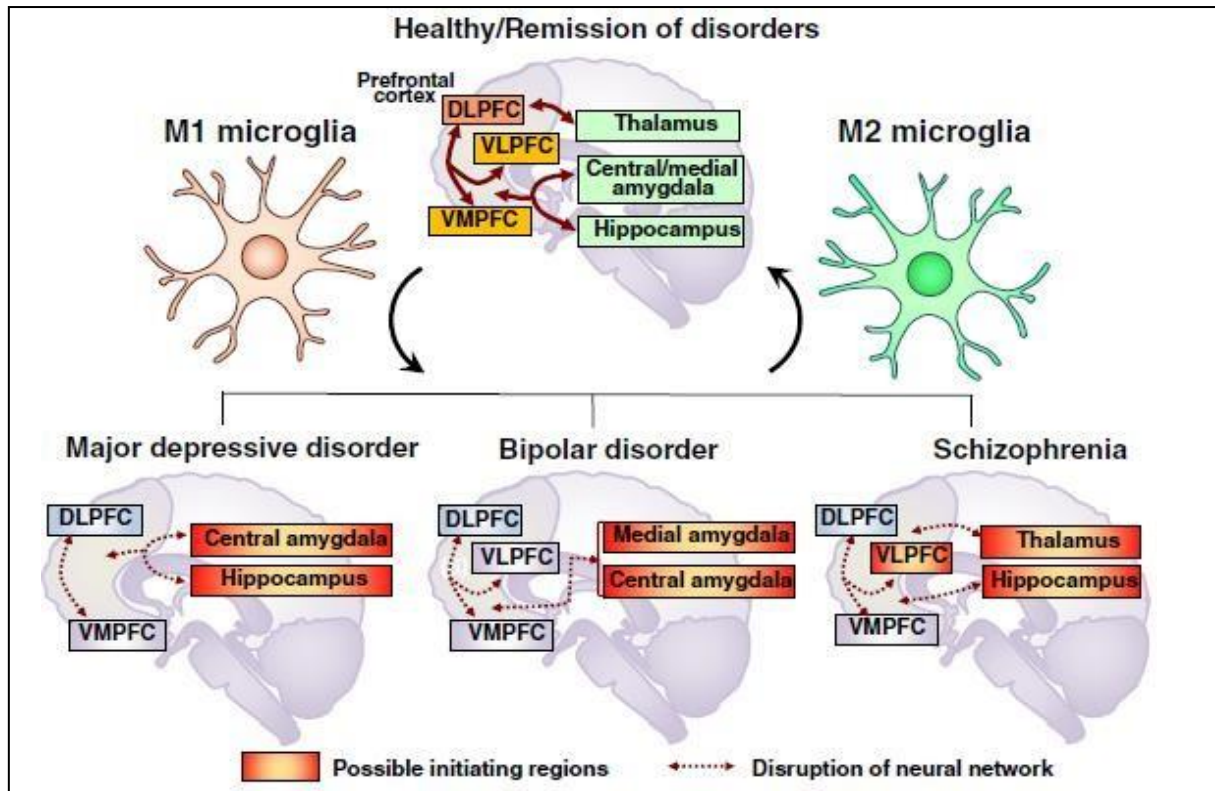


Figure 18. Le modèle hypothétique des anomalies des réseaux neuronaux dans le trouble dépressif majeur, le trouble bipolaire, et la schizophrénie (Nakagawa and Chiba, 2015).

Le cortex préfrontal dorsolatéral (DLPFC, dans la figure) chez les individus sains maintient une planification et une action appropriées en situation sociale en fonction de l'information ascendante. Ce cortex régule le fonctionnement de l'amygdale, qui est le siège des émotions notamment l'anxiété et la peur, pour assurer des comportements socialement acceptables. Dans l'état dépressif, l'hyperactivation neuronale au niveau de l'amygdale centrale (qui traite les stimuli aversifs) et l'hippocampe (siège de la mémoire) pourrait induire l'activation des cellules microgliales en phénotypes M1 et M2. Si la polarisation en phénotype M2 n'est pas suffisante, les cellules microgliales M1 peuvent entraîner une perturbation du réseau neuronal, et ensuite un dysfonctionnement du cortex préfrontal dorsolatéral. La dérégulation de ce cortex contribue à des anomalies de l'émotion / l'humeur, de la réponse au stress et de l'agressivité. Les cellules microgliales M2 restaurent l'homeostasie au niveau du réseau neuronal y compris le rétablissement de la fonction de la régulation du cortex préfrontal dorsolatéral. Il est fort probable que le dysfonctionnement de l'amygdale (centrale et médiane) se produit dans le trouble bipolaire en induisant des fortes aberrations au niveau du cortex préfrontal dorsolatéral et ventrolatéral par rapport à celles trouvées dans le trouble dépressif majeur. Les dommages sévères au niveau du cortex préfrontal sont vraisemblablement associés au comportement social "hors du contrôle" dans l'état de la manie. D'autre part, dans la schizophrénie, la neuroinflammation dans le cortex préfrontal ventrolatéral, le thalamus et l'hippocampe induirait une perturbation du réseau neuronal, suivi par celle du cortex préfrontal dorsolatéral et ventrolatéral comme mentionné pour la dépression majeure et également le trouble bipolaire.

Chez les patients dépressifs majeurs, l'hyperactivation des circuits neuronaux de l'humeur y compris l'amygdale active les cellules microgliales vers le phénotype M1.

Cependant, les M2 pourraient jouer un rôle fondamentale dans la résolution de la dépression, en rétablissant l'homéostasie des fibres nerveuses ainsi que la biosynthèse du 5-HT (la serotonine) (Nakagawa and Chiba, 2014, 2015), ce qui permettrait ainsi la réparation du dysfonctionnement du cortex préfrontal et du noyau accumbens (figure 19). Le lien entre l'inflammation et la pathologie de la dépression sera discuté d'une façon élaborée dans la section discussion de notre article n° 1 présenté dans ce mémoire dans la partie Résultats et Discussion.

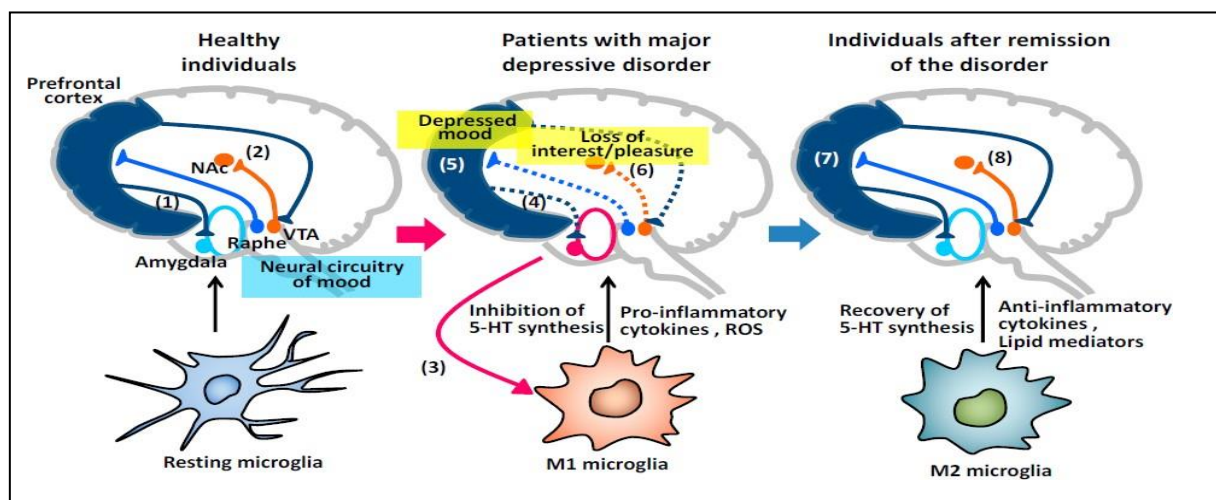


Figure 19. Les rôles possibles de la polarisation M1/M2 dans les fonctions du réseau neuronal, dans les activités des neurones à monoamine, et dans les symptômes du trouble dépressif majeur (Nakagawa and Chiba, 2014).

Chez les individus sains, le cortex préfrontal régule les circuits neuronaux de l'humeur, y compris l'amygdale et les neurones dopaminergiques projetant de la zone tegmentale ventrale (VTA) au noyau accumbens (Nac) (1, 2). Chez les patients présentant un trouble dépressif majeur, l'hyperactivation des circuits neuronaux induit une polarisation des cellules microgliales en M1 (3) entraînant un dysfonctionnement des fibres nerveuses entre le cortex préfrontal et les circuits neuronaux (4), et l'hypoactivation des neurones 5-HT projetant du noyau du raphé au cortex préfrontal (5). Le dysfonctionnement du cortex préfrontal peut réduire l'activité de neurones dopaminergiques projetant de la zone tegmentale ventrale (VTA) au noyau accumbens (Nac) (6). L'hypoactivation du cortex préfrontal et du noyau accumbens sont associés à une humeur dépressive et à une diminution marquée d'intérêt ou du plaisir. Une polarisation des cellules microgliales en M2 rétablit l'homéostasie des fibres nerveuses ainsi que la biosynthèse du 5-HT (la serotonine), en réparant ainsi le dysfonctionnement du cortex préfrontal et du noyau accumbens (7, 8).

La dépression et les troubles cognitifs apparaissent souvent ensemble, suggérant une relation temporelle car on n'ignore si la dépression précède les troubles cognitifs ou vice-

versa. Les troubles cognitifs et les symptômes dépressifs sont significativement corrélés, cependant, les troubles attentionnels et les troubles du rappel précèdent le développement des symptômes dépressifs. De même, comme pour la dépression, il a été suggéré que l'inflammation jouerait un rôle déterminant dans les fonctions cognitives. En effet, un niveau basal des cytokines inflammatoires serait requis pour un meilleur apprentissage, et d'une façon générale pour une cognition appropriée. Si la réactivité des cellules microgliales est trop élevée, à l'inverse, un dysfonctionnement des fonctions cognitives est plutôt suggéré. La figure 20 illustre parfaitement la conséquence de l'activation de deux types de cellules microgliales (cellules quiescentes ou en repos *vs.* cellules pré-activées) sur la mémoire, chez le modèle rongeur. Le lien entre l'inflammation et les fonctions cognitives sera discuté dans ce mémoire dans la partie Résultats et Discussion d'une façon plus détaillée (voir la section discussion de notre article n° 3).

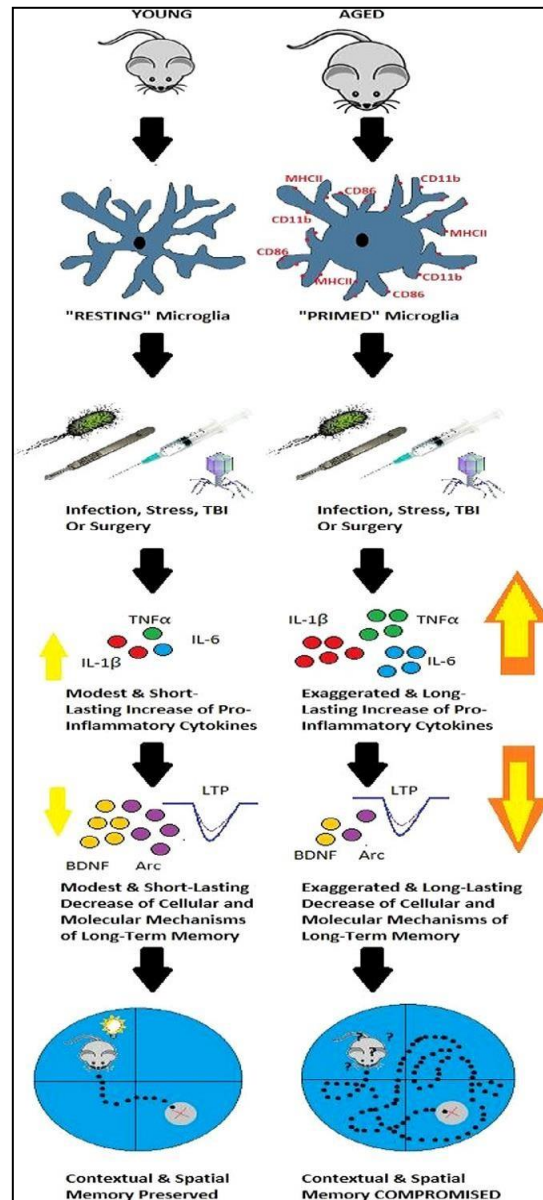


Figure 20. Comparaison de la réactivité des cellules microgliales chez des jeunes rongeurs (cellules microgliales en repos) vs. rongeurs âgés (cellules microgliales pré-activées) face à différents défis (infection bactérienne, virale...) (Barrientos et al., 2015). Une production des cytokines pro-inflammatoires a été âge-dépendante avec une production exagérée ainsi que durable chez les rongeurs âgés en réponse aux défis. De même, une réduction âge-dépendante de la PLT ainsi des médiateurs moléculaires de la mémoire à long- terme tels que le BDNF et l'ARC. Ainsi, la mémoire contextuelle et la mémoire spatiale de long-terme ont été profondément affectées chez les rongeurs âgés.

Matériels & Méthodes

I. Animaux

Les animaux utilisés au cours de ce travail sont des souris Swiss Albinos (CD1) âgées de 9 semaines à la réception et ayant un poids moyen d'environ 30g. Ces souris proviennent du centre d'élevage agréé Charles River situé en France. Dès leur réception, les souris sont placées dans des cages d'habitation pour une période d'acclimatation d'une semaine. Pendant la période d'expérimentation, les souris ont un accès libre à la nourriture comprenant des aliments standards pour rongeurs de laboratoire (granulés M25, SDS Dietex, St-Gratien, France), et à l'eau potable. Elles sont gardées dans l'animalerie à une température constante ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), à une humidité relative de $55 \pm 10\%$, et sont exposées à un cycle de lumière/obscurité inversé de 12h/12h. Le jour de la parturition ou la mise bas a été considéré comme le jour postnatal 1 (JPN1). Toutes les portées (13-18 jeunes par portée) ont été égalisées d'une façon randomisée pour avoir 10 nouveaux-nés / portée à raison de 5 nouveaux-nés/ sexe, afin d'éviter les biais de taille de la portée. En ce qui concerne les souriceaux restants (à JPN1), un seul nouveau-né/portée a été sélectionné d'une façon randomisée et mis à mort comme décrit ci-dessous dans la section des analyses biochimiques. Au sevrage (c'est-à-dire au JPN21), des souris mâles et femelles ont été séparées de leur mère et logées dans deux salles différentes ($n = 5$ / cage: $21 \times 37 \times 15$ cm) pour exclure les effets des phéromones sexuelles sur le comportement à l'âge adulte. Des efforts ont été faits pour avoir un nombre important de femelles dans la même pièce (> 150 femelles) afin de prolonger, synchroniser voire supprimer leur cycle oestral (Marsden et Bronson, 1965; Whitten, 1959). Il est à noter qu'à partir de l'âge de 8 mois, les souris Swiss sont marquées par un cycle œstral irrégulier en raison du prolongement de la phase de diestrus (Kaur, 1994).

Toutes les procédures expérimentales réalisées sur les animaux sont en conformité avec les directives de l'Union Européenne (2010/63/EU) et dans le respect de l'éthique animale.

I.1. Mise en reproduction des souris

Après deux semaines d'habituation aux locaux, les femelles ont été mises en reproduction avec les mâles (2;1) pendant 4 jours. Le lendemain, elles ont été examinées et les souris fécondées ont été déterminées par la mise en place du bouchon vaginal qui annonce le début de la gestation (le jour où un bouchon copulatoire est observé et considéré le jour gestationnel (JG) 1). Après la fécondation, 40 femelles ont été placées individuellement dans des cages. Par la suite elles ont été réparties en 4 groupes d'exposition. Une semaine avant la mise-bas, du papier absorbant est fourni en tant que source de matériaux de nidification. Au jour de la mise bas (JPN1), selon les recommandations de l'Organisation de Coopération et de Développement Économiques (OCDE, 2007), le sexe et le poids de chaque individu de la progéniture ont été déterminés et le nombre des nouveau-nés de souris a été réduit à un effectif de $n = 10$, soit 5 mâles et 5 femelles par litière, quand c'est possible. L'unification du nombre d'animaux par portée est une stratégie contre tout biais expérimental qui pourrait être engendré en lien de la taille de la portée avec le développement comportemental de la progéniture (par rapport à l'accès au lait maternel). Le reste de la portée a été euthanasié pour prélever les cerveaux néonataux et isoler les cellules microgliales. A partir de la mise-bas (JPN1), les femelles ont été quotidiennement observées, et un suivi pondéral de la progéniture a été réalisé. Au sevrage (JPN21), les souris juvéniles de chaque litière ont été mises ensemble par sexe ($n=5$ souris) par cage. Les mâles et les femelles ont été séparés dans deux salles différentes pour exclure l'effet des phéromones sexuelles sur le comportement. Des tests comportementaux et cognitifs ont été conduits conformément aux recommandations de l'OCDE (2007). Ainsi, une souris/sexe a été sélectionnée au hasard, de chaque litière, ce qui fait que le nombre d'animaux étudiés dans chaque test était 10 animaux/ sexe/groupe.

II. Exposition aux extraits d'anguilles

II.1. Les anguilles

Afin de nous rapprocher le plus près de la réalité des expositions humaines aux contaminants chimiques alimentaires, il nous paraît très important de travailler avec des aliments contaminés naturellement. C'est pour cette raison que nous avons choisi de travailler sur l'anguille "*Anguilla anguilla* L.". C'est l'une des espèces connues par sa forte contamination par les polluants organiques persistants incluant les PCB, les pesticides organochlorés, et aussi les métaux lourds. Ce poisson est fortement consommé par plusieurs populations dans de nombreux pays européens, asiatiques et nord-américains (Tsukamoto et Kuroki., 2014). Cet excellent bioindicateur de la pollution environnementale représente un vecteur (ou une matrice alimentaire) de transfert des contaminants chimiques alimentaires présentant ainsi un vrai risque sanitaire pour l'Homme et l'animal. En effet, les polluants détectés dans le muscle des anguilles sont aussi identifiés dans les liquides biologiques et les matrices tissulaires humains et animaux y compris le lait maternel, le sang, le cerveau, les cheveux (Harrad et al., 1999; Orloff et al., 2003 ; Maes et al., 2007; Ennaceur et al, 2008, EFSA, 2010; Ferrante et al., 2010; Tapie et al., 2011; Bjemo et al., 2013; Abdallah et al. 2014; Blanchet Letrouve et al., 2014; Quinete et al., 2014; Malarvannan et al., 2014; Szlinder-Richert et al., 2014 ; Wohlfahrt-Veje et al., 2014).

Dans cette étude, l'anguille européenne, *Anguilla anguilla* a été utilisée pour concevoir les différents groupes d'exposition. 5 anguilles de la rivière ont été électrocutées et capturées à l'aide d'un filet dans la Meuse (Belgique) pendant le printemps (2011) (autorisation de pêche N° DNF/DCP/CD705.1 / Sortie 2007: 31416 obtenue auprès du Ministère de la Région wallonne en Belgique). En plus, 10 anguilles d'élevage ont été achetées auprès de la zone aquicole (Helmond, Pays-Bas). L'examen autopsique réalisé par les biologistes de l'Université de Liège (ULg) a permis d'identifier les deux types d'anguilles de la rivière et d'élevage qui

ont été reconnues comme étant l'espèce d'anguille européenne *Anguilla anguilla* L. Ensuite, les parties musculaires des anguilles ont été prélevées, séparées en deux lots différents, selon leur provenance, lyophilisées et conservées à -20°C jusqu'à utilisation dans la conception des groupes d'exposition. Un échantillon de chaque lot d'anguille d'élevage et de la rivière a été utilisé pour déterminer les niveaux des polluants incluant les polychlorobiphényles (PCB), les polychlorodibenzo-p-dioxine/dibenzofuranes (PCDD/F), les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), les polybromodiphényléthers (BDE), les pesticides organochlorés et les métaux lourds tels que le mercure et le plomb. Ces analyses chimiques ont été conduites dans le centre de recherche analytique et technologique (CART, Belgique) en utilisant une chromatographie en phase gazeuse (GC) couplée à une spectrométrie de masse à haute résolution (HRMS) et une technique de dilution isotopique et un marquage au ^{13}C pour la quantification des congénères des PCB, des PCDD/F, des HAP et des BDE. Les pesticides organochlorés ont été quantifiés en utilisant une GC couplée à un détecteur de capture d'électron (ECD) (Focant et al., 2001; Veyrand et al., 2007). Les résultats de ces analyses nous ont permis de considérer les anguilles de la rivière et les anguilles d'élevage comme étant respectivement deux matrices d'anguilles hautement et faiblement polluées. Une troisième matrice artificielle a été conçue en mélangeant l'anguille de la rivière hautement polluée et l'anguille d'élevage faiblement polluée à des proportions 2:1. Cette dernière matrice d'anguille artificielle a été utilisée dans le but d'évaluer un niveau de pollution intermédiaire. Cette approche de mixture permet d'obtenir des matrices alimentaires contaminées naturellement à des doses différentes sans addition de contaminants chimiques pour l'ajustement des doses. L'objectif étant de travailler dans les conditions les plus proches de la réalité.

II.2. Préparation de la diète maternelle et conception des groupes d'exposition

Les différents régimes auxquels les souris femelles gestantes et allaitantes ont été exposées, ont été conçues sous forme de pâtes. Ces pâtes contiennent essentiellement la poudre de la croquette standard enrichie ou non avec les différentes matrices poissons à savoir, l'anguille de la rivière, l'anguille d'élevage et le mélange artificiel de ses deux types d'anguilles. Il est à noter que chaque souris maman pesant 40 g doit ingérer 32 mg d'anguilles qui correspondait à 0,8 g/matière sèche d'anguilles/kg de poids corporel (pc). Pour ce faire, la diète contaminée a été préparée quotidiennement pour chaque groupe de souris mamans (n=10) en mélangeant, rigoureusement, 10 g de la poudre de pastilles alimentaires (M25, SDS Dietex, St Gratien, France), 10 ml d'eau, 0,5 ml de sirop sucré et 1 ml d'huile de maïs et 320 mg d'anguilles lyophilisées à l'aide d'un mixeur domestique (Robot monofonction Seb Valentin 8553, France) pour obtenir une pâte homogène. Ensuite, cette pâte a été découpée en petits morceaux en fonction du poids des femelles gestantes et allaitantes (40-70g) afin d'être administrée à 0,8 g de matière sèche de muscles d'anguilles / kg-pc/jour chez les souris. On distingue donc 4 groupes :

- 1- Un groupe contrôle de souris gestantes et allaitantes (n = 10), ayant ingéré des boulettes contenant avec les mêmes ingrédients cités ci-dessus mais sans ajout d'anguilles, vu l'impossibilité de se procurer d'une anguille propre non polluée.
- 2-Un groupe de souris gestantes et allaitantes, ayant ingéré des boulettes contenant l'anguille d'élevage et donc faiblement polluée.
- 3- Un groupe de souris gestantes et allaitantes, ayant ingéré des boulettes contenant le mélange artificielle d'anguilles et donc une matrice qui reflète un niveau de pollution intermédiaire ou moyennement polluée.
- 4- Un groupe de souris gestantes et allaitantes, ayant ingéré des boulettes contenant l'anguille de rivière hautement polluée.

Dans cette étude, quatre groupes expérimentaux de souris gestantes et allaitantes (n=10/groupe) ont été constitués d'une façon randomisée. Les souris gestantes et allaitantes ont ingéré, quotidiennement, la diète standards (M25, SDS Dietex, St Gratien, France), enrichi ou non avec d'extraits d'anguilles quotidiennement depuis le sixième jour de la gestation (JG) 6 jusqu'au sevrage (jour postnatal JPN 21). Chaque femelle gestante et allaitante a reçu la pâte appropriée tous les jours durant la période d'exposition. Ce mode d'administration à accès libre est très avantageux puisqu'il réduit le stress d'ingestion et de gavage chez les souris exposées et qui peut biaiser les marqueurs comportementaux, oxydatifs et inflammatoires à étudier. Même si les pâtes concues dans ce protocole expérimental présente un degré de palatabilité très appréciée par les souris, une surveillance quotidienne a été réalisée pour s'assurer de l'ingestion complète de la boulette. Aucun résidu n'a été trouvé dans les cages après environ 15 min de la mise de la pâte.

III. Etude comportementale

III.1 Evaluation du comportement maternel des souris gestantes et allaitantes exposées aux anguilles polluées

Afin de mettre en évidence les effets propres de l'exposition aux contaminants alimentaires, toutes les précautions sur d'éventuels effets propre aux liens de la mère et sa progéniture ont été prises en compte et maîtrisées.

III.1.1. Test de construction du nid ou « Nest building activity»

Ce test permet d'estimer la qualité des soins apportés aux jeunes. L'observation de la construction et de l'agencement du nid constituent de bons indicateurs de la disposition des mères à élever précautionneusement leur progéniture. Le nid constitué par la mère pour loger les jeunes est observé tous les 2 jours de la parturition jusqu'au 12ème jour de vie postnatale des jeunes. Le développement des jeunes étant dépendant des soins apportés par leurs mères durant les premiers jours de vie, toute perturbation du comportement maternel, sous l'influence

de l'exposition étudiée, peut avoir des conséquences sur leur maturation cérébrale, leur neurodéveloppement et leur croissance. Ce test permet d'identifier un éventuel défaut dans la qualité des soins apportés par les mères et de vérifier si le comportement maternel constitue aussi un facteur dans les troubles du neurodéveloppement susceptibles d'être observés.

Pour ce faire, une semaine avant la mise bas, une feuille de Sopalin (23 x 23 cm) a été déposée dans la mangeoire de la cage d'habitation laissant ainsi à disposition de la mère un matériau qu'elle va pouvoir utiliser en plus de la sciure pour confectionner son nid. Elle va ainsi pouvoir le déchiqueter et utiliser ces morceaux pour lui donner forme (figure 21). L'ajout de ce matériau va permettre d'évaluer la qualité de la construction au fil des jours.



Figure 21: Photo illustrant un nid construit et couvert

A chaque jour d'observation, une note a été attribuée en fonction de la qualité du nid construit et de l'utilisation du matériau. Pour ce faire, nous avons utilisé une échelle à trois points ou " Nest Quality Scores " pour qualifier le nid construit (Kalueff et al., 2006 avec modifications). Ainsi, les scores attribués sont :

- 0 : soit absence de nid ou un nid plat primitif. Dans ce cas, la femelle n'a pas utilisé le papier pour la construction de nid ou le matériel a été déchiqueté sans aucune trace ou forme claire identifié du nid.
- 1 : nid partiellement construit et découvert.
- 2 : nid construit et entièrement couvert.

III.1.2. Test du ramassage des jeunes ou “Retrieving test”

Ce test permet d'évaluer le comportement de rassemblement des jeunes au sein du nid par les génitrices souris. La rapidité avec laquelle les mères rapatrient un jeune sorti du nid constitue un bon indicateur de leur disposition à protéger leur progéniture. Le test a été réalisé au 3^{ème}, 5^{ème}, 7^{ème} et 9^{ème} jour de vie postnatale des jeunes. Sa durée a été limitée à 3 minutes. Au départ, un jeune a été extrait du nid et placé à l'extrémité opposée à 20 cm du nid dans la cage d'habitation. Les jeunes animaux doivent être saisis au niveau de la nuque en pinçant légèrement la peau du cou, de la même manière que leur mère fait pour les transporter. La manipulation des jeunes avec des gants laissant sur eux des traces olfactives pouvant influencer le comportement des mères, il est recommandé, avant de les toucher, de se frotter les doigts avec un peu de sciure de leur cage d'habitation. Le temps mis par les mères pour ramener au nid les jeunes isolés a été mesuré (Bouayed et al., 2009).

III.2. Evaluation du comportement des souris adultes et d'âge moyen de la génération F1

Les tests comportementaux ont eu lieu entre 10h et 13h. Les tests ont été effectués sur un mâle et une femelle prélevés de chaque portée (10 portées / groupe). Ainsi, 10 souris / sexe / groupe, c'est-à-dire un total de $n = 20$ / groupe ont été testées. Tous les tests comportementaux ont été filmés et enregistrés. Toutes les souris testées étaient naïves aux tests comportementaux, ont été sélectionnées d'une façon randomisée. En plus de la randomisation, nous avons effectué les tests en double aveugle.

III.2.1. Evaluation de l'activité

III.2.1.1. Test de l'open field

Le test de l'open field, a été conçu par Hall et Ballachey (1932). Il a été utilisé dans cette étude afin d'évaluer l'activité locomotrice et exploratoire des souris adultes et d'âge moyen testées dans un milieu nouveau aux jours postnataux 47, 90, 195 et 329. Toute perturbation (diminution ou augmentation significative) de l'activité locomotrice des animaux traités par

rapports aux témoins peut renseigner sur l'atteinte des structures cérébrales impliquées dans la régulation de l'activité locomotrices.

Le dispositif est constitué d'une plate-forme circulaire de 50 cm de diamètre divisée en 36 cases, répartie en 20 cases dans la zone périphérique du diapositif, 12, dans la zone médiane et 4 dans la zone centrale. 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 (l'intensité de la lumière rouge ne dépasse pas 60 lux) (figure 22).

Les souris testées ont été, individuellement, placées dans la zone périphérique du diapositif, le visage en face de la paroi de l'appareil et ont été autorisées d'explorer librement la surface de l'open field pendant 6 min. Après 1 min d'habituation, le nombre de cases totale (périphériques + médianes+ centrales) traversés par l'animal (activité horizontale) ainsi que le nombre de redressement (activité verticale) ont été enregistrés pendant 5 min (Bouayed et al., 2009, 2012; Elnar et al., 2012, Dridi et al., 2017).

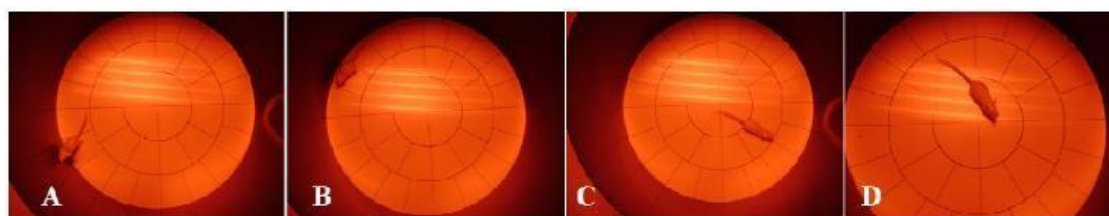


Figure 22. Le dispositif du test de l'open field montrant la souris qui explore le milieu verticalement (A), et horizontalement (B : zone périphérique ; C : zone médiane ; D : zone centrale).

III.2.1.2. Test de l'actimètre

Le test de l'actimètre a été utilisé pour évaluer l'activité motrice spontanée des souris d'âge moyen (JPN305) testées dans un environnement familier (c'est à dire dans leur cage d'habitation) en évitant les réponses de type néophobiques (Viggiano, 2008). L'activité motrice spontanée est l'ensemble des fonctions qui assurent le mouvement, incluant l'activité

locomotrice. L'instrument de mesure (Bioseb, Vitrolles, France) utilise les vibrations de la cage pour mesurer les déplacements de l'animal, y compris ses activités locomotrices horizontale et verticale « redressement » et inclue des fonctions exhaustives pour quantifier son activité sur une période de temps prédéfinie. Le dispositif est constitué d'un plateau métallique (L : 33 cm × l : 17 cm) relié par un câble USB à un ordinateur (Figure 1). Deux détecteurs à infrarouges (L : 33 cm × h : 8 cm) complètent le dispositif en étant placés de part et d'autre du plateau dans le sens de la longueur, chacun y étant relié par un câble adapté (Figure 2). Le logiciel BIO-ACTIV, dont l'interface qui permet de l'utiliser est installée sur l'ordinateur, est activé par le branchement de la clé USB contenant la licence du test (Figure 23).

Le logiciel renvoie automatiquement certains paramètres d'identification (date et heure, nom du projet, de l'expérience, de l'expérimentateur, du groupe, de l'animal testé, durée de l'observation, ...) et des variables propres à l'activité mesurée à savoir :

- Le temps total d'activité et d'inactivité,
- Le temps et pourcentage d'activité immobile, d'activité lente et d'activité rapide,
- La distance parcourue (cm),
- La vitesse moyenne (cm/s),
- Le temps global de mouvement (temps d'activité lente + temps d'activité rapide),
- Le nombre de redressements,
- Le temps total passé à se redresser.



Figure 23 : Actimètre, interface du logiciel sur PC et détecteurs à infrarouges.

Pour ce faire, environ 24 heures avant le test, les animaux testés ont été placés individuellement dans des cages transparentes en plastique (12 × 35 × 14 cm), qui contenaient de la sciure propre, de l'eau et de la nourriture ad libitum afin de les familiariser à leurs cages.

Juste avant de commencer le test, chaque cage a été calibrée et les paramètres du système ont été réglés. La durée d'acquisition a été fixée à 15 min, durant lesquelles, la distance parcourue (cm), la vitesse moyenne (cm / s), le temps d'activité (s), les variables propres à l'activité décrites précédemment ont été enregistrés.

III.3. Evaluation du comportement de résignation ou « Dépressif-like »

III.3.1. Test de la suspension caudale

Ce test a été réalisé sur les souris adultes de la génération F1 aux jours postnataux allant du 95 à 100. Il a été réalisé selon la méthode décrite par Steru et al., (1985) et Bouayed et al., (2012). C'est un test de référence non invasif et non douloureux qui permet l'évaluation rapide des effets psychotropes des substances médicamenteuses, notamment les effets antidépresseurs et sédatifs sur des rongeurs (Steru et al., 1985). En effet, la souris est suspendue par la queue, tête vers le bas, pour une durée de 6 minutes. L'inconfort de la position provoquera chez l'animal de nombreuses tentatives d'échappement à cette situation (tentatives de redressements), générant un certain nombre de mouvements. N'ayant pas trouvé de possibilité de s'échapper, la souris adoptera alors une position immobile et donc un comportement de résignation.

Pour ce faire, Les animaux testés ont été individuellement suspendus par la queue, de telle sorte que la base de la queue soit perpendiculaire à la barre, à l'aide d'un ruban adhésif situé à un 1 cm de la pointe de la queue de la souris (Figure 24). Les souris ainsi suspendues essaient, de manière innée, d'échapper à cette position inconfortable, en se redressant pour saisir la barre. A force d'échouer dans leurs tentatives de redressement, elles génèrent un état de désespoir qui se traduit par de l'immobilité et une résignation. Un tel comportement d'une souris peut être décrit comme « dépressif-like », sans que l'on puisse jamais dire que la souris est déprimée (Boissy et al., 2009). Cependant, la magnitude de cette immobilité est considérée comme corrélée à un comportement « dépressif-like ». La durée du test est de 6 min.

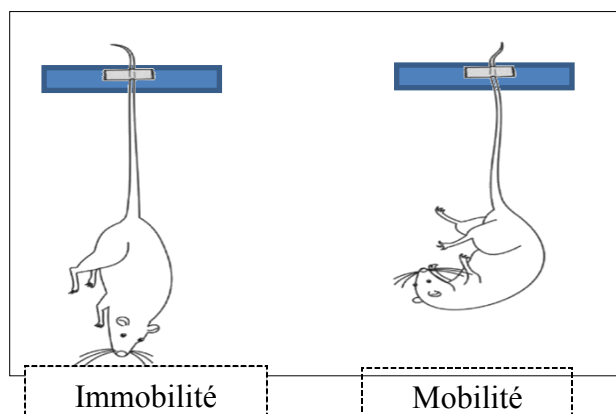


Figure 24: Test de la suspension caudale

Le temps cumulé d'immobilité ou de résignation des animaux testés n'est mesuré que lors des 4 dernières minutes du test (Steru et al., 1985).

III.3.1. Test de la nage forcée

Au jours postnataux 95 à 100, nous avons réalisés le test de la nage forcée selon la méthode décrite par Porsolt et al., (1977). Comme le test de la suspension caudale, le test de la nage forcée est très recommandé dans la recherche préclinique de molécules ou des substances médicamenteuses à effet antidépresseur.

Pour ce faire, la souris a été placée dans une cuve cylindrique étroite remplie au 2/3 d'eau (environ 15 cm ; à 25 ± 1 °C), sans possibilité d'échapper à cette situation anxiogène et non confortable. Dans un premier temps, l'animal va chercher une issue et initiera de nombreux mouvements de nage ou de tentatives d'escalade des parois (figure 25). N'ayant pas trouvé de possibilité de s'échapper, il adoptera alors une position immobile et donc un comportement de résignation. Il est admis que l'immobilité reflète chez l'animal un échec de la persistance de la volonté d'échapper à la situation (désespoir comportemental). La souris n'a été considérée immobile que lorsqu'elle flottait et ne réalisait que des mouvements de faible amplitude lui permettant de maintenir sa tête hors de l'eau. Le temps d'immobilité cumulé des souris testées a été enregistré durant les 5 dernières minutes du test qui est corrélé avec le comportement «

dépressive-like » (Porsolt et al., 1977). Plus le temps d'immobilité est important plus l'animal est résigné et plus il est « dépressif-like ».

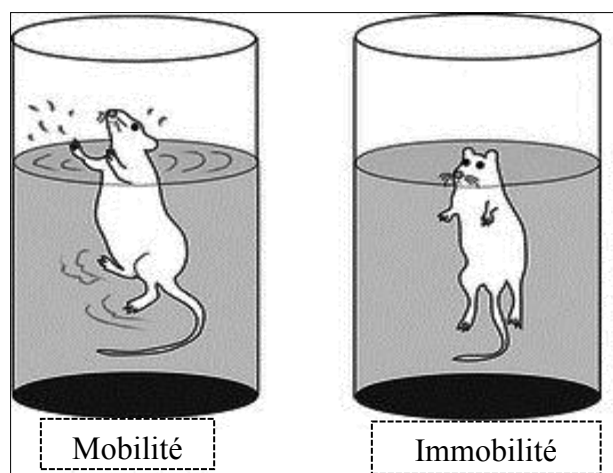


Figure 25: Le dispositif du test de la nage forcée

III.4. Evaluation des fonctions cognitives (l'apprentissage et la mémoire) chez les souris d'âge moyen de la génération F1

III.4.1. Test du labyrinthe en « Y »

Le test du labyrinthe en « Y » permet d'évaluer la mémoire de travail immédiate, qui correspond à la capacité de retenir une information, à court terme et l'utiliser. Il est basé sur la tendance naturelle des rongeurs à explorer d'une façon spontanée et alternée les différents bras du labyrinthe (Hughes, 2004). Le test du labyrinthe en « Y » a été réalisé au JPN 325 sur des souris d'âge moyen.

Le labyrinthe est formé de trois bras noirs, identiques ($25 \times 14 \times 5$ cm), notés A, B et C, séparés l'un de l'autre par un angle de 120° et convergeant vers un point central (figure 14). Le labyrinthe a été très faiblement éclairé (10 lux) (Figure 26).

Pour ce faire, les souris testées ont été, individuellement placées à l'extrémité du bras « A », la tête dirigée vers la paroi et elles ont été autorisées d'explorer, librement, le labyrinthe pendant 5 min. L'ordre de succession des bras parcourus par les souris a été relevé (Youssef et al., 2008). Cet ordre correspond à une alternance qui est définie comme étant la visite

successive des trois bras effectuée de trois bras différents constituant un triplé par exemple, ABC, ACB, BCA.... Le nombre d'alternance correspond au nombre total de bras visités moins 2. Le % d'alternance spontanée des souris SWISS non traitées est de l'ordre de 75% (Belzung et al., 1999).

Le pourcentage d'alternance spontanée était calculé selon la formule ci-dessous:

% d'alternance spontanée = (Nombre d'alternance / Nombre de triplets totaux) × 100 (Dridi et al., 2014; Grova et al., 2007)

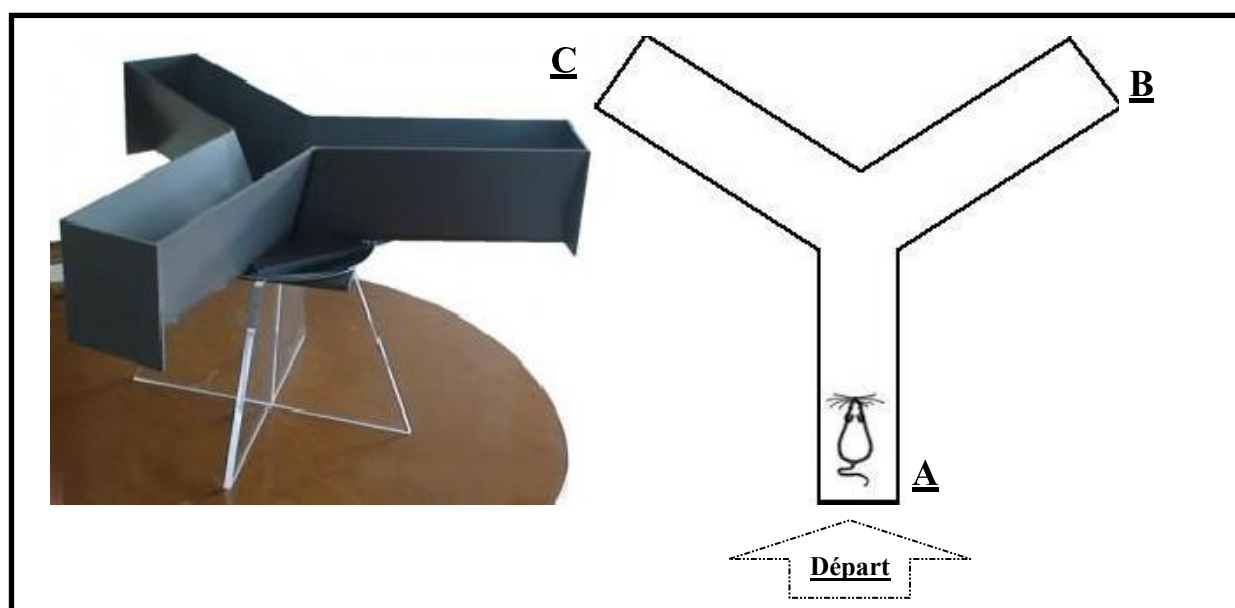


Figure 26: Dispositif du labyrinthe en Y

III.4.2. Test de la piscine de Morris (JPN 300-310)

Le labyrinthe de Morris a été réalisé sur les souris d'âge moyen au JPN 300 et au JPN 310 pour évaluer l'apprentissage et la mémoire spatiale de rétention (Morris, 1984, Vorhees et Williams, 2006). Ce test a initialement été développé par Morris (1984, 1981) comme un open-field aquatique. Il est basé sur la motivation de l'animal à échapper l'eau et sur sa stratégie de navigation pour retrouver une plate-forme de refuge cachée. Pour l'aider à se repérer dans la piscine, des indices proximaux sont placés sur la paroi intérieure. La configuration de la pièce de test et les objets qui s'y trouvent constituent des indices distaux qui lui permettent également

de s'orienter. En effet, l'animal va développer l'aptitude de mémoriser les signaux distaux et apprendre à identifier l'emplacement de la palteforme à chaque fois mis dans le dispositif. Ce qui implique un apprentissage progressif et une aptitude de mémoriser et retenir l'information acquise à court terme et à long terme.

Le dispositif de Morris est une piscine circulaire ouverte ayant 100cm de diamètre et 45cm de profondeur. Cette piscine doit être remplie à moitié avec de l'eau à 25 ± 1 °C.

Le labyrinthe d'eau de Morris a été réalisé aux PND 300 et 310 pour évaluer l'apprentissage spatial et la rétention de la mémoire, respectivement (Morris, 1984, Vorhees et Williams, 2006). A cet effet, une piscine circulaire ouverte (100 cm de diamètre, 45 cm de profondeur) a été choisie, remplie d'environ la moitié de la hauteur avec de l'eau (25 ± 1 °C). Quatre formes géométriques différentes qui forment les indices proximaux sont placées dans la paroi supérieure et interne de la piscine marquant ainsi les 4 quadrants virtuels du dispositif. L'objectif de l'animal était de localiser une plate-forme (12 x 12 cm) cachée à 1 cm sous la surface de l'eau et placée dans une position fixe au milieu d'un quadrant de la piscine (située à 12 cm du mur). Cette plate-forme a été camouflée en plaçant du lait écrémé en poudre dans l'eau (figure 27). Vingt-quatre heures avant de commencer la première phase du test, les souris ont été habituées à la piscine en leur permettant d'effectuer une nage de 60 secondes sans la plate-forme. Le jour du test, les souris ont reçu huit essais consécutifs / jour (une seule phase d'apprentissage unique telle que décrite par Morris (1984) et De Quervain et al. (1998). Chaque essai a duré 60 secondes. Cependant, pour le premier et le deuxième essai, si la souris a dépassé 60 secondes sans trouver son échappatoire, elle a été doucement guidée vers la plate-forme par l'expérimentateur. Après chaque essai, la souris a été laissée sur la plate-forme pendant 30 secondes et a ensuite été placée dans une cage pendant 60 secondes jusqu'au début de l'essai suivant. Durant cette première phase, l'animal est censé d'apprendre progressivement à parcourir son chemin vers la plate-forme cachée et la localiser facilement en mettant moins du

temps d'un essai à un autre. En effet, au JPN 300, la première phase d'apprentissage a été effectuée en plaçant délicatement la souris dans l'eau, la tête face au mur de la piscine, dans le but de retrouver la plate-forme placée dans le quadrant opposé. Ainsi, le paramètre prélevé, pour chaque essai d'apprentissage est le temps mis par la souris pour atteindre pour la première fois la plate-forme submergée. Après cette phase d'acquisition, la deuxième phase de rétention a été réalisée 10 jours après (c'est-à-dire au JPN 310). Au cours de cette phase, la souris a passé un seul essai dont la durée est de 60 secondes. Les paramètres mesurés pour évaluer la mémoire de rétention à long-terme sont : le temps de la latence pour échapper à la plate-forme, le temps passé sur la plate-forme et le nombre de passage de la souris par la plateforme.

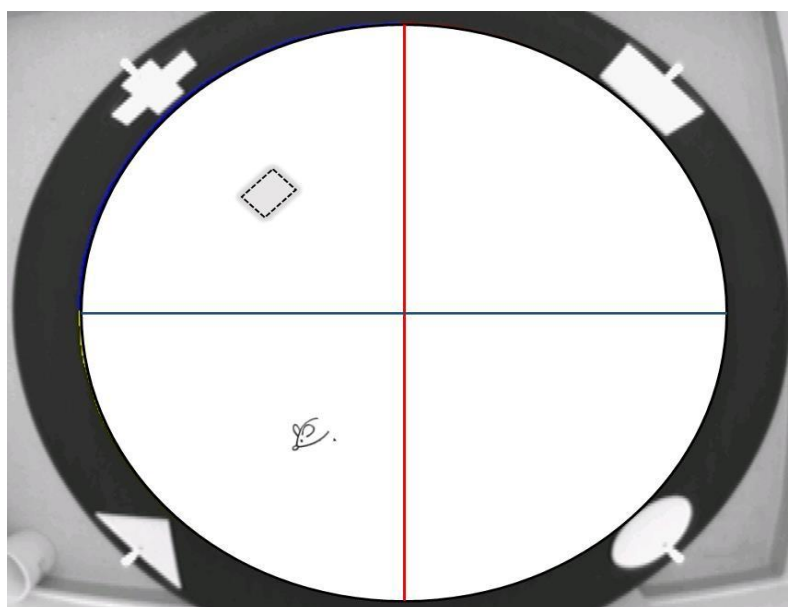


Figure 27: La représentation schématique du dispositif du test de la piscine de Morris

IV. Etudes cellulaires, moléculaires et fonctionnelles

Afin de caractériser la réponse inflammatoire, une série de prélèvement a été effectuée en fonction de l'âge et le tissu et/ou le liquide biologique. Pour ce faire, 5 souris par sexe par groupe ont été sélectionnées d'une façon randomisée à partir des 10 litières par groupe en raison d'une souris par litière. Cette sélection a été effectuée à plusieurs âges à savoir au JPN 1 (soit au jour de leur naissance) pour évaluer les effets de l'exposition gestationnelle aux extraits

d'anguilles, au JPN 21(souris juveniles, jour de sevrage) pour évaluer l'effets de l'exposition additionnelle gestationnelle et lactationnelle, au JPN 100 (souris adultes) pour évaluer les effets tardifs d'une exposition périnatale aux extraits d'anguilles et au JPN 330 (souris d'âge moyen) pour caractériser les effets de cette exposition à un âge avancé des souris de la génération F1. Les différents prélèvements réalisés sont : les tissus cérébraux, les cellules microgliales, l'hippocampe, le sang et le plasma.

IV.1. Prélèvements tissulaires et sanguins

Les souris ont été anesthésiées avec de l'isoflurane et mises à mort par décapitation. Ensuite, les cerveaux (JPN 1, 21, 100 et 330) ainsi que les hippocampes (JPN 330) ont été prélevés dans des conditions aseptiques. Les tissus cérébraux ont été broyés par la suite et homogénéisés à l'aide d'un téflon en verre dans du tampon Tris-HCl (10mM, pH 7,4, à 4°C). Après centrifugation à 12000 tours/minutes pendant 30min et à 4°C, le surnageant a été récupéré, et stocké à -80°C jusqu'à analyses biochimiques ultérieures.

Le sang a été prélevé, au plus tard dans les 20 premières secondes qui succèdent la décapitation. Ensuite, il a été centrifugé à 4000 tours/minutes pendant 10 min et le plasma a été collecté et stocké à -80°C afin d'être analysé ultérieurement.

IV.2. Isolement des cellules microgliales

Aux JPN 1, 21, 100 et 330, les cerveaux des souris mâles et femelles de la génération F1 ont été prélevés afin d'isoler les cellules microgliales en se basant sur le protocole d'isolement fourni par Milteny Biotec, France en incluant des modifications. Il est important de signaler que ce protocole a été adapté en fonction de la maturité et l'âge du prélèvement du cerveau vu les modifications structurales comme le degré de myélinisation, la taille et la masse du cerveau. Ce même protocole se résume essentiellement en une sélection positive des cellules microgliales exprimant le récepteur membranaire CD11b.

Pour ce faire, le cerveau une fois isolé a été placé dans le milieu de culture DMEM/F12 non complémenté. Ensuite, une digestion enzymatique a été réalisée toute la nuit (environ 14 à 16 heures d'incubation), sous agitation et à 4°C. Cette digestion est assurée grâce à un cocktail enzymatique contenant 10% de trypsine, 10% d'élastase, 2% de collagénase II, 4% de collagénase III et 10% de DNase. Ensuite, le lysat du cerveau a été lavé deux fois par un tampon MACS fourni par Milteny Biotec, centrifugé ($1000 \times g$, 4 °C, 20 min) et le surnagent a été éliminé. Délicatement, le culot cellulaire a été mis en suspension et remué dans du tampon MACS. Les cellules en suspension ont été filtrées à l'aide de filtres de pré-séparation 70 μm (Miltenyi Biotec; Bergisch Gladbach, Germany) pour éliminer les débris cellulaires et un pourcentage important de myéline. Après centrifugation ($1000 \times g$, 4 °C, 20 min), le culot cellulaire du filtrat obtenu a été remis en suspension dans du tampon MACS. C'est ainsi que les cellules vont être incubées à 4°C, à l'obscurité et pendant 15-20 min avec les microbilles magnétiques anti-CD11b ((kit, Miltenyi Biotec; Bergisch Gladbach, Germany) qui se fixent selectivement sur les cellules microgliales. Après une étape de centrifugation ($1000 \times g$, 4 °C, 10 min) et une autre de filtration en utilisant un filtre de pré-séparation de 30 μm (pre-separation filters, Partec, France), les cellules marquées vont passer dans des colonnes de séparation, des colonnes MiniMACS MS (Miltenyi Biotec; Bergisch Gladbach, Germany). Enfin, le complexe cellule microgliale-bille magnétique anti-CD11b a été retenu dans la colonne et son élution s'effectue en appliquant fermement le piston fourni avec la colonne. Une fois collecté, un aliquot de cellules microgliales sélectionnées et retenues dans les colonnes et un autre de celles qui ont été éluées en premier ont servi afin de déterminer le rendement d'isolement et de purification. En effet, ces deux aliquots ont été doublement marqués aux anticorps CD11b et CD45, passés en cytométrie en flux FC500 (CXP, Beckman Coulter, France). Le rendement moyen de purification et d'isolement a été estimé à 88% de cellules isolées. Le nombre de cellules microgliales obtenues a été déterminé par un comptage microscopique au bleu du

trypan et il a été normalisé à 1.6 million de cellules microgliales par cerveau et par âge. Ainsi, la viabilité des cellules microgliales isolées par cette méthode est en moyenne supérieure à 94%.

Finalement, suite à une étape d'homogénéisation, l'homogénat des cellules microgliales a été équitablement aliquoté afin de doser les différents marqueurs inflammatoires.

IV.4. Quantification des interleukines pro et anti-inflammatoires

Les taux de cytokines pro/anti-inflammatoires ont été évalués dans les homogénats tissulaires et cellulaires cérébraux en utilisant 7 kits ELISAs: IL1 β , IL4, IL10, IL6, TNF α , TGF β et IFN γ et se basant sur les instructions indiquées dans le protocole du fabricant (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). L'absorbance a été mesurée à 450 nm à l'aide d'un lecteur de microplaque MR96 A (Mindray, Chine) et les concentrations (en pg/ml) des cytokines mesurées ont été déterminées à l'aide d'une courbe standard fournie avec chaque kit.

IV.5. Dosage du monoxyde d'azote (NO)

La quantification de la production de NO a été déterminée en utilisant la méthode de dosage Griess décrite par Green et al, (1982) et Drisch et al, (1998). D'une façon succincte, le NO a été mesuré en ajoutant 100 μ l de réactif Griess fraîchement préparé (1% de sulfanilamide et 0,1% de naphthylènediamine dans 5% d'acide phosphorique) à 100 μ l d'homogénat des cellules microgliales ou du tissu cérébral. L'absorbance de la couleur résultante a été mesurée à 540 nm en utilisant un spectrophotomètre DU 720 (Beckman Coulter, États-Unis). Les concentrations du NO (μ M) ont été déterminées à l'aide d'une courbe standard de nitrite de sodium.

IV.6. Evaluation de l'expression des protéines activées de la voie NF- κ B

Les niveaux d'expression de la sous-unité P65 NF- κ B ont été déterminés dans la fraction nucléaire des hippocampes isolés au JPN330 à l'aide du Kit Elisa "NF- κ B p65 transcription factor assay kit (ab133112)" en suivant les instructeurs du fabricant (Abcam; Cambridge, UK).

IV.7. Evaluation de l'expression des protéines activées de la voie des MAP kinases

L'implication de la voie des MAP kinases au niveau de l'hippocampe des souris moyennement âgées (JPN 330) a été évaluée en déterminant le niveau d'expression des protéines p38 et ERK1/2 en utilisant deux kits ELISA "p38 MAPK alpha (ab176664) et ERK 1/2 (ab176660) " en suivant les instructions du fabricant (Abcam; Cambridge, UK).

IV.8. Dosage de l'acétylcholine (ACh) au niveau de l'hippocampe des souris d'âge moyen

Au JPN 330, le taux de l'ACh a été mesuré en utilisant un kit ELISA "Choline/ Acetylcholine Assay Kit (ab65345) " en suivant les instructions du fabricant (Abcam; Cambridge, UK).

IV.9. Dosage de la myéloperoxidase (MPO)

Les niveaux plasmatiques de cette protéine inflammatoire (MPO) ont été déterminés chez les souris mâles et femelles adultes et d'âge moyen de génération F1. Les concentrations de cette enzyme inflammatoire ont été déterminées à l'aide d'un kit ELISA (Catalog #ab155458; Abcam) en suivant les instructions du fabricant.

IV.10. Dosage des corticostéroïdes

Les concentrations des corticostéroïdes plasmatiques ont été déterminées dans le sang des souris adultes et d'âge moyen de la F1 (JPN100 et 330) à l'aide d'un kit ELISA et en suivant les instructions du fabricant (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA).

V. Analyses statistiques

Les marqueurs inflammatoires évalués au niveau du cerveau entier et des cellules microgliales ont été analysés en utilisant une ANOVA à trois facteurs, en considérant l'exposition périnatale aux anguilles, le sexe et l'âge les 3 facteurs principaux. Les niveaux plasmatiques de MPO, de corticostéroïdes et les marqueurs évalués au niveau de l'hippocampe ont été analysés en utilisant une ANOVA à deux facteurs avec l'exposition périnatale aux anguilles polluées et le sexe comme les facteurs principaux. Aussi, une ANOVA à deux facteurs a été utilisée pour analyser les paramètres comportementaux des tests de l'Openfield, de la

suspension caudale, de la nage forcée, du labyrinthe en Y et de la mémoire de rétention de la piscine de Morris. Concernant le comportement maternel et la phase d'acquisition de la piscine de Morris, une ANOVA avec des mesures répétées a été utilisée en considérant l'exposition aux anguilles, le sexe (uniquement pour la piscine de Morris) comme facteurs principaux, et les essais (pour la phase d'apprentissage à la piscine de Morris) ou le jour du test (pour le comportement maternel) comme mesures répétées. Pour analyser les marqueurs inflammatoires évalués au niveau du sang maternel, une ANOVA à un facteur a été utilisée après vérification de la distribution normale des données obtenues. Une fois les ANOVA démontrent un effet significatif, les comparaisons entre les différents groupes d'exposition aux anguilles ont été évalués en utilisant le test du Tukey's HSD. Pour toutes ces analyses statistiques, le niveau de significativité a été fixé à $p < 0,05$. Ces évaluations statistiques ont été obtenues à l'aide du logiciel SPSS 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL).

Résultats & Discussions

Dans ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à évaluer les effets « combinés » inflammatoires, comportementaux et cognitifs de l'exposition périnatale à trois matrices alimentaires (3 types d'anguilles) qui reflètent 3 niveaux de pollution (faible, moyenne et haute), dans un modèle murin tout en considérant le sexe des souris ainsi que leurs âges.

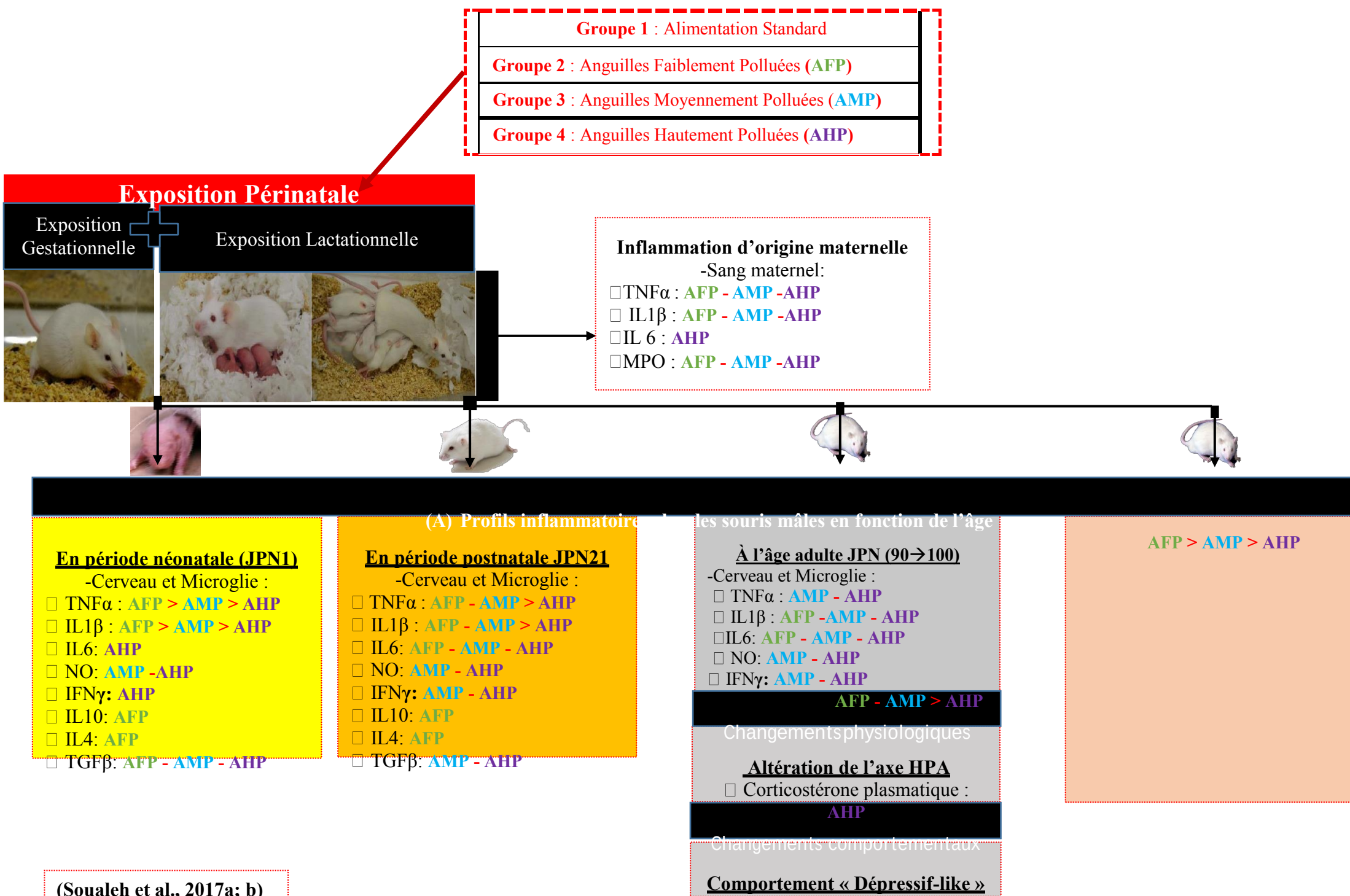
D'où les objectifs principaux de cette thèse qui sont :

- Prouver que l'exposition périnatale aux anguilles contaminées induirait l'inflammation à différents niveaux (cérébral, microglial et périphérique) et à des stades de vie distincts.
- Evaluer les changements comportementaux qui pourraient se manifester, notamment l'impact de l'exposition périnatale aux anguilles contaminées dans l'induction de la dépression à l'âge adulte et sa corrélation avec les effets inflammatoires induits d'une façon précoce et également chronique.
- Evaluer les changements cognitifs, notamment l'impact de l'exposition périnatale aux anguilles contaminées dans l'induction d'un déficit de la mémoire chez les souris d'âge moyen et sa corrélation avec les effets inflammatoires induits précoce et chronique.

L'ensemble des résultats obtenus a été regroupé dans un schéma récapitulatif (voir ci-après).

Tous ces résultats vont être analysés et discutés en détails dans les 3 articles présentés par la suite dans cette section.

Schéma récapitulatif des effets inflammatoires, comportementaux et cognitifs induits chez la progéniture mâle (A) et femelle (B) à des stades de vie distincts



À l'âge moyen
(JPN300→330)

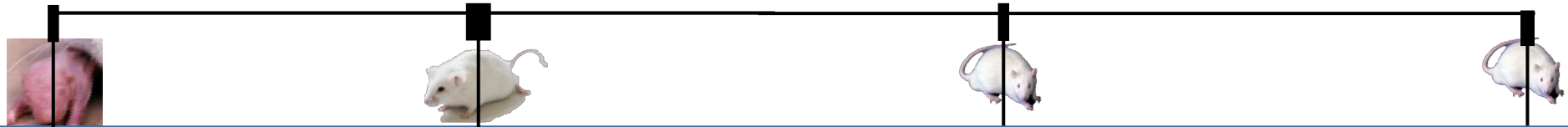
Cellules de la Microglie :

- ☐ TNF α : **AHP**
- ☐ IL1 β : **AFP -AMP - AHP**
- ☐ IL6: **AMP - AHP**
- ☐ NO: **AMP - AHP**
- ☐ IFN γ : **AMP - AHP**

-Hippocampe:

- ☐ TNF α : **AFP -AMP - AHP**
- ☐ IL1 β : **AFP -AMP - AHP**
- ☐ IL6 : **AFP -AMP - AHP**
- ☐ P38MAPK : **AMP - AHP**

Suite→



(B) Profils inflammatoires chez les souris femelles en fonction de l'âge

En période Néonatale (JPN1)

Cerveau et Microglie :

- TNF α : AFP > AMP > AHP
- IL1 β : AFP - AMP - AHP
- IL6: AHP
- NO: AFP > AMP > AHP
- IFN γ : AHP
- IL10: AFP
- IL4: AFP

En période Postnatale JPN21

- Cerveau et Microglie :

- TNF α : AMP > AHP
- IL1 β : AMP > AHP
- IL6: AMP - AHP
- NO: AMP - AHP
- IFN γ : AMP - AHP
- IL10: AFP
- IL4: AFP
- TGF β : AFP - AMP - AHP

À l'âge Adulte JPN 100

- Cerveau et Microglie :

- TNF α : AMP - AHP
- IL1 β : AMP - AHP
- IL6: AFP - AMP - AHP
- NO: AFP > AMP > AHP
- IFN γ : AMP - AHP
- Sang: □ MPO: AFP - AMP > AHP

À l'âge Moyen JPN 330

- Cerveau et Microglie :

- TNF α : AHP
- IL1 β : AFP - AMP - AHP
- IL6: AMP - AHP
- NO: AMP - AHP
- IFN γ : AMP - AHP
- Hippocampe:
- TNF α : AFP - AMP - AHP
- IL1 β : AFP - AMP - AHP
- IL6: AFP - AMP - AHP
- P38 MAPK: AMP - AHP
- ERK1/2: AMP - AHP
- NF κ B P65: AMP - AHP

Changements physiologiques

Hippocampe :

□ Acétylcholine : AFP - AMP - AHP

Hippocampe et cortex préfrontal :

□ Activité de AChE : AFP - AMP - AHP

Changements Comportementaux et cognitifs

Hyperactivité JPN 195

AFP - AMP - AHP

-Déficit de la mémoire à long terme JPN 310 :

AMP - AHP

-Hyperactivité JPN 305 et 329 :

AFP - AMP - AHP

Article 1:

“Perinatal programming of depressive-like behavior by inflammation in adult offspring mice whose mothers were fed polluted eels: Gender selective effects

Article 1: Soualeh et al., “Perinatal programming of depressive-like behavior by inflammation in adult offspring mice whose mothers were fed polluted eels: Gender selective effects” *Brain Behav Immun* 63 (2017) 137–147

IF: 5,96/ Q1

Dans ce travail, nous avons étudié l’effet tardif de l’exposition précoce aux anguilles polluées sur le comportement de la résignation, à l’âge adulte, en utilisant le test de la nage forcée et le test de la suspension caudale. Nous avons trouvé que le comportement de résignation a augmenté d’une façon significative chez les mâles adultes; alors que leurs homologues femelles n’ont pas été affectées. L’immobilité des souris mâles dans les tests de la dépression n’a pas été interprétée par un effet des polluants sur l’activité motrice puisque l’open field a révélé que l’activité horizontale et verticale des souris n’a pas été altérée. En plus de cet effet dichotomique sur le comportement dépressif-like, la corticostérone, hormone de stress, était produite d’une façon significative uniquement chez les mâles adultes périnatallement exposées par rapport aux témoins. Ces résultats sont en faveur d’une altération sélective de l’axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien, chez les souris mâles adultes exposées aux anguilles polluées. Nos résultats suggèrent une programmation périnatale du comportement dépressif-like chez les souris mâles par l’inflammation. En effet, les cerveaux de la progéniture ont présenté une inflammation dès la naissance jusqu’à l’âge adulte, d’une façon plus accentuée chez les souris mâles. Nos résultats ont montré que les statuts inflammatoires des cerveaux en période néonatale (JPN 1) et des cerveaux en période postnatale (JPN 21) étaient similaire avec une légère augmentation de l’inflammation chez ces derniers. Les cerveaux en période prénatale reflètent une exposition exclusivement gestationnelle aux polluants ; alors que les cerveaux en période postnatale reflètent une exposition gestationnelle et lactationnelle. Nous avons pu

conclure que le cerveau serait beaucoup plus vulnérable aux défis inflammatoires lors de la vie prénatale vs. la vie postnatale.

Perinatal programming of depressive-like behavior by inflammation in adult offspring mice whose mothers were fed polluted eels: gender selective effects.

Nidhal Soualeh¹, Imen Dridi¹, Gauthier Eppe², Christophe Némos¹, Rachid Soulimani¹, Jaouad Bouayed^{1,*}

¹Université de Lorraine, Neurotoxicologie Alimentaire et Bioactivité, BP 4102, 57040 Metz, France.

²Université de Liège, Inorganic Analytical Chemistry, CART (Center for Analytical and Research Technology), B-4000 Sart-Tilman, Belgium.

* Corresponding author at: Université de Lorraine, BP 4102, 57040 Metz, France.

E-mail address: jaouad.bouayed@univ-lorraine.fr (J. Bouayed).

Abstract

Several lines of evidence indicate that early-life inflammation may predispose to mental illness, including depression, in later-life. We investigated the impact of perinatal exposure to polluted eels on neonatal, postnatal, and adult brain inflammation, and on the resignation behavior of male and female adult offspring mice. The effects of maternal standard diet (laboratory food) were compared to the same diet enriched with low, intermediate, or highly polluted eels. Brain inflammatory markers including cytokines were assessed in offspring mice on the day of birth (i.e., on the postnatal day– PND 1), upon weaning (PND 21) and at adulthood (PND 100). Plasma myeloperoxidase and corticosterone levels were evaluated at PND 100. Immobility behavior of offspring was assessed in adulthood (i.e., at PNDs 95 to 100), using the tail suspension and forced swimming tests. Chronic brain inflammation was found in male and female offspring mice compared to controls, as assessed at PNDs 1, 21, and 100. The level of myeloperoxidase was found to be significantly higher in both adult males and females vs. control offspring. However, high corticosterone levels were only found in male offspring mice that were perinatally exposed to eels, suggesting a gender-selective dysregulation of the adult hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis. Gender-specific differences were also detected in adulthood in regard to offspring resignation behavior. Thus, compared to controls, males, but not females, whose mothers were fed eels during pregnancy and lactation exhibited a depressive-like behavior in adult age in both behavioral models of depression. Depressive symptoms were more pronounced in male mice perinatally exposed to either intermediate or highly polluted eels than those exposed to only lowly polluted eels. Our results indicate that early-life inflammatory insult is a plausible causative factor that induces the depressive phenotype exhibited by male adult offspring mice, most likely through a gender-specific HPA axis enhanced activation.

Keywords: Depressive-like behavior; Early-life exposure; Inflammation; Later-life; Polluted eels; Maternal diet; HPA axis.

1. Introduction

During the perinatal period, the developing brain presents specific time windows in regard to both vulnerability and opportunity (Andersen, 2003; Arain et al., 2013; Hale et al., 2014; Ingber and Pohl, 2016; Marques et al., 2013; Viggiano, 2008). Several factors could interplay with these temporal windows, and the consequences may not necessarily be immediate, instead becoming manifest later in the life (Andersen, 2003; Hale et al., 2014; Spencer et al., 2007; Wainwright, 2002). Among the perinatal factors, the maternal life style, including dietary aspects, remains among the most important factors interfering with windows of vulnerability or opportunity in the immature brain (Fall, 2009; Hale et al., 2014; Lauritzen et al., 2001; Marques et al., 2013). Dependency of brain growth on the maternal supply of essential nutrients such as omega-3 fatty acids has already been emphasized (Dangour and Uauy, 2008; Lauritzen et al., 2001). Benefits of dietary ingredients following consumption of a healthy diet or supplementation on brain function have been reported, while negative effects due to dietary deficiencies have also been observed (Dangour and Uauy, 2008; Hale et al., 2014; Lauritzen et al., 2001; Wainwright, 2002). However, there is increasing evidence that our diet contains “good”, i.e. physiologically supportive compounds promoting the development of young organism (e.g. vitamins, polyphenols, carotenoids, fatty acids) and “bad” ingredients, i.e. those inhibiting normal development (e.g. methylmercury, dioxins, pesticides, polychlorinated biphenyls–PCBs), many of which can act as neurotoxins and endocrine disruptors, as well as pro-inflammatory agents (Bohn et al., 2011; Dietert, 2012; Dridi et al., 2014; EFSA, 2005; Roegge and Schantz, 2006). Thus, the perinatal diet may act by altering or programming the development of the brain, e.g. by epigenetic regulation of inflammatory pathways such as hypomethylation of inflammatory genes (Bolton and Bilbo, 2014; Spencer,

2013). It has further been suggested that early-life exposure to pollutants including PCBs; dioxins; pesticides; polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs); and heavy metals, such as lead, arsenic, cadmium and mercury, can program misregulated inflammation in offspring throughout their life (Dietert, 2012). Surprisingly, developmental programming of brain and behavior by perinatal diet occurs more in males than in females, probably following the high vulnerability of the former to immune challenges that occur in early-life (Bolton and Bilbo, 2014). Perinatal programming by inflammation could result in decreased serotonin levels following exposure to elevated levels of pro-inflammatory cytokines (Bolton and Bilbo, 2014; Manuelpillai et al., 2005; Miller and Raison, 2016). An altered brain development trajectory may lead to modified behavior in later-life of the offspring, with a high risk of onset of diseases including neuropsychiatric disorders such as depression in adulthood (Andersen, 2003; Bilbo and Schwarz, 2009; Bolton and Bilbo, 2014). Studies of twins have revealed that the contribution of environmental factors in the pathogenesis of unipolar depression is very substantial, as genes only account for about 25–30% of the variance (Henn et al., 2004). Stress is considered to be the most important etiological factor of depression (Charney and Manji, 2004; Paykel, 2003). Undoubtedly, in addition to ongoing stress, early-life stress might also contribute to the onset of this mental illness throughout the individual's lifespan (Charney and Manji, 2004).

Fatty fish is a recommended weekly dietary component for pregnant women (Lichtenstein et al., 2006; SACN, 2004). This food item contains beneficial ingredients (e.g. omega-3 PUFAs and selenium) as well as detrimental ingredients (e.g. persistent organic pollutants—POPs—and metals) (Dridi et al., 2014; SACN, 2004). For instance, European eel (*Anguilla anguilla* L.) contains high concentrations of POPs, which are mainly of anthropic origin (Dridi et al., 2014; Macgregor et al., 2010; Szlinder-Richert et al., 2010). Eel is considered to be the most PCB-contaminated fish (EFSA, 2005; SACN, 2004). However, this

fish is also a popular food item for many populations, e.g. in many European, Asian, and North America countries (Tsukamoto and Kuroki, 2014). Due to the longstanding human tradition of eel usage as food, several types of eel dishes are commonly consumed such as kabayaki, smoked eel, eel pie, jellied eels, angulas, eel stew, eel curry, and matelote d'anguille (Tsukamoto and Kuroki, 2014). Thus, in this study, we aimed to examine whether gestational and lactational exposure to eels naturally contaminated with pollutants including PCBs could induce changes in the resignation behavior of offspring male and female mice at adult age (i.e. at postnatal days—PNDs— from 95 to 100). For this purpose, the tail suspension and forced swimming tests, which are common behavioral tests to address depression, were used (Bouayed et al., 2012; Cryan et al., 2005; Zhao et al., 2008). We also performed an open-field test at PNDs 90–92, to evaluate locomotor activity in order to ensure that differences in activity levels did not bias the results in the other tasks (Bouayed et al., 2012).

Additionally, brain inflammation was assessed at PNDs 1, 21, and 100 by measuring levels of interleukin (IL)-1 β , IL4, IL10, IL6, tumor necrosis factor alpha (TNF α), transforming growth factor beta (TGF β), interferon gamma (IFN γ), and nitric oxide (NO). Moreover, the levels of the inflammatory enzyme myeloperoxidase (MPO) and the stress marker corticosterone were assessed in the plasma of adult offspring mice at PND 100.

2. Materials and Methods

2.1. Animals

Forty pregnant CD1 mice (Charles River, France), obtained after a mating session performed in our laboratory as detailed in our previous studies (Bouayed et al., 2009; Dridi et al., 2014; 2016; Elnar et al., 2012), were used in this study. They were housed individually in standard cages with *ad libitum* access to water and food pellets (SDS Dietex, St Gratien, France) and they were maintained on a standard 12-hr light/dark cycle (lights “on” starting at 8:00 p.m.),

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/gender in order to prevent litter size bias. In regard to the remaining pups, only one pup/litter was randomly selected and sacrificed as described below in the section for Biochemical analyses. On PND 21 (i.e. at weaning), male and female offspring mice were separated from their mothers and housed in two different rooms to exclude effects of sexual pheromones on behavior at adult age. During the dark phase (1h 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 4 hours per day of experimentation (i.e. experiments finished at 5h after lights “off” to avoid circadian cycle bias). All animal procedures were carried out in accordance with the relevant European Union regulations (Directive 2010/63/EU), and they were approved by the institutional ethics committee of the University of Lorraine (authorization number CELMEA-2013-0010).

2.2 Perinatal diet manipulation

2.2.1. Eel matrix and pollutant quantification

A permit to fish for eels was obtained from the Ministry of the Walloon region, Belgium (authorization number DNF/DCP/CD705.1 / Sortie 2007: 31416). Five river yellow eels (la Meuse, Belgium) were stunned and caught with a dip net in the spring of 2011. Additionally, 10 reared yellow eels were purchased from Zon-Aquafarming (Helmond, The Netherlands). Biologists from the University of Liège (ULg) identified both the river and the reared eels as *Anguilla anguilla* L. during the autopsy process. Eel muscle was then sampled, separated into two pools according to their origin, freeze-dried, mixed, and stored at -20°C until paste preparation. Additionally, a portion of each pool was used to determine pollutant levels. PCBs and metals including mercury and lead were identified and quantified as previously described

by Dridi et al., (2014). In this study, we also quantified the levels of other pollutants including polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins/dibenzofurans (PCDD/Fs), polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), polybrominated diphenyl ethers (BDEs), and pesticides (see Table 1) in both the reared and the river muscle eels. Briefly, all of these organic pollutants were analyzed by gas chromatography (GC) coupled to high-resolution mass spectrometry (HRMS) using isotope dilution techniques for quantification (i.e., using ¹³C labeled homologue compounds for PCDD/Fs, PCBs, and PAHs). Organochlorine pesticides were analyzed by GC connected with an electron capture detector (ECD). A full description of all analytical methods can be found elsewhere (Focant et al., 2001; Veyrand et al., 2007).

2.2.2. Eel paste preparation

The contaminated food (paste consisting of eels and chow) was prepared for a group of mothers (n=10) by mixing 10 g of powdered food pellets (SDS Dietex, St Gratien, France) with 10 ml of water, 0.5 ml of sweet syrup, and 1 ml of corn oil and 320 mg of lyophilized eels with a kitchen household blender (Robot monofonction Seb Valentin 8553, France) to obtain a homogenous paste (i.e., a mother weighing 40 g ingested 32 mg-dw of eels that corresponded to 0.8 g-dw of eel per kg of body weight (bw) of the mouse). On the following day, the paste was cut into smaller pieces based on the weight of the pregnant and nursing females (40-70g) in order to be delivered as 0.8 g-dw of eel muscle/kg-bw/day to the mice. For control pregnant and lactating mice (n=10), the paste was prepared with the same ingredients cited above but without adding eels, as no unpolluted eels (e.g. no PCB-free eels) could be sourced.

2.2.3. Perinatal exposure to polluted eels

Pregnant females were allocated to the four experimental groups by stratified randomization; 40 dams ingested the standard diet (food pellets, SDS Dietex, St Gratien, France) plus paste with or without eels on a daily basis from gestational day (GD) 6 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 eaten 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 eels, three groups of female mice (n=10 per group) ingested eel muscle (0.8 g-dw/kg/day) containing a range of pollutants including metals and PCBs. Eels were delivered to each group of mice based on their pollution levels. Thus, river and reared eels were considered to be highly and lowly polluted eels, respectively (Table. 1). In this study, an artificial eel matrix obtained by mixing reared and river eels, at a ratio of 2:1, was used in order to assess the effects of an intermediate level of pollution. Therefore, three groups of pregnant and lactating mice received 0.8 g-dw/kg of eel muscle daily from either the lowly, the intermediately, or the highly polluted eels that contained, for example, the following doses of $\Sigma 6$ NDL-PCBs: 85, 216 and 400 ng/kg-bw/day, respectively (Dridi et al., 2014; 2016).

2.3. Maternal behavior

2.3.1. Nest building activity

Every two days from parturition, a paper towel (23 x 23cm) was placed on the lid of each cage. This material was used by the mothers to build a nest. The quality of the nest was assessed from PND 2 to PND 12, using the following three-point scale (Nest Quality Scores, modified from Kalueff et al. (2006)): 0 = no nest or a primitive flat nest (the female used no cotton for nest construction or scattered the material in the home cage, but no clear shape of the nest was evident); 1 = a complex cup-shaped nest (the female used the cotton to form the wall of the cup); 2 = a complex hooded nest (the female built a round and well-shaped nest with walls forming a ceiling).

2.3.2. Retrieving test

A pup was gently removed from its nest and placed at the opposite end of the home cage at a 20-cm distance from the nest. The time spent by the mothers to bring the isolated pup back to the nest was measured (Bouayed et al., 2009). The retrieving test was conducted every other day from the nest building activity test, i.e., from PND 3 until PND 9.

2.4. Pup and adult offspring biochemical analyses

For the biochemical analyses, a total of 5 mice (offspring) per gender and group were randomly selected from 10 litters/group (one mouse/litter), euthanized with isoflurane and decapitated on PND 1 and PND 21, as well as PND 100 for which adult mice were randomly picked after behavioral testing, as detailed below. Neonatal, postnatal, and adult brain tissues were homogenized with a Potter homogenizer (glass-Teflon) in an aliquot of 10 mM Tris-HCl (pH 7.4) buffer at 4°C, and centrifuged at 12,000 rpm for 30 min at 4°C. The supernatant was collected, aliquoted and stored at -80°C until analysis. Blood samples were taken within three minutes of the adult animals being first handled.

2.4.1. Measurement of cytokine levels

Cytokine levels were evaluated in brain tissue homogenates using 7 mouse ELISA kits: IL-1 β , IL4, IL10, IL6, TNF α , TGF- β , and IFN γ according to the manufacturer's protocol (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). The absorbance was measured at 450 nm using a MR96 A (Mindray, China) microplate reader, and concentrations (pg/ml) were determined using a standard curve provided with each kit.

2.4.2. Nitric oxide (NO) production

NO production was determined using the Griess reaction assay previously described by Green et al, (1982) and Drisch et al., (1998). Briefly, NO was measured by adding 100 μ l of Griess reagent (1 % sulfanilamide and 0.1 % naphthylendiamine in 5 % phosphoric acid) to 100 μ l of brain tissue homogenate. The resulting color was measured at 540 nm by using a DU

720 spectrophotometer (Beckman Coulter, USA). The absorbance values were compared to a standard sodium nitrite curve, and the absorbance values were converted to the corresponding nitrite concentrations (μM).

2.4.3. Myeloperoxidase (MPO) level

MPO levels were evaluated in plasma collected from whole heparinized blood of adult offspring mice at PND 100 using a mouse ELISA kit (Catalog #ab155458; Abcam) according to the user's manual.

2.4.4. Corticosterone level

Total plasma corticosterone levels were assayed in the blood of adult offspring mice at PND 100 using the ELISA kit purchased from Enzo Life Sciences (sensitivity: 27 pg/ml, Farmingdale, NY, USA) according to the manufacturer's instructions.

2.5. Behavioral testing of adult offspring mice

Behavioral testing was carried out between 9 a.m. and 1 p.m. Tests were conducted in one male and one female randomly selected from each litter (10 litters/group) in a silent, isolated room under dim red lighting. Thus, 10 adults/gender/group, i.e., a total of $n=20/\text{group}$ were analyzed. All behavioral experiments were recorded. The general activity was assessed using an open-field test. However, the immobility behavior was evaluated using the tail suspension and forced swimming tests. Activity and the immobility time were measured by an experienced researcher in a blind manner. Both behavioral tests of depression were counterbalanced by subjecting 50% of the mice first of all to the tail suspension test and then after two days of recovery to the forced swimming test, and vice versa for the other 50% of the animals.

2.5.1. Open-field test

On PNDs 90–92, a circular open-field was employed to assess the general activity of the mice. The floor of the apparatus was divided into 36 squares. Mice were individually

placed in the front part of the apparatus wall, and after 1 min of becoming habituated, the number of squares crossed by all four paws (horizontal activity) and rearings (vertical activity) were recorded for 5 min (Bouayed et al., 2012; Dridi et al., 2016).

2.5.2. Tail suspension test

On PNDs 95–100, the tail suspension test was carried out according to the method described by Steru et al. (1985) and Bouayed et al., (2012). Mice were placed on the edge of a shelf 35 cm above a tabletop and fixed by adhesive tape, placed approximately 1 cm from the tip of the tail. They were allowed to hang for 6 min, and the duration of immobility was recorded during the last 4 min of the test. Mice were considered immobile only when they hung passively and completely motionless. For each mouse, the immobility time was measured starting immediately after the animal was considered to have become immobile.

2.5.3. Forced swimming test

On PNDs 95–100, we used the forced swimming test according to the method described by Porsolt et al. (1977). Mice were individually placed in to 2 L glass beakers (water temperature of 25 ± 1 °C, water depth of 15 cm) and they were allowed to swim for 6 min. The duration of immobility was recorded during the last 5 min of the test. Each mouse was classified as immobile when it ceased to struggle and remained floating motionless in the water, making only those movements necessary to keep its head above the water level. Immobility time was measured starting immediately after the mouse was considered to have become immobile.

2.6. Statistical analyses

The markers of brain inflammation were analyzed using three-way ANOVA, considering perinatal exposure to eels, gender, and age as independent between-subject factors. Behavioral measurements, as well as MPO and corticosterone levels were analyzed using two-way

ANOVA with perinatal exposure to polluted eels and gender as the main factors. For maternal behavior, repeated measures ANOVA was used with exposure to eels as between-subject factor, and trials as the repeated measure. The significant effects of the exposure were further assessed using Tukey's HSD test when the one-way ANOVA results suggested significant differences. The results were reported as the mean ($\pm$ SEM). For all statistical evaluations, the level of significance was set at $p < 0.05$. All statistical analyses were performed using SPSS 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL).

3. Results

3.1. Maternal behavior

Repeated measures ANOVA revealed no significant effect of exposure on the nest quality [$F(3,35) = 0.30, p = 0.8$] during the mothers' nest building activity. However, during the nursing period, the trials revealed a significant effect [$F(5,175) = 28.54, p < 0.001$] although no interaction was found with exposure [$F(15,175) = 0.69, p = 0.8$] (see Table 1 in the Supplementary Data).

Repeated measures ANOVA revealed no significant effect of exposure on the retrieving time [$F(3,35) = 0.81, p = 0.50$]. However, an interaction with the trials was found [$F(9,105) = 2.04, p < 0.05$]. Analyses showed that the retrieving activity did not vary depending on the trials from PND 3 to PND 9 [$F(3,105) = 0.9, p = 0.45$]. One-way ANOVAs showed no significant effects between the various mother groups in regard to retrieving activity (all $p > 0.05$) (see Fig. 1 in the Supplementary Data).

3.2. Effects of perinatal exposure to eels on neonatal, postnatal, and adult brain inflammatory markers

Three-way ANOVA revealed significant main effects of the perinatal exposure to eels on TNF α [$F(3,93) = 32.11, p < 0.001$], IL1 β [$F(3,93) = 30.90, p < 0.001$], IFN γ [$F(3,93) = 111.16, p < 0.001$], NO [$F(3,93) = 31.44, p < 0.001$], IL10 [$F(3,93) = 25.50, p < 0.001$], IL4 [$F(3,93)$

= 28.85, $p < 0.001$], and TGF β [$F(3,93) = 8.52$, $p < 0.001$]. However, no main effects of gender on IFN γ [$F(1,93) = 0.09$, $p = 0.76$], NO [$F(1, 93) = 1.13$, $p = 0.28$], IL10 [$F(1, 93) = 0.04$, $p = 0.83$], IL4 [$F(1, 93) = 0.16$, $p = 0.68$], and TGF β [$F(1, 93) = 0.05$, $p = 0.82$] were found, except for TNF α , IL6, and IL1 β [all $F(1, 93) > 5.20$, all $p < 0.05$]. For the age factor, a significant effect was detected for all cytokines (all $F(2, 93) > 10.59$, all $p < 0.001$), except for NO [$F(2, 93) = 0.93$, $p = 0.39$]. Moreover, no interaction was found between all studied factors (exposure x age x gender: $p > 0.05$). Furthermore, the effect of exposure on the production of inflammatory markers depended on the age (all exposure x age: $p < 0.05$), except for NO, TNF α , and IL1 β ($p > 0.05$).

Although the effect of exposure on the production of brain inflammatory markers was independent of the offspring's gender (all exposure x gender: $p > 0.05$), in this study the factor gender was taken into account in the subsequent analyses. For males as well as females, one-way ANOVA revealed significant differences between the various groups of exposed offspring (all $p < 0.05$), except for adult male brains in regard to TGF β ($p > 0.05$) and adult female brains in regard to TGF β , IL4, and IL10 (all $p > 0.05$).

Post hoc comparisons showed that exposure to all eel matrices significantly increased IL1 β ($p < 0.01$) and TNF α ($p < 0.05$) compared to standard diet alone in the neonatal male as well as the female brains (PND 1). Additionally, in both postnatal male and female brains IL1 β was only significantly increased by exposure to the highly polluted eels (PND 21, $p < 0.05$). Moreover, TNF α significantly increased in the postnatal male brain for all polluted eel matrices ($p < 0.01$); although the production of this cytokine in the postnatal female brain was significant only for exposure to the highly polluted eels ($p < 0.05$). TNF α and IL1 β levels were also significantly enhanced by exposure to intermediate and highly polluted eels in the adult male and female brain (PND 100, both $p < 0.05$) (Table 2).

Moreover, exposure to the lowly polluted eels significantly increased IL4 and IL10 in the neonatal as well as the postnatal brains of both males ($p < 0.01$) and females ($p < 0.05$). Furthermore, in the adult male brains, changes in IL4 were only found to be significant following exposure to the intermediately polluted eels ($p < 0.05$). For TGF β , the effect of the three different types of eels was significant (all $p < 0.05$) in the neonatal male, but not female, brains. Again, in the postnatal male brains, TGF β was found to only be significantly elevated following exposure to intermediate and highly polluted eels (both $p < 0.01$) (Table 2)

IFN γ was only significantly enhanced in the neonatal, the postnatal, and the adult male and female brains of mice perinatally exposed to the highly polluted eels (all $p < 0.05$). Additionally, IL6 was only significantly higher in the neonatal brains of both males ($p < 0.01$) and females ($p < 0.05$) exposed to the highly polluted eels. The production of IL6 was further found to be significantly higher in the postnatal as well as adult male and female brains for all eel matrices (all $p < 0.05$). The concentration of NO was only significantly higher in the neonatal, the postnatal, and the adult male brains (all $p < 0.05$) of the mice that were exposed to the highly polluted eels. Furthermore, the NO concentration was found to be significantly higher for all types of eel matrices in all of the studied female brains (all $p < 0.05$) (Table. 2).

3.3. Effects of perinatal exposure to eels on plasma MPO and corticosterone levels

Two-way ANOVA revealed significant main effects of the studied factors and also of their interaction [perinatal exposure: $F(3,32) = 146.49$, $p < 0.001$; gender: $F(1,32) = 42.22$, $p < 0.001$; exposure $\times$ gender: $F(3,32) = 21.29$, $p < 0.001$] on MPO levels. Then, considering this interaction, one-way ANOVA showed a significant effect of perinatal exposure to eels for both males [$F(3,16) = 238.66$, $p < 0.001$] and females [$F(3,16) = 23.11$, $p < 0.001$]. Subsequent analyses demonstrated significant effects of exposure to the studied eel matrices for males (all $p < 0.001$) as well as for females (all $p < 0.01$) on MPO levels (Fig. 1A).

Two-way ANOVA revealed a significant main effect of perinatal exposure to eels [$F(3,32) = 5.13, p < 0.01$], and gender [$F(1,32) = 38.44, p < 0.001$], with a significant interaction between these two factors [$F(3,32) = 3.62, p < 0.05$] on corticosterone levels. While one-way ANOVA revealed a significant effect of perinatal exposure for males [$F(3,16) = 5.97, p < 0.01$], no effect was observed for females [$F(3,16) = 0.90, p = 0.46$]. Thus for males, *post hoc* comparisons showed a trend toward increased levels for offspring exposed to lowly or intermediately polluted eels ($p = 0.072$ and $p = 0.062$, respectively), and a significant effect for highly polluted eels ($p < 0.01$) on corticosterone levels (Fig. 1B).

3.4. Effects of perinatal exposure to eels on adult behavior

In regard to the horizontal activity (locomotion) assessed in the open-field test, two-way ANOVA showed that there was no effect of exposure [$F(3,72) = 1.63, p = 0.19$]. Additionally, neither a significant effect of gender [$F(1,72) = 1.39, p = 0.24$] nor of its interaction with exposure [$F(3,72) = 1.54, p = 0.21$] on the locomotor activity was observed among any of the groups (Fig. 2A). As for the vertical activity (rearings), a significant effect of gender was detected [$F(1,72) = 6.97, p < 0.05$]. However, neither a main effect of exposure [$F(3,72) = 1.83, p = 0.15$] nor of its interaction with gender [$F(3,72) = 1.54, p = 0.21$] were observed (Fig. 2B).

In regard to the tail suspension test, two-way ANOVA revealed a main effect of perinatal exposure to eels [$F(3,72) = 26.26, p < 0.001$] and gender [$F(1,72) = 70.72, p < 0.001$], with a significant interaction between these two factors [$F(3,72) = 20.51, p < 0.001$] on immobility time. When each gender was examined separately, no effect of treatment was found in the females [$F(3,36) = 0.28, p = 0.84$]. By contrast, a significant effect between the male groups was detected in one-way ANOVA [$F(3,36) = 41.04, p < 0.001$]. Subsequent analyses demonstrated a trend (non-significant) toward increased immobility times for male offspring mice whose mothers were exposed to lowly polluted eels ($p = 0.059$). Furthermore, significant

effects were found for male mice perinatally exposed either to intermediately or highly polluted eels (both $p < 0.001$) (Fig. 3A).

In regard to the forced swimming test, two-way ANOVA showed a significant main effect of both factors [exposure: $F(3,72) = 33.73$, $p < 0.001$ and gender: $F(1,72) = 89.33$, $p < 0.001$], with a significant interaction between them [$F(3,72) = 31.15$, $p < 0.001$] on immobility time. Considering this interaction, a significant main effect of perinatal exposure was only detected in the males [$F(3,36) = 83.85$, $p < 0.001$] and not in the female offspring mice [$F(3,36) = 0.69$, $p = 0.57$]. Tukey's HSD *post hoc* test demonstrated a significant increase in immobility time for all male mice perinatally exposed to eels in comparison to controls (lowly polluted eels: $p < 0.05$; both of the more polluted eels: $p < 0.001$) (Fig. 3B).

4. Discussion

In the present study, offspring mice were perinatally exposed to three eel muscle matrices representing three pollution levels: lowly, intermediately, and highly polluted eels. Eels contain a range of pollutants including dioxin and non-dioxin-like PCBs; heavy metals such as Hg, Pb, and Al; dioxins; pesticides; PAHs (see Table 1), and many more, as they may contain other unspecified chemicals (e.g., antibiotics, estrogen, etc.). Most of these xenobiotics are known for their ability to promote inflammation in offspring (Dietert, 2012; Marques et al., 2013) through various cellular pathways including nuclear factor- κ B (NF- κ B), mitogen-activated protein kinases (MAPKs), and the induction of both cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase gene expression (Cardenas-Gonzalez et al., 2013; Dietert, 2015; Kim et al., 2002; Liu et al., 2015; Osgood et al., 2013; Sipka et al., 2008). We here studied a “cocktail” or “combined” effect of pollutants within eel matrices that may interact with effects from beneficial eel ingredients (e.g. omega-3 PUFAs and selenium). Thus, in addition to the possibility that the adverse effects of these pollutants might be camouflaged by beneficial eel constituents; contrary to individual conditions, eel pollutants as they occur in the mixture may

function additively, synergistically, or even antagonistically, thus resulting in specific responses that vary depending on the complexity of the mixtures (Dridi et al., 2014; Elnar et al., 2012; Roegge et al., 2004; Sitarek and Gralewicz, 2009; Sugawara et al., 2008).

We noted very early inflammation, i.e. within the first day of life (PND 1) in the brains of neonates whose mothers were exposed to polluted eels. Interestingly, in their adult lives, only male offspring mice exhibited a depressive-like phenotype in both the tail suspension test and the forced swimming test (Fig. 3). This suggests a perinatal programming of adult depressive-like behavior by inflammation, a condition also found in postnatal brain (PND 21) and that was more pronounced in adult brain (PND 100) (Table 2). In these behavioral models of depression, which are based on escape-related behaviors, rodents try to escape a stressful situation that competes with passive defense mechanisms, expressed as tonic immobility, i.e. the so-called resignation behavior (Belzung, 2014; Cryan and Leonard, 2010; Cryan et al., 2005). Locomotor activity and rearing were found to be unaffected in adult male offspring, as assessed in the open-field tests at PND 90-92 (Fig. 2). Thus, this finding clearly demonstrates that the significant increase of immobility-like behavior observed in the two behavioral models of depression employed in this study reflects resignation behavior. We have previously shown that perinatal exposure to eels induces a gender-selective hyperactive phenotype only in female offspring and not in male mice (Dridi et al., 2016). Hyperactivity was permanent, although it manifested later in life, at PNDs 195, 305, and 329 but not at PND 47 (Dridi et al., 2016). In this study, the activity of offspring mice was unaffected in both males and females (Fig. 2), suggesting that the hyperactive phenotype in females may only become apparent after PND 90-92. Our previous studies (Dridi et al., 2014; 2016) and current data (results not shown) have further demonstrated that early-life exposure to polluted eels did not affect the body weight of offspring mice. The immobility behavior can therefore not be attributed to a potential decline in body weight. Moreover, in adulthood, the level of the primary stress hormone corticosterone

was also found to be altered in male adult offspring but not in female mice. This finding supports the hypothesis that a selective involvement of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis in the depressive-like symptoms only occurs in adult male offspring. Maternal performances in the nest building activity and retrieving tests ruled out any abnormality in maternal behavior of eel-exposed dams that could affect pup development and depressive-like behavior in adulthood (see Table 1 and Fig. 1 in the Supplementary Data).

Findings from human and animal models suggest that inflammation constitutes a plausible causative factor for the development of depression (Bilbo and Schwarz, 2009; Bolton and Bilbo, 2014; Miller and Raison, 2016). Interestingly, human studies have shown that, when exposed to laboratory stressors, individuals predisposed to depression (e.g. who experienced early-life trauma) developed elevated inflammatory responses as compared to controls (Pace et al., 2006). Post-mortem studies have highlighted increased expression of pro-inflammatory cytokines such as IL1 β , IL6, and TNF α in brain samples of suicide victims who suffered from depression (Maes, 1995; Miller et al., 2009). Blood levels of IL1 β and IL18 correlate positively with the severity of depression; although reduced concentrations of anti-inflammatory cytokines such as IL10 and TGF- β in depressive patients have also been reported (Li et al., 2010). In our study, significant increased levels of the pro-inflammatory cytokines IL1 β and TNF α were found in male and female neonatal brains from mice that were prenatally exposed to polluted eels (Table 2). A further significant production of pro-inflammatory cytokines including IFN γ and IL6 was induced in the neonatal male and female brains by *in utero* exposure to the highly polluted eels. Although prenatal exposure to polluted eels induced inflammation in both genders, it appears that there is differential production of pro-inflammatory cytokines in males relative to females, as TNF α , IL6, and IFN γ levels in male neonatal brains were slightly higher than those found in female neonatal brains, particularly in case of exposure to the highly polluted eels. Conversely, NO production was found to be

significantly higher in the female neonatal brains. An imbalance of anti-inflammatory responses of prenatally exposed neonatal males as well as females vs. unexposed controls was found following exposure of the pregnant mice to the lowly polluted eels, as significantly higher expression of IL10 and IL4 were detected (Table 2). Again, gender differences were noted, as only prenatally exposed neonatal males produced significant levels of the anti-inflammatory cytokine TGF β . Notably, the inflammatory status in neonatal brains of exposed neonates reflected exclusive responses to *in utero* exposure to eels. Although in our study the offspring inflammation was developmental in origin following exposure of the mothers to polluted eels, the etiology of the inflammation in the neonates cannot be inferred from our results, as the cytokines may have been of maternal, placental, and/or fetal origin (Bolton and Bilbo, 2014; Hale et al., 2014; Marques et al., 2013). However, in this study, pups were still exposed to polluted eels during lactation (i.e. until weaning, at PND 21) and thus, the inflammatory status in postnatal brains of exposed pups reflects responses to *in utero* plus lactational exposure to polluted eels. Our results indicate postnatal brain inflammation of males as well as females following significant production of IL6. The effect of perinatal exposure on postnatal brain inflammation depended on the level of pollutants in the eels, as greater effects on TNF α , IL1 β , IFN γ , and NO levels in the brains of both genders were seen with the highly polluted eels. A gender differential in pro-inflammatory marker levels was also observed in the brains of pups, as TNF α was produced at higher levels in postnatal male brains; although NO production was considerably higher in the postnatal female brains. Pro- and anti-inflammatory profiles of male and female brains pre- vs. peri-natally exposed to polluted eels were approximately similar. Thus, an increase in the production of pro-inflammatory cytokines was observed in postnatal brains (TNF α and IFN γ for male brains and IL6 for both male and female brains). A decrease in the level of TGF β was found, however, in the male postnatal brains. This may indicate a relatively limited contribution of lactational exposure in the induction of inflammatory

processes, as cytokines could also have a postnatal origin (Bolton and Bilbo, 2014). In this respect, it has been reported that lactational exposure to pollutants (e.g. lead and urban air pollution) results in a greater toxicity (e.g. nephrotoxicity and cardiotoxicity) than that found following prenatal exposure (Damaceno-Rodrigues et al., 2009; Vyskocil et al., 1995). This assumption has also been extended to the developmental effects of individual pollutants on the emotional behavior of rodent offspring, as found in the studies carried out on bisphenol A (Gioiosa et al., 2013; Palanza et al., 2016). In this study, exposed neonatal male as well as female brains (in other words, when only prenatal exposure occurred) showed similar, although more pronounced, inflammatory profiles to those observed in the postnatal male and female brains (i.e. when subjected to *in utero* as well as lactational exposure), thus underscoring the high vulnerability of the developing brain in mice to inflammatory challenges during the gestational period. In addition to the potential specific action of the combined effects of pollutants on inflammatory mechanisms during gestation, our findings also point out the importance of investigating developmental effects of dietary pollutants in a real food matrix instead of artificial contamination or individual pollutants. Inflammation was also found on PND 100, following the high expression of inflammatory markers including TNF α , IL1 β , IFN γ , IL6, and NO, which indicates that conditions of chronic brain inflammation in male and female offspring mice exist throughout their life (Table 2). Interestingly, depressive symptoms have been found to be strongly associated with chronic inflammation (Bilbo and Schwarz, 2009). A low level of anti-inflammatory cytokine responses was observed in brains of adult mice (Table 2), as compared to developing brains, indicating that brain inflammation was more pronounced in adult males and females than at early-life stages (PNDs 1-21). The inflammatory profile of adult male brains was very similar to that of adult female brains, although higher levels of TNF α , IL1 β , and IL4 were detected in the males. This differential induction of cytokines may contribute to the gender differences observed in the resignation behavior tests. It was recently,

noted that perinatal sensitivity to immune challenges appears to be higher in males compared to females owing to the gender-specific strategies adopted in the immune responsiveness of both the developing brain and placenta (Bolton and Bilbo, 2014). This might explain the higher risk of depression among male infants who are small for their gestational age (SGA) than SGA females in adulthood (Bolton and Bilbo, 2014; Thompson et al., 2001). Our results emphasized the importance of considering gender in developmental studies as it could be a confounding factor since exposed adult offspring males, but not females, developed a depressive phenotype, and our previous work showed that aged females, but not males, exhibited a hyperactive phenotype (Dridi et al., 2016). Pro-inflammatory cytokines may act by decreasing the availability of serotonin, dopamine, and noradrenaline, which are the key neurotransmitters involved in the pathophysiology of depression (Miller and Raison, 2016; Wilson et al., 2002). Furthermore, our study revealed higher plasma MPO levels for both adult male and female offspring mice compared to controls. In a study of twins, an association was made between major depression disorders and inflammatory biomarkers in general, and more particularly with MPO, an inflammatory enzyme produced by activated leukocytes (Vaccarino et al., 2008). In another study, it was shown that both MPO mRNA and protein levels were elevated in patients with recurrent depressive disorder compared to controls (Talarowska et al., 2015). Thus, MPO may play a role in the depressive-like behavior of offspring males as a greater increase was found in males than in females, in particular those perinatally exposed to intermediately and highly polluted eels (Fig. 1A). Interestingly, depressive symptoms were greater in male mice perinatally exposed to either intermediately or highly polluted eels than in those exposed to only lowly polluted eels (Fig. 3), which further emphasizes that MPO may be a contributing factor in the observed resignation behavior of adult offspring males. Behavioral gender differences between males and females to early-life exposure to pollutants are likely adaptive

behavioral strategies that could also result from the interference of chemicals acting as endocrine disruptors of sexual differentiation processes (Gore et al., 2014; Palanza et al., 2016).

Furthermore, inflammation can also affect the HPA axis, for which dysregulation predisposes, amongst others things, to depression, (Jurueña, 2014; Spencer et al., 2014). Hyperactivity of the HPA axis in major depression has already been shown to occur, and this is likely due to the impaired feedback inhibition of this axis by circulating glucocorticoids (Jurueña, 2014; Tofoli et al., 2011). It has been suggested that early-life stress as well as perinatal diet can result in programming changes of the HPA axis, most likely through epigenetic mechanisms (Cai et al., 2016; Spencer, 2013), and such changes may cause the development of depression in adulthood (Jurueña, 2014). In this study, plasma corticosterone, a hormone that is a systemic marker of stress, was used as an indicator of activation of the adult HPA axis (Spencer et al., 2007). We have only found elevated corticosterone levels in adult male offspring (Fig. 1B), suggesting a dysregulation of their HPA axis as a possible major contributor to the development of depressive-like behaviors in males, while this is not the case for adult offspring females. It has been suggested that HPA axis regulation depends on several factors including gender (Veldhuis et al., 2013), and this may explain the discrepancy in stress-adaptive corticosterone production between males and females.

In conclusion, our results emphasize the role of maternal diet as a preconditioning factor for normal or abnormal behavior in offspring at a later stage of life. Perinatal exposure to lowly, intermediately, or highly polluted eels only induced late depressive-like behavior in adult male offspring, and not in females. The eel matrix pollutant level constituted a determinant factor as depressive symptoms were higher in male mice perinatally exposed to either intermediately or highly polluted eels than those exposed to lowly polluted eels. We believe that early inflammation is the origin of these depressive-like symptoms exhibited by offspring males in adulthood as a result of gender selective HPA axis dysregulation. As pointed out in recent

studies, polluted fish nowadays represents a significant issue in regard to human health (Berger et al., 2001; Genuis, 2008; Oken et al., 2005; Paliwoda et al., 2016). To limit the possible toxic effects on offspring, women have often been advised to continue eating fish during pregnancy but to select species with lower levels of contamination such as small fatty fish (e.g. sardines), and canned tuna (Genuis, 2008; Oken et al., 2005; Paliwoda et al., 2016). Although French authorities have prohibited consumption of eels from several rivers and lakes, reared eels (the least polluted eels used in this study) are still available for consumption. Therefore, we believe that sensitive populations that are at risk of adverse neurodevelopmental effects, including women of childbearing age, pregnant, or nursing women should avoid consuming eels all together.

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). River eels used in this study were harvested for a scientific study sponsored by the Service Public de Wallonie, DGO “Agriculture, Ressources Naturelles et Environnement, n° 10/65/593”. We gratefully acknowledge assistance from Dr. Julie Peiffer for performing the experiments on maternal behavior.

References

- Andersen, S.L., 2003. Trajectories of brain development: point of vulnerability or window of opportunity? *Neurosci Biobehav Rev* 27, 3-18.
- Arain, M., Haque, M., Johal, L., Mathur, P., Nel, W., Rais, A., Sandhu, R., Sharma, S., 2013. Maturation of the adolescent brain. *Neuropsychiatr Dis Treat* 9, 449-461.
- Belzung, C., 2014. Innovative drugs to treat depression: did animal models fail to be predictive or did clinical trials fail to detect effects? *Neuropsychopharmacology* 39, 1041-1051.
- Berger, D.F., Lombardo, J.P., Jeffers, P.M., Hunt, A.E., Bush, B., Casey, A., Quimby, F., 2001. Hyperactivity and impulsiveness in rats fed diets supplemented with either Aroclor 1248 or PCB-contaminated St. Lawrence river fish. *Behav Brain Res* 126, 1-11.
- Bilbo, S.D., Schwarz, J.M., 2009. Early-life programming of later-life brain and behavior: a critical role for the immune system. *Front Behav Neurosci* 3, 14.
- Bohn, T., Cocco, E., Gourdol, L., Guignard, C., Hoffmann, L., 2011. Determination of atrazine and degradation products in Luxembourgish drinking water: origin and fate of potential endocrine-disrupting pesticides. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 28, 1041-1054.
- Bolton, J.L., Bilbo, S.D., 2014. Developmental programming of brain and behavior by perinatal diet: focus on inflammatory mechanisms. *Dialogues Clin Neurosci* 16, 307-320.
- Bouayed, J., Bohn, T., Tybl, E., Kiemer, A.K., Soulimani, R., 2012. Benzo[α]pyrene-induced anti-depressive-like behaviour in adult female mice: role of monoaminergic systems. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 110, 544-550.
- Bouayed, J., Desor, F., Rammal, H., Kiemer, A.K., Tybl, E., Schroeder, H., Rycken, G., Soulimani, R., 2009. Effects of lactational exposure to benzo[α]pyrene (B[α]P) on postnatal neurodevelopment, neuronal receptor gene expression and behaviour in mice. *Toxicology* 259, 97-106.
- Cai, G., Ziko, I., Barwood, J., Soch, A., Sominsky, L., Molero, J.C., Spencer, S.J., 2016. Overfeeding during a critical postnatal period exacerbates hypothalamic-pituitary-adrenal axis responses to immune challenge: a role for adrenal melanocortin 2 receptors. *Sci Rep* 6, 21097.
- Cardenas-Gonzalez, M., Gaspar-Ramirez, O., Perez-Vazquez, F.J., Alegria-Torres, J.A., Gonzalez-Amaro, R., Perez-Maldonado, I.N., 2013. p,p'-DDE, a DDT metabolite, induces proinflammatory molecules in human peripheral blood mononuclear cells "in vitro". *Exp Toxicol Pathol* 65, 661-665.
- Charney, D.S., Manji, H.K., 2004. Life stress, genes, and depression: multiple pathways lead to increased risk and new opportunities for intervention. *Sci STKE* 2004, re5.
- Cryan, J.F., Leonard, B.E. (Eds.), 2010. *Depression: From Psychopathology to Pharmacotherapy*. Karger.
- Cryan, J.F., Mombereau, C., Vassout, A., 2005. The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: review of pharmacological and genetic studies in mice. *Neurosci Biobehav Rev* 29, 571-625.
- Dangour, A.D., Uauy, R., 2008. N-3 long-chain polyunsaturated fatty acids for optimal function during brain development and ageing. *Asia Pac J Clin Nutr* 17 Suppl 1, 185-188.
- Dietert, R.R., 2012. Misregulated inflammation as an outcome of early-life exposure to endocrine-disrupting chemicals. *Rev Environ Health* 27, 117-131.
- Dietert, R.R., 2015. *Effects of Endocrine Disrupters on Immune Function and Inflammation*. Mica Haley, USA.
- Dirsch, V.M., Stuppner, H., Vollmar, A.M., 1998. The Griess assay: suitable for a bio-guided fractionation of anti-inflammatory plant extracts? *Planta Med* 64, 423-426.
- Dridi, I., Leroy, D., Guignard, C., Scholl, G., Bohn, T., Landoulsi, A., Thome, J.P., Eppe, G., Soulimani, R., Bouayed, J., 2014. Dietary early-life exposure to contaminated eels does not

impair spatial cognitive performances in adult offspring mice as assessed in the Y-maze and the Morris water maze. *Nutr Res* 34, 1075-1084.

Dridi, I., Soualeh, N., Bohn, T., Soulimani, R., Bouayed, J., 2016. Chemically contaminated eel fed to pregnant and lactating mouse dams causes hyperactivity in their offspring.

International Journal for Vitamin and Nutrition Research. DOI 10.1024/0300-9837/a000288.

EFSA, 2005. European Food Safety Authority. Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to the presence of non dioxine-like polychlorinated biphenyls (PCB) in feed and Food. *EFSA J.* , 1-137.

EFSA, 2010. European Food Safety Authority Scientific report of EFSA. Results of the monitoring of non dioxin-like PCBs in food and feed. *EFSA J.* 8, 1-38.

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

Fall, C., 2009. Maternal nutrition: effects on health in the next generation. *Indian J Med Res* 130, 593-599.

Focant, J.F., Eppe, G., Pirard, C., De Pauw, E., 2001. Fast clean-up for polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans and coplanar polychlorinated biphenyls analysis of high-fat-content biological samples. *J Chromatogr A* 925, 207-221.

Genuis, S.J., 2008. To sea or not to sea: benefits and risks of gestational fish consumption. *Reprod Toxicol* 26, 81-85.

Gore, A.C., Martien, K.M., Gagnidze, K., Pfaff, D., 2014. Implications of prenatal steroid perturbations for neurodevelopment, behavior, and autism. *Endocr Rev* 35, 961-991.

Green, L.C., Wagner, D.A., Glogowski, J., Skipper, P.L., Wishnok, J.S., Tannenbaum, S.R., 1982. Analysis of nitrate, nitrite, and [^{15}N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 126, 131-138.

Hale, M.W., Spencer, S.J., Conti, B., Jasoni, C.L., Kent, S., Radler, M.E., Reyes, T.M., Sominsky, L., 2014. Diet, behavior and immunity across the lifespan. *Neurosci Biobehav Rev* 58, 46-62.

Henn, F., Vollmayr, B., Sartorius, A., 2004. Mechanisms of depression: the role of neurogenesis. *Drug Discov Today Dis Mech.* 1, 407-411.

Ingber, S.Z., Pohl, H.R., 2016. Windows of sensitivity to toxic chemicals in the motor effects development. *Regul Toxicol Pharmacol* 74, 93-104.

Juruena, M.F., 2014. Early-life stress and HPA axis trigger recurrent adulthood depression. *Epilepsy Behav* 38, 148-159.

Kalueff, A.V., Keisala, T., Minasyan, A., Kuuslahti, M., Miettinen, S., Tuohimaa, P., 2006. Behavioural anomalies in mice evoked by "Tokyo" disruption of the Vitamin D receptor gene. *Neurosci Res* 54, 254-260.

Kim, S.H., Johnson, V.J., Sharma, R.P., 2002. Mercury inhibits nitric oxide production but activates proinflammatory cytokine expression in murine macrophage: differential modulation of NF-kappaB and p38 MAPK signaling pathways. *Nitric Oxide* 7, 67-74.

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

Li, Y., Xiao, B., Qiu, W., Yang, L., Hu, B., Tian, X., Yang, H., 2010. Altered expression of CD4(+) CD25(+) regulatory T cells and its 5-HT(1a) receptor in patients with major depression disorder. *J Affect Disord* 124, 68-75.

Lichtenstein, A.H., Appel, L.J., Brands, M., Carnethon, M., Daniels, S., Franch, H.A., Franklin, B., Kris-Etherton, P., Harris, W.S., Howard, B., Karanja, N., Lefevre, M., Rudel, L., Sacks, F., Van Horn, L., Winston, M., Wylie-Rosett, J., 2006. Diet and life style recommendations

revision: A scientific statement from the American Heart Association Nutrition Committee Circulation.

Liu, D., Perkins, J.T., Petriello, M.C., Hennig, B., 2015. Exposure to coplanar PCBs induces endothelial cell inflammation through epigenetic regulation of NF-kappaB subunit p65. *Toxicol Appl Pharmacol* 289, 457-465.

Macgregor, K., Oliver, I.W., Harris, L., Ridgway, I.M., 2010. Persistent organic pollutants (PCB, DDT, HCH, HCB & BDE) in eels (*Anguilla anguilla*) in Scotland: current levels and temporal trends. *Environ Pollut* 158, 2402-2411.

Maes, M., 1995. Evidence for an immune response in major depression: a review and hypothesis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 19, 11-38.

Manuelpillai, U., Ligam, P., Smythe, G., Wallace, E.M., Hirst, J., Walker, D.W., 2005. Identification of kynurenine pathway enzyme mRNAs and metabolites in human placenta: up-regulation by inflammatory stimuli and with clinical infection. *Am J Obstet Gynecol* 192, 280-288.

Marques, A.H., O'Connor, T.G., Roth, C., Susser, E., Bjorke-Monsen, A.L., 2013. The influence of maternal prenatal and early childhood nutrition and maternal prenatal stress on offspring immune system development and neurodevelopmental disorders. *Front Neurosci* 7, 120.

Miller, A.H., Maletic, V., Raison, C.L., 2009. Inflammation and its discontents: the role of cytokines in the pathophysiology of major depression. *Biol Psychiatry* 65, 732-741.

Miller, A.H., Raison, C.L., 2016. The role of inflammation in depression: from evolutionary imperative to modern treatment target. *Nat Rev Immunol* 16, 22-34.

Oken, E., Wright, R.O., Kleinman, K.P., Bellinger, D., Amarasingiwardena, C.J., Hu, H., Rich-Edwards, J.W., Gillman, M.W., 2005. Maternal fish consumption, hair mercury, and infant cognition in a U.S. Cohort. *Environ Health Perspect* 113, 1376-1380.

Osgood, R.S., Upham, B.L., Hill, T., 3rd, Helms, K.L., Velmurugan, K., Babica, P., Bauer, A.K., 2013. Polycyclic aromatic hydrocarbon-induced signaling events relevant to inflammation and tumorigenesis in lung cells are dependent on molecular structure. *PLoS One* 8, e65150.

Pace, T.W., Mletzko, T.C., Alagbe, O., Musselman, D.L., Nemeroff, C.B., Miller, A.H., Heim, C.M., 2006. Increased stress-induced inflammatory responses in male patients with major depression and increased early life stress. *Am J Psychiatry* 163, 1630-1633.

Palanza, P., Nagel, S.C., Parmigiani, S., Vom Saal, F.S., 2016. Perinatal exposure to endocrine disruptors: sex, timing and behavioral endpoints. *Curr Opin Behav Sci* 7, 69-75.

Paliwoda, R.E., Newbigging, A.M., Wang, Z., Le, X.C., 2016. Benefits and risks associated with consumption of Great Lakes fish containing omega-3 fatty acids and polychlorinated biphenyls (PCBs). *J Environ Sci (China)* 41, 1-5.

Paykel, E.S., 2003. Life events and affective disorders. *Acta Psychiatr Scand Suppl*, 61-66.

Porsolt, R.D., Le Pichon, M., Jalfre, M., 1977. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* 266, 730-732.

Roegge, C.S., Schantz, S.L., 2006. Motor function following developmental exposure to PCBs and/or MEHG. *Neurotoxicol Teratol* 28, 260-277.

Scientific advisory committee on nutrition (SACN), 2004. Advice on fish consumption: benefits and risks. London.

Sipka, S., Eum, S.Y., Son, K.W., Xu, S., Gavalas, V.G., Hennig, B., Toborek, M., 2008. Oral administration of pcbs induces proinflammatory and prometastatic responses. *Environ Toxicol Pharmacol* 25, 251-259.

Spencer, S.J., 2013. Perinatal nutrition programs neuroimmune function long-term: mechanisms and implications. *Front Neurosci* 7, 144.

- Spencer, S.J., Emmerzaal, T.L., Kozicz, T., Andrews, Z.B., 2014. Ghrelin's Role in the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Stress Response: Implications for Mood Disorders. *Biol Psychiatry* 78, 19-27.
- Spencer, S.J., Hyland, N.P., Sharkey, K.A., Pittman, Q.J., 2007. Neonatal immune challenge exacerbates experimental colitis in adult rats: potential role for TNF-alpha. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292, R308-315.
- Steru, L., Chermat, R., Thierry, B., Simon, P., 1985. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 85, 367-370.
- Szlinder-Richert, J., Usydus, Z., Pelczarski, W., 2010. Organochlorine pollutants in European eel (*Anguilla anguilla* L.) from Poland. *Chemosphere* 80, 93-99.
- Talarowska, M., Szemraj, J., Galecki, P., 2015. Myeloperoxidase gene expression and cognitive functions in depression. *Adv Med Sci* 60, 1-5.
- Thompson, C., Syddall, H., Rodin, I., Osmond, C., Barker, D.J., 2001. Birth weight and the risk of depressive disorder in late life. *Br J Psychiatry* 179, 450-455.
- Tofoli, S.M., Baes, C., Martins, C.M., Juruena, M.F., 2011. Early life stress, HPA axis, and depression *Front Psychiatry* 4, 229-234.
- Tsukamoto, K., Kuroki, M., 2014. *Eels and humans*. Springer, Tokyo.
- Vaccarino, V., Brennan, M.L., Miller, A.H., Bremner, J.D., Ritchie, J.C., Lindau, F., Veledar, E., Su, S., Murrah, N.V., Jones, L., Jawed, F., Dai, J., Goldberg, J., Hazen, S.L., 2008. Association of major depressive disorder with serum myeloperoxidase and other markers of inflammation: a twin study. *Biol Psychiatry* 64, 476-483.
- Veldhuis, J.D., Sharma, A., Roelfsema, F., 2013. Age-dependent and gender-dependent regulation of hypothalamic-adrenocorticotrophic-adrenal axis. *Endocrinol Metab Clin North Am* 42, 201-225.
- Veyrand, B., Brosseaud, A., Sarcher, L., Varlet, V., Monteau, F., Marchand, P., Andre, F., Le Bizec, B., 2007. Innovative method for determination of 19 polycyclic aromatic hydrocarbons in food and oil samples using gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry based on an isotope dilution approach. *J Chromatogr A* 1149, 333-344.
- Viggiano, D., 2008. The hyperactive syndrome: metanalysis of genetic alterations, pharmacological treatments and brain lesions which increase locomotor activity. *Behav Brain Res* 194, 1-14.
- Wainwright, P.E., 2002. Dietary essential fatty acids and brain function: a developmental perspective on mechanisms. *Proc Nutr Soc* 61, 61-69.
- Wilson, C.J., Finch, C.E., Cohen, H.J., 2002. Cytokines and cognition--the case for a head-to-toe inflammatory paradigm. *J Am Geriatr Soc* 50, 2041-2056.
- Zhao, Y., Ma, R., Shen, J., Su, H., Xing, D., Du, L., 2008. A mouse model of depression induced by repeated corticosterone injections. *Eur J Pharmacol* 581, 113-120.

Figure legends:

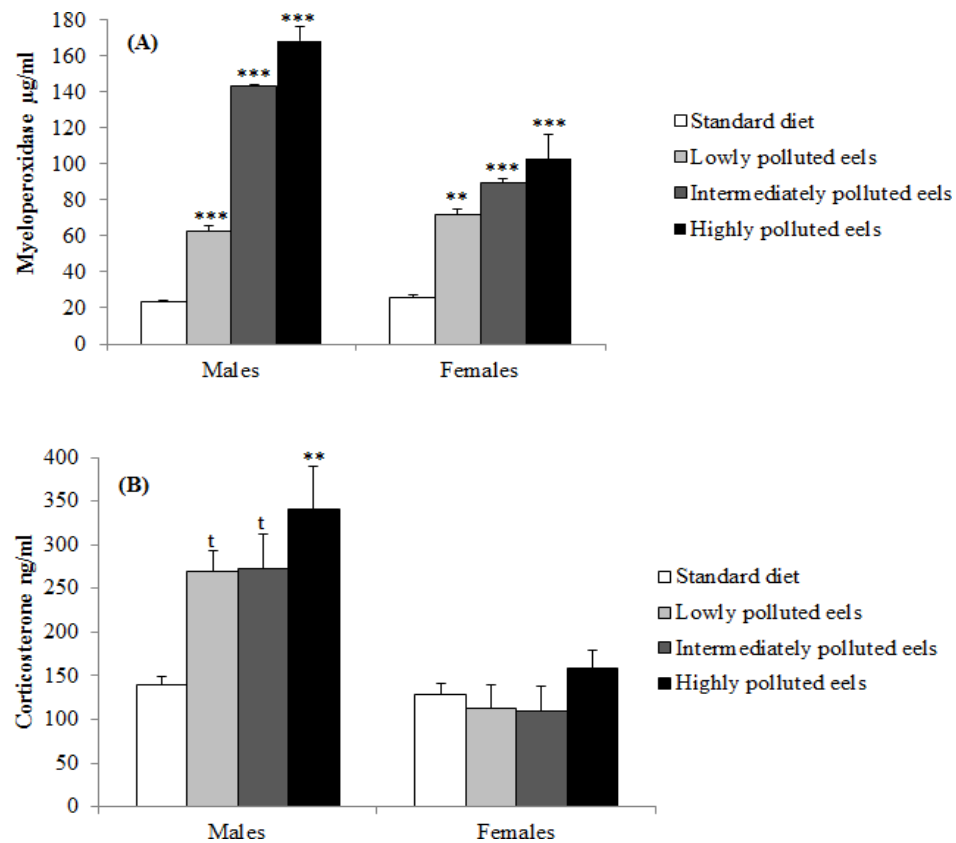


Fig. 1. Effects of perinatal exposure to polluted eels on plasma levels of myeloperoxidase (MPO) (A) and corticosterone (B) of adult offspring male and female mice ($n = 5/\text{sex}/\text{group}$), compared to standard diet alone (i.e., diet without eel). Intermediately polluted eel corresponds to an artificial eel matrix obtained by mixing lowly polluted and highly polluted eels at a ratio of 2:1. The data are reported as the mean $\pm$ SEM. $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ significantly different from the control. The ‘t’ indicates that corticosterone levels of male mice whose mothers were exposed to lowly polluted and intermediately polluted eels approached significance, compared to controls ($p = 0.07$ and $p = 0.06$, respectively).

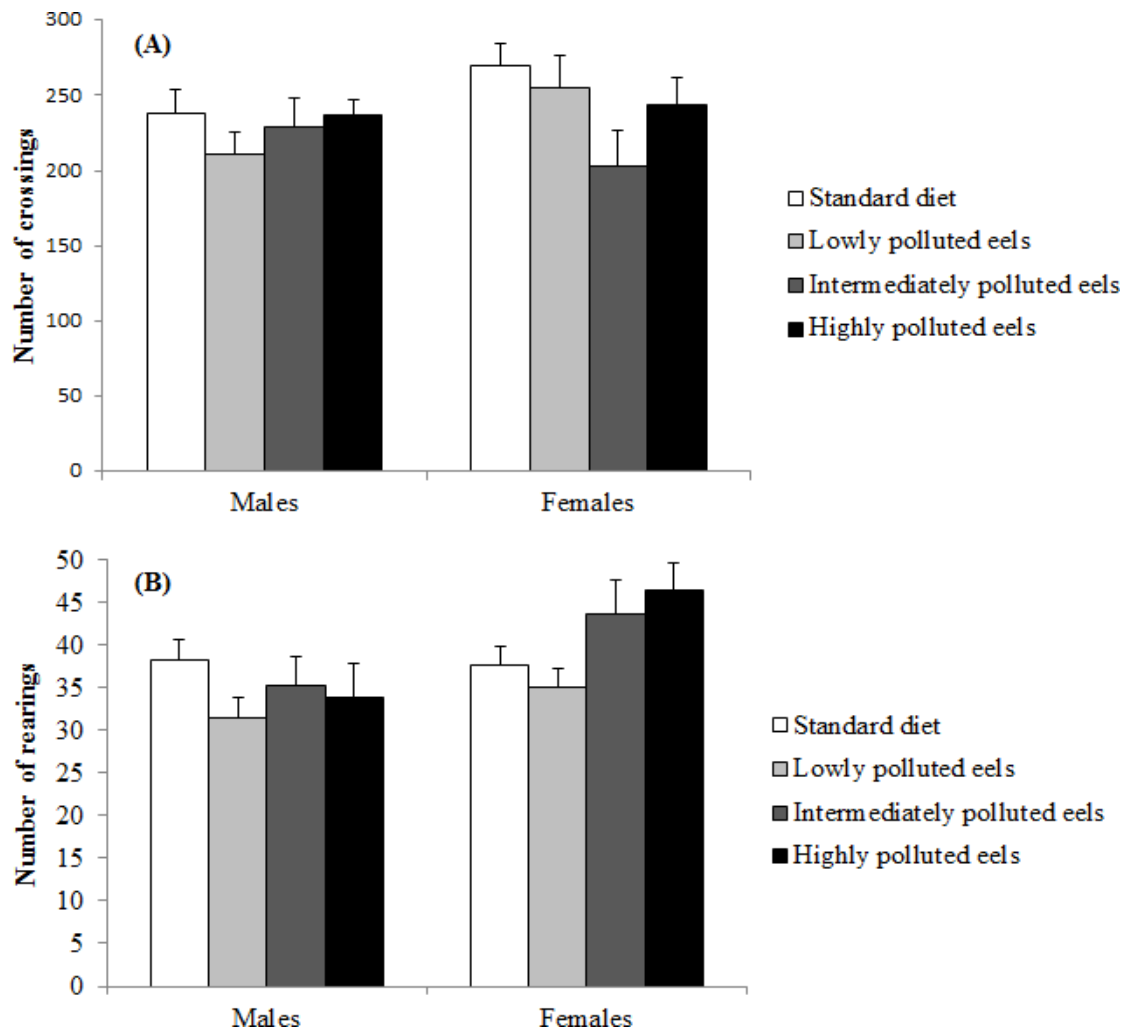


Fig. 2. Open-field horizontal (A) and vertical (B) activities of adult offspring male and female mice whose mothers were fed polluted eels during pregnancy and lactation, compared to controls (i.e. maternal standard diet alone). Intermediately polluted eel corresponds to an artificial eel matrix obtained by mixing lowly polluted and highly polluted eels at a ratio of 2:1. Data are reported as the mean $\pm$ S.E.M. ($n = 20$, males: $n=10$, females: $n=10$, per group).

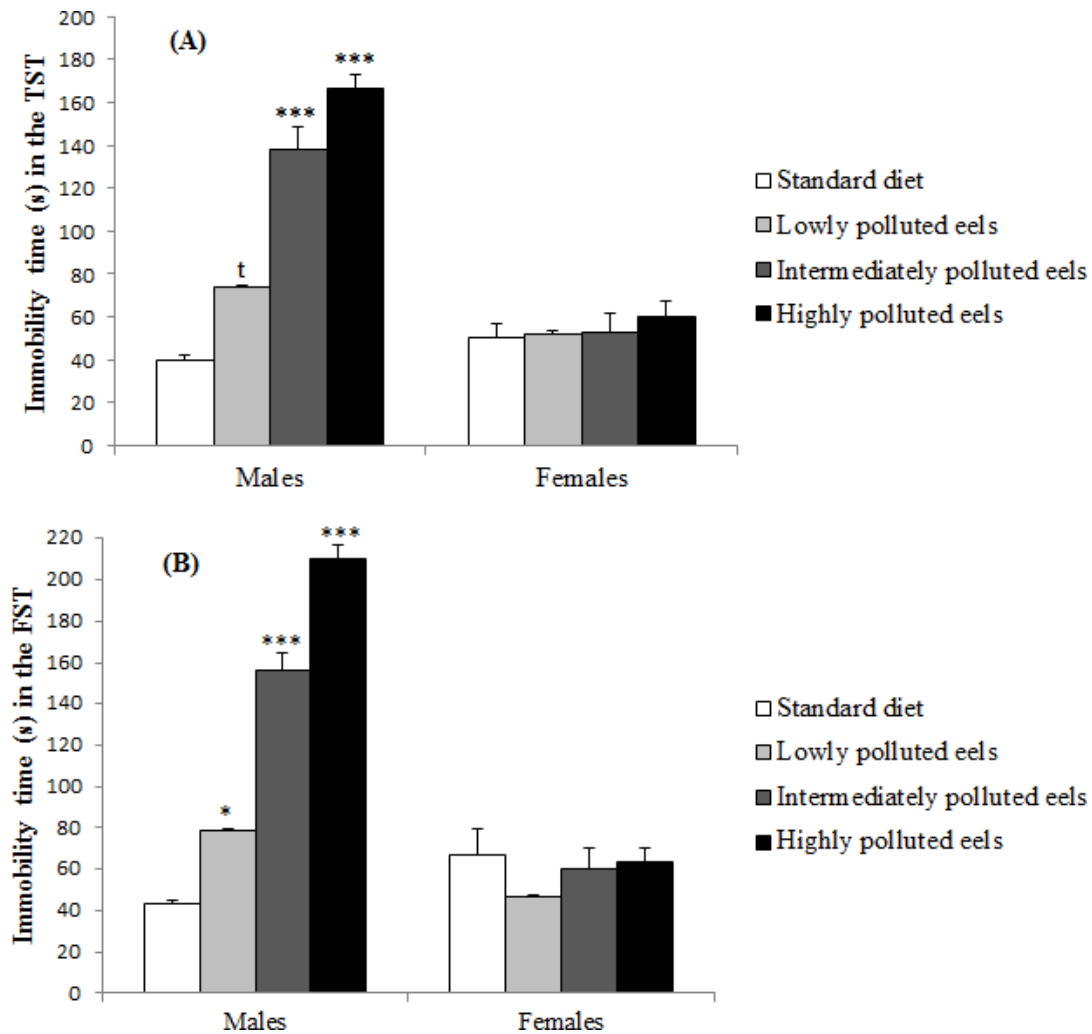


Fig. 3. Effects of perinatal exposure to lowly, intermediately, or highly polluted eels on immobility time of adult offspring male and female mice ($n = 10/\text{sex}/\text{group}$) in both the tail suspension test (TST) (A) and the forced swimming test (FST) (B), compared to standard diet alone (i.e. diet without eel). Intermediately polluted eel corresponds to an artificial eel matrix obtained by mixing lowly polluted and highly polluted eels at a ratio of 2:1. The data are reported as the mean $\pm$ SEM. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ significantly different from the control. The 't' indicates that immobility time in the TST of male mice whose mothers were exposed to lowly polluted eels approached significance compared to controls ($p = 0.06$).

Table 1. Pollutant levels detected in both reared (lowly polluted) and river (highly polluted) eels.

Chemical groups (ng/g fw)	Pollutants	Reared eels (la Meuse, Belgium)	River eels (The Netherlands)
PCBs:	Σ6 NDL-PCB indicators	52.9	250.5
	Total NDL-PCBs ^a	105.9	501.0
	Total DL-PCBs ^b	10.6	50.1
	Total PCBs ^c	116.5	551.1
Dioxins/Furans:	PCDD/Fs	620	820
PAHs:	Naphtalene	< 15	< 16
	Acenaphtylene	< 15	< 16
	Acenaphtene	< 15	39
	Fluorene	46	23
	Phenanthrene	39	46
	Anthracene	40	42
	Fluoranthene	< 38	< 41
	Pyrene	< 38	< 41
	Chrysene	< 38	< 41
	Benzo(k)fluoranthene	< 76	< 82
BDEs:	BDE47	< 38	< 41
	BDE99	< 38	< 41
	BDE100	< 38	< 41
	BDE154	< 38	< 41
	BDE153	< 38	< 41
	BDE183	< 38	< 41
Pesticides:	α-HCH	2.87	1.64
	HCB	3.24	3.04
	β-HCH	1.56	3.11
	γ-HCH	0.79	0.43
	op'DDE	0.81	0.42
	pp'DDE	10.59	19.98
	op'DDD	0.89	1.41
	op'DDT	1.75	0.67
	pp'DDD	1.58	5.46
	pp'DDT	5.35	5.17
Metals ^d :	Mercury (Hg)	0.277	0.550
	Aluminium (Al)	7.076	6.899
	Vanadium (V)	<0.588	<0.588
	Chromium (Cr)	0.594	<0.151
	Manganese (Mn)	0.853	0.562
	Iron (Fe)	10.94	8.351
	Cobalt (Co)	0.015	0.028
	Nickel (Ni)	0.140	0.066

Copper (Cu)	0.718	0.725
Zinc (Zn)	38.28	49.24
Arsenic (As)	3.019	<0.475
Selenium (Se)	0.399	1.802
Molybdenum (Mo)	0.052	0.042
Cadmium (Cd)	0.024	<0.010
Lead (Pb)	0.043	0.033
Platinum (Pt)	<0.012	<0.012

BDEs: polybrominated diphenyl ethers; DDD: dichlorodiphenyldichloroethane; DDE: dichlorodiphenyldichloroethylene; DDT: dichlorodiphenyltrichloroethane; DL-PCBs: dioxin-like polychlorinated biphenyls; fw: fresh weight; HCB: hexachlorobenzene; HCH: hexachlorocyclohexane; NDL-PCBs: non-dioxin like polychlorinated biphenyls; PAHs: polycyclic aromatic hydrocarbons; PCDD/Fs: polychlorinated dibenzo(p)dioxins and furans; $\Sigma 6$ NDL-PCB: the sum of the 6 NDL-PCBs: 28, 52, 101, 138, 153, and 180.

^a total NDL-PCBs corresponds to an estimated value obtained by considering the 6 NDL-PCB indicators approximately 50% of total NDL-PCBs (EFSA, 2005).

^b total DL-PCBs corresponds to an estimated value obtained by considering the 6 NDL-PCBs indicators close to five times higher than the sum of total DL-PCBs (EFSA, 2010).

^c Total PCBs corresponds to the sum of DL- and NDL-PCBs.

^d Weight given as $\mu\text{g/g}$ dry weight; average water content 51.08%.

Table2. Effects of perinatal exposure to polluted eels on the brain inflammatory markers of male and female pups, assessed at PNDs 1 and 21, and male and female adult mice, assessed at PND 100, compared to standard diet alone (i.e. diet without eel).

	Maternal diet with or without eels	TNFα	IL1β	IL6	IFNγ	NO ^s	IL10	IL4	TGFβ	
PND1	Males	Standard diet	100.5±4.8	37.4±7.2	71.4±5.9	50.2±2.4	0.3±0.0	76.5±21.4	102.9±28.8	102.4±26.4
		Lowly polluted eels	301.7±15.0*	152.3±14.2***	54.8±9.3	50.8±7.5	1.4±0.3	279.4±49.6**	375.7±66.7**	1118.6±135.6**
		Intermediately polluted eels [#]	407.0±14.6***	158.6±4.8***	81.8±9.7	99.1±5.6	3.3±1.2 ^t	171.8±26.1	242.7±29.6	898.3±54.4*
		Highly polluted eels	548.±77.9***	187.3±11.8***	274.4±59.9**	294.3±34.1***	4.3±0.8**	146.2±20.0	170.6±22.3	1112.7±267.0**
	Females	Standard diet	100.3±3.4	31.9±2.1	77.3±11.6	50.1±1.7	0.5±0.0	126.8±26.7	170.5±36.0	148.6±23.8
		Lowly polluted eels	328.4±10.3***	164.7±15.5***	88.1±12.9	64.2±5.2	1.7±0.0*	288.7±51.1*	388.4±68.7*	880.6±41.6
	Intermediately polluted eels [#]	362.5±9.9***	118.4±9.2**	68.1±6.8	101.2±18.4 ^t	2.1±0.1**	157.6±27.7	207.4±35.0	1472.7±786.6	
PND21	Males	Highly polluted eels	462.0±40.9***	225.0±26.9***	169.9±37.0*	231.0±20.4***	5.3±0.6***	107.5±6.7	146.8±8.8	1119.7±404.8
		Standard diet	96.1±20.4	65.5±5.4	108.5±44.7	48.0±10.2	0.4±0.0	98.0±26.5	131.9±35.6	98.1±26.5
		Lowly polluted eels	558.6±84.0**	186.5±87.0	405.3±50.0*	179.3±41.9 ^t	1.2±0.4	291.4±33.1**	375.8±66.9**	280.5±52.6 ^t
		Intermediately polluted eels [#]	537.0±73.0**	313.6±97.8 ^t	396.8±105.2*	168.5±36.8	3.5±1.3	180.5±22.0	286.7±22.5	541.3±66.1***
		Highly polluted eels	750.0±79.5***	343.5±50.3*	433.0±51.6*	375.0±39.8***	8.6±3.3*	126.9±16.6	164.6±28.8	380.6±49.8**
	Females	Standard diet	235.3±64.4	70.9±10.6	57.7±3.0	117.6±32.8	0.6±0.0	130.8±26.7	170.5±35.9	126.8±26.7
	Lowly polluted eels	299.6±80.2	117.6±14.5	169.2±20.17*	176.2±29.4	1.9±0.1*	271.8±48.1*	388.4±68.7*	268.8±61.1	
	Intermediately polluted eels [#]	461.8±111.3	255.1±81.5 ^t	292.0±85.9*	150.9±73.9	2.9±0.2**	154.2±26.0	207.3±35.0	262.5±78.1	
PND100	Males	Highly polluted eels	879.2±218.9*	321.0±52.8*	460.6±44.0***	439.6±109.5*	5.7±0.6***	119.1±21.3	151.8±11.1	327.3±25.3 ^t
		Standard diet	77.5±17.9	70.0±6.6	44.4±9.1	49.2±6.0	0.4±0.0	56.0±21.9	75.3±29.4	83.7±33.3
		Lowly polluted eels	905.5±112.3 ^t	253.0±78.7	181.0±16.9***	55.9±11.7	1.4±0.3	126.9±12.8 ^t	170.7±3.7 ^t	295.3±58.8
		Intermediately polluted eels [#]	1046.0±350.1*	444.0±95.4**	188.5±5.7***	66.3±4.7	3.4±1.7	139.3±26.1	199.0±29.6*	300.5±61.8
		Highly polluted eels	1183.4±259.9*	493.2±70.3**	222.5±14.0***	542.9±75.3***	8.1±3.1*	113.7±20.0	127.0±22.3	341.0±153.5
	Females	Standard diet	77.5±13.0	62.7±6.7	37.8±2.5	56.1±5.6	0.5±0.0	94.3±26.7	126.8±36.0	140.7±70.8
		Lowly polluted eels	457.9±61.9	155.2±18.5	195.7±18.4***	64.2±8.9	1.8±0.0*	110.5±18.7	148.6±25.2	456.9±151.5
		Intermediately polluted eels [#]	626.9±189.5*	187.9±36.9*	140.7±11.0**	158.1±16.6	2.2±0.1**	125.2±17.7	163.7±35.0	254.0±85.8
	Highly polluted eels	631.9±95.9*	294.6±33.5***	267.4±32.0***	524.3±79.0***	5.5±0.6***	75.1±6.7	103.1±8.8	149.2±29.8	

Values represent the mean $\pm$ SEM for 10 individuals (5 females and 5 males)/group, and are expressed as pg/ml. ^sNO expressed as μ M. [#]Intermediately polluted eel corresponds to an artificial eel matrix obtained by mixing lowly polluted and highly polluted eels at a ratio of 2:1. * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 significantly different from the control. The 't' indicates that inflammatory markers in brain of mice whose mothers were exposed to polluted eels approached significance compared to controls.

Supplementary data

Figure legend:

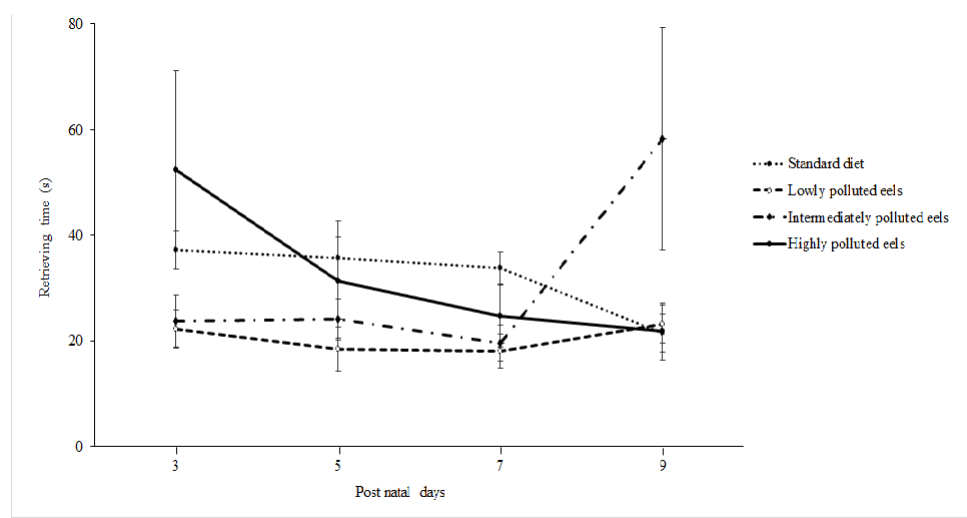


Fig. 1. Retrieving time of pups performed by mouse mothers exposed, during pregnancy and lactation, to standard diet enriched with Lowly, intermediately, or highly polluted eels compared to mothers fed standard diet alone (i.e. the controls). Intermediately polluted eel corresponds to an artificial eel matrix obtained by mixing Lowly polluted and highly polluted eels at a ratio of 2:1. The data are reported as the mean±SEM.

Table. 1. Nest quality scores, from PND 2 to PND12, carried out by mouse mothers exposed, during pregnancy and lactation, to standard diet enriched with Lowly , intermediately, or highly polluted eels compared to mothers fed standard diet alone (controls).

Maternal diet with or without eels	PND 2	PND 4	PND 6	PND 8	PND 10	PND 12
Standard diet	1.7±0.1	1.4±0.2	1.1±0.2	1.1±0.0	1.0±0.1	0.9±0.2
Lowly polluted eels	1.7± 0.2	1.4± 0.2	1.2± 0.1	0.9± 0.1	0.8± 0.1	0.7± 0.2
Intermediately polluted eels [#]	1.5±0.2	1.4±0.1	1.1±0.1	1.0±0.0	1.1±0.1	0.7± 0.2
Highly polluted eels	1.9±0.1	1.4±0.1	1.2±0.1	1.1±0.1	1.0±0.0	0.8± 0.1

Values represent the mean ± SEM for 10 mothers/group. [#] Intermediately polluted eel corresponds to an artificial eel matrix obtained by mixing Lowly polluted and highly polluted eels at a ratio of 2:1. PND: Postnatal day.

Article 2:

“Chemically contaminated eel fed to pregnant and lactating mouse dams causes
hyperactivity in their offspring”

Article 2: Dridi. I, **Soualeh. N**, et al., “Chemically contaminated eel fed to pregnant and lactating mouse dams causes hyperactivity in their offspring” *Int J Vitam Nutr Res* (2017), 1–12.

IF: 1,5/Q2

Dans cette étude, l'activité locomotrice des souris exposées périnatalement aux anguilles polluées a été examinée au fil du temps (du JPN 47 au JPN 329). Nous avons trouvé que l'activité des mâles a resté intacte durant la durée de l'étude. Cependant, une hyperactivité tardive a été observée chez les femelles. En effet, au JPN 47, l'activité des femelles jeunes adultes était intacte ; cependant l'hyperactivité a commencé à apparaître dès le JPN 195, c'est-à-dire à l'âge adulte avancé (âge analogue chez l'Homme de 30 ans). De plus, cette hyperactivité a été aussi observée à l'âge moyen (JPN 305 et 329), âge analogue chez l'Homme de 39-48 ans). Dans cette étude, le test de l'open field a été utilisé pour évaluer l'activité, après une minute d'habituation des animaux. Le fait de répéter le même test au JPN 47, 195 et 329 pourrait entraîner une habituation au test, ce qui est un avantage pour évaluer l'activité motrice. En effet, la première minute d'habituation voire la répétition du même test est en faveur de la diminution de l'anxiété des animaux, ce qui neutraliserait ce stress lors de l'évaluation de l'activité. En outre, nous avons utilisé au JPN 305, le test de l'actimètre qui permet d'évaluer l'activité motrice des animaux dans un milieu familier en évitant les réponses de type néophobiques. L'hyperactivité a été donc confirmée à l'âge moyen via 2 tests différents.

Chemically contaminated eel fed to pregnant and lactating mouse dams causes hyperactivity in their offspring

SHORT TITLE: Early-life exposure to PCBs and hyperactivity

Imen Dridi^{1,2}, Nidhal Soualeh¹, Torsten Bohn³, Rachid Soulimani¹, Jaouad Bouayed^{1,*}

¹Université de Lorraine, Neurotoxicologie Alimentaire et Bioactivité, MRCA/UR AFPA/INRA, BP 4102, 57040 Metz, France

²Unité de Biochimie des Lipides et Interaction des Macromolécules en Biologie (03/UR/0902), Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire, Faculté des Sciences de Bizerte, Zarzouna, Bizerte, Tunisia

³Luxembourg Institute of Health, Department of Population Health, Strassen, Luxembourg

* Corresponding author at: Université de Lorraine, BP 4102, 57040 Metz, France.

E-mail addresses: jaouad.bouayed@univ-lorraine.fr (J. Bouayed).

Abstract

This study examined whether perinatal exposure to polluted eels (*Anguilla anguilla* L.) induces changes in locomotor activity of offspring mice across lifespan (post-natal day (PND) 47 to 329), using the open field and the home cage activity tests. Dams were exposed during gestation and lactation, through diets enriched in eels naturally contaminated with pollutants including PCBs. Analysis of the eel muscle focused on the six non-dioxin-like (NDL) indicator PCBs ($\Sigma 6$ NDL-PCBs: 28, 52, 101, 138, 153 and 180). Four groups of dams (n=10 per group) received either a standard diet without eels or eels (0.8 mg/kg/day) containing 85, 216, or 400 ng/kg/day of $\Sigma 6$ NDL-PCBs. The open field test showed that early-life exposure to polluted eels increased locomotion in female offspring of exposed dams but not in males, compared to controls. This hyperlocomotion appeared later in life, at PNDs 195 and 329 (up to 32% increase, $p < 0.05$). In addition, overactivity was observed in the home cage test at PND 305: exposed offspring females showed a faster overall locomotion speed (3.6-4.2 cm/s) than controls (2.9 cm/s, $p < 0.05$); again, males remained unaffected. Covered distances in the home cage test were only elevated significantly in offspring females exposed to highest PCB concentrations (3411 ± 590 cm vs. 1377 ± 114 cm, $p < 0.001$). These results suggest that early-life exposure to polluted eels containing dietary contaminants including PCBs caused late, persistent and gender dependent neurobehavioral hyperactive effects in offspring mice. Furthermore, female hyperactivity was associated with a significant inhibition of acetylcholinesterase activity in the hippocampus and the prefrontal cortex.

Keywords: Eels; hyperactivity; acetylcholinesterase activity; PCBs; offspring mice; perinatal exposure; late effects.

1. Introduction

Several epidemiological studies have emphasized the preventive effect of regular fish consumption, especially fatty fish and fish oils, against cardiovascular diseases (CVD) and related mortality. This is thought to be mainly due to their long chain omega-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) such as docosahexaenoic acid (22:6n-3; DHA) and eicosapentaenoic acid (20:5n-3; EPA), able to reduce plasma triacylglycerol levels, blood pressure, platelet aggregation and inflammation [1, 4]. Fish consumption may further exert beneficial effects on fetal development [4-7]. Two portions of fish per week (i.e. 2 times 140 g) have been recommended, of which one should be rich in fatty acids [4, 8], such as sardines, salmon, mackerel, and trout.

Fish consumption has been recognized to reestablish a more balanced omega 6 to omega 3 fatty acid ratio in humans, even for fetuses and neonates [9]. DHA is essential for the human brain development; DHA is preferentially incorporated into the cell membranes of neuronal cells and the retina, constituting the most abundant omega-3 fatty acid in the brain and retina [10, 13]. The fetus and newborn infants are dependent on a maternal supply of DHA, particularly during the last trimester of pregnancy (via placental transfer), characterized by the brain's growth spurt, and the first postnatal months (via breast-milk or infant formula) [11, 14]. During the entire gestation period, a total of ca. 600 g of essential fatty acids including DHA are transferred from the mother to the fetus [11].

In contrast to the health-promoting effects of the naturally occurring ingredients in fatty fish, contaminants constitute a serious human health concern. This is especially true for lipophilic and persistent compounds that accumulate in predatory fish species [4, 15, 16] through the food chain, particularly in their fat tissues. Concentrations of persistent organic pollutants (POPs) such as polychlorinated biphenyls (PCBs), dioxins and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in fish depend further on other factors, such as their migration patterns,

fat content, age, the number of times they spawn, size, and feeding habits [4, 17]. Both dioxin-like (DL) and non-dioxin-like (NDL) were observed in fish and fish products. Strong correlations between NDL-PCBs levels and total dioxins + DL-PCBs were found in fish [18].

Eel (*Anguilla anguilla* L.) represents a good indicator species for assessing ecosystem health, general environmental levels of pollutants, and PCBs in particular [19, 21]. Eel is a useful bioindicator due to (i) its carnivorous diet (implying a high bioaccumulation for a wide range of contaminants), (ii) its expanded migratory life style (eels begin their life-cycle in the ocean and spend most of their lives in fresh water, returning to the ocean to spawn and die), (iii) its comparably large body size (60-80 cm to 1.5 m in some cases) and (iv) its weight (reaching 3-4 kg, offering sufficient tissues for analyses), and (v) its lifespan (10-15 y on average) [22, 23]. Many European studies have indicated that eels are the most PCB contaminated fish [4, 24]. PCB pollution may be an important factor in the decline of European eels, which are considered endangered [25]. The mean levels of the six non-dioxin-like indicator (NDL) PCBs (28, 52, 101, 138, 153 and 180) in eel muscle has shown to reach up to 2700 ng/g [26]. However, the maximum permitted level (MPL) of the sum of the six indicator PCB congeners ($\Sigma 6$ NDL-PCBs) in muscle meat of wild caught eel and products is 300 ng/g wet weight [27]. The sum of these six NDL-PCBs are used as indicators to estimate total PCBs (DL and NDL-PCBs) in food matrices as it is well accepted that the 6 NDL-PCBs represent about 50% of total NDL-PCBs in food. In addition, $\Sigma 6$ NDL-PCBs occurs in concentrations close to five times higher than the sum of total DL-PCBs [18, 24].

Several developmental animal studies have investigated the neurobehavioral effects of PCBs administered either as individual congeners or as commercial mixtures [28, 31]. However, studying the effect of PCBs naturally contained in the food matrix (e.g. fatty fish) may be of great interest in order to assess the risk-benefit ratio following the consumption of such human polluted items, as their beneficial ingredients (e.g. omega-3 PUFAs and selenium)

might play a role in reducing or counterbalancing the adverse effects of these man-made chemicals.

As many studies have shown that motor activity can be affected by early-life exposure to chemicals, resulting in transient or even permanent abnormal later activity levels [28, 30, 32-35], the aim of this study was to examine whether gestational and lactational exposure to eels naturally contaminated with PCBs would induce changes in the locomotor activity of offspring mice, following potential effects across their lifespan. For this purpose behavioral models of general activity, including the open field and the home cage activity test were used. In addition, acetylcholinesterase activity was assessed in several brain regions; this enzyme was proposed as a sensitive biological marker for contaminants including PCBs, even at low levels [36]. To the best of our knowledge, this is the first animal study that aimed to investigate the effect of early-life exposure to fish contaminated with PCBs, on rodent offspring activity. The contamination level of eels was assessed, particularly on PCB contamination; metal concentrations including mercury levels in the used eel matrices have been previously determined [37].

2. Materials and Methods

2.1. Animals and Breeding

CD1 mice, an outbred strain, were obtained from the breeder (Charles River, France). Mice including females (n = 50) and males (n = 40), aged 9 weeks and weighing 30-40 g, were maintained on a standard 12-hr light/dark cycle (lights on starting at 8:00 p.m.), temperature controlled conditions ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), and a relative humidity of $55 \pm 10\%$. They were housed in groups of five per sex in standard cages with *ad libitum* access to water and food pellets (SDS Dietex, St Gratien, France). All animal procedures were carried out in accordance with the European Union (Directive 2010/63/EU), and were

approved by the institutional ethics committee of the University of Lorraine (authorization number CELMEA-2013-0010).

Mice mating, involving one male with two females per cage, began after a 2-week period of acclimatization. The day on which a vaginal plug was present, fecundated females were housed individually. Once the number of forty pregnant females was obtained (10 dams/group), the mating session was terminated. After a 2-week period of gestation, small pieces of cotton were placed on the lid of each cage to be used for the construction of the maternal nest. The day of parturition was considered to be postnatal day (PND) 1. To prevent litter size bias [29, 35] the recommendations of the OECD [38] were applied in order to equalize pup number among litters (n=10 pups/litter, 5 pups/sex).

2.2. Perinatal exposure to eels containing PCBs:

2.2.1. Eel matrix

The eel fishing permit was obtained from the Ministry of the Walloon region, Belgium, authorization number DNF/DCP/CD705.1 / Sortie 2007: 31416). Five river yellow eels (la Meuse, Belgium) were stunned and caught with a dip net in spring 2011. In addition, 10 reared yellow eels were purchased from Zon-Aquafarming (Helmond, The Netherlands). Biologists of the University of Liège (ULg) identified both river and sea reared eels as *Anguilla anguilla* L. within the autopsy process. Then, eel muscle was sampled, separated in 2 pools according to their origin, freeze dried, mixed and kept at -20°C until paste preparation. Additionally, a portion of each pool was used to determine PCB concentration. Metal concentrations including mercury levels in the eel muscle has been previously described by Dridi et al. [37] It is worth noting that eel matrices may contain other unspecified chemicals, including lipophilic contaminants.

2.2.2. Eel paste preparation

The contaminated food (paste consisting of eels and chow) was prepared by mixing with a kitchen household blender (Robot monofonction Seb Valentin 8553, France) 10 g of powder food pellets (SDS Dietex, St Gratien, France) with 10 ml water, 0.5 ml sweep syrup, 1 ml corn oil and 320 mg of lyophilized eel to obtain a homogenous paste. On the following day, the paste was cut to smaller pieces according to the weight of pregnant and nursing females in order to be delivered to mice at 0.8 mg/kg/day (i.e., a mother weighing 40 g ingested 32 mg-dw of eels that corresponded to 0.8 g-dw of eel per kg of body weight (bw) of the mouse). For control mice (n=10), the paste was prepared with the same ingredients cited above but without adding eels, as no PCB-free eels were found.

2.2.3. PCB exposure and doses

Nurturing females were allocated to the 4 experimental groups by stratified randomization; 40 dams ingested daily the standard diet (food pellets, SDS Dietex, St Gratien, France) plus paste with or without eels from gestational day (GD) 6 until PND 21 (weaning). The appropriate pastes were filed daily into the cage of each female during the exposure period. Paste was completely eaten by each female and no residual was found in the cage. Thus, in addition to control mice receiving the standard diet plus paste without eels, three groups of female mice (n=10 per group) ingested eel muscle (0.8 mg/kg/day) containing the following doses of $\Sigma 6$ NDL-PCBs: 85 ng/kg/d (reared eels only), 216 ng/kg/d (a mix of reared and river eels) and 400 ng/kg/day (river eels only).

The doses of this study were chosen firstly based on the average daily dietary intake of total NDL-PCBs in humans, which were estimated by EFSA to be in the range of 10-45 ng/kgbody weight (b.w.) per day [24]. Secondly, the interspecies uncertainty factor of 10 was also taken into account to extrapolate results from animals to humans, as the interspecies variation has been widely considered in risk assessment procedures, assuming that humans may be 10-fold

more sensitive than animals [39, 40]. Thus, mice exposure to 85 ng/kg/day was assumed to reflect low human exposure inferior to the tolerable daily intake (TDI) of $\Sigma 6$ NDL-PCBs, corresponding to 10 ng/kg/day. On the other hand, 400 ng/kg/day would reflect high dietary PCB exposure. For example, some specific subpopulations such as Baltic fishermen have been reported to ingest up to 40 ng/kg of the $\Sigma 6$ NDL-PCBs [24].

On PND 21 (weaning), male and female offspring mice were separated into two different rooms to exclude the effect of sexual pheromones at adult age on behavior. Thus, 5 same-sex littermates were housed in each cage [38]. Behavioral testing was carried out between 10 a.m. and 1 p.m. Tests were conducted in one male and one female randomly selected from each litter (10 litters/group). Thus, 10 pups/gender/group i.e., a total of $n=20$ /group were analyzed. All behavioral experiments were recorded. The home cage activity was quantified using an Activmeter (Bioseb, Vitrolles, France); locomotion in the open-field test was evaluated by an experienced researcher. The offspring body weight was periodically measured from parturition (PND 1) until PND 330 (i.e. at PNDs: 1, 12, 20, 26, 40, 130, 200 and 330).

2.3. Biochemical analyses

For biochemical analysis, a total of 5 mice (offspring) per sex and group were randomly selected from 10 litters/group, euthanized with isoflurane and decapitated on PND 338. The skull was opened and the brain was placed on cold ice. After removal of the meninges, the cerebellum, prefrontal cortex and hippocampus were collected and weighed. Each tissue was homogenized with a potter in 9 volumes (1:10, w/v) of 20 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4 containing KCl (140 mM). Homogenates were centrifuged at 400 x g for 30 min at 4 °C to discard nuclei and cell debris. The pellet was discarded and the supernatant, a suspension of mixed and preserved organelles was collected, aliquoted and stored at -80°C until analysis.

2.4. NDL-PCB analyses

NDL-PCB contamination level of the 2 eel pools was determined by a fully validated method based on the EN16215:2011 European standard in an ISO 17025 accredited laboratory (Center of Analytical Research and Technology, CART, Belgium). Briefly, fat was extracted with a pressurized solvent extraction system (Thermo-Fisher, Palo-Alto, USA), followed by a subsequent purification by liquid chromatography carried out with a PowerPrep automat (FMS, Watertown, MA), and finally analyzed by GC-HRMS on an Autospec Premier (Waters, Millford, MA). Quantitation was achieved by isotope dilution technique using a $^{13}\text{C}_{12}$ labelled analog for each NDL-PCB [37].

2.5. Behavioral tests – open field test and home cage activity test

According to the OECD guidelines for the testing of chemicals [38], weighing and behavioral tests were conducted in one pup of each sex that was randomly selected from each litter i.e., 10/gender/group, thus a total of $n=20/\text{group}$.

A circular open field was employed to assess the general locomotor activity of mice on PNDs 47, 195 and 329. The apparatus floor was divided into 36 squares. Mice were individually placed in the frontal part of the apparatus wall, and after 1 min of habituation, the number of squares crossed by all four paws (horizontal activity) was recorded for 5 min [29, 41].

Testing activity in the home cage (familiar environment) avoids the interaction with novelty and any induction of the neophobic behavior [42]. This test was performed at PND 305 to evaluate the spontaneous activity of the tested mice using an activimeter (Activimeter; Bioseb, Vitrolles, France). Approximately 24h before testing, each animal was placed in a transparent plastic cage ($12 \times 35 \times 14$ cm) in order to become accustomed to the cage. The floor of the home cage was covered with sawdust and the animal was given unlimited access to food and water. The locomotion was evaluated based on the vibrations of the

cage, and infrared photocell detectors recorded rearing movements. The covered distance (cm), the average speed (cm/s), total activity time (s), global movement, including low-speed and high-speed activities, and rears were measured⁴³ over a 15-min period.

2.6. Acetylcholinesterase activity assay

Acetylcholinesterase activity was spectrophotometrically determined (DU 720 UV/Visible spectrophotometer, Beckman Coulter, Palo Alto, CA) in offspring mouse tissues (prefrontal cortex, cerebellum and hippocampus) according to Ellman et al [44]. In brief, 0.85 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 tissue extract. After 5 min at ambient temperature, the reaction was started by the adding 0.05 ml of acetylthiocholine (8.25 mM) to the mixture. Acetylcholinesterase activity was assessed at 412 nm (at 20°C) by kinetic measurement using molar extinction coefficient (ϵ) 13,6 mM⁻¹ cm⁻¹. The results were expressed as nanomoles acetylthiocholine hydrolyzed per minute per milligram protein.

2.7. Statistical analyses

When quantitative results followed a Gaussian distribution, analysis of variance (ANOVA) with perinatal exposure to chemically contaminated eels and gender as between-subject fixed-factors, time as a repeated measures variable (within-subject factor) was used to analyze the following dependent variables: body weight and behavioral measures. The dependent variable acetylcholinesterase activity was also analyzed using three-way ANOVA with exposure, gender and brain region as the main factors. The significant effects of the exposure were further assessed using Fisher's protected LSD test when the one-way ANOVA results suggested significant differences. The results were reported as the mean ($\pm$ SEM). When data were not normally distributed, the effects of exposure were assessed using a Kruskal–Wallis non-parametric test followed by Mann–Whitney *U* individual test to compare the exposed groups to the control. The data were reported as the median (IQR). For all statistical

evaluations, the level of significance was set at $p < 0.05$. All statistical analyses were performed using Statview® 4.5 (Abacus Concepts, Inc., Piscataway, NJ, USA).

3. Results

3.1. Body weight

Throughout the 330-postnatal day study period (PNDs: 1, 12, 20, 26, 40, 130, 200 and 330), three-way ANOVA showed that there was no significant effect of chemically contaminated eel fed to pregnant and lactating mice on the weight of their offspring: [exposure: $F(3.615) = 0.18, p = 0.9$; exposure $\times$ gender: $F(3.611) = 0.038, p = 0.99$; exposure $\times$ age: $F(21.58) = 1.17, p = 0.26$; exposure $\times$ age $\times$ gender: $F(21.555) = 0.402, p = 0.99$]. As expected, offspring mice gained weight over time, as shown by a significant effect of age [$F(7.611) = 1108.63, p < 0.0001$]. Postnatal evolution of the body weight was also gender-dependent [$F(7.611) = 7.29, p = 0.007$], which reached, to some extent, a plateau starting on PND 130 for both males and females (Figure 1).

3.2. Open field test

In contrast to age [$F(2.216) = 7.65, p = 0.0013$], exposure [$F(3.215) = 0.83, p = 0.83$] and gender [$F(1.217) = 0.59, p = 0.44$] had no significant effect on locomotion used as an indicator for general activity. However, three-way ANOVA revealed that the effect of perinatal exposure to eel contaminants on the general activity of F1 mice depended on age and gender, as significant interactions between these main factors were found: [exposure $\times$ age: $F(6.207) = 2.132, p = 0.05$; exposure $\times$ gender $F(3.211) = 5.401, p = 0.0013$]. To explore these interactions, separate one-way ANOVA analyses were performed, and males and females were analyzed separately at each time of testing (PNDs 47, 195 and 329). On PND 47, no significant effect of perinatal exposure to contaminants on total ambulation was found in males [$F(3.36) = 1.568, p = 0.21$] or in females [$F(3.36) = 0.45, p = 0.71$]. On PNDs 195 and 329, no effect of exposure

during the gestational and breast feeding period to contaminants was found in males [$F(3.31) = 0.18$, $p = 0.90$ and $F(3.31) = 1.32$, $p = 0.28$, respectively]. However, there was an exposure effect in females [$F(3.32) = 6.85$, $p = 0.001$ and $F(3.30) = 3.40$, $p = 0.03$, respectively].

Post-hoc comparisons revealed that the three studied groups of female mice whose mothers ingested eels containing PCBs at different doses, exhibited significantly more locomotion than controls ($p < 0.05$). Indeed, at PND 195, perinatal exposure by females to 85, 218 and 400 ng/kg/day ($\Sigma 6$ NDL-PCBs) induced hyperactivity compared to controls ($p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$, respectively). This effect was persistent at PND 329, as hyperactivity was also detected in females exposed to 85, 216 and 400 ng/kg/day in comparison to controls ($p < 0.01$, $p < 0.05$, $p < 0.05$, respectively) (Figure 2).

3.3. Home cage activity test

Two-way ANOVA showed significant main effects of early-life exposure to dietary contaminants in eels [$F(3.66) = 4.5$, $p = 0.01$], and of gender [$F(1.68) = 4.63$, $p = 0.03$] on the covered distance during the 15 min activity test in the home cage. A significant interaction between these two factors was also found [exposure $\times$ gender: $F(3.62) = 3.31$, $p = 0.02$]. When each gender was examined separately, effect of exposure was found in females [$F(3.30) = 5.96$, $p = 0.002$] but not in males [$F(3.31) = 0.24$, $p = 0.86$]. *Post-hoc* tests showed that only the distance covered by female mice whose mothers ingested eels containing 400 ng/kg/d ($\Sigma 6$ NDL-PCBs) were significantly higher than controls ($p = 0.002$) (Table 1).

However, perinatal exposure to contaminants had neither significant effect on the activity time [$F(3.66) = 2.45$, $p = 0.07$] nor on the number of rearings [$F(3.66) = 0.63$, $p = 0.59$] or global movement [$F(3.66) = 1.76$, $p = 0.16$]. No interaction between these performances and gender were found. Concerning the speed score of the offspring mice in the home cage, the Kruskal-Wallis test revealed a significant effect of exposure on this performance ($H = 8.25$, p

= 0.04). *Post hoc* Mann–Whitney *U* tests showed that, in the three groups exposed to PCBs, the average speed significantly increased compared to controls: $\Sigma 6$ NDL-PCBs at 85 ($z = -2.08$, $p=0.03$), 216 ($z = -2.09$, $p = 0.034$) and 400 ng/kg/day ($z = -2.58$, $p = 0.009$) (Table 1).

3.4. Acetylcholinesterase activity

In contrast to the hippocampus [$F(3.36) = 5.77$, $p = 0.0027$], three-way ANOVA showed no main effects of early-life exposure to chemically contaminated eel on the acetylcholinesterase activity in the prefrontal cortex [$F(3.36) = 0.920$, $p = 0.44$] and the cerebellum [$F(3.36) = 0.821$, $p = 0.49$]. Nevertheless, it was revealed that the effect of perinatal exposure to eel contaminants on the acetylcholinesterase activity depended on brain area and gender, as interactions between these main factors were found: [exposure $\times$ brain area: $F(6.96) = 7.202$, $p < 0.0001$; exposure $\times$ gender $F(3.96) = 5.887$, $p = 0.001$]. To explore these interactions, separate one-way ANOVA analyses were performed, and thus males and females were analyzed separately, focusing on each brain region. In the prefrontal cortex, no effect of exposure during the gestational and breast feeding period to contaminants was found in males [$F(3.16) = 0.373$, $p = 0.77$]. However, there was an exposure effect on acetylcholinesterase activity in females [$F(3.16) = 6.559$, $p = 0.0042$]. In the hippocampus, a main effect of exposure was observed in offspring mice in both males and females [$F(3.16) = 8.481$, $p = 0.013$ and $F(3.16) = 6.271$, $p = 0.0015$, respectively]. In the cerebellum, no effect of exposure was found in males [$F(3.16) = 0.940$, $p = 0.44$] and females [$F(3.16) = 1.123$, $p = 0.36$]. *Post-hoc* comparisons revealed that acetylcholinesterase activity was significantly inhibited in the prefrontal cortex of exposed offspring females at the lowest and the highest doses during perinatal periods, in comparison to controls (85 ng/kg/day ($p = 0.01$) and 400 ng/kg/day ($p = 0.0006$)) (Table 2). In addition, *Post-hoc* comparisons revealed that acetylcholinesterase activity was significantly inhibited only in the hippocampus of exposed offspring females (85

ng/kg/day ($p = 0.0043$), 218 ng/kg/day ($p = 0.0042$) and 400 ng/kg/day ($p = 0.0014$) in comparison to controls (Table 2).

4. Discussion

The present results demonstrated that early-life exposure to dietary contaminants including PCBs via eels ingested by dams during the gestation and lactation period produces late (i.e. at PNDs 195, 305 and 329) and persistent hyperlocomotion in offspring females but not males, according to two behavioral models of general activity i.e., the open field test and the home cage activity test. Furthermore, locomotor hyperactivity in offspring female mice was associated with an inhibition of acetylcholinesterase activity in the hippocampus and the prefrontal cortex.

Throughout pregnancy, the fetus' brain is highly vulnerable to toxic-chemical insults including alcohol, drugs, dietary contaminants and pollutants. Besides this prenatal vulnerability, the human brain presents also a postnatal sensitivity, in particular at the lactational period, constituting a crucial phase for neurodevelopment including neuromaturation [45, 46]. The developing brain is characterized by a not fully established blood-brain barrier, as barrier development is a gradual process that starts in utero and is achieved around 6 months after birth [46]. Therefore, some toxic agents that are normally blocked by the blood-brain barrier can enter the developing brain freely, interfering with specific developmental processes [46]. If a developmental process in the brain is altered, there is little potential for subsequent repair, and the consequences can therefore be permanent or occur later in life [29, 45, 46, 47].

In rodent models, the period of ca. PND10-20 constitutes a specific time window during which exposure to toxic agents (e.g., ethanol, manganese, methylmercury (MeHg)) as well as

physical agents (e.g., traumatic injury and chronic hypoxia) might provoke locomotor hyperactivity [42]. Our findings highlighted the occurrence of hyperactivity in female offspring mice later in life, which resulted from exposure in utero and early postnatal life (until weaning) of immature brain to contaminants including PCBs. It is hypothesized that when optimal brain development occurs, psychomotor hyperactivity in the body is moderated by a control system that connects the olfactory bulb frontally and the entorhinal cortex caudally (entorhinal–hippocampal–septal–prefrontal cortex–olfactory bulb axis); however the interference with the development of this brain axis during a specific postnatal time window results in overactivity [42].

Our results revealed that females whose mothers ingested eel at perinatal periods showed inhibited acetylcholinesterase activity in the hippocampus and the prefrontal cortex in comparison to control females at PND 338. Disturbed functioning of the hippocampus and the prefrontal cortex, belonging to the neural circuit controlling activity, in exposed offspring females might explain their persistent abnormal active behavior. It has also been noted that alterations in the acetylcholinergic system are linked to hyper/hypoactivity [42]. Inhibition of acetylcholinesterase by PCBs has been shown in previous studies [36, 48, 49] including the hippocampus [48, 49], which might be a consequence of induction of cytochrome P450, a source of free radicals [36, 49, 50]. Acetylcholinesterase is an integral part of the acetylcholine system that is involved in many functions in the CNS, including the control of locomotor activity, emotional behavior and cognitive function [51, 33]. However, it is thought that alterations of any neurotransmitter system including dopaminergic, GABAergic, glutamatergic systems may result in increased locomotor activity [42]. In addition to consider lesions or alterations affecting brain regions and neurotransmitter systems as serious factors in the etiology of hyperactivity, hyperlocomotion can also result from other conditions including gene lesions, hormonal alterations (sexual hormones and thyroid hormones), mutation of many

growth factors and their receptors [42]. In this study, only exposed offspring females exhibited hyperactive behavior while exposed offspring males displayed a normal ratio of exploratory activity in the two employed behavioral mouse models. Yet, researchers have ignored how early chemical insult interacts with sex and gonadal hormones to produce sex-dependent effects. It is postulated that early insult alters gonadal hormone expression or function [45, 54, 55], or alternatively, hormones do alter the nature of the insult [45, 56].

The adverse effects of PCB exposure, including early life, on activity are well established. For example, it has been found that exposure to either Aroclor 1248 or PCB-contaminated St. Lawrence river fish around puberty produced hyperactivity and impulsiveness in adult male rats [57]. In the present study, hyperactivity was detected at late stages, but only in offspring female mice. Thus, an alteration of sexual hormones cannot be excluded. For instance, it has been reported that early-life exposure to PCBs and dioxins is associated with gonadal hormone levels in both genders, including reduced cord serum testosterone and estradiol levels in females and males, respectively [58]. Unlike the home cage test, representing a non-constraining situation as the environment is familiar; the open field test involves constraining situations due to the forced exploration in the paradigm. In this study, mouse exploration into the open field was done at distinct postnatal periods (PNDs 47, 195 and 329). Repeated testing in the open field may provoke habituation to the test, which in turn, may diminish the effect of the novelty on the activity. Hyperactivity in offspring female mice was observed at PNDs 195 and 329, suggesting that the eel contaminants significantly increased their walking speed in the open field. Speed activity in the home cage was significantly faster in offspring female mice than controls, suggesting that early-life exposure to eel contaminants induces overactivity in females. The covered distance in the home cage was significantly influenced only in the offspring mice exposed to the highest concentration of PCBs.

In addition to PCBs, eel muscle contains other contaminants including MeHg. Combined exposure to MeHg and PCBs at early life may result in motor dysfunctions, following interactive effects, in particular on the cerebellum [59]. However, in vitro studies showed that at higher concentrations or longer durations, the two chemicals antagonized each other [59]. Epidemiological studies of developmental PCB and MeHg exposure have mainly focused on cognitive outcomes with some indications on motor impairments [59]. However, several epidemiological studies have demonstrated the negative effect of developmental exposure to PCBs on activity. The offspring of Japanese and Taiwanese pregnant women ingesting rice oil contaminated with PCBs suffered from hypoactivity [60] and hyperactivity [61], respectively. A prospective epidemiological investigation involving children whose mothers resided near a PCB-contaminated harbor in New Bedford (MA) has demonstrated a link between perinatal exposure to organochlorines, and particularly PCBs (including 118, 138, 153 and 180), with inattentive and impulsive behaviors.⁶² In this cohort study, only boys were affected. In line with this result, several studies have pointed out that early-life exposure to PCBs constitutes a risk factor for attention deficit/hyperactivity disorder (ADHD) [62, 63] and poorer response inhibition in children⁶⁴.

In keeping with human data, developmental studies on animal models have also emphasized that early-life exposure to PCBs can result in hyperactive and hypoactive behavioral phenotypes; these behavioral abnormalities, which were sometimes gender specific, remain among the most observed effects of PCBs [32-34, 65, 66]. Supplementary table 1 summarizes some data obtained from early-life exposure to PCBs on activity in animal models [28, 30, 32-35, 65-67]; the discrepancy between results is attributed to differences in the time of exposures, the type of mixtures or individual compounds employed, dosage used, etc. For instance, xenobiotics in mixtures, contrary to individual conditions, function additively, synergistically or even antagonistically, resulting in specific responses that vary based on the

complexity of the mixtures. The toxicity of NDL-PCBs also depends on differences in their metabolism, absorption and excretion, as less chlorinated congeners such as PCB 52 and 101 are more easily metabolized and excreted than the more persistent ones (PCB 138, 153 and 180) [68]. Dioxins and DL-PCBs share the same mechanism of toxicity, mediated through the aryl hydrocarbon (Ah) receptor. In contrast, NDL-PCBs elicit their effects via multiple toxicity pathways, inducing oxidative stress, suppressing cellular communication and inhibiting apoptosis, without involving Ah receptors [18, 24]. Therefore, PCBs elicit an array of toxicological effects, e.g. carcinogenicity as well as effects on liver, thyroid, immune function and reproduction. PCBs, comprising 209 congeners, are also neurotoxins and endocrine disrupters eliciting neurological, neuroendocrine, and endocrine effects [18, 24]. Thus, behavioral toxicity resulting from PCB effects on the nervous and the hormonal system might have gender-specific consequences, as emphasized in supplementary table 1).

This study has stressed that chemically contaminated eel fed to pregnant and lactating mouse dams causes hyperactivity in their female offspring. We cannot affirm that the hyperactive phenotype exhibited by females at progressive stages is completely attributed to PCBs, as other toxic contaminants can also exist in eels, including heavy metals, other POPs such as dioxins, PAHs, polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and organochlorine pesticides. Our results emphasize the importance to take into account the gender in the developmental studies assessing the risk of chemicals as it could be a confounding factor. Organic and inorganic chemicals including PCBs, dioxins, PBDEs, MeHg and lead are known as endocrine disrupters, and effects may therefore be gender dependent. However, PCBs are plausible hazardous compounds to induce locomotor activity, given the effects seen in earlier studies (see Supplementary table 1). Even though this study assesses the risk-benefit ratio of polluted eel (as fatty fish composition includes “healthy and nutritious” components, such as omega-3 fatty acids and selenium, and “bad” components such as POPs or methylmercury,

principally of anthropic origin), we suggest that the gender-specific hyperactivity encountered later in life in mice does have the “behavioral signature” of PCBs.

When taking into account the safety factor of 10, which considers uncertainty in extrapolating animal research to human, the doses used in this study reflect realistic human exposure to PCBs. The interspecies uncertainty factor that is widely adopted in the goal of protecting human health, extrapolating results from animals, assumes that humans may be 10-fold more sensitive than animal models [39]. However, it has been debated that mammalian phylogenetic distance between human and most animal models used including rodents represents orders with class differences, and thus a 65 to 87 fold-uncertainty factor rather than the 10-fold factor may be applicable, which is more appropriate when the comparisons represents species-within-genus [39].

In conclusion, our results suggest a late hyperactive gender-effect of earlier exposure to contaminated eels. The nutrients ingested via the eels, such as omega-3 fatty acids, did not fully protect against the detrimental effects of contaminants including PCBs. Despite advices given by the public health agencies to reduce eel consumption by estimating a portion as only 70 g for a 60 kg adult (unlike other fatty fishes, for which a portion has been estimated to be 140 g)⁴, we think that women of childbearing age, pregnant or nursing women should avoid eel consumption, as they are considered sensitive populations for neurodevelopmental risks.

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) . River eels used in this study were fished for a scientific study sponsored by the Service Public de Wallonie, DGO “Agriculture, Ressources Naturelles et Environnement, n° 10/65/593”. The authors thank Prof. P. Poncin for river eel fishing, and Prof. J-P. Thomé, Prof. G. Eppe and Dr. G. Scholl from the CART of the ULg for their assistance over the analytical behavior.

References

1. Albert, C. M., Hennekens, C. H., O'Donnell, C. J., Ajani, V. J. Carey, U. A., Willett, W. C., Ruskin, J. N. and Manson, J. E. (1998) Fish consumption and risk of sudden cardiac death. *J. A. M. A.* 279, 23–28.
2. Burr, M. L., Fehily, A. M., Gilbert, J. F., Rogers, S., Holliday, R. M., Sweetnam, P. M., Elwood, P. C. and Deadman, N. M. (1989) Effects of changes in fat, fish, and fibre intakes on death and myocardial rein farction: diet and rein farctiontrial (DART). *Lancet.* 2,757–761.
3. Daviglus, M. L., Stamler, J., Orencia, A. J., Dyer, A. R., Liu, K., Greenland, P., Walsh, M. K., Morris, D. R. and Shekelle, B. (1997) Fish consumption and the 30-year risk of fatal myocardial infarction. *New Engl. J. Med.* 336, 1046–1053.
4. Scientific advisory committee on nutrition (2004) Advice on fish consumption: benefits and risks. London.
5. Jorgensen, M. H., Hernell, O., Hughes, E. and Michaelsen, K. F. (2001) Is there a relation between docosahexaenoic acid concentration in mothers' milk and visual development in term infants. *J. Pediatr. Gastro. Enterol. Nutr.* 32, 293–296.
6. O'Connor, D. L., Hall, R., Adamkin, D., Auestad, N., Castillo, M., Connor, W. E., Connor, S. L., Fitzgerald, K., Groh-Wargo, S., Hartmann, E.E., Jacobs, J., Janowsky, J., Lucas, A., Margeson, D., Mena, P., Neuringer, M, Nesin, M., Singer, L., Stephenson, T., Szabo, J. and Zemon, V. (2001) Growth and development in preterm infants fed long-chain polyunsaturated fatty acids: a prospective, randomized controlled trial. *Pediatrics.* 108, 359–371.
7. Olsen, S. F. and Secher, N. J.(2002) Low consumption of seafood in early pregnancy as a risk factor for preterm delivery: prospective cohort study. *B. M. J.* 324, 447–450.
8. Lichtenstein, A. H., Appel, L. J., Brands, M., Carnethon, M., Daniels, S., Franch, H. A., Franklin, B., Kris-Etherton, P., Harris, W. S., Howard, B., Karanja, N., Lefevre, M., Rudel, L.,

Sacks, F., Van Horn, L., Winston, M. and Wylie-Rosett, J. (2006) Diet and life style recommendations revision: A scientific statement from the American Heart Association Nutrition Committee *Circulation*;114, 82–96.

9. Weaver, K. L., Ivester, P., Chilton, J. A., Wilson, M. D., Pandey, P., Chilton, F. D. (2008) The content of favorable and unfavorable polyunsaturated fatty acids found in commonly eaten fish. *J. Am. Diet. Assoc.* 108, 1178–1185.

10. Crawford, M. A. (1993) The role of essential fatty acids in neural development: implications for perinatal nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* 57, 703S–710S.

11. Dangour, A. D. and Uauy, R. (2008) n–3 long-chain polyunsaturated fatty acids for optimal function during brain development and ageing. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* 17, 185–188.

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

13. Wainwright, P. E. (2002) Dietary essential fatty acids and brain function: a developmental perspective on mechanisms. *Proc. Nutr. Soc.* 61, 61–69.

14. Ryan, A. S., Astwood, J. D., Gautier, S., Kuratko, C. N., Nelson, E. B. and Salem, N. J. (2010) Effects of long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation on neurodevelopment in childhood: a review of human studies. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty. Acids.* 82, 305–314.

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

16. FAO/WHO, Report of the Joint FAO/WHO (2011). Expert Consultation on the Risks and Benefits of Fish Consumption Rome, Food and Agriculture Organization of the United Nations; Geneva, World Health Organization, 1–50.

17. Takaomi A. (2013) Bioaccumulation of organochlorines in relation to the life history in the white-spotted charr *Salvelinus leucomaenis*. Mar. Pollut. Bull. 67, 166–176.
18. EFSA, European Food Safety Authority Scientific report of EFSA. (2010). Results of the monitoring of non dioxin-like PCBs in food and feed. EFSA J. 8, 1–38.
19. Belpair, C. and Goemans, G. (2007) The European eel *Anguilla anguilla*, a reporter of the chemical status for the water framework directive. Life Environ. 57, 235–252.
20. Oliveria Ribeiro, C. A., Vollaie, Y., Coulet, E. and Roche, H. (2008) Bioaccumulation of polychlorinated biphenyl in the eel (*Anguilla anguilla*) at the Camargue Nature Reserve- France. Environ. Pollut. 153, 424–431.
21. Szlinder-Richer, J., Usydus, Z. and Pelcazarski, W. (2010) Organochlorine pollutants eel (*Anguilla anguilla* L.) from Poland. Chemosphere. 80, 93–99.
22. Bertin, L. (1951) Les anguilles. Variation, croissance, euryhalinité, toxicité, hermaphrodisme juvénile et sexualité, migrations, métamorphoses. Paris Payot.
23. Pujolar, J. M., Bevacqua, D., Andrello, M., Coccioni, F., Ciccotti, E., De Leo, G. A. and Zane, L. (2011) Genetic patchiness in European eel adults evidenced by molecular genetics and populations dynamics modelling. Mol. Phylogenet. Evol. 58, 198–206.
24. EFSA, European Food Safety Authority (2005) Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to the presence of non dioxin-like polychlorinated biphenyls (PCB) in feed and Food. EFSA J. 1–137.
25. Van Ginneken, V., Palstra, A., Leonards, P., Nieveen, M., Van Den Berg, H., Flik, G., Spanings, T., Niemantsverdriet, P., Van den Thillart, G. and Murk, A. (2009) Aquat. Toxicol., 92, 213–220.
26. ANSES - Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (2006). ANSES J, 1–160.

27. EU, Commission Regulation (EU) No. 1259/2011 of 2 December amending Regulation (EC) No 1881/2006 as Regards maximum levels of dioxins-like PCBs and non-dioxin-like PCBs in foodstuffs. European Commission, Brussels, Belgium. 2011
28. Boix, J., Cauli, O., Leslie, H. and Felipo, V. (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. *Neurochem. Int.* 58, 69–77.
29. Bouayed, J., Desor, F., Rammal, H., Kiemer, A. K., Tybl, E., Schroeder, H., Rychen, G. and Soulimani, R. (2009) Effects of lactational exposure to benzo[α]pyrene (B[α]P) on postnatal neurodevelopment, neuronal receptor gene expression and behaviour in mice. *Toxicology*. 259, 97–106.
30. Cauli, O., Piedrafita, B., Lansola, M. and Felipo, V. Gender differential effects of developmental exposure to methyl-mercury, polychlorinated biphenyls 126 or 153, or its combinations on motor activity and coordination. *Toxicology*, 2012, 311, 61–68.
31. Holene, E., Nafstad, I., Skaare, J. U. and Sagvolden, T. (1998) Behavioural hyperactivity in rats following postnatal exposure to sub-toxic doses of polychlorinated biphenyl congeners 153 and 126. *Behav. Brain Res.* 94, 213–224.
32. Lesmana, R., Shimokawa, N., Takatsuru, Y., Iwasaki, T. and Koibuchi, N. (2014) Lactational exposure to hydroxylated polychlorinated biphenyl (OH-PCB 106) causes hyperactivity in male rat pups by aberrant increase in dopamine and its receptor. *Environ. Toxicol.* 29, 876–883.
33. Kuriyama, S. N. and Chahoud, I. (1994) In utero exposure to low-dose 2,3,4,4,5-pentachlorobiphenyl (PCB 118) impairs male fertility and alters neurobehavior in rat offspring. *Toxicology*. 202, 185–197.

34. Eriksson, P. and Fredriksson, A. (1996) Developmental neurotoxicity of four ortho-substituted polychlorinated biphenyls in the neonatal mouse. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* L. 155–165.
35. Elnar, A. A., Diesel, B., Desor, F., Feidt, C., Bouayed, J., Kiemer, A. K. and Soulimani, R. (2012) Neurodevelopmental and behavioral toxicity of lactational exposure to the sum of six indicator non-dioxin-like-polychlorinated biphenyls ($\Sigma 6$ NDL-PCBs) in offspring mice. *Toxicology*. 299, 44–54.
36. Payne, J. F., Mathieu, A., Melvin, W. and Fancey, L. L. (1996) Acetylcholinesterase, an old biomarker with a new future? Field trials in association with two urban rivers and a paper mill in New found land. *Marine Pollution Bulletin*, 32, 225–231.
37. Dridi, I., Leroy, D., Guignard, C., Scholl, G., Bohn, T., Landoulsi, A., Thomé, J-P., Eppe, G., Soulimani, R. and Bouayed, J. (2014) Dietary early-life exposure to contaminated eels does not impair spatial cognitive performances in adult offspring mice as assessed in the Y-maze and the Morris water maze. *J. Nutr. Res.* 12, 1075–1084.
38. OECD-Organization for Economic Co-operation and Development (2007). OECD guideline for the testing of chemicals. Developmental Neurotoxicity Study.
39. Calabrese, E. J and Baldwin, L. A. (1994) A toxicological basis to derive a generic interspecies uncertainty factor. *Environ. Health Persp.* 102, 14–17.
40. Tilson H.A., Jacobson, J.L. and Rogan, W.J. (1990) Polychlorinated biphenyls and the developing nervous system cross-species comparisons. *Neurotoxicol. Teratol.* 12, 239–248.
41. Bouayed, J., Bohn, T., Tybl, E., Kiemer, A. K. and Soulimani, R. (2012) Benzo[α]pyrene-induced anti-depressive-like behaviour in adult female mice: Role of monoaminergic systems. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 110, 544–550.

42. Viggiano D. (2008) The hyperactive syndrome: Metanalysis of genetic alterations, pharmacological treatments and brain lesions which increase locomotor activity. *Behav. Brain Res.* 194, 1–14.
43. Sluka, K. A., Rasmussen, L. A., Edgar, M. M., O'Donnell, J. M., Walder, R. Y., Kolker, S. J., Boyle, D. L. and Firestein, G. S. (2013) Acid-sensing ion channel 3 deficiency increases inflammation but decreases pain behavior in murine arthritis. *Arthritis Rheum.* 65, 1194–1202.
44. Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V. and Featherstone, R. M. (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharm.* 7, 88–95.
45. Andersen, S. L. (2003) Trajectories of brain development: point of vulnerability or window of opportunity. *Neurosci Biobehav Rev*, 27, 3–18.
46. Rodier, P. M. (1991) Developing brain as a target of toxicity. *Environ. Health Perspect.* 103, 73–76.
47. Landrigan, P. J., Sonawane, B., Butler, R. N., Trasande, L., Callan, R. and Droller, D. (2005) Early environmental origins of neurodegenerative disease in later life. *Environ. Health Perspect.* 113, 1230–1233.
48. Selvakumar, K., Bavithra, S., Krishnamoorthy, G., Venkataraman, P. and Arunakaran, J. (2012) Polychlorinated biphenyls-induced oxidative stress on rat hippocampus: A neuroprotective role of quercetin. *The Scientific World Journal*, doi:10.1100/2012/980314.
49. Venkataraman, P., Krishnamoorthy, G., Vengatesh, G., Srinivasan, N., Aruldas, M. N. and Arunakaran, J., (2008) Protective role of melatonin on PCB (Aroclor 1254) induced oxidative stress and changes in acetylcholine esterase and membrane bound ATPases in cerebellum, cerebral cortex and hippocampus of adult rat brain. *Int. J. Devl. Neuroscience.* 26, 585–591.
50. Parkinson, A., Safe, S. H., Robertson, L. W., Thomas, P. E., Ryan, D. E., Reik, L. M. and Levin, W. (1983) Immunochemical quantitation of cytochrome P-450 isozymes and epoxide

hydrolase in liver microsomes from polychlorinated or polybrominated biphenyl-treated rats. A study of structure–activity relationships. *J. Biol. Chem.* 258, 5967–5976.

51. Everitt, B. J. and Robbins, T. W. (1997) Central cholinergic systems and cognition. *Annu. Rev. Psychol.* 48, 649–684.

52. Taly, A., Corringer, P.-J., Guedin, D., Lestage, P. and Changeux, J.-P. (2009) Nicotinic receptors: allosteric transitions and therapeutic targets in the nervous system. *Nat. Rev. Drug Discov.* 8, 733–750.

53. Wess, J., Eglen, R. M. and Gautam, D. (2007) Muscarinic acetylcholine receptors: mutant mice provide new insights for drug development. *Nat. Rev. Drug Discov.* 6, 721–733.

54. Edwards, H. E., MacLusky, N. J. and Burnham, W. M. (2000) The effect of seizures and kindling on reproductive hormones in the rat. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 24, 753–762.

55. McGivern, R. F., Handa, R. J. (1996) Prenatal exposure to drugs of abuse: methodological considerations and effects on sexual differentiation. *NIDA Res. Monogr.* 164, 78–124.

56. Allen, N. B., Lewinsohn, P. M. and Seeley, J. R. (1998) Prenatal and perinatal influences on risk for psychopathology in childhood. *Dev. Psycho. Pathol.* 10, 513–529.

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

58. Cao, Y., Winneke, G., Wilhelm, M., Wittsiepe, J., Lemm, F., Furst, P., Ranft, U., Imohl, M., Kraft, M., Oesch-Bartlomowicz, B. and Kramer, U. (2008) Environmental exposure to dioxins and polychlorinated biphenyls reduce levels of gonadal hormones in newborns: results from the Duisburg cohort study. *Int. J. Hyg. Environ. Health*, 11, 30–39.

59. Roegge, C. S. and Schantz, S. L. (2006) Motor function following developmental exposure to PCBs and/or MEHG. *Neurotoxicol and Teratol.* 28, 260–277.

60. Harada, M. (1976) Intrauterine poisoning: clinical and epidemiological studies and significance of the problem. *Bull. Inst. Constitutional Med. (Suppl)*, 25, 1–60.
61. Chen, Y. C., Yu, M. L., Rogan, W. J., Gladen, B. C. and Hsu, C. C. (1994) A 6-year follow-up of behavior and activity disorders in the Taiwan Yu-cheng children. *Am. J. Public Health*, 84, 415–421.
62. Eubig, P. A., Aguiar, A. and Schantz, S. L. (2010) Lead and PCBs as risk factors for attention deficit/hyperactivity disorder. *Environ Health Perspect.* 118, 1654–1667.
63. Sagiv, S. K., Thurston, S. W., Bellinger, D. C., Altshul, L. M. and Korrick, S. A. (2012) Neuropsychological measures of attention and impulse control among 8-Year-old children exposed prenatally to organochlorines. *Environ. Health Perspect.* 120, 904–909.
64. Stewart, P., Fitzgerald, S., Reihman, J., Gump, B., Lonky, E., Darvill, T., Pagano, J. and Hauser, P. (2012) Prenatal PCB exposure, the corpus callosum, and response inhibition. *Environ. Health Perspect.* 111, 1670–1677.
65. Sugawara, N., Nakai, K., Nakamura, T., Ohba, T., Suzuki, K., Kameo, S., Satoh, C. and Satoh, H. (2006) Developmental and neurobehavioral effects of perinatal exposure to polychlorinated biphenyls in mice. *Arch. Toxicol.* 80, 286–292.
66. Colciago, A., Casati, L., Mornati, O., Vergoni, A. V., Santagostino, A., Celotti, F. and Negri-Cesi, P. (2009) Chronic treatment with polychlorinated biphenyls (PCB) during pregnancy and lactation in the rat. Part 2: Effects on reproductive parameters, on sex behaviour, on memory retention and on hypothalamic expression of aromatase and 5 α -reductases in the offspring. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 239, 46–54.
67. Tian, Y-H., Kim, S. H., Lee, S-Y. and Jang, C-G. (2011) Lactational and postnatal exposure to polychlorinated biphenyls induces sex-specific anxiolytic behavior and cognitive deficit in mice offspring. *Synapse.* 65, 1032–1041.

68. Van Larebeke, N., Hens, L., Schepens, P., Covaci, A., Baeyens, J., Everaert, K., Bernheim, J. L., Vlietinck, R. and De Poorter, G. (2001) The Belgian PCB and dioxin incident of January-June 1999: exposure data and potential impact on health. *Environ. Health Perspect.* 109, 265–273.

Figure legends

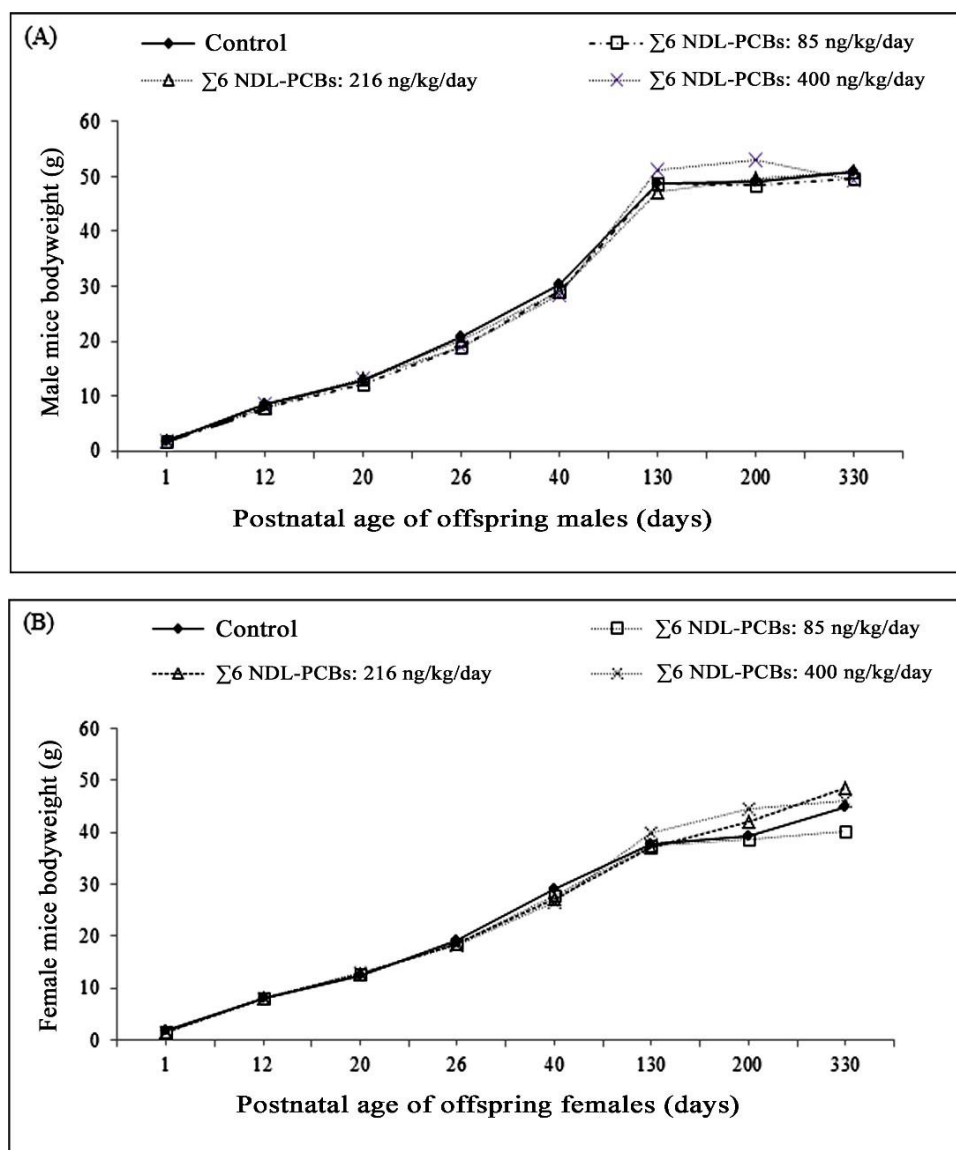


Figure 1. Postnatal evolution of the body weight of male (A) and female (B) mice, which were exposed during the perinatal period to chemically contaminated eel containing PCBs, in which the concentration is estimated by PCB indicators ($\Sigma 6$ NDL-PCBs), present in the eel matrix at 85, 216 and 400 ng/kg, compared to control offspring mice whose mothers received the standard diet without fish (PCB-free diet, n=7-10/sex/group). Body weight of offspring mice was assessed at PNDs: 1, 12, 20, 26, 40, 130, 200 and 330. The data are reported as mean.

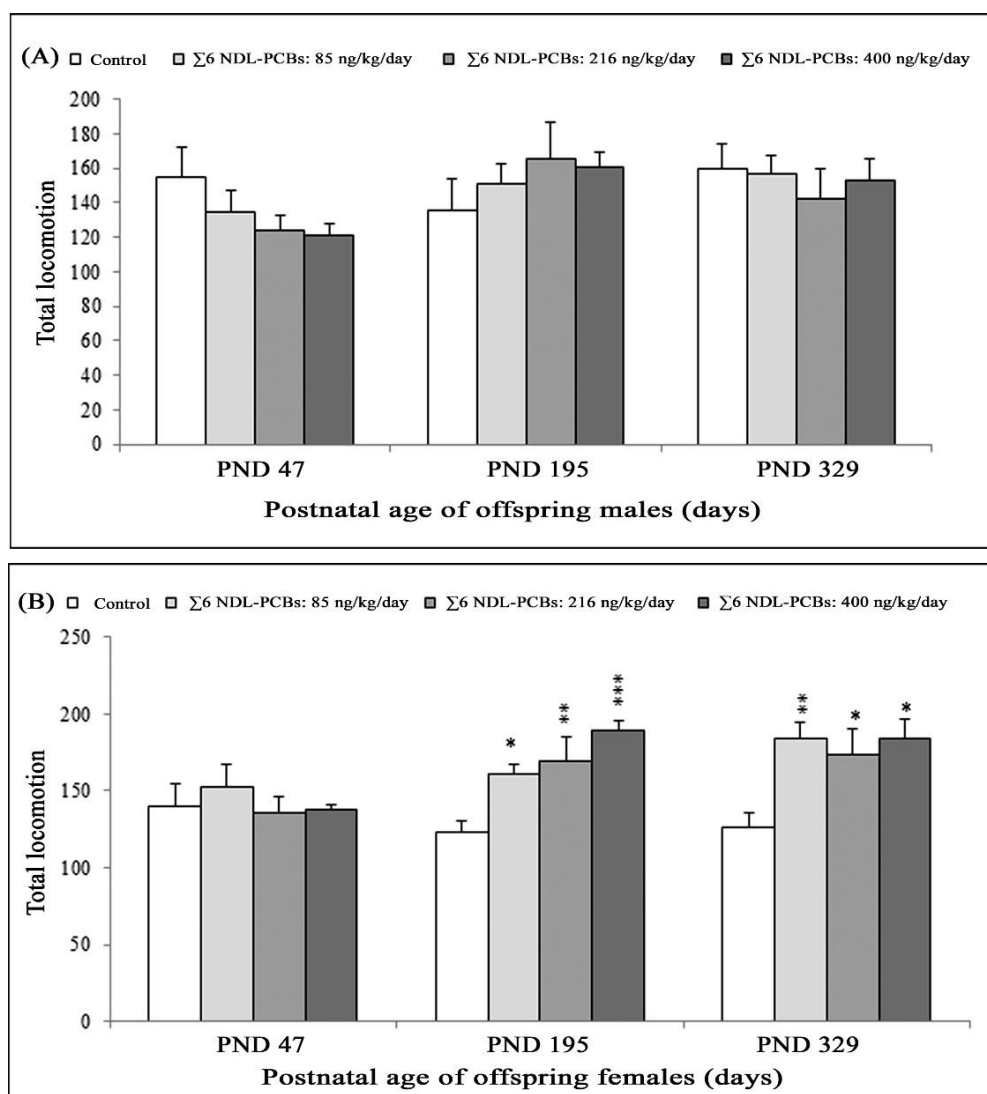


Figure 2. The effect of perinatal exposure to chemically contaminated eel containing PCBs, in which the concentration is estimated by PCB indicators ($\Sigma 6$ NDL-PCBs), present in the eel matrix at 85, 216 and 400 ng/kg, on the motor activity of offspring male (A) and female (B) mice assessed in the open field test on PND 47, PND 195 and PND 329 compared to control mice whose mothers received the standard diet without fish (PCB-free diet). (n=7-10/sex/group). The data are reported as mean $\pm$ SEM. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001 significantly different from the control. PND= postnatal day.

Table 1. The effect of gestational and lactational exposure to PCB-contaminated eel on the motor activity (as assessed in the home cage activity test at PND 305) of offspring mice. PCB concentration in eel was estimated by non-dioxin-like PCB indicators ($\Sigma 6$ NDL-PCBs) present in the eel matrix at 85, 216 and 400 ng/kg. Effects in offspring mice are compared to control offspring mice whose mothers received the standard diet without eel (PCB-free diet).

Performance tests	$\Sigma 6$ NDL-PCBs (ng/kg/day)							
	0 (control)		85		216		400	
	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female
Covered distance (cm)	1652 $\pm$ 227	1378 $\pm$ 115	1652 $\pm$ 189	2224 $\pm$ 264	1878 $\pm$ 304	2100 $\pm$ 207	1856 $\pm$ 271	3411 $\pm$ 591 ^{***}
Activity time (s)	736 $\pm$ 67	839 $\pm$ 21	838 $\pm$ 20	782 $\pm$ 49	825 $\pm$ 20	844 $\pm$ 20	861 $\pm$ 24	889 $\pm$ 3
Number of rearing	275 $\pm$ 73	265 $\pm$ 55	264 $\pm$ 34	220 $\pm$ 81	192 $\pm$ 39	231 $\pm$ 29	238 $\pm$ 41	302 $\pm$ 47
Global movement	460 $\pm$ 68	531 $\pm$ 45	634 $\pm$ 56	495 $\pm$ 79	613 $\pm$ 44	580 $\pm$ 54	560 $\pm$ 71	680 $\pm$ 40
Average speed (cm/s)	3 [2.47-3.82]	2.9 [2.07-3.25]	3.15 [3-3.75]	4 [*] [3.2-4.92]	3.2 [2.07-3.95]	4.2 [*] [3.2-5]	3.1 [3-4.42]	3.6 ^{**} [3.35-5.55]

The data are reported as the mean $\pm$ S.E.M or median [IQ25 - IQ75]. (n=7-10 mice/gender/group). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ significantly different from the respective control.

Table 2. The effect of gestational and lactational exposure to PCB-contaminated eel on the acetylcholinesterase activity (assessed in the prefrontal cortex, the hippocampus and the cerebellum) of offspring mice. PCB concentration in eel was estimated by non-dioxin-like PCB indicators ($\Sigma 6$ NDL-PCBs) present in the eel matrix at 85, 216 and 400 ng/kg. Effects in offspring mice are compared to control offspring mice whose mothers received the standard diet without eel (PCB-free diet).

Acetylcholinesterase activity [#]	$\Sigma 6$ NDL-PCBs doses ng/kg/day							
	0 (control)		85		216		400	
	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female
Prefrontal cortex	20.53 $\pm$ 4.6	21.07 $\pm$ 4.44	15.87 $\pm$ 4.85	10.86 $\pm$ 0.52**	23.77 $\pm$ 6.14	14.73 $\pm$ 1.57	24.14 $\pm$ 8.7	6.07 $\pm$ 1.42***
Hippocampus	194 $\pm$ 31	381 $\pm$ 82	178 $\pm$ 35	176 $\pm$ 39**	221 $\pm$ 58	160 $\pm$ 23**	205 $\pm$ 23	125 $\pm$ 9**
Cerebellum	85.17 $\pm$ 21.61	62.45 $\pm$ 11.64	62.45 $\pm$ 11.64	84.76 $\pm$ 12.83	86.15 $\pm$ 12.23	76.77 $\pm$ 11.69	61.29 $\pm$ 6.37	62.37 $\pm$ 6.4

The data are reported as mean $\pm$ S.E.M. (n=5 mice/gender/group). [#]nmol acetylcholine hydrolyzed per minute per milligram protein. ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ significantly different from the control.

Supplementary table 1: Compilation of developmental data on PCB effects on motor activity in offspring rodents

Developmental exposure	PCB congeners or mixtures used	Doses	Effects on motor activity and age of assessment	Biochemical analyses	References
Prenatal exposure	OH-PCB 106 ^s	0.5*, 5*or 50 mg/kg (every 2 nd day from GD3 to GD13)	Gender selective hyperactivity only in male offspring but not in female rats (assessed at PND 28)	Dopamine level* and its receptors D ₁ , D ₂ *-D ₅	[32]
	PCB 118	375µg/kg (single dose at GD6)	Late hyperactivity both in offspring male and female rats (assessed at PND 30-34 and PND 70-74*)	Testosterone and LH levels measured at PND 170	[33]
Postnatal exposure	PCBs : 28*, 52* [#] , 118 or 156	0.18 - 3.6 mg/kg (single dose at PND 10)	*Persistent aberrations in spontaneous behavior (hypoactivity and then hyperactivity in mice, this study was performed only in males) (assessed at 4 months)	The cholinergic nicotinic receptors in the cerebral cortex [#]	[34]
	Arochlor 1254	6-18 mg/kg/day (Dam's exposure PNDs 7-2 plus offspring's exposure PNDs 22-42)	No effects on motor activity neither in males nor in female mice (assessed at PND 35)	Dopamine receptors D ₁ and D ₂ , Dopamine transporter (DTA) and NMDA receptors* in females	[67]
	PCBs : 52 ^φ , 138* ^φ or 180 ^{#,φ}	1mg/kg/day (PND 7 – PND 21)	*Hypoactivity in both male and female offspring rats. # Gender selective hypoactivity occurred only in male but not in female offspring rats (assessed at 4 months of age)	-Extracellular dopamine [#] and glutamate ^φ in the NAcc. -PCB content in striatum and perirenal fat.	[28]
	Σ 6 NDL-PCBs: 28, 52, 101, 138, 153 and 180	1*, 10* [#] or 100 ng/kg/day (PND 1- PND 21)	Transient gender selective hypoactivity produced only in male but not in offspring female mice (assessed at PND 28*, PND 40 and PND 160)	mRNA expression of 5-HT _{1A} , GABA _{Aα1} , MOR ₁ and RyR ₃ [#] in the cerebellum, [#] the prefrontal cortex and the hippocampus	[35]
Perinatal exposure	PCB 126	100 ng/kg/day (GD 7- PND 21)	Transient gender selective hypoactivity induced only in female but not in offspring rats (assessed at 2*, 3, 5 and 7 months of age)	ND	[30]
	PCB 153	1mg/kg/day (GD 7- PND 21)	*Transient gender selective hypoactivity induced only in females but not in males, then followed by a [#] late hyperactivity in offspring male and female rats (assessed at 2, 3*, 5, 7 [#] months of age)		
	Arochlor 1254	6, 18*, 54 mg/kg (every 3 days from GD 6 – PND 20)	Transient hypoactivity in mice (this study was performed only in males) (assessed at *8 and 9 weeks of age)	ND	[65]

	Σ PCBs: 126, 138, 153 and 180.	10 mg/kg/day (GD 15-GD19) then twice a week till PND21	No effect on activity in both male and female offspring rats	Hypothalamic expression of both aromatase* and the 5α-reductase*	[66]
--	--------------------------------	--	--	--	------

In the same study (i.e., the same line in the table), when several congeners were used or even several doses were employed for the same congener or mixture, the symbols: *, # and ^ϕ indicate the active dose and the corresponding significant effects either on the activity or the measured biochemical parameters. When several assessments of the activity were carried out, these symbols indicate also the age of rodents on which the effect on motor activity occurred. GABA_{Aα1}: Gamma-aminobutyric acid receptor A subunit alpha-1; GD: gestational day; 5-HT_{1A}: 5-hydroxytryptamine serotonin receptor 1A; ⁵Hydroxylated metabolite of PCB 106; LH: Luteinizing hormone; MOR₁: μ 1-opioïd receptor; NAcc: nucleus accumbens; NMDA: N-methyl-D-aspartic acid; PND: postnatal day; RyR₃: ryanodine receptor 3; ND: not determined.

Article 3:

“Hippocampal-dependent memory deficit induced by perinatal exposure to
polluted eels in middle-aged offspring mice: Sex differential effects”

Article 3: Soualeh et al., “Hippocampal-dependent memory deficit induced by perinatal exposure to polluted eels in middle-aged offspring mice: Sex differential effects” *Toxicol Lett* **280** (2017), 247-258

IF: 3,85/ Q1 Ranking

Dans ce travail, nous avons également évalué l'effet d'une exposition précoce aux anguilles polluées sur les fonctions cognitives des souris d'âge moyen (de 10 à 15 mois), âge analogue chez l'Homme de 39-48 ans. Nous avons trouvé qu'il n'y avait pas d'effet sur la mémoire de travail, évaluée par le labyrinthe Y, et l'apprentissage, évalué par le test de Morris, à cette tranche d'âge. Cependant, la mémoire à long-terme a été altérée chez les souris d'âge moyen d'une façon sexe et dose dépendantes. En effet, seulement la mémoire des femelles périnatement exposées aux anguilles hautement et moyennement polluées a été affectée ; alors que la rétention de leurs homologues mâles ne l'était pas. La mémoire a été évaluée par 3 marqueurs à savoir le temps de latence pour trouver la plateforme submergée 10 jours après la phase d'apprentissage, le temps passé dans la plateforme et le nombre de passage sur la plateforme durant 60 secondes du test. Par ailleurs, nous avons trouvé une inflammation chronique aussi bien chez les souris mâles que femelles, avec une production beaucoup plus prononcée de cytokines pro-inflammatoires, au niveau central, et la myéloperoxydase, au niveau périphérique, chez les mâles. Il est important de souligner que cette inflammation a été découverte dans le cerveau, et les cellules microgliales dès le premier jour de la naissance (JPN 1), et elle a été aussi détectée dans toutes les tranches d'âges (évaluation aux JPN 21, 100 et 330). Il est très connu que les cytokines ont un effet bidirectionnel sur les fonctions cognitives. A fortes doses, ils produisent des déficits cognitifs ; cependant à faibles doses ils sont nécessaires pour les processus d'acquisition et de consolidation. Dans cette étude, nous avons travaillé aussi sur l'hippocampe compte tenu de son rôle dans la mémoire. Une inflammation

hippocampique a été également détectée. De même, au niveau de l'hippocampe des animaux d'âge moyen, il a été trouvé qu'il y a eu une activation significative de la voie MAP kinase p38 mais d'une façon plus prononcée chez les femelles. Cependant, une diminution significative aussi bien de l'activation des voies ERK1/2 que du taux de l'acétylcholine hippocampique ont été trouvée exclusivement chez les femelles. Nos résultats suggèrent une programmation périnatale du déficit de la mémoire chez les souris femelles d'âge moyen par l'inflammation. Les cytokines inflammatoires ont agi sur les voies de MAP kinases (p38 et ERK 1/2) en baissant le taux de l'acétylcholine, ce qui a affecté la mémoire. Nos résultats montrent que le cerveau d'âge moyen est plus vulnérable aux effets d'une exposition précoce aux polluants par rapport au cerveau adulte. Il est fort probable qu'avec l'âge, il y avait eu une sensibilisation de cellules microgliales activées, ce qui expliquerait cette vulnérabilité du cerveau femelle d'âge moyen. En outre, le niveau des cytokines inflammatoires dans le cerveau pourrait expliquer l'effet sexe dépendant sur la mémoire. L'effet perturbateur endocrinien des polluants pourrait aussi expliquer le dimorphisme sexuel observé. Dans cette étude, en dépit que l'anguille d'élevage (l'anguille faiblement polluée) n'a pas induit un déficit cognitif, il reste que cette anguille ne serait pas recommandée pour la consommation comme elle induit l'inflammation qui est un facteur étiologique important. Notre étude a montré que les 3 types d'anguilles et d'une façon dépendante du niveau de contamination ont provoqué de l'inflammation chez les mères, ce qui renforce l'idée de l'origine maternelle de l'inflammation chez la progéniture. Cependant, l'inflammation pourrait avoir une origine placentaire, comme elle pourrait être également induite par une directe interaction des polluants (ou leurs métabolites) avec le fœtus (durant la gestation) et/ou le nouveau-né (durant l'allaitement).

**Hippocampal-dependent memory deficit induced by perinatal exposure to polluted eels
in middle-aged offspring mice: Sex differential effects**

Nidhal Soualeh, Rachid Soulimani, Jaouad Bouayed*

Université de Lorraine, Neurotoxicologie Alimentaire et Bioactivité, BP 4102, 57040 Metz,
France.

* Corresponding author at: Université de Lorraine, BP 4102, 57040 Metz, France.

E-mail address: jaouad.bouayed@univ-lorraine.fr (J. Bouayed).

Abstract

The effects of perinatal exposure to low, intermediate, or highly polluted eels on neonatal, postnatal, adult and middle-aged brain inflammation, and on cognitive performances of middle-aged offspring mice were compared to those of offspring controls. Inflammatory markers in microglia were assessed in offspring on the postnatal days—PNDs 1, 21, 100 and 330. Activated p38MAPK, ERK-1/2 and p65, and acetylcholine levels were assessed in the middle-aged hippocampus. Plasma myeloperoxidase and corticosterone levels were evaluated at PND 330. Learning and its retention, and working memory in middle-aged offspring were assessed using the Morris water maze, and Y-maze. Our results showed enhanced microglia production of inflammatory markers across the lifespan of male as well as female exposed offspring. Inflammation and increased p38 MAPK activation were detected in the exposed middle-aged hippocampus of both exposed sexes. Significant levels of MPO, but not corticosterone, were found in middle-aged males and females perinatally exposed to eels. However, decreases in ERK1/2 and p65 activation, and acetylcholine levels were only detected in female hippocampus exposed to either intermediately or highly polluted eels. Sex selective effects were also detected with regard to memory, the only altered cognitive function. Thus, middle-aged females, but not males, perinatally exposed to either intermediately or highly polluted eels take longer to locate the escape platform, spend considerably less time in the platform and perform less visit to the platform in the retention test. Our results suggest perinatal programming of hippocampal-dependent memory deficit by inflammation in middle-aged offspring, in sex and dose dependent manner.

Key words: Cognitive deficit; Early-life exposure; Microglia; Inflammation; Later-life; Polluted eels; Long-term memory.

1. Introduction

Accumulating evidence indicates that physiology or pathophysiology associated to health or diseases throughout our lifespan may depend on the course of brain development, if remaining normal or rather becoming altered (De Luca et al., 2016; Soualeh et al., 2017; Spencer, 2013a, b; Spencer and Tilbrook, 2009). Brain development trajectory may be incredibly influenced by early-life events including immune challenges (Bilbo and Schwarz, 2009; Marques et al., 2013; Spencer, 2013a). In addition to infections, maternal conditions including elevated body weight, obesity, unhealthy diet such as high-fat or polluted fish-containing diets, trauma or stress and diseases, such as diabetes may constitute factors favoring pro-inflammatory responses (Bolton and Bilbo, 2014; Hale et al., 2014; Marques et al., 2013; Soualeh et al., 2017; Spencer, 2013a, b). Such conditions result in an enhanced cytokine production, which may have maternal, placental, fetal and/or postnatal origin (Hagberg et al., 2015; Hale et al., 2014; Hava et al., 2006), mediating a bi-directional communication between the nervous and immune regulatory systems (ThyagaRajan and Priyanka, 2012; Wilson et al., 2002). The timing of the early challenge is critical since developing brain presents several sensitive time points during neurodevelopment (Ingber and Pohl, 2016; Spencer, 2013b; Spencer et al., 2007; Spencer et al., 2006; Viggiano, 2008). Recently, a particular interest is given to maternal diet, as besides healthy and nutritious components, maternal diet may also contain detrimental ingredients such as persistent organic pollutants—POPs—and mercury, which is the case of fatty fishes including eels, sardines, salmon, mackerel, tuna and trout (SACN, 2004; Soualeh et al., 2017). POPs and heavy metals (or their metabolites) can cross the protective barriers, such as placenta, intestinal as well as blood-brain barrier, and further be available in breast milk (Bouayed et al., 2009b; Elnar et al., 2012; Li et al., 2013; Marques et al., 2013), thereby eliciting brain programming via early-life inflammation (Soualeh et al., 2017). However, besides inflammation, diet constituents may also influence developmental

programming via other mechanisms, e.g. owing to their ability to promote modulations in the offspring gut microbiome, which in turn belongs to the brain-gut-enteric microbiota axis (Borre et al., 2014; Marques et al., 2013; Spencer, 2013a). Therefore, maternal diet can be the conditioning factor of several late effects across our lifespan, including alterations in behavioral and cognitive functions (Hale et al., 2014; Marques et al., 2013; Spencer, 2013a, b).

The purpose of this study is to evaluate late effects of perinatal exposure to polluted eels on cognitive function of offspring mice, considering sex. Our previous results have showed that early-life exposure to polluted eels resulted in differential sex alterations in neonatal, postnatal and adult brain inflammatory responses (Soualeh et al., 2017), and in behavior of offspring mice including activity (Dridi et al., 2017) and resignation (Soualeh et al., 2017). Given that the life stages of offspring mice e.g. mature adult (3-6 months), middle (10-15 months) and old (≥ 18 months) ages, which are equivalent in human years to 22-30, 39-48 and ≥ 57 , respectively (Flurkey et al., 2007), may be determinant for the onset of impairments induced by early-life pollutant exposure (Andersen, 2003; Cauli et al., 2012; Dridi et al., 2017), this study was carried out at middle age, although no effects were found on spatial cognitive performances in juvenile (postnatal day–PND 38, age analogues to periadolescence period in human) and adult (PNDs 120-123) offspring mice (Dridi et al., 2014). Thus, cognitive performances of male and female middle-aged offspring mice perinatally exposed to polluted eels were assessed using the Morris water maze spatial navigation task to evaluate both spatial learning and memory retention, and the Y-maze to evaluate immediate working memory. In addition, inflammation was assessed in microglia isolated from neonatal (PND 1), postnatal (PND 21), adult (PND 100) and middle-aged (PND 330) brains by assessing the levels of interleukin (IL)-1 β , IL4, IL10, IL6, tumor necrosis factor alpha (TNF α), transforming growth factor beta (TGF β), interferon gamma (IFN γ) and nitric oxide (NO). Owing to the role of the hippocampus in learning and memory processes (Broadbent et al., 2004; Karabeg et al., 2013; Miller and Spencer, 2014; Squire, 1992,

1993), the levels of IL1 β , IL4, IL6, TNF α , activated p38 mitogen-activated protein kinases (p38MAPK), activated extracellular signal-regulated kinases (ERK)-1/2, activated nuclear factor NF-kappa-B p65 subunit (p65), and acetylcholine were assessed in the middle-aged hippocampus. Moreover, corticosterone, a stress marker, and myeloperoxidase (MPO), an inflammatory enzyme, were assessed in plasma of middle-aged offspring mice at PND 330. Due to the potential role of maternal inflammation on offspring programming, the plasma levels of IL1 β , IL6, TNF α , and MPO were therefore evaluated in mothers.

2. Materials and Methods

2.1. Animals

Forty pregnant CD1 mice (Charles River, France), obtained after a mating session performed in our laboratory as detailed in our previous study (Bouayed et al., 2009a), were used in this study. The presence of a vaginal plug was designated as the first gestational day (G1). Pregnant females were housed individually in standard cages with *ad libitum* access to water and food pellets (SDS Dietex, St Gratien, France) and they were maintained on a standard 12-hr light/dark cycle (lights “on” starting at 8:00 p.m.), 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 (n= 13-18) were randomly equalized to have n=10 pups/litter, 5 pups/sex in order to prevent litter size bias. In regard to the remaining pups (i.e. at PND 1), only one pup/litter was randomly selected and sacrificed as described below in the section for Biochemical analyses. 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 / cage: 21 x 37 x 15 cm) to exclude effects of sexual pheromones on behavior at adult age. Efforts were made to have a relevant number of females in the same room (>150 females) in order to develop a lengthened estrous cycle, which is a phenomena obtained by effects of the all-female environment

(crowded females) which leads to the suppression of estrus due to a prolonged diestrus (Marsden and Bronson, 1965; Whitten, 1959). Although our strategy aimed to obtain synchronized females, it should be noted that from 8 months age, Swiss albino mice are marked by irregular estrous cycle showing prolonged cycles due to extended diestrus (Kaur, 1994).

During the dark phase (1h 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 4 hours per day of experimentation (i.e. experiments finished at 5h after lights “off” to avoid circadian cycle bias). All animal procedures were carried out in accordance with the relevant European Union regulations (Directive 2010/63/EU), and they were approved by the institutional ethics committee of the University of Lorraine (authorization number CELMEA-2013-0010).

2.2 Perinatal diet manipulation

2.2.1. Eel matrix and pollutant quantification

A permit to fish for eels was obtained from the Ministry of the Walloon region, Belgium (authorization number DNF/DCP/CD705.1 / Sortie 2007: 31416). Five river yellow eels (la Meuse, Belgium) were stunned and caught with a dip net in the spring of 2011. Additionally, 10 reared yellow eels were purchased from Zon-Aquafarming (Helmond, The Netherlands). Biologists from the University of Liège (ULg) identified both the river and the reared eels as *Anguilla anguilla* L. during the autopsy process. Eel muscle was then sampled, separated into two pools according to their origin, freeze-dried, mixed, and stored at -20°C until paste preparation. Levels of pollutants including polychlorinated biphenyls (PCBs), polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins/dibenzofurans (PCDD/Fs), polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), polybrominated diphenyl ethers (BDEs), organochlorine pesticides and metals such as mercury and lead were reported in both reared and river muscle eels, as described in the table. 1 (Soualeh et al., 2017). It is worth noting that eel matrices may contain other unspecified chemicals

(antibiotics, estrogen, etc.). Thus, in this study, river and reared eels were considered to be highly and lowly polluted eels, respectively. In addition, an artificial eel matrix obtained by mixing reared and river eels, at a ratio of 2:1, was used in order to assess the effects of an intermediate level of pollution i.e., intermediately polluted eels (Soualeh et al., 2017).

2.2.2. Eel paste preparation

The contaminated food (paste consisting of eels and chow) was prepared daily for a group of mothers (n=10) by mixing 10 g of powdered food pellets (SDS Dietex, St Gratien, France) with 10 ml of water, 0.5 ml of sweet syrup, and 1 ml of corn oil and 320 mg of lyophilized eels (i.e., low, intermediate, or highly polluted eels) with a kitchen household blender (Robot monofonction Seb Valentin 8553, France) to obtain a homogenous paste (i.e., a mother weighing 40 g ingested 32 mg-dw of eels that corresponded to 0.8 g-dw of eel per kg of body weight (bw) of the mouse). Vigorous mixing was employed to assure complete mixing, following protocols that were established in earlier investigations (Soualeh et al., 2017; Dridi et al., 2014; 2017). On the following day, the obtained homogenous paste was cut into smaller pieces based on the weight of the pregnant and nursing females (40-70g) in order to be delivered as 0.8 g-dw of eel muscle/kg-bw/day to the mice. For control pregnant and lactating mice (n=10), the paste was prepared with the same ingredients cited above but without adding eels, as no unpolluted eels (e.g. no PCB-free eels) could be sourced.

2.2.3. Perinatal exposure to polluted eels:

Pregnant females were allocated to the four experimental groups by stratified randomization; 40 dams ingested the standard diet (food pellets, SDS Dietex, St Gratien, France) plus paste with or without eels on a daily basis from gestational day (GD) 6 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 eaten by each female (during ca. 10-15

min), and no residual paste was found in the cages. Thus, in addition to control mice receiving the standard diet plus paste without eels, three groups of female mice (n=10 per group) ingested polluted eel muscle (0.8 g-dw/kg/day). Eels were delivered to each group of mice based on their pollution levels. Therefore, three groups of pregnant and lactating mice received 0.8 g-dw/kg of eel muscle daily from either the lowly, the intermediately, or the highly polluted eels that contained, for example, the following doses of the sum of the 6 non-dioxin-like (NDL-) PCB indicators: 85, 216 and 400 ng/kg-bw/day, respectively (Soualeh et al., 2017). When extrapolating mice exposure to human consumption of the 6 NDL-PCBs, assuming that humans may be 10-fold more sensitive than animal models (in other words, considering the interspecies uncertainty factor of 10), 85 and 216 ng/kg/day were assumed to reflect human average daily intake of total NDL-PCBs (i.e., 10-45 ng/kg-bw/day), corresponding to a human intake of the 6 NDL-PCBs about 5-23 ng/kg/day, as the sum of these 6 indicators corresponds approximately to 50% of total NDL-PCBs (Dridi et al., 2014; EFSA, 2005). On the other hand, 400 ng/kg/day should reflect high dietary PCB exposure. For example some specific subpopulations (Baltic fishermen), have been reported to ingest from fish up to 40 ng/kg/day of the 6 NDL-PCBs (Dridi et al., 2014; EFSA, 2005).

2.3. Biochemical analyses

For the biochemical analyses, a total of 5 mice (offspring) per sex and group were randomly selected from 10 litters/group (one mouse/litter), anaesthetized with isoflurane and decapitated on PND 1, PND 21, PND 100 as well as PND 330 for which middle-aged mice were randomly picked one day after behavioral testing, as detailed below. Brains (i.e., neonatal, postnatal, adult and middle-aged brains) were removed and weighed, from which microglia cells were isolated to assess the level of their NO and cytokines (i.e., IL-1 β , IL4, IL10, IL6, TNF α , TGF- β and IFN γ), as described below. In addition, the hippocampus was isolated from middle-aged offspring in both sexes (n=5), to assess the following markers: IL-1 β , IL4, IL6 and

TNF α , acetylcholine, p38MAPK, ERK1/2, and p65, a subunit of NF κ B. Hippocampus tissues were homogenized with a Potter homogenizer (glass-Teflon) in an aliquot of 10 mM Tris–HCl (pH 7.4) buffer at 4 °C, and centrifuged at 12,000 rpm for 30 min at 4 °C. The supernatant was collected, aliquoted and stored at -80 °C until analysis. Blood was also collected from male and female middle-aged offspring mice (n=5) in order to assess MPO and corticosterone levels. On the day of weaning (PND 21), a total of 6 mothers per group were randomly selected, euthanized, and bloods were centrifuged and plasma were then frozen to assess the following inflammatory markers: IL-1 β , IL6, TNF α and MPO. Blood samples were taken within 20 seconds of the mothers and middle-aged animals being first handled.

2.3.1. Microglia isolation

On PNDs 1, 21, 100 and 330, brains of male and female offspring mice were collected in order to isolate microglia, from individual brains, according to the manufacturer's protocol (Miltenyi Biotec) with few modifications. Briefly, the brain was removed in DMEM/F12 medium, and then enzymatically digested overnight under stirring at 4°C, using an enzymatic cocktail containing trypsin (10 %), elastase (10 %), collagenase II (2 %), collagenase III (4 %) and DNase (10 %). Afterwards, brain lysates were twice washed with MACS buffer (Miltenyi Biotec), centrifuged (1000 $\times$ g, 4 °C, 20 min), and supernatants were discarded. Cell suspensions were manually triturated, and were passed through a 70 μ m nylon mesh (pre-separation filters, Miltenyi Biotec; Bergisch Gladbach, Germany) to remove tissue debris. After centrifugation (1000 $\times$ g, 4 °C, 20 min) and resuspension in MACS buffer, cells were incubated, at 4°C for 15-20 min, with CD11b microbeads (kit, Miltenyi Biotec; Bergisch Gladbach, Germany) in order to select microglia cells. After centrifugation (1000 $\times$ g, 4 °C, 10 min) and filtration through 30 μ m nylon mesh (pre-separation filters, Partec, France), stained cells were separated on a MiniMACS MS column, according to the manufacturer's instructions (Miltenyi, Biotec). Finally, the magnetically labeled microglia are retained on the column and consecutively flushed out by firmly applying the plunger supplied with the column. The number of cells was counted by trypan blue staining, and normalized to 1.6 million/brain/age. The viability of cells isolated by this method is more than 92%. Cell homogenate was equally divided for all inflammatory markers.

2.3.2. Measurement of cytokine levels

Cytokine levels were evaluated using 7 mouse ELISA kits: IL-1 β , IL4, IL10, IL6, TNF α , TGF- β and IFN γ according to the manufacturer's protocol (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). The absorbance was measured at 450 nm using a microplate reader MR96 A (Mindray, China) and concentrations (pg/ml) were determined using a standard curve provided in each kit.

2.3.3. Nitric oxide (NO) production

NO production was determined using the Griess reaction assay previously described by Green et al, (1982) and Drisch et al., (1998). Briefly, NO was measured by adding 100 μ l Griess reagent (1 % sulfanilamide and 0.1 % naphthylenediamine in 5 % phosphoric acid) to 100 μ l of microglia homogenates. The resulting color was measured at 540 nm by using a DU 720 spectrophotometer (Beckman Coulter, USA). The absorbance values were compared to a standard sodium nitrite curve and the absorbance values were converted to corresponding nitrite concentrations (μ M).

2.3.4. Activated levels of ERK 1/2 and p38 MAP-kinases

Hippocampal MAPK signaling was assessed using ERK 1/2 (pT202/Y204 + Total) and p38 MAPK alpha (pT180/Y182 + Total) ELISA kits (ab176660, ab176664, respectively) according to the manufacturer's instructions (Abcam; Cambridge, UK).

2.3.5. Activated level of p65

p65 NF κ B signaling was assessed in hippocampal nuclear extracts using NF κ B p65 transcription factor assay kit (ab133112) according to the manufacturer's instructions (Abcam; Cambridge, UK).

2.3.6. Acetylcholine (ACh) level

Hippocampal ACh was measured by commercial Choline/ Acetylcholine Assay Kit (ab65345) according to the manufacturer's instructions (Abcam; Cambridge, UK).

2.3.7. Corticosterone Level

Total plasma corticosterone levels were assayed in offspring mice's blood at PND 330 using the ELISA kit purchased from Enzo Life Sciences (sensitivity: 27 pg/ml, Farmingdale, NY, USA) according to the manufacturer's instructions.

2.3.8. Myeloperoxidase (MPO) level

MPO levels were evaluated in plasma collected from whole heparinized blood of offspring mice at PND 330 using a mouse ELISA kit (Catalog #ab155458, sensitivity <0.6 ng/ml; Abcam) according to the user's manual.

2.4. Behavioral testing of middle-aged offspring mice

Behavioral testing was carried out between 10 a.m. and 1 p.m. Tests were conducted in one male and one female picked from each litter (10 litters/group). Thus, 10 pups/sex/group i.e., a total of n=20/group were analyzed. All behavioral experiments were recorded. Middle-aged mice were naive to cognitive tests, and the same animals were tested in both the Morris water maze and Y-maze. Mice were randomly tested and performances were measured by an experienced researcher in a blind manner.

2.4.1. The Morris water maze for spatial learning and memory

The Morris water maze was performed at PNDs 300 and 310 to evaluate spatial learning and memory retention, respectively (Morris, 1984; Vorhees and Williams, 2006). For this purpose, an open circular pool (100 cm in diameter, 45 cm of depth) was chosen, filled ca. half of the height with water ($25 \pm 1^\circ\text{C}$). Twenty-four hours prior to the start of training, mice were habituated to the pool by allowing them to perform a 60 sec swim without the platform. Four different geometric shapes (intramaze cues) were glued in the higher part of the wall of the pool, marking each quadrant. The animal objective was to locate a platform (12 x 12 cm) that was hidden 1 cm underneath the water surface, placed in a fixed position in the middle of one quadrant of the pool (located 12 cm from the wall). The platform was camouflaged by placing skimmed milk powder in the water. Mice were given eight consecutive trials/day (a single training session as described by Morris (1984) and De Quervain et al., (1998). Each trial was

last 60 sec. However, for the first and the second trials, if the mouse exceeded 60 sec, it was gently guided to the platform by the experimenter. After each trial, the mouse remained on the platform for 30 sec, and was then placed in a holding cage for 60 sec until the start of the next trial. In this step, the animal had to learn to navigate a direct path to the hidden platform, resulting in less time for reaching it. On PND 300, the spatial learning task started by gently placing the mouse into the water with its head facing the pool wall, and it had to find the platform in the opposite quadrant. To assess retention of memory, 10 days (i.e. PND 310) post spatial learning task, the mouse had to undergo another trial. The latency (time) to escape to the platform was recorded for each animal. In addition, the time spent in the platform and the number of crossing the platform were recorded during 60 sec for each mouse.

2.4.2. Y-maze for assessing working memory

Immediate working memory performance was assessed at PND 325, by recording spontaneous alternation behavior in a Y-maze (Hughes, 2004). The maze was of black painted wood, each arm 25 cm long, 14 cm high, 5 cm wide and positioned at equal angles. Mice were placed at the end of one arm and allowed to move freely through the maze during 5 min. The number of arm entries was recorded. An arm entry was considered to be completed when the four paws of the mouse were completely placed in the arm. Alternation was defined as triplets of explored arms and counted only if the mouse entered into the three arms of maze (without revisiting the first arm at the third visit). The percentage of spontaneous alternation was calculated as the ratio of successful overlapping alternations by the total possible triplets (defined as the total number of arm entries minus 2) multiplied by 100 (Dridi et al., 2014; Grova et al., 2007) .

2.5. Statistical analyses

As for the acquisition phase in the Morris water maze, the latency escape was analyzed using repeated measures ANOVA, considering perinatal exposure to polluted eels and sex as

between-subject fixed-factors, and trials as the repeated measure. For the memory retention and working memory tasks, as well as MPO and corticosterone levels were analyzed using two-way ANOVA with exposure and sex as the main factors. In addition, two-way ANOVA was used to analyze biochemical parameters assessed in the hippocampus. To analyze neuroinflammatory markers in isolated microglia from entire brain, three-way ANOVA was further used, with exposure, sex and age as independent between-subject factors. To analyze inflammatory markers in blood mothers, one-way ANOVA was used. The significant effects of the exposure were further assessed using Tukey's HSD test when ANOVA results suggested significant differences. The results were reported as the mean ($\pm$ SEM). For all statistical evaluations, the level of significance was set at $p < 0.05$. All statistical analyses were performed using SPSS 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL).

3. Results

3.1. Effects of exposure to eels on plasma inflammatory markers in mothers

The applied one-way ANOVA for inflammatory markers of mothers resulted in a significant main effect of exposure [all $F(3,23) > 3$, $p < 0.05$]. *Post hoc* comparisons showed that exposure to all eel matrices significantly increased the plasma levels of MPO, TNF α and IL1 β (all $p < 0.01$). In addition, exposure to the highly polluted eels significantly enhanced the plasma level of IL6 ($p < 0.05$) (Table. 2).

3.2. Effects of perinatal exposure to eels on inflammatory markers in microglia of neonatal, postnatal, adult and middle-aged brain

The applied three-way ANOVA for cytokine production in microglia resulted in a significant main effect of exposure [all $F(3,128) > 13$, all $p < 0.001$] and age [all $F(3,128) > 2$, all $p < 0.05$]. Again, the effect of exposure was significant for NO [$F(3,128) = 18.61$, $p <$

0.001]. Furthermore, cytokine production, except for IL10 and TGF β , was significantly influenced by the interaction between exposure and age [all $F(9,128) > 1.433$, all $p < 0.05$].

For males as well as females, one-way ANOVA revealed significant differences between the various groups of exposed offspring with regard the majority of inflammatory markers in the different studied brains ($p < 0.05$).

Post hoc comparisons showed that exposure to all eel matrices significantly increased IL1 β levels compared to standard diet alone in the male brains at all life stages (i.e., from PND 1 to PND 330) (all $p < 0.05$) (Table. 3). Similar results were found with regard IL1 β levels in the female brains (all $p < 0.05$), except with exposure to the lowly polluted eels in the postnatal brain (PND 21). Concerning TNF α , exposure to all eel matrices significantly increased its levels in both neonatal male and female brains (PND 1) as well as postnatal male brains (PND 21) (all $p < 0.05$), compared to standard diet alone. However, only intermediate and highly polluted eels significantly increased TNF α levels in postnatal female brains, and adult brains of both males and females (PND 100) (all $p < 0.05$). Additionally, only highly polluted eels significantly increased TNF α levels in the middle-aged male as well as female brains (both $p < 0.01$). Moreover, exposure to the intermediate and highly polluted eels significantly increased both IL6 and IFN γ levels in the postnatal, adult and middle-aged male as well as female brains (all $p < 0.05$). A significant increase was also found for IL6 in the neonatal female brains exposed to the highly polluted eels ($p < 0.05$). In all life stages, the level of NO was significantly increased following exposure to both the intermediate and highly polluted eels ($p < 0.05$). However, all eel matrices significantly increased TGF β levels only in the postnatal brains of both males and females ($p < 0.05$). Furthermore, in the postnatal male and female brains, high IL4 levels were only found to be significant following exposure to the lowly polluted eels ($p < 0.05$). In addition, high IL10 levels were found to be significant following exposure to the lowly and intermediately polluted eels in the neonatal brains of both sexes as well as the postnatal

male brains (all $p < 0.05$). A further significant effect was found for IL10 following exposure to the lowly polluted eels in the brains of postnatal females and middle-aged males (both $p < 0.05$) (Table. 3).

3.3. Effects of perinatal exposure to eels on middle-aged hippocampal markers

The applied two-way ANOVA for IL-1 β , IL6, TNF α , p38MAPK, ERK1/2, p65 and acetylcholine in hippocampus resulted in a significant main effect of exposure [all $F(3,32) = > 6.98$, all $p < 0.001$]. In addition, main effect of sex was found for all markers except for IL6 and TNF α [all $F(1,32) > 10.56$, all $p < 0.01$]. Furthermore, the level of TNF α , acetylcholine, p38MAPK, ERK1/2, and p65 in the hippocampus were significantly influenced by the interaction between exposure and sex [all $F(3,32) > 3.58$, all $p < 0.05$]. For males as well as females, one way-ANOVA analyses demonstrated significant differences between the various groups of exposed offspring mice with respect to IL-1 β , IL6, TNF α , p38MAPK and ERK1/2 [all $F(3,19) > 4.4$, all $p < 0.05$]. In addition, significant differences were only found in females with respect to p65 and acetylcholine [both $F(3,19) > 13.26$, both $p < 0.001$]. For both males and females, *Post hoc* comparisons showed that exposure to all polluted eels significantly increased the levels of IL-1 β , IL6 and TNF α in the hippocampus (all $p < 0.05$). In addition, exposure to intermediately and highly polluted eels significantly increased the levels of p38MAPK, in hippocampus of both sexes (all $p < 0.01$) (Table. 4). In female hippocampus, exposure to intermediately and highly polluted eels significantly decreased the levels of acetylcholine and ERK1/2 (all $p < 0.001$) (Table. 4). Additionally, highly polluted eels significantly decreased the levels of p65 in female hippocampus ($p < 0.05$) (Table. 4).

3.4. Effects of perinatal exposure to eels on plasma corticosterone and MPO levels in middle-aged mice

The applied two-way ANOVA for plasma corticosterone resulted in a significant main effect only on sex [$F(1,32) = 10.55$, all $p < 0.01$] (Fig. 2 A). Concerning MPO levels, two-way ANOVA revealed significant main effect of perinatal exposure to eels [$F(3,32) = 136.76$, $p < 0.001$], and sex [$F(1,32) = 30.92$, $p < 0.001$], with a significant interaction between these two factors [$F(3,32) = 16.74$, $p < 0.001$]. One-way ANOVA showed a significant effect of perinatal exposure to eels for both males [$F(3,16) = 181.49$, $p < 0.001$] and females [$F(3,16) = 25.20$, $p < 0.001$]. Subsequent analyses demonstrated significant effects of exposure to the studied eel matrices for males (all $p < 0.001$) as well as for females (all $p \leq 0.001$) on MPO level (Fig. 2B).

3.5. Effects of perinatal exposure to eels on middle-aged cognitive performances

As for the acquisition phase in the Morris water-maze, repeated measures ANOVA revealed significant main effects for perinatal exposure to polluted eels [$F(3,71) = 3.55$, $p < 0.05$] and trials [$F(7,497) = 65.507$, $p < 0.001$] on learning. An interaction between exposure and trials [$F(21,497) = 1.842$, $p < 0.05$], and also between the 3 main factors “exposure x sex x trials” [$F(21,497) = 1.69$, $p < 0.05$] were found.

For males as well as females, *post hoc* comparisons demonstrated no significant effects of perinatal exposure to eels on the latency time, except for females exposed to the highly polluted eels that spent more significant time to reach the hidden platform, in the trial 2, suggesting the absence of effect of perinatal exposure to eels on the acquisition process in both male and female middle-aged offspring mice (Fig. 3).

As for the consolidation phase in the Morris water-maze, two-way ANOVA revealed significant effects for perinatal exposure to polluted eels [all $F(3,72) > 6.66$, all $p < 0.001$] on long-term memory. For middle-aged males, *post hoc* comparisons revealed no significant differences between the various groups of mice compared to controls with respect to memory retention (all $p = n.s$). In contrast, for middle-aged females, *post hoc* comparisons demonstrated that long-term memory retention was negatively affected only in those perinatally exposed to

both intermediately or highly polluted eels, compared to controls, as they needed significantly more time to reach the escape platform and spent less time in the platform during testing in the retention test (all $p < 0.05$). In addition, these exposed mice exhibited a significant reduction in the number of times that they crossed the platform (both $p < 0.05$) (Fig. 4). When comparing eel matrices, significant differences were found between the highly and the lowly polluted eels with regard the three behavioral indicators used to assess retention in the retention test (all $p < 0.05$) (Fig. 4). However, only a significant difference was found between the intermediately and the lowly polluted eels with regard the time spent in the platform ($p < 0.01$) (Fig. 4B).

As for the working memory task in the Y-maze, two-way ANOVA showed no significant effects for perinatal exposure to polluted eel exposure [$F(3,72) = 1.85$, $p = \text{n.s.}$] and sex [$F(1,72) = 1.27$, $p = \text{n.s.}$] or their interaction [exposure x sex: $F(3,72) = 0.18$, $p = \text{n.s.}$] on the percentage of spontaneous alternation. This result suggests that early-life exposure to polluted eels does not impair immediate spatial working memory in middle-aged male and female mice (Fig. 5).

4. Discussion

We here studied a “cocktail” or “combined” effect of pollutants within eel matrices that may interact with effects from beneficial eel ingredients (e.g. omega-3 PUFAs and selenium) on microglia inflammatory responses across lifespan (PND 1 to PND 330), and some aspects of cognitive function in middle-aged offspring mice perinatally exposed to polluted eels. Thus, in addition to the possibility that the adverse effects of these pollutants might be camouflaged by beneficial eel constituents; contrary to individual conditions, eel pollutants as they occur in the mixture may function additively, synergistically, or even antagonistically, thus resulting in specific responses that vary depending on the complexity of the mixtures (Dridi et al., 2014; Soualeh et al., 2017). Inflammatory responses were assessed in microglia in the

neonatal (PND 1, i.e., the day of birth), the postnatal (PND 21, the day of weaning), the adult (PND 100) and the middle-aged (PND 330) brains of male and female offspring mice whose mothers were fed, during gestation and lactation, polluted eels, reflecting three pollution levels: lowly, intermediately, or highly polluted (Soualeh et al., 2017). In addition to chronic central inflammation, demonstrated by enhanced microglia production of inflammatory markers across the lifespan of offspring (Table. 3), peripheral inflammation, highlighted by significant levels of plasma MPO, was also found in both male and female middle-aged offspring mice perinatally exposed to polluted eels (Fig. 2B). However, our results demonstrated sex and dose dependent deficits in long-term memory retention, as only female middle-aged mice were affected following perinatal exposure to either intermediately or highly polluted eels (Fig. 4). Interestingly, inflammation was also detected in the hippocampus of these mice, a brain region involved in the formation of spatial memory; although the hippocampus of male exposed offspring was too (Table. 4). Consistent with sex selective effects observed only on memory of female offspring, significant decreases in ERK1/2 activation, activated p65, and acetylcholine levels were detected only in female hippocampus exposed to either intermediately or highly polluted eels. Although increased p38MAPK activation was found in the hippocampus of both males and females exposed to intermediately and highly polluted eels; greater effects were rather detected in middle-aged females. Taken together, our results suggest perinatal programming of long-term memory retention deficit in female middle-aged offspring, in a dose-dependent manner. Our results further suggest the alteration of hippocampal dependent memory in middle-aged females by cytokines, exerting their action via ERK1/2 and p38 signaling pathways, resulting in a decrease in the level of hippocampal acetylcholine.

Inflammation plays a pivotal role in cognitive dysfunction (Miller and Spencer, 2014; Moieni et al., 2015; Simen et al., 2011; Wilson et al., 2002). In addition to central inflammation, peripheral inflammation was also linked to lower cognitive performances in animal models

(Murray et al., 2010; Wilson et al., 2002; Zhang et al., 2009) as well as human, as observed e.g., in people experiencing acute infection (Elison et al., 2008; Reichenberg et al., 2001; Wilson et al., 2002). Inflammation is also linked to both age-related cognitive decline and pathological aging processes such as Alzheimer's disease (Dilger and Johnson, 2008; Lee et al., 2008; Miller and Spencer, 2014; Wilson et al., 2002). Activated microglia are the major source of pro-inflammatory cytokines within the brain (Simen et al., 2011). Microglia are not only responsible for immunomodulatory functions in the brain but they act as modulators of cognitive function including memory (Blank and Prinz, 2013). Findings from this study linked the very early brain inflammation, assessed at PND 1, to the very late retention deficit, found at PND 310, in female middle-aged offspring mice perinatally exposed to intermediately or highly polluted eels. Microglia from brain of eel-exposed females have exacerbated pro-inflammatory marker production across their lifespan compared to controls. However, TNF α , IL1 β , NO, IL6 and IFN γ levels in females were more pronounced following exposure to intermediately and highly polluted eels, compared to lowly polluted eels (Table. 3). Approximately, the same pro-inflammatory profile was seen in microglia from male brains from mice that were perinatally exposed to polluted eels (Table 3). Systemic inflammation was also found following the significantly elevated levels of plasma MPO in eel-exposed male as well as female middle-aged mice (Fig. 2B). In this study, the level of systemic inflammation in both sexes depended on the level of pollutants in the eels, as greater effects on TNF α , IL1 β , NO, IL6, IFN γ as well as MPO levels were seen with the highest polluted eels (Table. 3). However, sex differential in the levels of systemic inflammation was also found between males and females, in particular greater increase in MPO levels was detected in middle-aged males than in female counterparts, particularly those perinatally exposed to intermediately and highly polluted eels. This differential production of pro-inflammatory markers including MPO was already highlighted in a previous study between male and female offspring exposed to eels, at

different stages of life (Soualeh et al. 2017). However, no obvious differences between male and female middle-aged exposed mice with regard the level of inflammation in the hippocampus were found, except for the higher production of TNF α with the highly polluted eels detected in males compared to females. When comparing inflammatory status of microglia from neonatal male as well as female brains (reflecting gestational-only exposure to polluted eels) vs. postnatal male as well as female brains (reflecting gestational plus lactational exposure to polluted eels), similar, although more pronounced, inflammatory profiles were observed in the postnatal brains, suggesting a relatively limited contribution of lactational exposure in the induction of inflammatory processes. This confirm our obtained previous data on the entire brain highlighting the high vulnerability of the developing brain in mice to inflammatory challenges during the gestational period (Soualeh et al., 2017). Although inflammation in the neonates might have been of placental and/or fetal origin following direct exposure of the fetus to pollutants (or their metabolites), detected inflammation in eel-exposed mothers following elevated plasma levels of pro-inflammatory markers including MPO, TNF α , IL1 β and IL6 was in favor of the maternal origin of inflammation in the offspring brain. Interestingly, inflammation was more pronounced in mothers exposed to the highest polluted eels (Table. 2).

It has been discussed that cytokines bidirectionally modulate memory; the overexpression of TNF α , IL1 β and/or IL6 (the most studied cytokines), is considered to be a critical contributor to the short- and long term deficits in hippocampal memory processes (Donzis and Tronson, 2014; Ohgidani et al., 2016; Thomson and Sutherland, 2005). In this study, high cytokine levels including TNF α , IL1 β and IL6 were found in the hippocampus, which highlights the role of these pro-inflammatory cytokines in the retention deficit detected in middle-aged females. Although non-exhaustive, underlying mechanisms of inflammation in brain by which cognitive dysfunction may operate, even in an age-dependent manner, could be (i) gene expression decrease (ii) neurogenesis reduction, (iii) alterations in neuronal functions

including the impairment of long-term potentiation (LTP), which is a cellular mechanism of learning and memory, (iv) neuronal apoptosis and (v) perturbation of hypothalamic connectivity with brain regions involved in cognitive function (Barrientos et al., 2015; De Luca et al., 2016; Dilger and Johnson, 2008; Gadani et al., 2012; Liu et al., 2012; Simen et al., 2011; Wilson et al., 2002). Chronically elevated cytokine levels are required to affect cognition (Simen et al., 2011), a condition found in our study, examining brain at 4 distinct stages of life. It should be noted that no cognitive effects of exposure to polluted eels were observed in both sexes at adult age (Dridi et al., 2014). In contrast, we have found long-term memory retention deficit that appeared later at middle age in female offspring mice perinatally exposed to intermediately or highly polluted eels, most likely following the interaction of their primed microglia with the aging process that may act as a sensitizing stimulus for these brain's resident macrophages (Barrientos et al., 2015; Dilger and Johnson, 2008). Thus, our results suggest that the middle-aged mouse brain is more sensitive to cognitive effects of perinatal exposure to polluted eels than the adult mouse brain. Exacerbated production of cytokines in the middle-aged brain may result in maladaptive behavioral and cognitive changes (Dilger and Johnson, 2008). However, a certain threshold of the activation of microglia as well as networked cytokines, constitutes also an important condition for appropriate cognition (De Luca et al., 2016; Donzis and Tronson, 2014). Sex-dependent differences were already reported with perinatal exposure to polluted eels on offspring behavior. On adulthood (PND 95-100), depressive-like symptoms were detected only in offspring males, but not in females, whose mothers were exposed to polluted eels (Soualeh et al., 2017). On middle age (PNDs 195-329), late hyperactivity was exhibited only by offspring females, but not by males, perinatally exposed to polluted eels (Dridi et al., 2017). This ruled out any effects of the activity on the retention scores of middle-aged females. In contrast, hypoactivity could be regarded as a confounding factor in our case. Sexually dimorphism in perinatally exposed offspring may also

be attributed to the disruptive effects of endocrine disrupting chemicals contained in eels, such as PCBs, on the organizational effects (at early-life) and/or on the activational effects (at later in life starting the puberty) of gonadal hormones on offspring brain. It is important to note that in adulthood (PND 100), we have demonstrated a sex selective effect on hypothalamic pituitary adrenal (HPA) axis, as higher levels of corticosterone were found only in offspring males, but not in females, perinatally exposed to eels (Soualeh et al., 2017). In contrast to this study, any dysregulation of HPA axis was found in both middle-aged males and females (Fig. 2A). In addition to sex, HPA axis regulation may also depend, among others, on the age (Moieni et al., 2015), which may explain the discrepancies between the two distinct ages (i.e., PND 100 and PND 330). Thus, retention deficit in the middle age was elicited by early-inflammation via a mechanism other than HPA dysregulation, which is also known as a plausible contributor to memory impairment (Miller and Spencer, 2014). However, our results suggest that ERK1/2 are the major contributors in the impairment of memory in middle-aged females, as a significant decrease of ERK1/2 activation was only detected in the female hippocampus perinatally exposed to the disruptive doses of pollutants in eels (i.e., intermediately and highly polluted eels). p38 MAPK pathway may also play a role in the observed cognitive deficit in females, as higher increased p38MAPK activation was found in the hippocampus of females exposed to intermediately and highly polluted eels. Consistent with our results, it has been shown that either decreased ERK1/2 activation or increased p38 MAPK activation, in the hippocampus, are associated with impairments of LTP, and in final with deficit in hippocampal memory processes (Donzis and Tronson, 2014; Giese and Mizuno, 2013). Animal studies have demonstrated that ERK1/2 are required for long term memory (Giese and Mizuno, 2013). Cytokines may modulate memory via several signal transduction pathways (Donzis and Tronson, 2014; Giese and Mizuno, 2013; Peng et al., 2010), and thus our results do not rule out the involvement of other pathways such as Janus kinase (JAK) - signal transduction. It is

possible that cytokine-dependent signal transduction pathways elicited the inhibition of the transcription factor NF- κ B, condition found only in the hippocampus of middle-aged females exposed to highly polluted eels. Interestingly, it has been suggested that activation of NF- κ B in neurons might enhance memory (Kaltschmidt and Kaltschmidt, 2009). Moreover, our results showed decreased levels of hippocampal acetylcholine in both groups of middle-aged females exposed to intermediately or highly polluted eels. It is reported that acetylcholine could enhance encoding e.g. by enhancing LTP in many areas, including the hippocampus (Hasselmo, 2006). Pro-inflammatory cytokines may act by decreasing the availability of neurotransmitters including acetylcholine (Bolton and Bilbo, 2014; Miller and Raison, 2016; Wilson et al., 2002), which may explain the observed effects on hippocampal acetylcholine levels in exposed females to the highest polluted eels. It seems that the decrease of acetylcholine in the hippocampus was not related to acetylcholinesterase activity, as we have already found a reduction of this enzyme activity, in this brain area (Dridi et al., 2017). Overall, we hypothesized that the disruptive effects of inflammatory signaling on memory of female middle-aged mice exposed to the intermediately and the highly polluted eels were mediated by ERK1/2 and p38 signaling pathways, altering the level of hippocampal acetylcholine.

Current findings on the link between maternal polluted fish intake and cognitive performances of offspring are controversial. Given the association between total fish pollution and its size (Genuis, 2008; Oken et al., 2005; Paliwoda et al., 2016), it should be noted that in the studies cited below, a focus was made by researchers either on methylmercury (MeHg) or PCBs, however a myriad of pollutants such as pesticides and lead among others that may also exist in fish, as it is the case of eels (Table. 1), were ignored. No adverse effects of perinatal exposure to MeHg from fish consumption on cognitive development were found in cohort studies of Seychellois children, assessed at 5.5 years (Palumbo et al., 2000) and at 9 years of age (Myers et al., 2003), although mothers reported consuming 12 fish meals per week (Myers

et al., 2003). Poor cognitive performances were, however, reported in recent prospective studies. Indeed, cognitive deficits were associated to high fish consumption with high mercury exposure in both Spanish preschoolers (4 years old) (Freire et al., 2010) and children (7 years old) from the Faroe Islands (Grandjean et al., 1997). Although high fish consumption (1.2 portions/wk) by pregnant women was associated with better infant cognition (assessed at 6 months of age) in a prospective U.S. pregnancy and child cohort study, higher mercury levels were associated with lower cognition (Oken et al., 2005). In a cohort study, maternal consumption of PCB-contaminated fish was associated with poorer visual recognition memory in babies at 7 months postpartum (Jacobson et al., 1985). In US cohort, it has been concluded that maternal fish consumption of two (or less) serving per week is without benefit on offspring cognition (3 years old). However, in this cohort, improved or decreased performance on tests of language and visual motor skills has been found with more than twice a week; cognitive outcomes were dependent on the level of mercury (Oken et al., 2008). In keeping with human studies linking offspring poorer cognitive performances with maternal fish intake, our results further emphasize this relationship, and highlight the determinant role of pollution level in fish. Indeed, the lowest polluted fish used in this study (reared eels), did not affect offspring cognition, however, the highest polluted fish (mixed and river eels) impaired memory retention in female offspring middle-aged mice. Moreover, significant differences between females perinatally exposed to the lowly and the highly polluted eels with regard memory performances were found (Fig. 4). Considering the memory deficit as an indicative of the vulnerability of the middle-aged female brain to the highest polluted eels, either the plasticity or the resilience of the middle-aged female brain of mice perinatally exposed to the lowly polluted eels might be explained by the efficient involvement of vitagene network. In stressful conditions, cells engage a series of adaptive responses, the so-called cellular stress response, by activating pro-survival pathways including cytoprotective genes also termed vitagenes, which encode e.g., for heat

shock proteins (Hsps), heme oxygenases, the thioredoxin and the sirtuin protein systems, such a response that may contribute to establish a cytoprotective state in a wide variety of diseases, including inflammation (Calabrese et al., 2010; 2012; 2016).

In conclusion, we have found that female, but not male, offspring mice perinatally exposed to either intermediately or highly polluted eels take a longer time to locate the escape platform, spend considerably less time in the platform and perform less visit to the platform in the retention assay of the Morris water maze test, which indicates an impairment of their long-term memory. However, retention of the previously learned task was not impaired in middle-aged mice perinatally exposed to lowly polluted eels, stressing the determinant role of the level of pollution in fish on cognitive alterations. We hypothesized that memory deficit elicited at middle age, but not at adult age, was attributed to early neuroinflammation, and further to the involvement of sensitized microglia during brain aging process. Our results emphasized the importance to consider sex as well as the stages of life in investigations evaluating the effects of endocrine disrupting chemicals to predict potential population impacts. On the basis of our results and previous data (Dridi et al., 2014; 2017; Soualeh et al., 2017) it is possible to infer that pregnant or nursing women should avoid eel consumption, and generally larger fish at higher trophic levels.

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). River eels used in this study were fished for a scientific study sponsored by the Service Public de Wallonie, DGO “Agriculture, Ressources Naturelles et Environnement, n° 10/65/593”. We gratefully acknowledge assistance from Dr. Imen Dridi for blood collection in mothers.

References

- Andersen, S.L., 2003. Trajectories of brain development: point of vulnerability or window of opportunity? *Neurosci Biobehav Rev* 27, 3-18.
- Barrientos, R.M., Kitt, M.M., Watkins, L.R., Maier, S.F., Neuroinflammation in the normal aging hippocampus. *Neuroscience* 309, 84-99.
- Barrientos, R.M., Kitt, M.M., Watkins, L.R., Maier, S.F., 2015. Neuroinflammation in the normal aging hippocampus. *Neuroscience* 309, 84-99.
- Bilbo, S.D., Schwarz, J.M., 2009. Early-life programming of later-life brain and behavior: a critical role for the immune system. *Front Behav Neurosci* 3, 14.
- Blank, T., Prinz, M., 2013. Microglia as modulators of cognition and neuropsychiatric disorders. *Glia* 61, 62-70.
- Bolton, J.L., Bilbo, S.D., 2014. Developmental programming of brain and behavior by perinatal diet: focus on inflammatory mechanisms. *Dialogues Clin Neurosci* 16, 307-320.
- Borre, Y.E., O'Keeffe, G.W., Clarke, G., Stanton, C., Dinan, T.G., Cryan, J.F., 2014. Microbiota and neurodevelopmental windows: implications for brain disorders. *Trends Mol Med* 20, 509-518.
- Bouayed, J., Desor, F., Rammal, H., Kiemer, A.K., Tybl, E., Schroeder, H., Rychen, G., Soulimani, R., 2009a. Effects of lactational exposure to benzo[α]pyrene (B[α]P) on postnatal neurodevelopment, neuronal receptor gene expression and behaviour in mice. *Toxicology* 259, 97-106.
- Bouayed, J., Desor, F., Rammal, H., Kiemer, A.K., Tybl, E., Schroeder, H., Rychen, G., Soulimani, R., 2009b. Effects of lactational exposure to benzo[α]pyrene (B[α]P) on postnatal neurodevelopment, neuronal receptor gene expression and behaviour in mice. *Toxicology* 259, 97-106.
- Broadbent, N.J., Squire, L.R., Clark, R.E., 2004. Spatial memory, recognition memory, and the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 14515-14520.
- Calabrese, V., Cornelius, C., Dinkova-Kostova, A.T., Iavicoli, I., Di Paola, R., Koverech, A., Cuzzocrea, S., Rizzarelli, E., Calabrese, E.J., 2012. Cellular stress responses, hormetic phytochemicals and vitagenes in aging and longevity. *Biochim Biophys Acta* 1822, 753-783.
- Calabrese, V., Cornelius, C., Maiolino, L., Luca, M., Chiaramonte, R., Toscano, M.A., Serra, A., 2010. Oxidative stress, redox homeostasis and cellular stress response in Meniere's disease: role of vitagenes. *Neurochem Res* 35, 2208-2217.
- Calabrese, V., Giordano, J., Signorile, A., Laura Ontario, M., Castorina, S., De Pasquale, C., Eckert, G., Calabrese, E.J., 2016. Major pathogenic mechanisms in vascular dementia: Roles of cellular stress response and hormesis in neuroprotection. *J Neurosci Res* 94, 1588-1603.
- Cauli, O., Piedrafita, B., Llansola, M., Felipo, V., 2012. Gender differential effects of developmental exposure to methyl-mercury, polychlorinated biphenyls 126 or 153, or its combinations on motor activity and coordination. *Toxicology* 311, 61-68.
- De Luca, S.N., Ziko, I., Sominsky, L., Nguyen, J.C., Dinan, T., Miller, A.A., Jenkins, T.A., Spencer, S.J., 2016. Early life overfeeding impairs spatial memory performance by reducing microglial sensitivity to learning. *J Neuroinflammation* 13, 112.
- de Quervain, D.J., Roozendaal, B., McGaugh, J.L., 1998. Stress and glucocorticoids impair retrieval of long-term spatial memory. *Nature* 394, 787-790.
- Dilger, R.N., Johnson, R.W., 2008. Aging, microglial cell priming, and the discordant central inflammatory response to signals from the peripheral immune system. *J Leukoc Biol* 84, 932-939.
- Dirsch, V.M., Stuppner, H., Vollmar, A.M., 1998. The Griess assay: suitable for a bio-guided fractionation of anti-inflammatory plant extracts? *Planta Med* 64, 423-426.

- Donzis, E.J., Tronson, N.C., 2014. Modulation of learning and memory by cytokines: signaling mechanisms and long term consequences. *Neurobiol Learn Mem* 115, 68-77.
- Dridi, I., Leroy, D., Guignard, C., Scholl, G., Bohn, T., Landoulsi, A., Thome, J.P., Eppe, G., Soulimani, R., Bouayed, J., 2014. Dietary early-life exposure to contaminated eels does not impair spatial cognitive performances in adult offspring mice as assessed in the Y-maze and the Morris water maze. *Nutr Res* 34, 1075-1084.
- Dridi, I., Soualeh, N., Bohn, T., Soulimani, R., Bouayed, J., 2017. Chemically contaminated eel fed to pregnant and lactating mouse dams causes hyperactivity in their offspring. *Int J Vitam Nutr Res* DOI 10.1024/1422-4917/a000288.
- EFSA, 2005. European Food Safety Authority. Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to the presence of non dioxine-like polychlorinated biphenyls (PCB) in feed and Food. *EFSA J* 1-137.
- EFSA, 2010. European Food Safety Authority Scientific report of EFSA. Results of the monitoring of non dioxin-like PCBs in food and feed. *EFSA J* 8, 1-38.
- Elison, S., Shears, D., Nadel, S., Sahakian, B., Garralda, M.E., 2008. Neuropsychological function in children following admission to paediatric intensive care: a pilot investigation. *Intensive Care Med* 34, 1289-1293.
- Elnar, A.A., Diesel, B., Desor, F., Feidt, C., Bouayed, J., Kiemer, A.K., Soulimani, R., 2012. Neurodevelopmental and behavioral toxicity via lactational exposure to the sum of six indicator non-dioxin-like-polychlorinated biphenyls ($\Sigma 6$ NDL-PCBs) in mice. *Toxicology* 299, 44-54.
- Flurkey, K., Curren, J.M., Harrison, D.E. (Eds.), 2007. "The Mouse in Aging Research," in *The Mouse in Biomedical Research*, 2nd Edition. Fox JG et al. (eds). American College Laboratory Animal Medicine. Academic Press.
- Freire, C., Ramos, R., Lopez-Espinosa, M.J., Diez, S., Vioque, J., Ballester, F., Fernandez, M.F., 2010. Hair mercury levels, fish consumption, and cognitive development in preschool children from Granada, Spain. *Environ Res* 110, 96-104.
- Gadani, S.P., Cronk, J.C., Norris, G.T., Kipnis, J., 2012. IL-4 in the brain: a cytokine to remember. *J Immunol* 189, 4213-4219.
- Genuis, S.J., 2008. To sea or not to sea: benefits and risks of gestational fish consumption. *Reprod Toxicol* 26, 81-85.
- Giese, K.P., Mizuno, K., 2013. The roles of protein kinases in learning and memory. *Learn Mem* 20, 540-552.
- Grandjean, P., Weihe, P., White, R.F., Debes, F., Araki, S., Yokoyama, K., Murata, K., Sorensen, N., Dahl, R., Jorgensen, P.J., 1997. Cognitive deficit in 7-year-old children with prenatal exposure to methylmercury. *Neurotoxicol Teratol* 19, 417-428.
- Green, L.C., Wagner, D.A., Glogowski, J., Skipper, P.L., Wishnok, J.S., Tannenbaum, S.R., 1982. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 126, 131-138.
- Grova, N., Valley, A., Turner, J.D., Morel, A., Muller, C.P., Schroeder, H., 2007. Modulation of behavior and NMDA-R1 gene mRNA expression in adult female mice after sub-acute administration of benzo(a)pyrene. *Neurotoxicology* 28, 630-636.
- Hagberg, H., Mallard, C., Ferriero, D.M., Vannucci, S.J., Levison, S.W., Vexler, Z.S., Gressens, P., 2015. The role of inflammation in perinatal brain injury. *Nat Rev Neurol* 11, 192- 208.
- Hale, M.W., Spencer, S.J., Conti, B., Jasoni, C.L., Kent, S., Radler, M.E., Reyes, T.M., Sominsky, L., 2014. Diet, behavior and immunity across the lifespan. *Neurosci Biobehav Rev* 58, 46-62.
- Hasselmo, M.E., 2006. The role of acetylcholine in learning and memory. *Curr Opin Neurobiol* 16, 710-715.

- Hava, G., Vered, L., Yael, M., Mordechai, H., Mahoud, H., 2006. Alterations in behavior in adult offspring mice following maternal inflammation during pregnancy. *Dev Psychobiol* 48, 162-168.
- Hughes, R.N., 2004. The value of spontaneous alternation behavior (SAB) as a test of retention in pharmacological investigations of memory. *Neurosci Biobehav Rev* 28, 497-505.
- Ingber, S.Z., Pohl, H.R., 2016. Windows of sensitivity to toxic chemicals in the motor effects development. *Regul Toxicol Pharmacol* 74, 93-104.
- Jacobson, S.W., Fein, G.G., Jacobson, J.L., Schwartz, P.M., Dowler, J.K., 1985. The effect of intrauterine PCB exposure on visual recognition memory. *Child Dev* 56, 853-860.
- Kaltschmidt, B., Kaltschmidt, C., 2009. NF-kappaB in the nervous system. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1, a001271.
- Karabeg, M.M., Grauthoff, S., Kollert, S.Y., Weidner, M., Heimig, R.S., Jansen, F., Popp, S., Kaiser, S., Lesch, K.P., Sachser, N., Schmitt, A.G., Lewejohann, L., 2013. 5-HTT deficiency affects neuroplasticity and increases stress sensitivity resulting in altered spatial learning performance in the Morris water maze but not in the Barnes maze. *PLoS One* 8, e78238.
- Kaur, A., 1994. Age related changes in the ovary, uterus, and fertility in Swiss Albino mice. *Proc Indian natn Sci Acad B* 60, 237-242.
- Lee, J.W., Lee, Y.K., Yuk, D.Y., Choi, D.Y., Ban, S.B., Oh, K.W., Hong, J.T., 2008. Neuro-inflammation induced by lipopolysaccharide causes cognitive impairment through enhancement of beta-amyloid generation. *J Neuroinflammation* 5, 37.
- Li, L.X., Chen, L., Meng, X.Z., Chen, B.H., Chen, S.Q., Zhao, Y., Zhao, L.F., Liang, Y., Zhang, Y.H., 2013. Exposure levels of environmental endocrine disruptors in mother-newborn pairs in China and their placental transfer characteristics. *PLoS One* 8, e62526.
- Liu, X., Wu, Z., Hayashi, Y., Nakanishi, H., 2012. Age-dependent neuroinflammatory responses and deficits in long-term potentiation in the hippocampus during systemic inflammation. *Neuroscience* 216, 133-142.
- Marques, A.H., O'Connor, T.G., Roth, C., Susser, E., Bjorke-Monsen, A.L., 2013. The influence of maternal prenatal and early childhood nutrition and maternal prenatal stress on offspring immune system development and neurodevelopmental disorders. *Front Neurosci* 7, 120.
- Marsden, H.M., Bronson, F.H., 1965. The Synchrony of Oestrus in Mice: Relative Roles of the Male and Female Environments. *J Endocrinol* 32, 313-319.
- Miller, A.A., Spencer, S.J., 2014. Obesity and neuroinflammation: a pathway to cognitive impairment. *Brain Behav Immun* 42, 10-21.
- Miller, A.H., Raison, C.L., 2016. The role of inflammation in depression: from evolutionary imperative to modern treatment target. *Nat Rev Immunol* 16, 22-34.
- Moieni, M., Irwin, M.R., Jevtic, I., Breen, E.C., Eisenberger, N.I., 2015. Inflammation impairs social cognitive processing: A randomized controlled trial of endotoxin. *Brain Behav Immun* 48, 132-138.
- Morris, R., 1984. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods* 11, 47-60.
- Murray, C., Sanderson, D.J., Barkus, C., Deacon, R.M., Rawlins, J.N., Bannerman, D.M., Cunningham, C., 2010. Systemic inflammation induces acute working memory deficits in the primed brain: relevance for delirium. *Neurobiol Aging* 33, 603-616 e603.
- Myers, G.J., Davidson, P.W., Cox, C., Shamlaye, C.F., Palumbo, D., Cernichiari, E., Sloane-Reeves, J., Wilding, G.E., Kost, J., Huang, L.S., Clarkson, T.W., 2003. Prenatal methylmercury exposure from ocean fish consumption in the Seychelles child development study. *Lancet* 361, 1686-1692.

- Ohgidani, M., Kato, T.A., Sagata, N., Hayakawa, K., Shimokawa, N., Sato-Kasai, M., Kanba, S., 2016. TNF- α from hippocampal microglia induces working memory deficits by acute stress in mice. *Brain Behav Immun* 55, 17-24.
- Oken, E., Radesky, J.S., Wright, R.O., Bellinger, D.C., Amarasiriwardena, C.J., Kleinman, K.P., Hu, H., Gillman, M.W., 2008. Maternal fish intake during pregnancy, blood mercury levels, and child cognition at age 3 years in a US cohort. *Am J Epidemiol* 167, 1171-1181.
- Oken, E., Wright, R.O., Kleinman, K.P., Bellinger, D., Amarasiriwardena, C.J., Hu, H., Rich-Edwards, J.W., Gillman, M.W., 2005. Maternal fish consumption, hair mercury, and infant cognition in a U.S. Cohort. *Environ Health Perspect* 113, 1376-1380.
- Paliwoda, R.E., Newbigging, A.M., Wang, Z., Le, X.C., 2016. Benefits and risks associated with consumption of Great Lakes fish containing omega-3 fatty acids and polychlorinated biphenyls (PCBs). *J Environ Sci (China)* 41, 1-5.
- Palumbo, D.R., Cox, C., Davidson, P.W., Myers, G.J., Choi, A., Shamlaye, C., Sloane-Reeves, J., Cernichiari, E., Clarkson, T.W., 2000. Association between prenatal exposure to methylmercury and cognitive functioning in Seychellois children: a reanalysis of the McCarthy Scales of Children's Ability from the main cohort study. *Environ Res* 84, 81-88.
- Peng, S., Zhang, Y., Zhang, J., Wang, H., Ren, B., 2010. ERK in learning and memory: a review of recent research. *Int J Mol Sci* 11, 222-232.
- Reichenberg, A., Yirmiya, R., Schuld, A., Kraus, T., Haack, M., Morag, A., Pollmacher, T., 2001. Cytokine-associated emotional and cognitive disturbances in humans. *Arch Gen Psychiatry* 58, 445-452.
- SACN, 2004. Scientific advisory committee on nutrition. Advice on fish consumption: benefits and risks. London.
- Simen, A.A., Bordner, K.A., Martin, M.P., Moy, L.A., Barry, L.C., 2011. Cognitive dysfunction with aging and the role of inflammation. *Ther Adv Chronic Dis* 2, 175-195.
- Soualeh, N., Dridi, I., Eppe, G., Nemos, C., Soulimani, R., Bouayed, J., 2017. Perinatal programming of depressive-like behavior by inflammation in adult offspring mice whose mothers were fed polluted eels: Gender selective effects. *Brain Behav Immun* 63, 137-147.
- Spencer, S.J., 2013a. Perinatal nutrition programs neuroimmune function long-term: mechanisms and implications. *Front Neurosci* 7, 144.
- Spencer, S.J., 2013b. Perinatal programming of neuroendocrine mechanisms connecting feeding behavior and stress. *Front Neurosci* 7, 109.
- Spencer, S.J., Hyland, N.P., Sharkey, K.A., Pittman, Q.J., 2007. Neonatal immune challenge exacerbates experimental colitis in adult rats: potential role for TNF-alpha. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292, R308-315.
- Spencer, S.J., Martin, S., Mouihate, A., Pittman, Q.J., 2006. Early-life immune challenge: defining a critical window for effects on adult responses to immune challenge. *Neuropsychopharmacology* 31, 1910-1918.
- Spencer, S.J., Tilbrook, A., 2009. Neonatal overfeeding alters adult anxiety and stress responsiveness. *Psychoneuroendocrinology* 34, 1133-1143.
- Squire, L.R., 1992. Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. *Psychol Rev* 99, 195-231.
- Squire, L.R., 1993. The hippocampus and spatial memory. *Trends Neurosci* 16, 56-57.
- Thomson, L.M., Sutherland, R.J., 2005. Systemic administration of lipopolysaccharide and interleukin-1beta have different effects on memory consolidation. *Brain Res Bull* 67, 24-29.
- ThyagaRajan, S., Priyanka, H.P., 2012. Bidirectional communication between the neuroendocrine system and the immune system: relevance to health and diseases. *Ann Neurosci* 19, 40-46.

- Viggiano, D., 2008. The hyperactive syndrome: metanalysis of genetic alterations, pharmacological treatments and brain lesions which increase locomotor activity. Behav Brain Res 194, 1-14.
- Vorhees, C.V., Williams, M.T., 2006. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. Nat Protoc 1, 848-858.
- Whitten, W.K., 1959. Occurrence of anoestrus in mice caged in groups. J Endocrinol 18, 102-107.
- Wilson, C.J., Finch, C.E., Cohen, H.J., 2002. Cytokines and cognition--the case for a head-to-toe inflammatory paradigm. J Am Geriatr Soc 50, 2041-2056.
- Zhang, A., Hao, S., Bi, J., Bao, Y., Zhang, X., An, L., Jiang, B., 2009. Effects of catalpol on mitochondrial function and working memory in mice after lipopolysaccharide-induced acute systemic inflammation. Exp Toxicol Pathol 61, 461-469.

Figure legends:

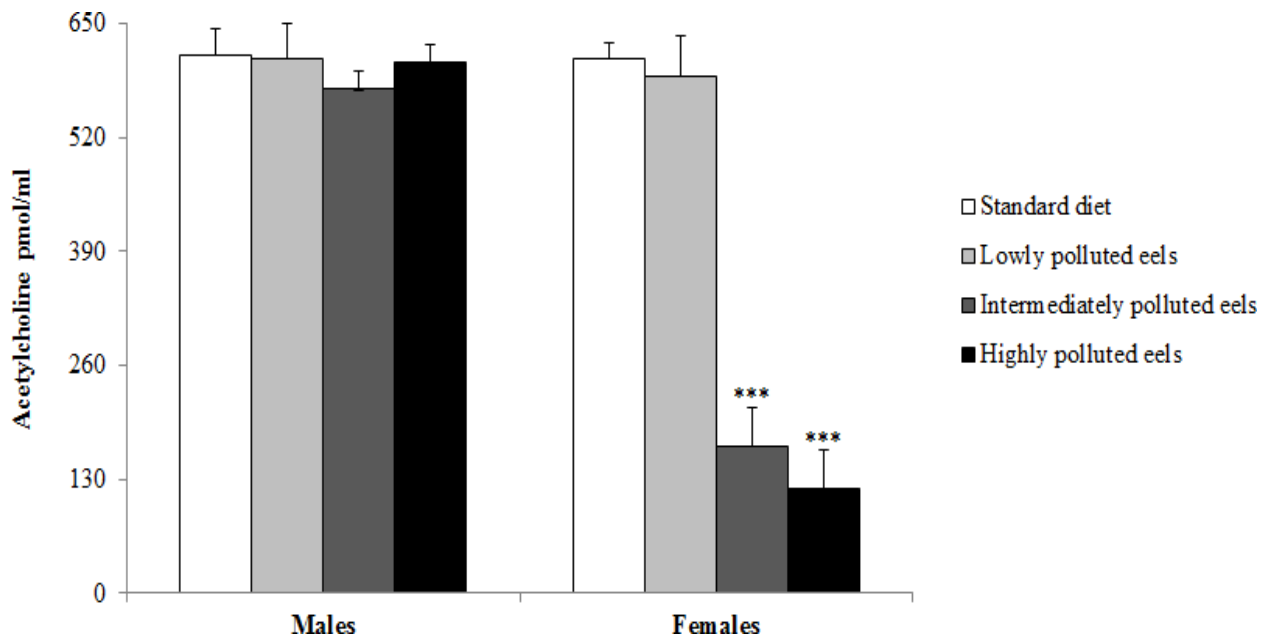


Fig. 1. Effects of perinatal exposure to polluted eels on hippocampal levels of acetylcholine (pmol/ml) of middle-aged offspring male and female mice ($n = 5/\text{sex}/\text{group}$), compared to standard diet alone (i.e., diet without eel). Intermediately polluted eel corresponds to an artificial eel matrix obtained by mixing lowly polluted and highly polluted eels at a ratio of 2:1. The data are reported as the mean $\pm$ SEM. *** $p < 0.001$ significantly different from the control.

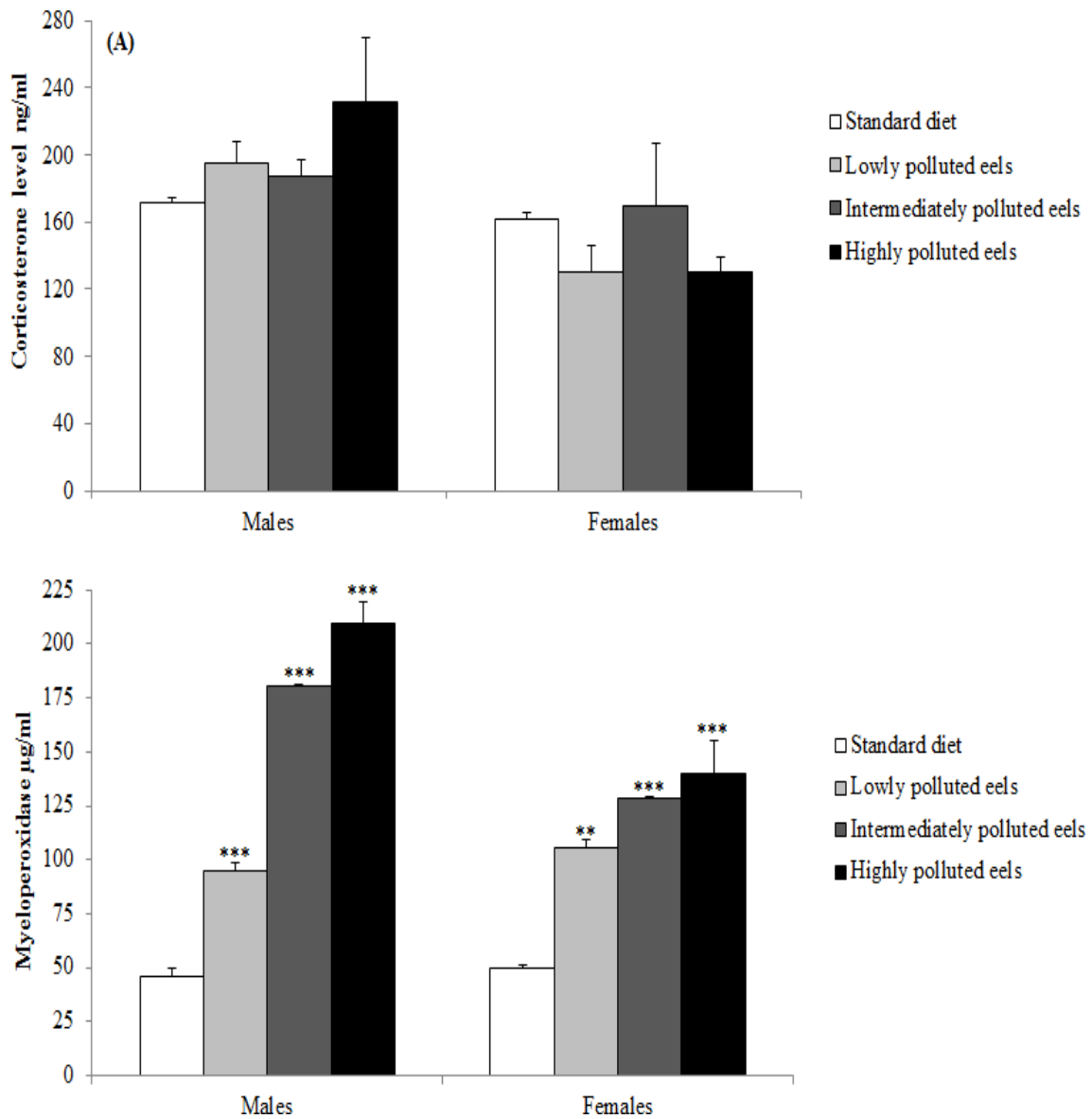


Fig. 2. Effects of perinatal exposure to polluted eels on plasma levels of corticosterone (A) and myeloperoxidase (MPO) (B) of middle-aged offspring male and female mice ($n = 5/\text{sex}/\text{group}$), compared to standard diet alone (i.e., diet without eel). Intermediately polluted eel corresponds to an artificial eel matrix obtained by mixing lowly polluted and highly polluted eels at a ratio of 2:1. The data are reported as the mean $\pm$ SEM. ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ significantly different from the control.

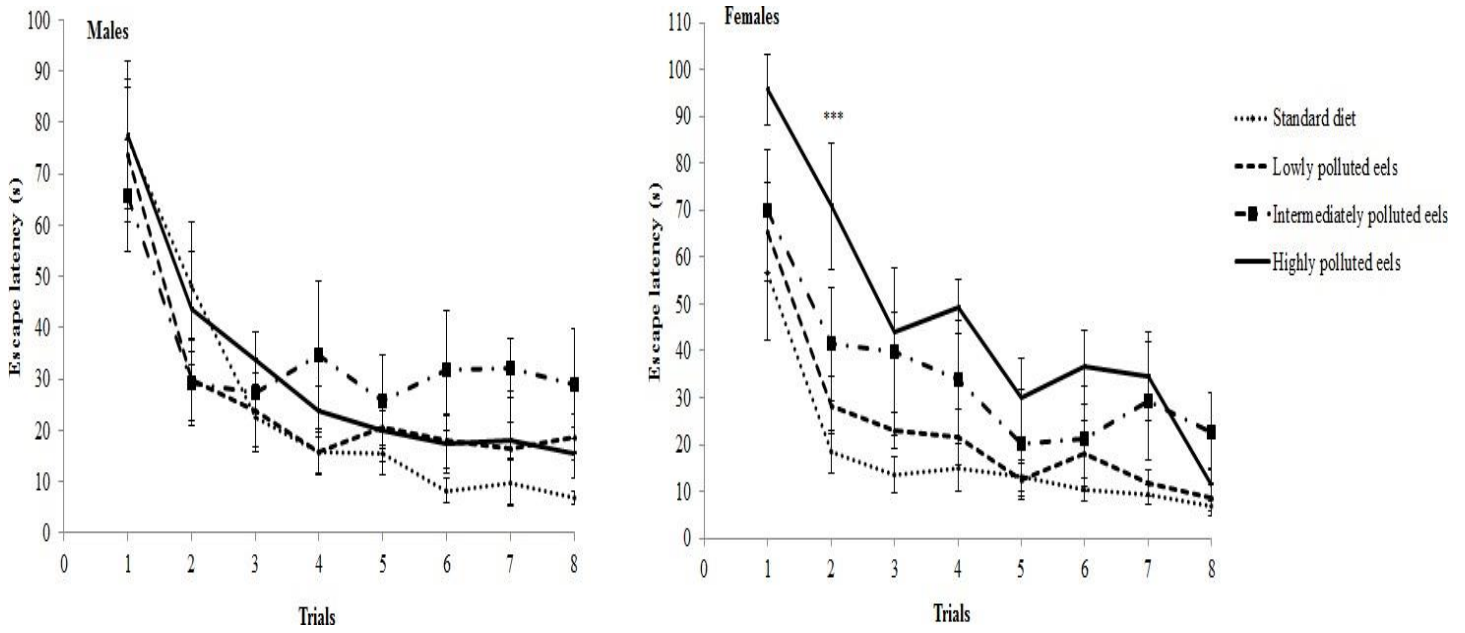


Fig. 3. Effects of perinatal exposure to polluted eels on spatial learning of middle-aged male and female offspring mice (n= 10/sex/group) in the acquisition phase of the Morris water maze, assessed at PND 300, compared to standard diet alone (i.e., diet without eel). Intermediately polluted eel corresponds to an artificial eel matrix obtained by mixing lowly polluted and highly polluted eels with a ratio 2:1. The data are reported as the mean $\pm$ SEM.

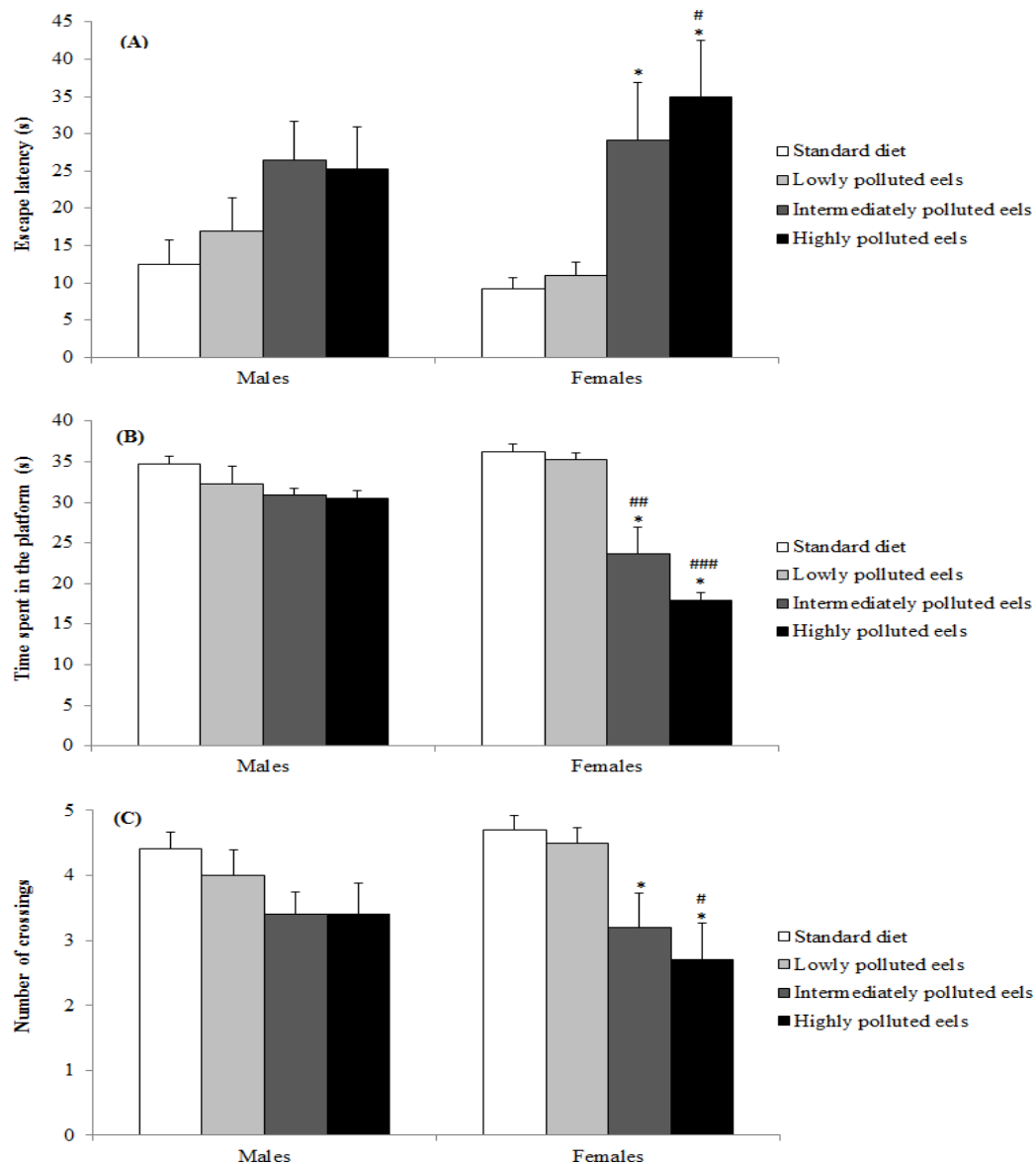


Fig. 4. Effects of perinatal exposure to polluted eels on long-term memory retention of middle-aged male and female offspring mice ($n = 10/\text{sex}/\text{group}$) in the retention test of the Morris water maze assessed during 60 sec at PND 310, 10 days post spatial learning task, compared to standard diet alone (i.e., diet without eel). (A) the latency (time) to escape to the platform. (B) the time spent in the platform. (C) the number of crossing the platform. Intermediately polluted eel corresponds to an artificial eel matrix obtained by mixing lowly polluted and highly polluted eels with a ratio 2:1. The data are reported as the mean ± SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ significantly different from the control. # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ and ### $p < 0.001$ significantly different from the lowly polluted eels.

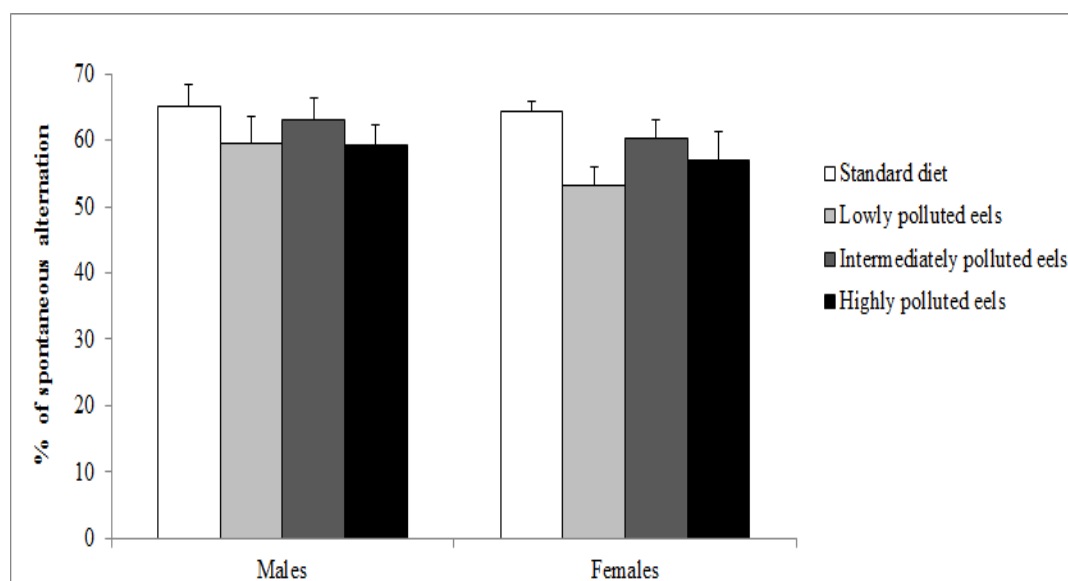


Fig. 5. Effects of perinatal exposure to polluted eels on the working memory of middle-aged male and female offspring mice ($n = 10/\text{sex}/\text{group}$) in the Y-maze assessed at PND 325, compared to standard diet alone (i.e., diet without eel). Intermediately polluted eel corresponds to an artificial eel matrix obtained by mixing lowly polluted and highly polluted eels with a ratio 2:1. The data are reported as the mean $\pm$ SEM.

Table 1. Pollutant levels detected in both reared (lowly polluted) and river (highly polluted) eels (Source: Soualeh et al., 2017).

Chemical groups (ng/g fw)	Pollutants	Reared eels (la Meuse, Belgium)	River eels (The Netherlands)
PCBs:	$\Sigma 6$ NDL-PCB indicators	52.9	250.5
	Total NDL-PCBs ^a	105.9	501.0
	Total DL-PCBs ^b	10.6	50.1
	Total PCBs ^c	116.5	551.1
Dioxins/Furans:	PCDD/Fs	620	820
PAHs:	Naphtalene	< 15	< 16
	Acenaphtylene	< 15	< 16
	Acenaphtene	< 15	39
	Fluorene	46	23
	Phenanthrene	39	46
	Anthracene	40	42
	Fluoranthene	< 38	< 41
	Pyrene	< 38	< 41
	Chrysene	< 38	< 41
	Benzo(k)fluoranthene	< 76	< 82

BDEs:	BDE47	< 38	< 41
	BDE99	< 38	< 41
	BDE100	< 38	< 41
	BDE154	< 38	< 41
	BDE153	< 38	< 41
	BDE183	< 38	< 41
Pesticides:	α -HCH	2.87	1.64
	HCB	3.24	3.04
	β -HCH	1.56	3.11
	γ -HCH	0.79	0.43
	op'DDE	0.81	0.42
	pp'DDE	10.59	19.98
	op'DDD	0.89	1.41
	op'DDT	1.75	0.67
	pp'DDD	1.58	5.46
	pp'DDT	5.35	5.17
Metals ^d :	Mercury (Hg)	0.277	0.550
	Aluminium (Al)	7.076	6.899
	Vanadium (V)	<0.588	<0.588
	Chromium (Cr)	0.594	<0.151
	Manganese (Mn)	0.853	0.562
	Iron (Fe)	10.94	8.351
	Cobalt (Co)	0.015	0.028
	Nickel (Ni)	0.140	0.066
	Copper (Cu)	0.718	0.725
	Zinc (Zn)	38.28	49.24
	Arsenic (As)	3.019	<0.475
	Selenium (Se)	0.399	1.802
	Molybdenum (Mo)	0.052	0.042
	Cadmium (Cd)	0.024	<0.010
	Lead (Pb)	0.043	0.033
	Platinum (Pt)	<0.012	<0.012

BDEs: polybrominated diphenyl ethers; DDD: dichlorodiphenyldichloroethane; DDE: dichlorodiphenyldichloroethylene; DDT: dichlorodiphenyltrichloroethane; DL-PCBs: dioxin-like polychlorinated biphenyls; fw: fresh weight; HCB: hexachlorobenzene; HCH: hexachlorocyclohexane; NDL-PCBs: non-dioxin like polychlorinated biphenyls; PAHs: polycyclic aromatic hydrocarbons; PCDD/Fs: polychlorinated dibenzo(p)dioxins and furans; Σ 6 NDL-PCB: the sum of the 6 NDL-PCBs: 28, 52, 101, 138, 153, and 180.

^a total NDL-PCBs corresponds to an estimated value obtained by considering the 6 NDL-PCB indicators approximately 50% of total NDL-PCBs (EFSA, 2005).

^b total DL-PCBs corresponds to an estimated value obtained by considering the 6 NDL-PCBs indicators close to five times higher than the sum of total DL-PCBs (EFSA, 2010).

^c Total PCBs corresponds to the sum of DL- and NDL-PCBs.

^d Weight given as $\mu\text{g/g}$ dry weight; average water content 51.08%.

Table 2. Effects of exposure to polluted eels on plasma inflammatory markers of mothers (n = 6/group), assessed at the day of weaning, compared to standard diet alone (i.e., diet without eel).

Maternal diet with or without eels	MPO ^{\$}	TNF α	IL1 β	IL6
Standard diet	47.6 $\pm$ 3.8	84.6 $\pm$ 8.5	155.1 $\pm$ 7.0	101.5 $\pm$ 15.8
Lowly polluted eels	145.8 $\pm$ 12.2***	117.6 $\pm$ 11.5**	302.5 $\pm$ 26.3***	143.7 $\pm$ 10.3
Intermediately polluted eels [#]	201.2 $\pm$ 9.3***	275.7 $\pm$ 56.8**	364.7 $\pm$ 21.8***	136.2 $\pm$ 13.0
Highly polluted eels	238.7 $\pm$ 12.6***	281.6 $\pm$ 41.3**	403.7 $\pm$ 4.9***	158.5 $\pm$ 12.4*

[#]Intermediately polluted eel corresponds to an artificial eel matrix obtained by mixing lowly polluted and highly polluted eels with a ratio 2:1. The data are reported as the mean $\pm$ SEM. TNF α , IL1 β and IL6 are expressed as pg/ml. ^{\$}MPO expressed as μ g/ml. * p < 0.05, ** p < 0.01 and *** p < 0.001 significantly different from the control.

Table 3. Effects of perinatal exposure to polluted eels on the microglia inflammatory markers of male and female pups, assessed at PND s 1 and 21, male and female adult mice, assessed at PND 100, as well as male and female middle-aged mice, assessed at PND 330, compared to standard diet alone (i.e. diet without eel).

	Maternal diet with or without eels	TNF α	IL1 β	IL6	IFN γ	NO ^s	IL10	IL4	TGF β		
PND21	Males	Standard diet	156.0 $\pm$ 10.6	114.6 $\pm$ 25.0	65.4 $\pm$ 0.6	53.3 $\pm$ 11.3	0.2 $\pm$ 0.1	134.4 $\pm$ 39.9	55.8 $\pm$ 3.2	494.5 $\pm$ 84.8	
		Lowly polluted eels	349.9 $\pm$ 37.3*	263.6 $\pm$ 18.0*	64.5 $\pm$ 1.1	59.8 $\pm$ 11.1	0.8 $\pm$ 0.3	250.1 $\pm$ 26.9*	68.2 $\pm$ 2.4	608.8 $\pm$ 36.0	
		Intermediately polluted eels [#]	520.2 $\pm$ 97.1**	366.2 $\pm$ 48.5***	63.9 $\pm$ 0.8	88.4 $\pm$ 11.0	1.2 $\pm$ 0.4*	282.1 $\pm$ 28.2*	63.5 $\pm$ 3.6	701.5 $\pm$ 76.1	
		Highly polluted eels	496.0 $\pm$ 50.5**	383.3 $\pm$ 30.7***	68.4 $\pm$ 2.1	110.0 $\pm$ 32.6	1.4 $\pm$ 0.4*	209.3 $\pm$ 34.9	57.3 $\pm$ 3.9	621.9 $\pm$ 22.3	
	Females	Standard diet	182.7 $\pm$ 17.6	114.4 $\pm$ 22.9	62.6 $\pm$ 0.5	57.5 $\pm$ 13.5	0.4 $\pm$ 0.2	116.4 $\pm$ 26.5	55.9 $\pm$ 0.5	452.8 $\pm$ 61.1	
		Lowly polluted eels	296.7 $\pm$ 40.7*	243.1 $\pm$ 17.5*	64.4 $\pm$ 0.7	60.9 $\pm$ 15.6	1.1 $\pm$ 0.2	389.8 $\pm$ 51.0**	66.4 $\pm$ 1.4	654.3 $\pm$ 39.6	
		Intermediately polluted eels [#]	363.1 $\pm$ 57.2*	286.0 $\pm$ 33.5**	62.8 $\pm$ 1.7	86.2 $\pm$ 8.3	1.2 $\pm$ 0.3*	201.01 $\pm$ 41.5*	63.4 $\pm$ 2.1	619.1 $\pm$ 69.3	
	Males	Highly polluted eels	501.2 $\pm$ 49.8**	366.0 $\pm$ 33.9***	81.4 $\pm$ 4.2*	96.9 $\pm$ 6.8	1.2 $\pm$ 0.1*	184.6 $\pm$ 38.9	65.8 $\pm$ 1.8	653.9 $\pm$ 52.0	
		Standard diet	78.8 $\pm$ 11.2	62.7 $\pm$ 1.3	85.1 $\pm$ 9.1	54.6 $\pm$ 6.1	0.2 $\pm$ 0.0	96.4 $\pm$ 12.6	92.5 $\pm$ 24.6	418.6 $\pm$ 27.5	
		Lowly polluted eels	410.8 $\pm$ 46.8***	171.1 $\pm$ 45.7*	207.7 $\pm$ 48.8	96.5 $\pm$ 9.6	0.6 $\pm$ 0.0	232.6 $\pm$ 27.7***	238.5 $\pm$ 33.1**	616.7 $\pm$ 36.5**	
		Intermediately polluted eels [#]	459.6 $\pm$ 37.7***	240.1 $\pm$ 55.6*	272.5 $\pm$ 16.8*	109.6 $\pm$ 10.6*	0.9 $\pm$ 0.1*	218.1 $\pm$ 11.2**	178.8 $\pm$ 22.1	687.5 $\pm$ 47.1** Highly	
		polluted eels	549.7 $\pm$ 42.7***	270.8 $\pm$ 23.5**	302.4 $\pm$ 29.9*	175.1 $\pm$ 15.1***	1.7 $\pm$ 0.5**	169.1 $\pm$ 7.6	125.7 $\pm$ 23.9	606.6 $\pm$ 13.1**	
Females	Standard diet	154.9 $\pm$ 29.5	60.0 $\pm$ 5.5	69.8 $\pm$ 12.2	79.1 $\pm$ 8.7	0.3 $\pm$ 0.0	142.0 $\pm$ 10.0	124.3 $\pm$ 27.1	409.0 $\pm$ 26.9		
	Lowly polluted eels	225.7 $\pm$ 38.0	120.1 $\pm$ 8.0	144.9 $\pm$ 16.3	84.9 $\pm$ 16.0	0.6 $\pm$ 0.0	285.8 $\pm$ 29.6**	241.1 $\pm$ 39.8*	631.1 $\pm$ 13.4*		
	Intermediately polluted eels [#]	341.6 $\pm$ 60.4*	203.8 $\pm$ 50.1*	205.5 $\pm$ 54.1*	116.8 $\pm$ 17.9*	0.9 $\pm$ 0.1*	194.8 $\pm$ 14.6	152.4 $\pm$ 26.4	631.9 $\pm$ 32.6* Highly		
PND100	Males	polluted eels	596.7 $\pm$ 93.2**	253.0 $\pm$ 28.0***	304.8 $\pm$ 38.5**	187.7 $\pm$ 24.9**	1.3 $\pm$ 0.2***	154.0 $\pm$ 31.7	107.7 $\pm$ 6.7	596.1 $\pm$ 78.9* Standard	
		diet	95.4 $\pm$ 25.7	109.5 $\pm$ 21.5	52.2 $\pm$ 2.6	63.5 $\pm$ 5.4	0.3 $\pm$ 0.1	109.7 $\pm$ 15.5	47.1 $\pm$ 1.8	489.7 $\pm$ 38.3	
		Lowly polluted eels	126.2 $\pm$ 36.8	311.4 $\pm$ 51.6**	66.5 $\pm$ 2.1	77.8 $\pm$ 9.6	1.0 $\pm$ 0.3	135.6 $\pm$ 19.8	52.1 $\pm$ 4.5	584.1 $\pm$ 44.4	
		Intermediately polluted eels [#]	451.0 $\pm$ 47.2*	353.1 $\pm$ 42.5**	88.4 $\pm$ 1.9*	82.4 $\pm$ 2.3*	1.3 $\pm$ 0.3*	121.6 $\pm$ 25.6	56.9 $\pm$ 3.2	532.9 $\pm$ 49.1	
		Highly polluted eels	571.5 $\pm$ 39.1***	420.8 $\pm$ 23.9***	89.6 $\pm$ 1.6*	87.0 $\pm$ 1.9*	1.7 $\pm$ 0.6*	141.1 $\pm$ 24.3	52.3 $\pm$ 5.1	589.2 $\pm$ 25.2	
	Females	Standard diet	176.4 $\pm$ 11.0	116.9 $\pm$ 29.9	62.5 $\pm$ 3.2	51.1 $\pm$ 7.0	0.5 $\pm$ 0.1	155.7 $\pm$ 32.0	69.2 $\pm$ 2.1	433.2 $\pm$ 22.9	
		Lowly polluted eels	400.4 $\pm$ 82.2	343.3 $\pm$ 47.1*	70.7 $\pm$ 2.7	69.6 $\pm$ 13.0	0.8 $\pm$ 0.1	203.2 $\pm$ 20.3	84.1 $\pm$ 3.7	591.0 $\pm$ 52.3	
		Intermediately polluted eels [#]	558.3 $\pm$ 58.6**	402.7 $\pm$ 39.3**	74.0 $\pm$ 1.6*	81.8 $\pm$ 7.9*	1.1 $\pm$ 0.1*	183.1 $\pm$ 34.1	77.6 $\pm$ 3.6	585.0 $\pm$ 69.6	
	PND330	Males	Highly polluted eels	553.4 $\pm$ 91.0**	388.8 $\pm$ 56.0*	78.7 $\pm$ 1.3*	93.3 $\pm$ 17.5*	1.2 $\pm$ 0.0*	192.4 $\pm$ 35.9	70.5 $\pm$ 3.1	573.0 $\pm$ 65.8
			Standard diet	173.9 $\pm$ 9.6	130.1 $\pm$ 28.5	63.2 $\pm$ 1.4	73.4 $\pm$ 9.7	0.5 $\pm$ 0.1	95.6 $\pm$ 25.5	62.5 $\pm$ 0.5	458.3 $\pm$ 53.8
Lowly polluted eels			264.1 $\pm$ 12.5	230.5 $\pm$ 7.6*	64.4 $\pm$ 1.7	88.9 $\pm$ 7.3	0.8 $\pm$ 0.3	273.3 $\pm$ 29.9*	65.2 $\pm$ 2.4	795.6 $\pm$ 55.3	
Intermediately polluted eels [#]			254.2 $\pm$ 30.0	282.2 $\pm$ 15.1*	70.7 $\pm$ 2.0*	109.2 $\pm$ 8.3*	1.4 $\pm$ 0.1*	230.7 $\pm$ 45.1	64.9 $\pm$ 1.9	754.2 $\pm$ 173.5	
Highly polluted eels			418.8 $\pm$ 48.5***	321.8 $\pm$ 38.1***	72.7 $\pm$ 1.6**	128.4 $\pm$ 3.3*	1.9 $\pm$ 0.1*	180.6 $\pm$ 64.1	67.3 $\pm$ 1.1	640.5 $\pm$ 90.6	
	Standard diet	184.6 $\pm$ 31.6	104.6 $\pm$ 27.9	61.2 $\pm$ 3.0	64.1 $\pm$ 9.2	0.5 $\pm$ 0.1	131.3 $\pm$ 30.9	61.9 $\pm$ 1.9	492.4 $\pm$ 98.4		

	Lowly polluted eels	238.9±17.7	230.0±18.2*	71.9±3.9	73.2±14.4	0.8±0.2	213.3±68.17	78.8±3.7	788.2±38.7
Females	Intermediately polluted eels [#]	288.5±37.5	232.0±20.0*	82.1±2.1*	88.9±6.6*	1.0±0.1*	293.9±65.2	64.5±2.3	660.0±146.5
	Highly polluted eels	379.8±53.1**	285.9±31.9***	98.7±1.1*	90.7±1.6*	3.6±0.5*	157.8±65.1	66.1±2.2	635.5±187.8

[#]Intermediately polluted eel corresponds to an artificial eel matrix obtained by mixing lowly polluted and highly polluted eels with a ratio 2:1. Values represent the mean ± SEM for 10 individuals (5 females and 5 males)/group, and are expressed as pg/ml. ^{\$}NO expressed as μM. **p* < 0.05, ***p* < 0.01 and ****p* < 0.001 significantly different from the control.

Table 4. Effects of perinatal exposure to polluted eels on the hippocampal inflammatory markers of male and female middle-aged mice, assessed at PND 330, compared to standard diet alone (i.e. diet without eel).

	Maternal diet with or without eels	Activated p38 MAPK	Activated erk1/2	NFKB p65	TNFα	IL1β	IL6	IL4
Males	Standard diet	0.16±0.0	0.53± 0.0	0.72±0.0	123.2±6.9	145.6±15.7	45.4±0.9	170.9±7.6
	Lowly polluted eels	0.19±0.0	0.68±0.0	0.87±0.0	537.7±44.9**	340.9±24.7**	188.2±24.7**	169.7±19.1
	Intermediately polluted eels [#]	0.30±0.0*	0.52±0.1	0.80±0.0	561.9±65.5**	332.3±48.2**	224.2±21.2***	169.1±21.1
	Highly polluted eels	0.30±0.0*	0.42±0.1	0.80±0.1	900.5±128.2***	412.6±11.8***	373.4±29.5***	194.4±27.7
Females	Standard diet	0.15±0.0	0.56±0.0	0.74±0.0	146.6±9.2	116.1±14.1	48.6±2.3	147.0±16.7
	Lowly polluted eels	0.32±0.0	0.49±0.0	0.87±0.0	534.8±79.9*	254.4±15.3*	179.3±14.8***	146.8±7.0
	Intermediately polluted eels [#]	0.50±0.0**	0.32±0.0***	0.62±0.0 ^t	553.8±4.2**	289.5±43.5**	274.6±8.0***	109.9±13.8
	Highly polluted eels	0.55±0.0***	0.26±0.0***	0.43±0.0*	777.6±123.8***	402.4±38.2***	360.5±25.6***	95.0±18.6

[#]Intermediately polluted eel corresponds to an artificial eel matrix obtained by mixing lowly polluted and highly polluted eels with a ratio 2:1. The data (n=5/sex/group) are reported as the mean±SEM. TNFα, IL1β, IL6 and IL4 are expressed as pg/ml. p38 MAPK, Erk 1/2, NFKB p65 are expressed as the the measuring absorbance (OD) at 450 nm. **p* < 0.05, ***p* < 0.01 and ****p* < 0.001 significantly different from the control. The 't' indicates that activated p65 level of female mice whose mothers were exposed to intermediately polluted eels approached significance, compared to controls (*p* = 0.061).

Discussion Générale

L'anguille d'Europe, *Anguilla anguilla*, est un poisson prédateur et migrateur qui constitue, pour les chercheurs, un excellent bio-indicateur de la pollution environnementale, du fait que ce poisson gras est un bio-accumulateur des polluants et également un très bon vecteur de transfert des contaminants chimiques vers l'Homme comme matrice alimentaire. Afin d'appréhender l'impact de la consommation de telles matrices alimentaires contaminées chimiquement sur l'individu durant les premières étapes de son développement et en particulier sur son neuro-développement, nous avons mené au cours de cette thèse, tous les travaux sur un modèle murin. L'objectif était d'évaluer, tout en considérant le sexe des souris ainsi que leurs âges, les effets neuro-inflammatoires, comportementaux et cognitifs de l'exposition périnatale à trois matrices alimentaires (3 types d'anguilles) qui reflètent 3 niveaux de pollution (faible, moyenne et haute). Nous soulignons que nous n'avons pas pu trouver d'anguille non polluée. Les chercheurs du Centre de Recherches Analytique et Technologique de l'Université de Liège en Belgique qui sont aussi nos partenaires sur ce projet, où les analyses des PCB et dioxines dans les denrées alimentaires et les effluents constituent une expertise de ce centre, nous ont signalé l'impossibilité de disposer d'anguilles non polluées. Trois matrices d'anguille ont été étudiées, le muscle d'anguille de rivière, le muscle d'anguille d'élevage, et une matrice « artificielle » obtenue en mélangeant les deux muscles des deux types d'anguilles afin d'obtenir une concentration intermédiaire. Les analyses des polluants dans les 2 anguilles (de rivière et d'élevage) ont révélé l'existence des PCB et d'autres polluants tels que les pesticides organiques, les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), les dioxines/furanes, les polybromodiphényléthers (PBDE) et les métaux lourds (Soualeh et al., 2017 a, b). D'autres polluants, non évalués sont soupçonnés d'être également présents dans les anguilles tels que les dérivés de médicaments largués dans les effluents notamment les antibiotiques et les œstrogènes. Les analyses chimiques ont montré que l'anguille de rivière était très polluée par rapport à celle de l'élevage considérée comme faiblement polluée. Ainsi, la matrice anguille mélangée reflète une pollution intermédiaire. Les souris mères gestantes et allaitantes ont été

exposées aux anguilles à raison de 0.8 g-muscle lyophilisé/kg/jour. Ainsi, l'apport quotidien en 6 PCB-NDL par 0,8 g de muscle d'anguilles polluées délivré aux souris, pendant la période de gestation et lactation, correspond à 85 ng/kg de PCB-NDL (anguille d'élevage), 216 ng/kg (anguille mélangée) et 400 ng/kg (anguille de rivière).

La majorité des xénobiotiques présents dans nos matrices alimentaires (anguilles) tels que les PCB, les pesticides et certains métaux lourds est connue par leur capacité d'induire une inflammation précoce chez la progéniture (Dietert, 2012; Marques et al., 2013) via l'activation ou la dérégulation de certaines voies de signalisation cellulaire telles que la voie du facteur nucléaire kappa B (NF- κ B), la voie de signalisation des protéines MAP kinases (MAPK), la voie d'induction génique de la cyclooxygénase-2 et de l'oxyde nitrique synthase (Cardenas-Gonzalez et al., 2013; Dietert, 2015; Kim et al., 2002; Liu et al., 2015; Osgood et al., 2013; Sipka et al., 2008). De plus, de nombreuses études cliniques (Chen et al., 1994; Harada, 1976; Jacobson et al., 1985; Sagiv et al., 2012; 2010) et sur des modèles animaux (Chen et al., 1994; Harada, 1976; Jacobson et al., 1985; Sagiv et al., 2012; 2010) ont mis en évidence l'induction des troubles comportementaux et cognitifs par certains de ces contaminants tels que les PCB. Dans le cas d'une exposition précoce aux PCB, ces troubles comportementaux et cognitifs peuvent se manifester tardivement (Boix et al., 2011; Cauli et al., 2012; Schantz et al., 1991; Karkaba et al., 2017). Ces troubles peuvent concerner entre autres le comportement social (Karkaba et al., 2017, Lee et al., 2008; Wang et al., 1999, Jolous-Jamshidi et al., 2010) l'anxiété (Orito et al., 2007, Elnar et al., 2012, Plusquellec et al., 2010, Bell et al., 2016; Gillette et al., 2016), l'hyperactivité (Dridi et al., 2017), la dépression (Fitzgerald et al., 2008; Gaum et al., 2014; Kilburn et al., 1989; Santiago-Rivera et al., 2007; Strom et al., 2014) et la cognition (Jacobson et al., 1985, Genuis, 2008; Oken et al., 2005; Paliwoda et al., 2016).

Dans ce travail de thèse, nous avons étudié l'effet « cocktail » ou « combiné » puisque l'effet évalué correspond à l'effet de l'ensemble des polluants présents dans la matrice anguille ainsi que celui de l'ensemble des ingrédients bénéfiques tels que les acides gras polyinsaturés (les oméga-3) et le sélénium également présents dans ces poissons gras. Ainsi, l'effet cocktail pourrait correspondre à plusieurs modes d'interactions entre les divers contaminants et ingrédients présents dans les matrices anguilles y compris des réactions synergiques, additives et/ou antagonistes (Dridi et al., 2014; Elnar et al., 2012; Roegge et al., 2004; Sitarek and Gralewicz, 2009; Sugawara et al., 2008).

1. Rôle de l'exposition périnatale aux anguilles contaminées dans l'induction de l'inflammation

1.1. Le statut inflammatoire au niveau cérébral

Dans ce travail, les réponses inflammatoires ont été évaluées au niveau cérébral (cerveau entier) à différentes tranches d'âge : à la naissance (jour postnatal 1, JPN1); au sevrage (JPN21) et à l'âge adulte (JPN100) chez les souris mâles et femelles dont les mères ont été exposées durant la période de gestation jusqu'à la fin de la période d'allaitement (Soualeh et al, 2017a). Nous avons constaté une inflammation précoce et prononcée dans le cerveau en période néonatale (JPN1), et également dans le cerveau en période postnatale (les cerveaux des souris, le jour du sevrage, JPN21). Cette inflammation a été qualifiée de chronique puisqu'elle était détectée aussi dans les cerveaux des souris adultes (JPN100).

En effet, des niveaux significatifs de cytokines proinflammatoires $IL1\beta$ et $TNF\alpha$ ont été observés dans les cerveaux néonataux mâles et femelles des souris exposées en période prénatale aux 3 types d'anguilles polluées. De plus, chez les souris mâles et femelles exposées *in utero* aux anguilles hautement polluées, une production importante de cytokines pro-inflammatoires, $IFN\gamma$ et $IL6$, a été aussi relevée dans les cerveaux en période néonatale. Bien que l'exposition prénatale aux anguilles polluées a induit une neuro-inflammation précoce chez

la progéniture, il semble qu'il y ait une production différentielle de cytokines pro-inflammatoires selon le sexe puisqu'une production accrue a été constatée chez les mâles. En effet, les niveaux de production des $\text{TNF}\alpha$, IL6 et $\text{IFN}\gamma$ dans le cerveau des mâles en période néonatale étaient légèrement plus élevés que ceux dans le cerveau des femelles en période néonatale, en particulier suite à une exposition aux anguilles hautement polluées. Inversement, la production de NO a été constatée significativement plus élevée dans le cerveau des femelles en période néonatale. Nous avons relevé, aussi, un dérèglement de la réponse anti-inflammatoire chez les cerveaux des mâles et des femelles exposés en période néonatale par rapport à ceux non exposés. En particulier, une production significativement élevée d'IL10 et d'IL4 a été détectée chez les cerveaux des souris mâles et femelles exposées *in utero* aux anguilles faiblement polluées en période néonatale (Soualeh et al., 2017a). Encore une fois, une différence entre les deux sexes a été notée, car seuls les cerveaux des mâles exposés en période néonatale ont produit des niveaux significatifs de la cytokine anti-inflammatoire $\text{TGF}\beta$. Ainsi, le statut inflammatoire induit dans le cerveau en période néonatale reflète donc des réponses exclusives à l'exposition *in utero* aux anguilles polluées. A ce stade néonatal, la production de différentes cytokines inflammatoires pourrait être d'origine placentaire (cytokines maternelles qui traversent le placenta) voire fœtale (production des cytokines suite à une exposition directe du fœtus aux polluants ou à leurs métabolites) (Bolton et Bilbo, 2014; Hale et al., 2014; Marques et al., 2013). Nous avons également pu confirmer l'induction d'une inflammation chez les mamans exposées aux anguilles par la présence des taux plasmatiques élevés des marqueurs pro-inflammatoires à savoir MPO, $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL1}\beta$ et IL6. Cette réponse pro-inflammatoire a été plus prononcée chez les mères exposées aux anguilles fortement polluées (Soualeh et al., 2017b). Ces résultats sont en faveur d'une origine maternelle de l'inflammation. Cependant, l'origine fœtale ne pourrait pas être exclue.

Dans notre étude, l'exposition de la progéniture aux anguilles polluées a été poursuivie pendant l'allaitement et jusqu'au sevrage (JPN21). Par conséquent, le statut inflammatoire dans les cerveaux postnatals des souris reflète des réponses à une exposition à la fois gestationnelle et lactationnelle aux anguilles polluées. En effet, une inflammation postnatale dans le cerveau des souris mâles et femelles a été constatée par une production importante d'IL6. Cette neuro-inflammation postnatale a dépendu étroitement du niveau de pollution des matrices anguilles étudiées. Les niveaux les plus importants de $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL1}\beta$, $\text{IFN}\gamma$ et NO ont été détectés dans le cerveau postnatal des souris mâles et femelles suite à une exposition périnatale aux anguilles hautement polluées. Un effet sexe dépendant a été également observé dans les cerveaux analysés en période postnatale concernant les niveaux de production de certains marqueurs pro-inflammatoires. En effet, le $\text{TNF}\alpha$ a été produit à des niveaux plus élevés chez le cerveau des mâles en période postnatale; bien que la production du NO ait été considérablement plus élevée dans le cerveau des femelles en période postnatale.

Il est important de noter que les profils pro et anti-inflammatoires dans les cerveaux mâles et femelles en période néonatale, comparés à ceux des cerveaux mâles et femelles en période postnatale sont approximativement similaires. Les différences que nous pouvons signaler entre le statut inflammatoire en période néonatale et celui en période postnatale sont (i) une augmentation légère de la production de certaines cytokines pro-inflammatoires observée dans les cerveaux en période postnatale ($\text{TNF}\alpha$ et $\text{IFN}\gamma$ pour chez les mâles et IL6 chez les femelles), (ii) une diminution du taux de $\text{TGF}\beta$ observée dans le cerveau des mâles en période postnatale. Par conséquent, nous constatons une contribution relativement limitée de l'exposition lactationnelle dans l'induction des réponses inflammatoires, puisque les cytokines pourraient également avoir une origine postnatale (Bolton et Bilbo, 2014). Dans ce même contexte, il a été signalé que l'exposition lactationnelle à certains types de polluants tels que le plomb et la pollution de l'air entraîne une néphrotoxicité et une cardiotoxicité accrues que

celles constatées après l'exposition prénatale (Damaceno-Rodrigues et al., 2009; Vyskocil et al., 1995). Cette hypothèse a été également approuvée dans les études réalisées sur les polluants à l'état individuel ou pur tel que le bisphénol A pour étudier les effets développementaux sur le comportement émotionnel chez les rongeurs (Gioiosa et al., 2013; Palanza et al., 2016). Dans notre étude, les cerveaux des animaux mâles et femelles en période néonatale, exposés *in utero* ont montré des profils inflammatoires similaires, voire plus prononcés, par rapport à ceux observés dans les cerveaux des animaux mâles et femelles en période postnatale, exposés à la fois *in utero* et pendant l'allaitement. Nous soulignons ainsi la forte vulnérabilité du cerveau en développement aux défis inflammatoires pendant la gestation. Nos résultats mettent en œuvre

l'effet combiné et potentiel d'une myriade de polluants dans l'induction des mécanismes inflammatoires *in utero* et nous relevons ainsi, l'importance d'étudier les effets neurodéveloppementaux des polluants alimentaires dans une matrice alimentaire avec des niveaux de pollution réels au lieu d'une matrice artificielle ou des polluants à l'état individuel.

Le caractère persistant de cette inflammation cérébrale a été également confirmé. En effet, à l'âge adulte (JPN100), nous avons relevé une forte expression des marqueurs pro-inflammatoires $TNF\alpha$, $IL1\beta$, $IFN\gamma$, $IL6$ et NO . Ce qui met en évidence l'aspect chronique de cette inflammation induite dans les cerveaux des souris mâles et femelles tout au long de leur vie (Soualeh et al, 2017a).

1.2. Le statut inflammatoire au niveau des cellules microgliales

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à évaluer les réponses inflammatoires au niveau des cellules microgliales à la naissance (JPN1), au sevrage (JPN21), à l'âge adulte (JPN100) et chez les souris mâles et femelles d'âge moyen (JPN330) dont les mamans ont été exposées durant la période de la gestation jusqu'à la fin de la période d'allaitement (Soualeh et al, 2017b).

Les cellules microgliales des cerveaux des souris femelles et mâles exposées périnatalement aux anguilles polluées ont manifesté une forte production de marqueurs

proinflammatoires d'une façon chronique depuis la naissance jusqu'à un âge très avancé en comparaison aux témoins. Cette production met en évidence l'état d'activation adoptée par les cellules microgliales. En effet, vu la libération importante des cytokines inflammatoires, les cellules microgliales sont forcément en état d'activation et ce depuis la naissance, chez les animaux exposés. Nous relevons aussi que la balance pro/anti-inflammatoire est clairement orientée vers la proinflammation vu l'abondance et la persistance de la production des cytokines proinflammatoires par ces cellules. Par conséquent, même si nous n'avons pas réalisé un phénotypage, le profil pro-inflammatoire pourrait indiquer que les cellules microgliales activées seraient donc majoritairement orientées vers un phénotype M1, susceptible d'induire des effets délétères par rapport à la neuroprotection qui pourrait être conférée par le phénotype M2.

Le taux de la production de certaines cytokines pro-inflammatoires par les cellules microgliales dépend du niveau de pollution. En effet, les concentrations des TNF α , IL1 β , NO, IL6 et IFN γ ont été plus prononcées dans les cellules microgliales des souris femelles et mâles exposées périnatalement aux anguilles hautement et moyennement polluées par rapport à celles des souris femelles et mâles exposées périnatalement aux anguilles polluées. Il est à noter que le profil pro-inflammatoire dans les cellules microgliales des cerveaux mâles a été approximativement similaire à celui des cellules microgliales des cerveaux femelles.

En concordance avec ce qui a été démontré au niveau du cerveau entier, nous avons constaté que les cellules microgliales des cerveaux néonataux mâles et femelles présentent des profils inflammatoires similaires, voire plus prononcés, par rapport à ceux détectés dans les cellules microgliales des cerveaux postnataux mâles et femelles exposés à la fois *in utero* et pendant l'allaitement. Par conséquent, nous constatons encore une fois une contribution relativement limitée de l'exposition lactationnelle dans l'induction des réponses inflammatoires cellulaires et nous confirmons ainsi la forte vulnérabilité du cerveau en développement aux défis inflammatoires pendant la gestation.

1.3. Le statut inflammatoire au niveau de l'hippocampe

Un intérêt particulier a été porté au statut inflammatoire au niveau d'une région cérébrale, l'hippocampe, à l'âge moyen (JPN 330). Nos résultats montrent une production importante des cytokines pro-inflammatoires notamment les $TNF\alpha$, $IL1\beta$ et $IL6$ au niveau de cette région chez les souris mâles et femelles d'âge moyen exposées périnatalement aux anguilles polluées. Nous avons montré également une diminution significative et sexe dépendante de l'activation des protéines de la voie des MAPK (ERK1/2) et la voie NF- κ B (p65), et des niveaux d'acétylcholine au niveau de l'hippocampe des souris femelles d'âge moyen suite à une exposition périnatale aux anguilles moyennement et hautement polluées. Une activation plus importante de la p38 MAPK a été également constatée dans l'hippocampe des souris femelles d'âge moyen que celui des mâles d'âge moyen exposées périnatalement aux anguilles moyennement et hautement polluées (Soualeh et al, 2017b).

1.4. Le statut inflammatoire au niveau périphérique

Au niveau périphérique, nous avons démontré une inflammation périphérique aussi bien chez les souris mâles que les femelles adultes et d'âge moyen, dont les mamans ont été exposées pendant la gestation et l'allaitement aux anguilles polluées, par des niveaux plasmatiques significativement élevés d'une enzyme pro-inflammatoire, la myéloperoxydase (MPO) (Soualeh et al, 2017b). La MPO est considérée comme étant un indicateur systémique de l'inflammation. De ce fait, il semblerait que l'inflammation détectée chez les souris mâles à l'âge adulte et moyen a été plus prononcée que celle détectée chez les femelles. Ces différences peuvent être attribuées aux stratégies adaptatives liées à chaque sexe. Un effet dose dépendant a aussi été trouvé puisque les souris mâles exposées aux anguilles hautement et moyennement polluées ont exprimé la MPO en forte concentration.

2. Programmation périnatale du comportement “dépressif-like” à l’âge adulte par l’inflammation

Nous avons pu démontrer lors de l’étude du comportement de résignation, à l’âge adulte (JPN100) que seules les souris mâles ont présenté un phénotype “dépressif-like” à la fois dans le test de la suspension caudale et le test de la nage forcée (Soualeh et al, 2017a). Il est important de noter que ce comportement “dépressif-like” observé dépend du niveau de la pollution. En effet, ces symptômes dépressifs ont été plus importants chez les souris mâles exposées périnatalement aux anguilles moyennement et hautement polluées que celles exposées aux anguilles faiblement contaminées.

Etant donné que ces souris ont manifesté une inflammation au niveau de leur cerveau depuis la naissance jusqu’à l’âge adulte, cela suggère une programmation périnatale du comportement “dépressif-like” par une inflammation précoce à effet tardif. Nous rappelons que dans ces modèles comportementaux de la dépression, les rongeurs tentent d’échapper à une situation anxiogène et expriment un comportement loin d’être passif appelé le comportement de résignation (Belzung, 2014; Cryan et Leonard, 2010; Cryan et al, 2005). Pour confirmer le résultat obtenu, nous avons démontré également que l’activité locomotrice n’a pas été affectée chez ces mêmes souris mâles adultes (JPN90-92). Ce qui confirme clairement que l’augmentation significative du comportement d’immobilité observée dans les deux tests comportementaux reflète un véritable comportement de résignation. Dans ce même contexte, nous avons démontré dans l’étude de Dridi et al (2017) que l’exposition périnatale aux anguilles polluées induit une hyperactivité chez les souris femelles uniquement. Cette hyperactivité ne s’est pas manifestée chez les femelles au JPN47 mais plutôt très tardivement aux JPN195, 305 et 329, c’est-à-dire à partir d’un âge adulte bien avancé puisque dans cette présente étude, l’activité locomotrice des souris à l’âge adulte (JPN 90) n’a pas été affectée. Nos précédentes études (Dridi et al., 2014, 2017), ainsi que les données recueillies au cours de ce travail ont

démontré que le poids corporel de la progéniture n'a pas été affecté suite à cette exposition périnatale aux anguilles polluées. Par conséquent, le comportement d'immobilité observé ne peut pas être attribué à une diminution potentielle du poids corporel. Ainsi, le comportement "dépressif-like" ou de résignation induit chez nos souris mâles adultes pourrait être lié à la dérégulation sélective et sexe-dépendante de l'axe hypothalamique pituitaire surrénalien (HPA) comme le niveau de production de la corticostérone, hormone du stress, a été altéré uniquement chez les souris mâles adultes.

Il est important de souligner que les performances maternelles dans le test de la construction du nid et le test de ramassage des jeunes ou "Retrieving test" n'ont pas été affectées ce qui exclut toute anomalie du comportement maternel qui pourraient affecter le développement de leur progéniture et contribuer à l'apparition du comportement dépressif à l'âge adulte (Soualeh et al., 2017a).

En concordance avec nos résultats qui lient l'exposition précoce aux faibles doses de contaminants, l'inflammation et la dépression, les résultats cliniques et aussi ceux obtenus sur le modèle animal suggèrent que l'inflammation constitue un facteur causal plausible qui contribue au développement de la dépression (Bilbo et Schwarz, 2009; Bolton et Bilbo, 2014, Miller et Raison, 2016). Par exemple, des études cliniques ont montré que l'exposition des individus prédisposés à développer une dépression (ayant vécu un traumatisme à l'enfance par exemple) à des situations stressogènes, a induit des réponses inflammatoires élevées par rapport aux sujets témoins (Pace et al., 2006). De même, des études post-mortem ont mis en évidence une expression élevée de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL1 β , l'IL6 et le TNF α dans le cerveau de victimes de suicide ayant souffert d'une dépression (Maes, 1995; Miller et al., 2009). Il est à noter aussi que les niveaux sanguins des interleukines pro-inflammatoires des IL1 β et IL18 sont corrélés positivement avec la gravité de la dépression; bien que des concentrations réduites des cytokines anti-inflammatoires telles que IL10 et TGF- β ont été

également rapportées chez des patients dépressifs (Li et al., 2010). De plus, les symptômes de la dépression majeures ont été fortement associés à une inflammation chronique (Bilbo and Schwarz, 2009).

Ce travail de thèse met bien en évidence la présence d'une inflammation cérébrale chronique avec un niveau de production faible des cytokines anti-inflammatoires détectées dans le cerveau des souris mâles et femelles adultes par rapport à celui des néonataux et postnataux. En outre, nous avons remarqué des taux plus élevés de $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL1}\beta$ et IL4 chez les mâles. Cette production et induction différentielle de ces cytokines peut contribuer aux effets sexe-dépendants observés dans les tests de comportement de résignation. Cette différence sexe-dépendante a été expliquée récemment par le fait que la sensibilité périnatale aux défis immunitaires semble être plus élevée chez les mâles que chez les femelles en raison des stratégies adaptatives spécifiques au sexe adoptées dans la réponse immunitaire du cerveau en développement et du placenta (Bolton et Bilbo, 2014, Thompson et al., 2001). Les cytokines pro-inflammatoires étudiées peuvent agir en diminuant la disponibilité de la sérotonine, de la dopamine et de la noradrénaline qui sont les principaux neurotransmetteurs impliqués dans la physiopathologie de la dépression (Miller et Raison, 2016, Wilson et al., 2002).

Nos résultats montrent également que les niveaux plasmatiques de MPO ont été élevés chez les souris adultes mâles et femelles par rapport aux témoins. En effet, dans une étude gémellaire, une association a été établie entre les troubles majeurs de la dépression et les biomarqueurs inflammatoires, plus particulièrement la MPO, une enzyme inflammatoire produite par des leucocytes activés (Vaccarino et al., 2008). Une autre étude a également montré que les niveaux d'expression génique et protéique de MPO ont été élevés chez les patients présentant un trouble dépressif récurrent par rapport aux témoins (Talarowska et al., 2015). Par conséquent, la MPO peut jouer un rôle dans le développement du comportement dépressif chez les mâles, vue les niveaux plasmatiques plus importants détectés chez ces animaux à l'âge

adulte par rapport à leurs congénères femelles, en particulier les souris qui ont été exposées périnatalement aux anguilles moyennement et hautement polluées.

3. Impact de l'exposition périnatale aux anguilles contaminées dans l'induction d'un déficit de la mémoire à long terme chez les souris femelles d'âge moyen : Rôle potentiel de l'inflammation induite au niveau de l'hippocampe

Nos résultats montrent qu'un déficit de la mémoire de rétention à long terme a été induit tardivement au JPN310 d'une façon sexe et dose dépendante. L'amnésie a été induite uniquement chez les souris femelles d'âge moyen exposées périnatalement à des anguilles moyennement et hautement polluées (Soualeh et al, 2017b). Nous rappelons que dans une étude précédente menée dans notre laboratoire, aucun effet sur la mémoire n'a été observé à l'âge adulte et chez les deux sexes (Dridi et al., 2014). Ce déficit de la mémoire de rétention à long terme a été constaté plus tardivement chez des souris femelles d'âge moyen suite à une exposition périnatale à des anguilles moyennement ou hautement polluées. Ainsi, le cerveau des souris d'âge moyen est plus sensible aux altérations cognitives induites par l'exposition périnatale aux anguilles polluées que le cerveau de souris adulte.

Le déficit mnésique semble être corrélé à une inflammation chronique induite d'une façon prononcée au niveau tissulaire (cerveau entier), cellulaires (les cellules microgliales) et périphérique (sang) depuis la naissance. Cette hypothèse a été accréditée par l'inflammation détectée dans l'hippocampe, région clef pour le processus mnésique. Nous rappelons que l'inflammation a été détectée aussi bien chez les souris mâles que femelles d'âge moyen. Cependant, d'une façon sexe dépendante, au niveau de l'hippocampe des souris femelles d'âge moyen exposées périnatalement aux anguilles moyennement et hautement polluées, nous avons trouvé une diminution significative de l'activation des protéines de la voie des MAPK (ERK1/2) et la voie NF- κ B (p65), et des niveaux d'acétylcholine. Une activation plus importante de la p38 MAPK a été également constatée dans l'hippocampe des souris femelles

d'âge moyen par rapport à celui des mâles d'âge moyen exposées périnatalement aux anguilles moyennement et hautement polluées.

L'ensemble de ces résultats suggèrent une programmation périnatale du déficit de rétention de la mémoire à long terme chez les souris d'âge moyen et ceci d'une façon dépendante du niveau de la pollution dans la matrice anguille. En effet, les cytokines pro-inflammatoires auraient altérées la mémoire chez les femelles d'âge moyen, en agissant spécifiquement sur l'activation des voies de signalisation ERK1/2 et p38, ce qui aurait entraîné par conséquent une diminution du niveau d'acétylcholine, un neurotransmetteur clef dans le processus mnésique, au niveau de l'hippocampe, siège de la mémoire à long-terme.

Dans notre étude, la voie ERK1/2 pourrait être le principal contributeur dans l'altération de la mémoire chez les femelles d'âge moyen exposées périnatalement aux anguilles moyennement et hautement polluées. La voie p38 MAPK pourrait également jouer un rôle dans le déficit cognitif observé chez les femelles d'âge moyen car une augmentation de l'activation de p38 MAPK a été observée dans l'hippocampe de femelles exposées à des anguilles moyennement et hautement polluées. En concordance avec nos résultats il a été démontré que la diminution de l'activation de l'ERK1/2 ou l'activation accrue de la p38 MAPK, dans l'hippocampe, sont associées à des déficiences de la PLT, ce qui engendre un déficit dans les processus de mémorisation à long terme (Donzis et Tronson, 2014; Giese et Mizuno, 2013). Aussi, des études sur des modèles animaux ont démontré que l'activation ERK1/2 est nécessaire pour la mémoire à long terme (Giese et Mizuno, 2013). Ces voies de transduction du signal dépendantes des cytokines peuvent provoquer l'inhibition du facteur de transcription NF-kB qui est une fois activé dans les neurones pourrait améliorer la mémoire (Kaltschmidt et Kaltschmidt, 2009). La diminution des niveaux d'acétylcholine dans l'hippocampe des femelles d'âge moyen exposées périnatalement à des anguilles moyennement ou hautement polluées pourrait être en adéquation avec ce qui a été rapporté sur ce neurotransmetteur qui facilite l'encodage des informations et

renforce le processus de la potentialisation à long terme dans l'hippocampe (Hasselmo, 2006). Les cytokines pro-inflammatoires peuvent agir en diminuant la disponibilité de ce neurotransmetteur (Bolton et Bilbo, 2014; Miller et Raison, 2016; Wilson et al., 2002), ce qui pourrait expliquer le déficit d'acétylcholine dans l'hippocampe des femelles d'âge moyen exposées aux anguilles moyennement et hautement polluées. Cependant nous rappelons que cette diminution significative ne soit pas liée à une activité importante de l'acétylcholinestérase puisque nous avons déjà trouvé que l'activité de cette enzyme est réduite dans l'hippocampe (Dridi et al., 2017).

Il est bien établi que l'inflammation du système cérébral joue un rôle central dans le dysfonctionnement cognitif (Miller et Spencer, 2014; Moieni et al., 2015; Simen et al., 2011; Wilson et al., 2002). L'inflammation périphérique a été également liée à des performances cognitives faibles chez les modèles animaux (Murray et al., 2010; Wilson et al., 2002; Zhang et al., 2009) ainsi que les humains tels que l'exemple des personnes souffrant d'une infection aigüe (Elison et al., 2008; Reichenberg et al., 2001; Wilson et al., 2002). L'inflammation est également liée au déclin cognitif lié à l'âge et au processus de vieillissement pathologique telles que les maladies neurodégénératives (Dilger et Johnson, 2008; Lee et al., 2008; Miller et Spencer, 2014, Wilson et al., 2002). Au niveau cérébral, les cellules microgliales interviennent comme des modulateurs de la fonction cognitive, notamment la mémoire (Blank et Prinz, 2013). Ces cellules une fois activées, constituent la principale source de cytokines pro-inflammatoires dans le cerveau (Simen et al., 2011). Plusieurs auteurs ont suggéré que les cytokines sont des modulateurs de la mémoire et des fonctions cognitives d'une façon bidirectionnelle. En effet, la surexpression des cytokines les plus étudiées à savoir TNF α , IL1 β et / ou IL6 au niveau de l'hippocampe est considérée comme un contributeur majeur dans l'induction des déficits de la mémoire à court et à long terme (Donzis et Tronson, 2014, Ohgidani et al., 2016, Thomson et Sutherland, 2005). La production exacerbée de cytokines dans le cerveau d'âge moyen peut

entraîner des changements comportementaux et cognitifs inadéquats (Dilger et Johnson, 2008). Bien qu'un certain seuil d'activation des cellules microgliales ainsi que des niveaux en cytokines constituent, à l'état physiologique, une condition requise pour une bonne cognition (De Luca et al., 2016, Donzis et Tronson, 2014), la production chronique à des niveaux élevés des cytokines pro-inflammatoires est une condition nécessaire pour altérer la mémoire (Simen et al., 2011). Cette condition a été prouvée dans notre étude puisque la production de ces cytokines au niveau des cellules microgliales a été significativement importante à 4 stades de vie distincts. Etant donnée que ce déficit mnésique a été détecté uniquement chez des souris femelles d'âge moyen suite à une exposition périnatale à des anguilles moyennement ou hautement polluées, nous suggérons que cette altération est due probablement à l'interaction des cellules microgliales déjà activées avec le processus de vieillissement qui joue dans ce cas le rôle d'un stimulus amplificateur de la réponse de ces cellules (Barrientos et al., 2015; Dilger and Johnson, 2008).

En plus, plusieurs mécanismes sous-jacents de l'inflammation peuvent être impliqués dans le dysfonctionnement cognitif comme (i) l'implication d'autres voies de signalisation telles que la voie de Janus kinase (JAK) (Donzis et Tronson, 2014, Giese et Mizuno, 2013, Peng et al., 2010), (ii) la diminution de l'expression des gènes, (iii) la réduction de la neurogénèse, (iv) les altérations des fonctions neuronales telle que l'atteinte de la potentialisation à long terme (PLT), qui est un mécanisme cellulaire d'apprentissage et de mémoire, (v) l'apoptose neuronale et la perturbation de la communication de l'hypothalamus avec les régions cérébrales impliquées dans les processus cognitifs (Barrientos et al., 2015; De Luca et al., 2016; Dilger et Johnson, 2008; Gadani et al., 2012; Liu et al., 2012; Simen et al., 2011; Wilson et al., 2002). Bien qu'à l'âge adulte (JPN100), nous avons mis en évidence une dérégulation sexe dépendante de l'axe HPA par une production importante de la corticostérone au niveau plasmatique chez les souris mâles, aucune altération n'a été signalée à l'âge moyen chez les deux sexes. Ce qui

suggère qu'en plus du sexe, la régulation de l'axe HPA dépend également de l'âge (Moieni et al., 2015). Ce constat pourrait expliquer ces différences observées entre deux âges distincts (c'est-à-dire JPN100 et JPN330). Ainsi, le déficit de la mémoire de rétention à long terme à l'âge moyen a été provoqué par une inflammation précoce par un mécanisme autre que la dérégulation de l'axe HPA, qui est également connu comme un contributeur plausible dans les troubles de la mémoire (Miller et Spencer, 2014).

Nos résultats mettent en évidence l'implication de la consommation maternelle des poissons pollués dans les performances cognitives de la progéniture. Cependant, les données bibliographiques actuelles sur ce lien sont controversées. Dans de nombreuses études (Genuis, 2008; Oken et al., 2005; Paliwoda et al., 2016), l'accent a été mis sur des polluants tels que le méthylmercure (MeHg) ou les PCB. Cependant, toute une myriade de polluants tels que les pesticides, les HAP, le plomb parmi d'autres qui peuvent être également présents dans ces poissons (Soualeh et al, 2017a) ont été ignorés. Certaines études de cohorte comme celles des enfants de Seychellois (Palumbo et al., 2000, Myers et al., 2003) ont démontré que l'exposition périnatale au MeHg provenant de la consommation de poisson n'a pas d'impact sur le développement cognitif même si les mères consommaient 12 repas de poisson par semaine. D'autres études prospectives ont démontré que des mauvaises performances cognitives induites chez des nourrissons, des bébés (7 et 6 mois) et des enfants (4 et 6 ans) ont été liées à la forte consommation du poisson contaminé par le mercure ou les PCB (Freire et al., 2010, Grandjean et al., 1997, Jacobson et al., 1985, Oken et al., 2005 et 2008).

En accord aux études reliant l'atteinte des performances cognitives chez les nourrissons, les bébés et les enfants à l'apport maternel de poisson, nos résultats soulignent encore cette relation en mettant en évidence le rôle déterminant du niveau de pollution dans les poissons. En effet, le poisson le moins pollué utilisé dans cette étude (anguilles d'élevage) n'a pas affecté les performances cognitives de la progéniture. Cependant, les poissons avec des niveaux de

pollution plus élevés (le mélange d'anguilles et les anguilles de la rivière) altèrent la mémoire de rétention à long terme des souris femelles d'âge moyen avec des différences significatives entre l'exposition périnatale des femelles d'âge moyen aux anguilles hautement polluées par rapport à celles exposées aux anguilles faiblement polluées.

Le déficit de la mémoire de rétention à long terme est un indicateur de vulnérabilité du cerveau des souris femelles d'âge moyen exposées aux anguilles hautement polluées. Cependant, le cerveau des femelles d'âge moyen exposées périnatalement aux anguilles faiblement polluées manifeste une plasticité ou une résilience qui pourrait être expliquées par l'implication des vitagènes qui sont des gènes cytoprotecteurs codant les protéines telles que les Hsp, l'hème oxygénase, la thiorédoxine et les sirtuines. Dans les conditions de stress, grâce à ces gènes, les cellules s'engagent dans une série de réponses adaptatives, dites réponses cellulaires au stress activant ainsi des voies de pro-survie. Une telle réponse peut établir un état cytoprotecteur dans une grande variété de maladies, y compris les maladies inflammatoires (Calabrese et al., 2010, 2012, 2016).

Conclusion Générale

Durant ce travail de thèse, de nombreux résultats et données ont été générés mettant en évidence, expérimentalement, l'impact tardif d'une exposition précoce au poisson faiblement contaminé sur la santé et le bien-être de la progéniture et à des stades de vie avancés voire très tardifs. A partir de nos résultats, deux conclusions (recommandations) majeures peuvent être tirées pour accomplir les études visant à prédire l'impact potentiel des contaminants alimentaires (y compris perturbateurs endocriniens) sur la santé des populations et celle de la progéniture. (i) La première conclusion ou recommandation est de prendre en compte l'effet, selon le sexe, dans ce type d'études, en particulier en lien avec le statut endocrinien ou hormonal des individus (perturbateurs endocriniens). En effet, tout au long de notre étude, nous avons trouvé des effets sexes dépendants. Un effet "dépressif-like" a été constaté chez les souris mâles, alors que les femelles n'ont pas manifesté un changement dans leur comportement de résignation. De même, un phénotype hyperactif a été décelé uniquement chez les femelles, à l'âge adulte et à l'âge moyen. Un dimorphisme sexuel a été aussi observé par rapport au déficit de la mémoire qui a été mis en évidence uniquement chez les femelles d'âge moyen. Le dimorphisme sexuel pourrait être expliqué par la perturbation de l'effet organisationnel des hormones sexuelles sur le cerveau en développement et/ou de leur effet activationnel sur le cerveau (à partir de la puberté) y compris les fonctions cognitives, comportementales et émotionnelles. Il serait aussi possible que les contaminants chimiques provoquent d'abord des lésions au niveau du cerveau, et ensuite les hormones sexuelles, via leurs effets organisationnels et activationnels, changeraient la nature de la lésion,—en induisant des réponses sexe-dépendantes selon les hormones sexuelles (testostérone vs. oestrogènes) mises en jeu. (ii) Comme seconde conclusion (recommandation), il est également important de considérer les différentes tranches d'âges lors de l'évaluation des effets des polluants. En effet, certaines sensibilités peuvent apparaître beaucoup plus tard dans les stades de la vie. Ainsi, l'hyperactivité n'a pas été détectée chez les femelles au JPN 47 (la période de préadolescence)

et au JPN 90-92 (âge adulte moyen). Cependant, le phénotype hyperactif n'a été décelé chez ces souris que tardivement à partir du JPN 195 (âge adulte avancé) et durant l'âge moyen (JPN 305-329). Le concept de l'origine développementale des maladies met souvent en avant l'altération de la trajectoire de développement du cerveau comme une cause précoce. L'inflammation précoce est un facteur important qui permet de changer le cours du développement du cerveau. Nos études ont démontré que nos animaux souffraient d'une inflammation précoce voire chronique. Le lien entre les mécanismes inflammatoires et les différentes déficiences trouvées dans cette étude (exemple, la dépression et les troubles de mémoire) sont bien établis par les chercheurs. Nous avons donc suggéré une programmation périnatale des différentes déficiences observées chez la progéniture des souris exposées aux anguilles polluées via les mécanismes inflammatoires.

En conclusion, l'anguille est un excellent exemple de matrice alimentaire polluée et vecteur du transfert des polluants de la chaîne alimentaire vers l'animal et/ou l'Homme. Même si la consommation des anguilles de rivière est interdite en France nous pouvons encore trouver celles d'élevage dans nos assiettes. Cette étude pourrait avoir une projection sur d'autres voies d'expositions et également sur d'autres matrices alimentaires (autres poissons comme le thon, les fruits de mer ...). L'une des conclusions les plus importantes dans cette étude et dans le contexte d'une application chez l'Homme, il est important de souligner et signaler le haut risque d'exposition chronique et répétée aux contaminants chimiques chez les femmes enceintes et allaitantes via la matrice poisson, même à faibles doses. La littérature est très abondante autour des études qui ont mis en évidence les effets oxydatifs et inflammatoires des expositions de manière générale. Nos études confirment ces effets et ont centré les effets au niveau du cerveau et certaines de ses fonctions. Ce couplage neuro-oxydativo-inflammatoire a comme conséquences de nombreux troubles du cerveau cognitifs, émotionnels et comportementaux. Ce

même couplage ne serait-il pas à l'origine de dégénérescence cellulaire et de vieillissement pathologique accéléré ?

Il serait ainsi judicieux, dans le cadre d'une perspective, d'envisager des études en associant l'introduction, dans des régimes alimentaires, des ingrédients nutritionnels à fort potentiel anti-oxydant et anti-inflammatoire afin de renforcer les effets cytoprotecteurs et surtout neuroprotecteurs pour limiter les risques d'impact des multi-expositions aux polluants. Dans le cadre de cette perspective, nos travaux préliminaires réalisés sur des fractions de plantes médicinales ont permis d'obtenir des activités anti-inflammatoire et cytoprotectrice importantes aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*.

Références Bibliographiques

-A-

- Aaltonen, R., Heikkinen, T., Hakala, K., Laine, K., Alanen, A., 2005. Transfer of proinflammatory cytokines across term placenta. *Obstetrics and gynecology* 106, 802-807.
- Aarum, J., Sandberg, K., Haeberlein, S.L., Persson, M.A., 2003. Migration and differentiation of neural precursor cells can be directed by microglia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 15983-15988.
- Allen, N.B., Lewinsohn, P.M., Seeley, J.R., 1998. Prenatal and perinatal influences on risk for psychopathology in childhood and adolescence. *Dev Psychopathol* 10, 513-529.
- Amor, S., Puentes, F., Baker, D., van der Valk, P., 2010. Inflammation in neurodegenerative diseases. *Immunology* 129, 154-169.
- Andersen, S.L., 2003. Trajectories of brain development: point of vulnerability or window of opportunity? *Neurosci Biobehav Rev* 27, 3-18.
- Arain, M., Haque, M., Johal, L., Mathur, P., Nel, W., Rais, A., Sandhu, R., Sharma, S., 2013. Maturation of the adolescent brain. *Neuropsychiatr Dis Treat* 9, 449-461.

-B

- Balasingam, V., Dickson, K., Brade, A., Yong, V.W., 1996. Astrocyte reactivity in neonatal mice: apparent dependence on the presence of reactive microglia/macrophages. *Glia* 18, 11-26.
- Balasingam, V., Yong, V.W., 1996. Attenuation of astroglial reactivity by interleukin-10. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 16, 2945-2955.
- Barker, D.J., 1995a. The fetal and infant origins of disease. *Eur J Clin Invest* 25, 457-463.
- Barker, D.J., 1995b. Fetal origins of coronary heart disease. *BMJ* 311, 171-174.
- Barker, D.J., 1998. In utero programming of chronic disease. *Clin Sci (Lond)* 95, 115-128.
- Barker, D.J., Gluckman, P.D., Godfrey, K.M., Harding, J.E., Owens, J.A., Robinson, J.S., 1993. Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. *Lancet* 341, 938-941.
- Barrientos, R.M., Kitt, M.M., Watkins, L.R., Maier, S.F., 2015. Neuroinflammation in the normal aging hippocampus. *Neuroscience* 309, 84-99.
- Bechade, C., Cantaut-Belarif, Y., Bessis, A., 2013. Microglial control of neuronal activity. *Frontiers in cellular neuroscience* 7, 32.
- Belarbi, K., Rosi, S., 2013. Modulation of adult-born neurons in the inflamed hippocampus. *Frontiers in cellular neuroscience* 7, 145.
- Bell, M.R., Thompson, L.M., Rodriguez, K., Gore, A.C., 2016b. Two-hit exposure to polychlorinated biphenyls at gestational and juvenile life stages: 1. Sexually dimorphic effects on social and anxiety-like behaviors. *Horm Behav* 78, 168-177.
- Biber, K., Neumann, H., Inoue, K., Boddeke, H.W., 2007. Neuronal 'On' and 'Off' signals control microglia. *Trends Neurosci* 30, 596-602.
- Biber, K., Pinto-Duarte, A., Wittendorp, M.C., Dolga, A.M., Fernandes, C.C., Von Frijtag Drabbe Kunzel, J., Keijser, J.N., de Vries, R., Ijzerman, A.P., Ribeiro, J.A., Eisel, U., Sebastiao, A.M., Boddeke, H.W., 2008. Interleukin-6 upregulates neuronal adenosine A1 receptors: implications for neuromodulation and neuroprotection. *Neuropsychopharmacology* 33, 2237-2250.
- Bilbo, S.D., Schwarz, J.M., 2009. Early-life programming of later-life brain and behavior: a critical role for the immune system. *Front Behav Neurosci* 3, 14.
- Blank, T., Prinz, M., 2013. Microglia as modulators of cognition and neuropsychiatric disorders. *Glia* 61, 62-70.
- Bogdan, C., Nathan, C., 1993. Modulation of macrophage function by transforming growth factor beta, interleukin-4, and interleukin-10. *Annals of the New York Academy of Sciences* 685, 713-739.
- Bogdan, C., Vodovotz, Y., Nathan, C., 1991. Macrophage deactivation by interleukin 10. *The Journal of experimental medicine* 174, 1549-1555.

- Boix, J., Cauli, O., Leslie, H., Felipo, V., 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. *Neurochem Int* 58, 69-77.
- Bolmont, T., Haiss, F., Eicke, D., Radde, R., Mathis, C.A., Klunk, W.E., Kohsaka, S., Jucker, M., Calhoun, M.E., 2008. Dynamics of the microglial/amyloid interaction indicate a role in plaque maintenance. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28, 4283-4292.
- Bolton, J.L., Bilbo, S.D., 2014. Developmental programming of brain and behavior by perinatal diet: focus on inflammatory mechanisms. *Dialogues Clin Neurosci* 16, 307-320.
- Bruce, A.J., Boling, W., Kindy, M.S., Peschon, J., Kraemer, P.J., Carpenter, M.K., Holtsberg, F.W., Mattson, M.P., 1996. Altered neuronal and microglial responses to excitotoxic and ischemic brain injury in mice lacking TNF receptors. *Nature medicine* 2, 788-794.
- Bouayed, J., Bohn, T., Tybl, E., Kiemer, A.K., Soulimani, R., 2012. Benzo[alpha]pyrene-induced anti-depressive-like behaviour in adult female mice: role of monoaminergic systems. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 110, 544-550.
- Bouayed, J., Desor, F., Rammal, H., Kiemer, A.K., Tybl, E., Schroeder, H., Rychen, G., Soulimani, R., 2009. Effects of lactational exposure to benzo[alpha]pyrene (B[alpha]P) on postnatal neurodevelopment, neuronal receptor gene expression and behaviour in mice. *Toxicology* 259, 97-106.

-C-

- Cai, G., Ziko, I., Barwood, J., Soch, A., Sominsky, L., Molero, J.C., Spencer, S.J., 2016. Overfeeding during a critical postnatal period exacerbates hypothalamic-pituitary-adrenal axis responses to immune challenge: a role for adrenal melanocortin 2 receptors. *Sci Rep* 6, 21097.
- Calabrese, F., Riva, M.A., Molteni, R., 2016a. Synaptic alterations associated with depression and schizophrenia: potential as a therapeutic target. *Expert opinion on therapeutic targets* 20, 1195-1207.
- Calabrese, V., Giordano, J., Signorile, A., Laura Ontario, M., Castorina, S., De Pasquale, C., Eckert, G., Calabrese, E.J., 2016b. Major pathogenic mechanisms in vascular dementia: Roles of cellular stress response and hormesis in neuroprotection. *Journal of neuroscience research* 94, 1588-1603.
- Calcia, M.A., Bonsall, D.R., Bloomfield, P.S., Selvaraj, S., Barichello, T., Howes, O.D., 2016. Stress and neuroinflammation: a systematic review of the effects of stress on microglia and the implications for mental illness. *Psychopharmacology (Berl)* 233, 1637-1650.
- Canani, R.B., Costanzo, M.D., Leone, L., Bedogni, G., Brambilla, P., Cianfarani, S., Nobili, V., Pietrobelli, A., Agostoni, C., 2011. Epigenetic mechanisms elicited by nutrition in early life. *Nutrition research reviews* 24, 198-205.
- Cardenas-Gonzalez, M., Gaspar-Ramirez, O., Perez-Vazquez, F.J., Alegria-Torres, J.A., Gonzalez-Amaro, R., Perez-Maldonado, I.N., 2013. p,p'-DDE, a DDT metabolite, induces proinflammatory molecules in human peripheral blood mononuclear cells "in vitro". *Exp Toxicol Pathol* 65, 661-665.
- Catalano, P.M., Presley, L., Minium, J., Hauguel-de Mouzon, S., 2009. Fetuses of obese mothers develop insulin resistance in utero. *Diabetes care* 32, 1076-1080.
- Cauli, O., Piedrafita, B., Llansola, M., Felipo, V., 2012. Gender differential effects of developmental exposure to methyl-mercury, polychlorinated biphenyls 126 or 153, or its combinations on motor activity and coordination. *Toxicology* 311, 61-68.
- Cavaillon, J.M., 1993a. [Contribution of cytokines to inflammatory mechanisms]. *Pathologie-biologie* 41, 799-811.
- Cavaillon, J.M., 1993b. [Infectious agents and cytokines]. *Presse medicale* 22, 847-849.
- Cavaillon, J.M., 1994. Cytokines and macrophages. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 48, 445-453.
- Cavaillon, J.M., 1995. [Cytokines in inflammation]. *Comptes rendus des seances de la Societe de biologie et de ses filiales* 189, 531-544.

- Cavaillon, J.M., 2001. Pro- versus anti-inflammatory cytokines: myth or reality. *Cellular and molecular biology* 47, 695-702.
- Cavaillon, J.M., Haeffner-Cavaillon, N., 1993. [Cytokines and inflammation]. *La Revue du praticien* 43, 547-552.
- Cavaillon, J.M., Muller-Alouf, H., Alouf, J.E., 1997. Cytokines in streptococcal infections. An opening lecture. *Advances in experimental medicine and biology* 418, 869-879.
- Cavaillon, J.M., Munoz, C., Fitting, C., Misset, B., Carlet, J., 1992. Circulating cytokines: the tip of the iceberg? *Circulatory shock* 38, 145-152.
- Chauvet, N., Palin, K., Verrier, D., Poole, S., Dantzer, R., Lestage, J., 2001. Rat microglial cells secrete predominantly the precursor of interleukin-1beta in response to lipopolysaccharide. *The European journal of neuroscience* 14, 609-617.
- Chekeni, F.B., Elliott, M.R., Sandilos, J.K., Walk, S.F., Kinchen, J.M., Lazarowski, E.R., Armstrong, A.J., Penuela, S., Laird, D.W., Salvesen, G.S., Isakson, B.E., Bayliss, D.A., Ravichandran, K.S., 2010. Pannexin 1 channels mediate 'find-me' signal release and membrane permeability during apoptosis. *Nature* 467, 863-867.
- Chen, S.K., Tvrdik, P., Peden, E., Cho, S., Wu, S., Spangrude, G., Capecchi, M.R., 2010. Hematopoietic origin of pathological grooming in Hoxb8 mutant mice. *Cell* 141, 775-785.
- Combs, C.K., Karlo, J.C., Kao, S.C., Landreth, G.E., 2001. beta-Amyloid stimulation of microglia and monocytes results in TNFalpha-dependent expression of inducible nitric oxide synthase and neuronal apoptosis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21, 1179-1188.
- Connat, J.L., 2011. [Inflammasome and cardiovascular diseases]. *Annales de cardiologie et d'angiologie* 60, 48-54.
- Czeh, M., Gressens, P., Kaindl, A.M., 2011. The yin and yang of microglia. *Developmental neuroscience* 33, 199-209.

-D-

- Dahlgren, J., Samuelsson, A.M., Jansson, T., Holmang, A., 2006. Interleukin-6 in the maternal circulation reaches the rat fetus in mid-gestation. *Pediatric research* 60, 147-151.
- Damani, M.R., Zhao, L., Fontainhas, A.M., Amaral, J., Fariss, R.N., Wong, W.T., 2011. Age-related alterations in the dynamic behavior of microglia. *Aging cell* 10, 263-276.
- Damaceno-Rodrigues, N.R., Veras, M.M., Negri, E.M., Zanchi, A.C., Rhoden, C.R., Saldiva, P.H., Dolhnikoff, M., Caldini, E.G., 2009. Effect of pre- and postnatal exposure to urban air pollution on myocardial lipid peroxidation levels in adult mice. *Inhal Toxicol* 21, 1129-1137.
- Dantzer, R., Aubert, A., Bluthé, R.M., Gheusi, G., Cremona, S., Laye, S., Konsman, J.P., Parnet, P., Kelley, K.W., 1999. Mechanisms of the behavioural effects of cytokines. *Advances in experimental medicine and biology* 461, 83-105.
- Dantzer, R., O'Connor, J.C., Freund, G.G., Johnson, R.W., Kelley, K.W., 2008. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nature reviews. Neuroscience* 9, 46-56.
- Davalos, D., Grutzendler, J., Yang, G., Kim, J.V., Zuo, Y., Jung, S., Littman, D.R., Dustin, M.L., Gan, W.B., 2005. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nature neuroscience* 8, 752-758.
- de Haas, A.H., van Weering, H.R., de Jong, E.K., Boddeke, H.W., Biber, K.P., 2007. Neuronal chemokines: versatile messengers in central nervous system cell interaction. *Molecular neurobiology* 36, 137-151.
- De Luca, S.N., Ziko, I., Sominsky, L., Nguyen, J.C., Dinan, T., Miller, A.A., Jenkins, T.A., Spencer, S.J., 2016. Early life overfeeding impairs spatial memory performance by reducing microglial sensitivity to learning. *J Neuroinflammation* 13, 112.
- Dempsey, P.W., Doyle, S.E., He, J.Q., Cheng, G., 2003. The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily. *Cytokine & growth factor reviews* 14, 193-209.

- De Quervain, D.J., Roozendaal, B., McGaugh, J.L., 1998. Stress and glucocorticoids impair retrieval of long-term spatial memory. *Nature* 394, 787-790.
- Derecki, N.C., Cronk, J.C., Kipnis, J., 2013. The role of microglia in brain maintenance: implications for Rett syndrome. *Trends in immunology* 34, 144-150.
- Desai, N., Roman, A., Rochelson, B., Gupta, M., Xue, X., Chatterjee, P.K., Tam Tam, H., Metz, C.N., 2013. Maternal metformin treatment decreases fetal inflammation in a rat model of obesity and metabolic syndrome. *American journal of obstetrics and gynecology* 209, 136 e131-139.
- Dibaj, P., Nadrigny, F., Steffens, H., Scheller, A., Hirrlinger, J., Schomburg, E.D., Neusch, C., Kirchhoff, F., 2010. NO mediates microglial response to acute spinal cord injury under ATP control in vivo. *Glia* 58, 1133-1144.
- Dietert, R.R., 2011. Role of developmental immunotoxicity and immune dysfunction in chronic disease and cancer. *Reprod Toxicol* 31, 319-326.
- Dietert, R.R., 2012. Misregulated inflammation as an outcome of early-life exposure to endocrine-disrupting chemicals. *Rev Environ Health* 27, 117-131.
- Dietert, R.R., 2015. Effects of Endocrine Disrupters on Immune Function and Inflammation. Mica Haley, USA.
- Dilger, R.N., Johnson, R.W., 2008. Aging, microglial cell priming, and the discordant central inflammatory response to signals from the peripheral immune system. *J Leukoc Biol* 84, 932-939.
- Dinarelli, C.A., 1986. Multiple biological properties of recombinant human interleukin 1 (beta). *Immunobiology* 172, 301-315.
- Dinarelli, C.A., 1998. Interleukin-1 beta, interleukin-18, and the interleukin-1 beta converting enzyme. *Annals of the New York Academy of Sciences* 856, 1-11.
- Dinarelli, C.A., 2009. Targeting the pathogenic role of interleukin 1{beta} in the progression of smoldering/indolent myeloma to active disease. *Mayo Clinic proceedings* 84, 105-107.
- Dinel, A.L., Joffre, C., Trifilieff, P., Aubert, A., Foury, A., Le Ruyet, P., Laye, S., 2014. Inflammation early in life is a vulnerability factor for emotional behavior at adolescence and for lipopolysaccharide-induced spatial memory and neurogenesis alteration at adulthood. *J Neuroinflammation* 11, 155.
- Dirsch, V.M., Stuppner, H., Vollmar, A.M., 1998. The Griess assay: suitable for a bio-guided fractionation of anti-inflammatory plant extracts? *Planta Med* 64, 423-426.
- Donzis, E.J., Tronson, N.C., 2014. Modulation of learning and memory by cytokines: signaling mechanisms and long term consequences. *Neurobiol Learn Mem* 115, 68-77.
- Dong, Y., Benveniste, E.N., 2001. Immune function of astrocytes. *Glia* 36, 180-190.
- Dridi, I., Leroy, D., Guignard, C., Scholl, G., Bohn, T., Landoulsi, A., Thome, J.P., Eppe, G., Soulimani, R., Bouayed, J., 2014. Dietary early-life exposure to contaminated eels does not impair spatial cognitive performances in adult offspring mice as assessed in the Y-maze and the Morris water maze. *Nutr Res* 34, 1075-1084.
- Dridi, I., Soualeh, N., Bohn, T., Soulimani, R., Bouayed, J., 2017. Chemically Contaminated Eel Fed to Pregnant and Lactating Mouse Dams Causes Hyperactivity in Their Offspring. *International journal for vitamin and nutrition research. Internationale Zeitschrift fur Vitamin- und Ernährungsforschung. Journal international de vitaminologie et de nutrition*, 1-12.
- Duhe, R.J., Evans, G.A., Erwin, R.A., Kirken, R.A., Cox, G.W., Farrar, W.L., 1998. Nitric oxide and thiol redox regulation of Janus kinase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 126-131.
- Duhe, R.J., Farrar, W.L., 1998. Structural and mechanistic aspects of Janus kinases: how the two-faced god wields a double-edged sword. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 18, 1-15.

-E-

- Eggen, B.J., Raj, D., Hanisch, U.K., Boddeke, H.W., 2013. Microglial phenotype and adaptation. *Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology* 8, 807-823.

- Elison, S., Shears, D., Nadel, S., Sahakian, B., Garralda, M.E., 2008. Neuropsychological function in children following admission to paediatric intensive care: a pilot investigation. *Intensive Care Med* 34, 1289-1293.
- Elnar, A.A., Diesel, B., Desor, F., Feidt, C., Bouayed, J., Kiemer, A.K., Soulimani, R., 2012. Neurodevelopmental and behavioral toxicity via lactational exposure to the sum of six indicator non-dioxin-like-polychlorinated biphenyls ($\Sigma 6$ ND-L-PCBs) in mice. *Toxicology* 299, 44-54.
- Eriksson, J.G., 2005. The fetal origins hypothesis--10 years on. *BMJ* 330, 1096-1097.
- Erta, M., Quintana, A., Hidalgo, J., 2012. Interleukin-6, a major cytokine in the central nervous system. *International journal of biological sciences* 8, 1254-1266.

-F-

- Fontainhas, A.M., Wang, M., Liang, K.J., Chen, S., Mettu, P., Damani, M., Fariss, R.N., Li, W., Wong, W.T., 2011. Microglial morphology and dynamic behavior is regulated by ionotropic glutamatergic and GABAergic neurotransmission. *PLoS One* 6, e15973.
- Fitzgerald, E.F., Belanger, E.E., Gomez, M.I., Cayo, M., McCaffrey, R.J., Seegal, R.F., Jansing, R.L., Hwang, S.A., Hicks, H.E., 2008. Polychlorinated biphenyl exposure and neuropsychological status among older residents of upper Hudson River communities. *Environ Health Perspect* 116, 209-215.
- Focant, J.F., Eppe, G., Pirard, C., De Pauw, E., 2001. Fast clean-up for polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans and coplanar polychlorinated biphenyls analysis of high-fat-content biological samples. *J Chromatogr A* 925, 207-221.
- Freire, C., Ramos, R., Lopez-Espinosa, M.J., Diez, S., Vioque, J., Ballester, F., Fernandez, M.F., 2010. Hair mercury levels, fish consumption, and cognitive development in preschool children from Granada, Spain. *Environ Res* 110, 96-104.
- Fuchs, E., Czeh, B., Kole, M.H., Michaelis, T., Lucassen, P.J., 2004. Alterations of neuroplasticity in depression: the hippocampus and beyond. *Eur Neuropsychopharmacol* 14 Suppl 5, S481-490.

-G-

- Galea, I., Bechmann, I., Perry, V.H., 2007. What is immune privilege (not)? *Trends in immunology* 28, 12-18.
- Gadani, S.P., Cronk, J.C., Norris, G.T., Kipnis, J., 2012. IL-4 in the brain: a cytokine to remember. *J Immunol* 189, 4213-4219.
- Gaum, P.M., Esser, A., Schettgen, T., Gube, M., Kraus, T., Lang, J., 2014. Prevalence and incidence rates of mental syndromes after occupational exposure to polychlorinated biphenyls. *Int J Hyg Environ Health* 217, 765-774.
- Genuis, S.J., 2008. To sea or not to sea: benefits and risks of gestational fish consumption. *Reprod Toxicol* 26, 81-85.
- Giese, K.P., Mizuno, K., 2013. The roles of protein kinases in learning and memory. *Learn Mem* 20, 540-552.
- Gillette, R., Reilly, M.P., Topper, V.Y., Thompson, L.M., Crews, D., Gore, A.C., 2016. Anxiety-like behaviors in adulthood are altered in male but not female rats exposed to low dosages of polychlorinated biphenyls in utero. *Horm Behav* 87, 8-15.
- Gioiosa, L., Parmigiani, S., Vom Saal, F.S., Palanza, P., 2013. The effects of bisphenol A on emotional behavior depend upon the timing of exposure, age and gender in mice. *Horm Behav* 63, 598-605.
- Grandjean, P., Weihe, P., White, R.F., Debes, F., Araki, S., Yokoyama, K., Murata, K., Sorensen, N., Dahl, R., Jorgensen, P.J., 1997. Cognitive deficit in 7-year-old children with prenatal exposure to methylmercury. *Neurotoxicol Teratol* 19, 417-428.
- Green, L.C., Wagner, D.A., Glogowski, J., Skipper, P.L., Wishnok, J.S., Tannenbaum, S.R., 1982. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 126, 131-138.
- Hale, M.W., Spencer, S.J., Conti, B., Jasoni, C.L., Kent, S., Radler, M.E., Reyes, T.M., Sominsky, L., 2014. Diet, behavior and immunity across the lifespan. *Neurosci Biobehav Rev* 58, 46-62.

- Galic, M.A., Riazi, K., Pittman, Q.J., 2012. Cytokines and brain excitability. *Frontiers in neuroendocrinology* 33, 116-125.
- Geng, Y., Gulbins, E., Altman, A., Lotz, M., 1994. Monocyte deactivation by interleukin 10 via inhibition of tyrosine kinase activity and the Ras signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 8602-8606.
- Gicquel, T., Robert, S., Vicitoni, T., Lagente, V., 2016. [The NLRP3 inflammasome: Physiopathology and therapeutic application]. *Presse medicale* 45, 438-446.
- Ginhoux, F., Lim, S., Hoeffel, G., Low, D., Huber, T., 2013. Origin and differentiation of microglia. *Frontiers in cellular neuroscience* 7, 45.
- Glass, C.K., Saijo, K., Winner, B., Marchetto, M.C., Gage, F.H., 2010. Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell* 140, 918-934.
- Glezer, I., Chernomoretz, A., David, S., Plante, M.M., Rivest, S., 2007a. Genes involved in the balance between neuronal survival and death during inflammation. *PLoS One* 2, e310.
- Glezer, I., Simard, A.R., Rivest, S., 2007b. Neuroprotective role of the innate immune system by microglia. *Neuroscience* 147, 867-883.
- Gluckman, P., Hanson, M., 2004. *The Fetal Matrix: Evolution, Development and Disease*. Cambridge: Cambridge University Press, 2004. [257 pp; ISBN 0-521-54235-9 (p/b); £24.99].
- Gluckman, P.D., Hanson, M.A., Bateson, P., Beedle, A.S., Law, C.M., Bhutta, Z.A., Anokhin, K.V., Bougneres, P., Chandak, G.R., Dasgupta, P., Smith, G.D., Ellison, P.T., Forrester, T.E., Gilbert, S.F., Jablonka, E., Kaplan, H., Prentice, A.M., Simpson, S.J., Uauy, R., West-Eberhard, M.J., 2009. Towards a new developmental synthesis: adaptive developmental plasticity and human disease. *Lancet* 373, 1654-1657.
- Godbout, J.P., Chen, J., Abraham, J., Richwine, A.F., Berg, B.M., Kelley, K.W., Johnson, R.W., 2005. Exaggerated neuroinflammation and sickness behavior in aged mice following activation of the peripheral innate immune system. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 19, 1329-1331.
- Gomez-Nicola, D., Perry, V.H., 2015. Microglial dynamics and role in the healthy and diseased brain: a paradigm of functional plasticity. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* 21, 169-184.
- Gordon, S., 2003. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 3, 23-35.
- Gordon, S., 2007. Macrophage heterogeneity and tissue lipids. *The Journal of clinical investigation* 117, 89-93.
- Gotz, F., Dorner, G., Malz, U., Rohde, W., Stahl, F., Poppe, I., Schulze, M., Plagemann, A., 1993. Short- and long-term effects of perinatal interleukin-1 beta-application in rats. *Neuroendocrinology* 58, 344-351.
- Graeber, M.B., Li, W., Rodriguez, M.L., 2011. Role of microglia in CNS inflammation. *FEBS letters* 585, 3798-3805.
- Grissom, N., Bowman, N., Reyes, T.M., 2014. Epigenetic programming of reward function in offspring: a role for maternal diet. *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society* 25, 41-48.
- Grissom, N.M., Reyes, T.M., 2013. Gestational overgrowth and undergrowth affect neurodevelopment: similarities and differences from behavior to epigenetics. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 31, 406-414.
- Grommes, C., Lee, C.Y., Wilkinson, B.L., Jiang, Q., Koenigsnecht-Talboo, J.L., Varnum, B., Landreth, G.E., 2008. Regulation of microglial phagocytosis and inflammatory gene expression by Gas6 acting on the Axl/Mer family of tyrosine kinases. *Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology* 3, 130-140.
- Gruol, D.L., Nelson, T.E., 1997. Physiological and pathological roles of interleukin-6 in the central nervous system. *Molecular neurobiology* 15, 307-339.

-H-

- Haddad, J.J., Saade, N.E., Safieh-Garabedian, B., 2003. Interleukin-10 and the regulation of mitogen-activated protein kinases: are these signalling modules targets for the anti-inflammatory action of this cytokine? *Cellular signalling* 15, 255-267.
- Hagberg, H., Mallard, C., Ferriero, D.M., Vannucci, S.J., Levison, S.W., Vexler, Z.S., Gressens, P., 2015. The role of inflammation in perinatal brain injury. *Nat Rev Neurol* 11, 192-208.
- Hale, M.W., Spencer, S.J., Conti, B., Jasoni, C.L., Kent, S., Radler, M.E., Reyes, T.M., Sominsky, L., 2014. Diet, behavior and immunity across the lifespan. *Neurosci Biobehav Rev* 58, 46-62.
- Hales, C.N., Barker, D.J., 1992. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia* 35, 595-601.
- Hales, C.N., Barker, D.J., Clark, P.M., Cox, L.J., Fall, C., Osmond, C., Winter, P.D., 1991. Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64. *BMJ* 303, 1019-1022.
- Hanisch, U.K., Kettenmann, H., 2007. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nature neuroscience* 10, 1387-1394.
- Hanson, M.A., Gluckman, P.D., 2013. Early developmental conditioning of later health and disease: physiology or pathophysiology? *Physiol Rev* 94, 1027-1076.
- Harada, M., 1976. Intrauterine poisoning: clinical and epidemiological studies and significance of the problem. *Bull. Inst. Constitutional Med. (Suppl)* 25, 1-60.
- Hasselmo, M.E., 2006. The role of acetylcholine in learning and memory. *Curr Opin Neurobiol* 16, 710-715.
- Ingber, S.Z., Pohl, H.R., 2016. Windows of sensitivity to toxic chemicals in the motor effects development. *Regul Toxicol Pharmacol* 74, 93-104.
- Harry, G.J., Kraft, A.D., 2012. Microglia in the developing brain: a potential target with lifetime effects. *Neurotoxicology* 33, 191-206.
- Hayashi, Y., Ishibashi, H., Hashimoto, K., Nakanishi, H., 2006. Potentiation of the NMDA receptor-mediated responses through the activation of the glycine site by microglia secreting soluble factors. *Glia* 53, 660-668.
- Heerwagen, M.J., Miller, M.R., Barbour, L.A., Friedman, J.E., 2010. Maternal obesity and fetal metabolic programming: a fertile epigenetic soil. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 299, R711-722.
- Heijmans, B.T., Tobi, E.W., Stein, A.D., Putter, H., Blauw, G.J., Susser, E.S., Slagboom, P.E., Lumey, L.H., 2008. Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 17046-17049.
- Hernandez-Ontiveros, D.G., Tajiri, N., Acosta, S., Giunta, B., Tan, J., Borlongan, C.V., 2013. Microglia activation as a biomarker for traumatic brain injury. *Frontiers in neurology* 4, 30.
- Hu, X., Leak, R.K., Shi, Y., Suenaga, J., Gao, Y., Zheng, P., Chen, J., 2015. Microglial and macrophage polarization-new prospects for brain repair. *Nat Rev Neurol* 11, 56-64.
- Huang, Y., Henry, C.J., Dantzer, R., Johnson, R.W., Godbout, J.P., 2008. Exaggerated sickness behavior and brain proinflammatory cytokine expression in aged mice in response to intracerebroventricular lipopolysaccharide. *Neurobiol Aging* 29, 1744-1753.
- Hughes, V., 2012. Microglia: The constant gardeners
news feature. *nature*.
- Hunter, C.A., Jones, S.A., 2015. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nature immunology* 16, 448-457.

-I-

- Iadecola, C., Anrather, J., 2011. The immunology of stroke: from mechanisms to translation. *Nature medicine* 17, 796-808.

Ingber, S.Z., Pohl, H.R., 2016. Windows of sensitivity to toxic chemicals in the motor effects development. *Regul Toxicol Pharmacol* 74, 93-104.

-J-

Jack, C., Ruffini, F., Bar-Or, A., Antel, J.P., 2005a. Microglia and multiple sclerosis. *Journal of neuroscience research* 81, 363-373.

Jack, C.S., Arbour, N., Manusow, J., Montgrain, V., Blain, M., McCrea, E., Shapiro, A., Antel, J.P., 2005b. TLR signaling tailors innate immune responses in human microglia and astrocytes. *J Immunol* 175, 4320-4330.

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

Jolous-Jamshidi, B., Cromwell, H.C., McFarland, A.M., Meserve, L.A., 2010. Perinatal exposure to polychlorinated biphenyls alters social behaviors in rats. *Toxicol Lett* 199, 136-143.

Jeru, I., Amselem, S., 2011. [Inflammasome and interleukin 1]. *La Revue de medecine interne* 32, 218-224.

Ji, R.R., Suter, M.R., 2007. p38 MAPK, microglial signaling, and neuropathic pain. *Molecular pain* 3, 33.

Joseph, B., José Luis, V., 2013. *Microglia*. humana Press.

Junien, C., Gallou-Kabani, C., Vige, A., Gross, M.S., 2005. [Nutritional epigenomics of metabolic syndrome]. *Medecine sciences : M/S* 21 Spec No, 44-52.

-K-

Kaltschmidt, B., Kaltschmidt, C., 2009. NF-kappaB in the nervous system. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1, a001271.

Kalueff, A.V., Keisala, T., Minasyan, A., Kuuslahti, M., Miettinen, S., Tuohimaa, P., 2006. Behavioural anomalies in mice evoked by "Tokyo" disruption of the Vitamin D receptor gene. *Neurosci Res* 54, 254-260.

Karkaba, A., Soualeh, N., Soulimani, R., Bouayed, J., 2017. Perinatal effects of exposure to PCBs on social preferences in young adult and middle-aged offspring mice. *Horm Behav*.

Kaur, A., 1994. Age related changes in the ovary, uterus, and fertility in Swiss Albino mice. *Proc. Indian natn. Sci. Acad. B* 60, 237-242.

Kilburn, K.H., Warsaw, R.H., Shields, M.G., 1989. Neurobehavioral dysfunction in firemen exposed to polychlorinated biphenyls (PCBs): possible improvement after detoxification. *Arch Environ Health* 44, 345-350.

Kim, S.H., Johnson, V.J., Sharma, R.P., 2002. Mercury inhibits nitric oxide production but activates proinflammatory cytokine expression in murine macrophage: differential modulation of NF-kappaB and p38 MAPK signaling pathways. *Nitric Oxide* 7, 67-74.

Kuriyama, S.N., Chahoud, I., 2004. In utero exposure to low-dose 2,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB 118) impairs male fertility and alters neurobehavior in rat offspring. *Toxicology* 202, 185-197.

Keegan, A.D., Johnston, J.A., Tortolani, P.J., McReynolds, L.J., Kinzer, C., O'Shea, J.J., Paul, W.E., 1995. Similarities and differences in signal transduction by interleukin 4 and interleukin 13: analysis of Janus kinase activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 7681-7685.

Kent, A.S., Sullivan, M.H., Elder, M.G., 1994. Transfer of cytokines through human fetal membranes. *Journal of reproduction and fertility* 100, 81-84.

Kim, S.H., Johnson, V.J., Sharma, R.P., 2002. Mercury inhibits nitric oxide production but activates proinflammatory cytokine expression in murine macrophage: differential modulation of NF-kappaB and p38 MAPK signaling pathways. *Nitric Oxide* 7, 67-74.

Kloss, C.U., Kreutzberg, G.W., Raivich, G., 1997. Proliferation of ramified microglia on an astrocyte monolayer: characterization of stimulatory and inhibitory cytokines. *Journal of neuroscience research* 49, 248-254.

Kohman, R.A., Rhodes, J.S., 2013. Neurogenesis, inflammation and behavior. *Brain Behav Immun* 27, 22-32.

- Konsman, J.P., Kelley, K., Dantzer, R., 1999. Temporal and spatial relationships between lipopolysaccharide-induced expression of Fos, interleukin-1beta and inducible nitric oxide synthase in rat brain. *Neuroscience* 89, 535-548.
- Kraft, A.D., McPherson, C.A., Harry, G.J., 2009. Heterogeneity of microglia and TNF signaling as determinants for neuronal death or survival. *Neurotoxicology* 30, 785-793.
- Kreutzberg, G.W., 1996. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* 19, 312-318.
- Kuno, R., Wang, J., Kawanokuchi, J., Takeuchi, H., Mizuno, T., Suzumura, A., 2005. Autocrine activation of microglia by tumor necrosis factor-alpha. *Journal of neuroimmunology* 162, 89-96.

-L-

- Ladeby, R., Wirenfeldt, M., Garcia-Ovejero, D., Fenger, C., Dissing-Olesen, L., Dalmau, I., Finsen, B., 2005. Microglial cell population dynamics in the injured adult central nervous system. *Brain research. Brain research reviews* 48, 196-206.
- Lambertsen, K.L., Clausen, B.H., Babcock, A.A., Gregersen, R., Fenger, C., Nielsen, H.H., Haugaard, L.S., Wirenfeldt, M., Nielsen, M., Dagnaes-Hansen, F., Bluethmann, H., Faergeman, N.J., Meldgaard, M., Deierborg, T., Finsen, B., 2009. Microglia protect neurons against ischemia by synthesis of tumor necrosis factor. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29, 1319-1330.
- Lee, H., Lee, S., Cho, I.H., Lee, S.J., 2013. Toll-like receptors: sensor molecules for detecting damage to the nervous system. *Current protein & peptide science* 14, 33-42.
- Lee, H.J., Caldwell, H.K., Macbeth, A.H., Tolu, S.G., Young, W.S., 3rd, 2008a. A conditional knockout mouse line of the oxytocin receptor. *Endocrinology* 149, 3256-3263.
- Lee, J.W., Lee, Y.K., Yuk, D.Y., Choi, D.Y., Ban, S.B., Oh, K.W., Hong, J.T., 2008b. Neuro-inflammation induced by lipopolysaccharide causes cognitive impairment through enhancement of beta-amyloid generation. *J Neuroinflammation* 5, 37.
- Li, Y., Xiao, B., Qiu, W., Yang, L., Hu, B., Tian, X., Yang, H., 2010. Altered expression of CD4(+) CD25(+) regulatory T cells and its 5-HT(1a) receptor in patients with major depression disorder. *J Affect Disord* 124, 68-75.
- Libby, P., 2007. Inflammatory mechanisms: the molecular basis of inflammation and disease. *Nutrition reviews* 65, S140-146.
- Liu, D., Perkins, J.T., Petriello, M.C., Hennig, B., 2015. Exposure to coplanar PCBs induces endothelial cell inflammation through epigenetic regulation of NF-kappaB subunit p65. *Toxicol Appl Pharmacol* 289, 457-465.
- Liu, X., Wu, Z., Hayashi, Y., Nakanishi, H., 2012. Age-dependent neuroinflammatory responses and deficits in long-term potentiation in the hippocampus during systemic inflammation. *Neuroscience* 216, 133-142.
- Lodge, P.A., Sriram, S., 1996. Regulation of microglial activation by TGF-beta, IL-10, and CSF-1. *J Leukoc Biol* 60, 502-508.
- Lullman-Rauch, R., 2008. histologie. de Boeck.

-M-

- Macgregor, K., Oliver, I.W., Harris, L., Ridgway, I.M., 2010. Persistent organic pollutants (PCB, DDT, HCH, HCB & BDE) in eels (*Anguilla anguilla*) in Scotland: current levels and temporal trends. *Environ Pollut* 158, 2402-2411.
- Mackaness, G.B., 1964. The Immunological Basis of Acquired Cellular Resistance. *The Journal of experimental medicine* 120, 105-120.
- Madan, J.C., Davis, J.M., Craig, W.Y., Collins, M., Allan, W., Quinn, R., Dammann, O., 2009. Maternal obesity and markers of inflammation in pregnancy. *Cytokine* 47, 61-64.

- Maes, M., 1995. Evidence for an immune response in major depression: a review and hypothesis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 19, 11-38.
- Maggi, L., Sciani, M., Branchi, I., D'Andrea, I., Lauro, C., Limatola, C., 2011. CX(3)CR1 deficiency alters hippocampal-dependent plasticity phenomena blunting the effects of enriched environment. *Frontiers in cellular neuroscience* 5, 22.
- Malabarba, M.G., Kirken, R.A., Rui, H., Koettnitz, K., Kawamura, M., O'Shea, J.J., Kalthoff, F.S., Farrar, W.L., 1995. Activation of JAK3, but not JAK1, is critical to interleukin-4 (IL4) stimulated proliferation and requires a membrane-proximal region of IL4 receptor alpha. *J Biol Chem* 270, 9630-9637.
- Malabou, C., 2009. What Should We Do With Your Brain? Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P., Sica, A., 2002. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends in immunology* 23, 549-555.
- Marsden, H.M., Bronson, F.H., 1965. The Synchrony of Oestrus in Mice: Relative Roles of the Male and Female Environments. *J Endocrinol* 32, 313-319.
- Marie, C., Losser, M.R., Fitting, C., Kermarrec, N., Payen, D., Cavaillon, J.M., 1997. Cytokines and soluble cytokine receptors in pleural effusions from septic and nonseptic patients. *American journal of respiratory and critical care medicine* 156, 1515-1522.
- Marie, C., Pitton, C., Fitting, C., Cavaillon, J.M., 1996. Regulation by anti-inflammatory cytokines (IL-4, IL-10, IL-13, TGFbeta) of interleukin-8 production by LPS- and/ or TNFalpha-activated human polymorphonuclear cells. *Mediators of inflammation* 5, 334-340.
- Marques, A.H., O'Connor, T.G., Roth, C., Susser, E., Bjorke-Monsen, A.L., 2013. The influence of maternal prenatal and early childhood nutrition and maternal prenatal stress on offspring immune system development and neurodevelopmental disorders. *Front Neurosci* 7, 120.
- McCoy, M.K., Ruhn, K.A., Martinez, T.N., McAlpine, F.E., Blesch, A., Tansey, M.G., 2008. Intranigral lentiviral delivery of dominant-negative TNF attenuates neurodegeneration and behavioral deficits in hemiparkinsonian rats. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 16, 1572-1579.
- McCoy, M.K., Tansey, M.G., 2008. TNF signaling inhibition in the CNS: implications for normal brain function and neurodegenerative disease. *J Neuroinflammation* 5, 45.
- Mi, J., Law, C., Zhang, K.L., Osmond, C., Stein, C., Barker, D., 2000. Effects of infant birthweight and maternal body mass index in pregnancy on components of the insulin resistance syndrome in China. *Ann Intern Med* 132, 253-260.
- Miller, A.A., Spencer, S.J., 2014. Obesity and neuroinflammation: a pathway to cognitive impairment. *Brain Behav Immun* 42, 10-21.
- Miller, A.H., Maletic, V., Raison, C.L., 2009. Inflammation and its discontents: the role of cytokines in the pathophysiology of major depression. *Biol Psychiatry* 65, 732-741.
- Miller, A.H., Raison, C.L., 2016. The role of inflammation in depression: from evolutionary imperative to modern treatment target. *Nat Rev Immunol* 16, 22-34.
- Minghetti, L., Polazzi, E., Nicolini, A., Levi, G., 1998. Opposite regulation of prostaglandin E2 synthesis by transforming growth factor-beta1 and interleukin 10 in activated microglial cultures. *Journal of neuroimmunology* 82, 31-39.
- Moieni, M., Irwin, M.R., Jevtic, I., Breen, E.C., Eisenberger, N.I., 2015. Inflammation impairs social cognitive processing: A randomized controlled trial of endotoxin. *Brain Behav Immun* 48, 132-138.
- Moriguchi, S., Mizoguchi, Y., Tomimatsu, Y., Hayashi, Y., Kadowaki, T., Kagamiishi, Y., Katsube, N., Yamamoto, K., Inoue, K., Watanabe, S., Nabekura, J., Nakanishi, H., 2003. Potentiation of NMDA receptor-mediated synaptic responses by microglia. *Brain research. Molecular brain research* 119, 160-169.
- Morris, R., 1984. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods* 11, 47-60.

- Mosley, B., Urdal, D.L., Prickett, K.S., Larsen, A., Cosman, D., Conlon, P.J., Gillis, S., Dower, S.K., 1987. The interleukin-1 receptor binds the human interleukin-1 alpha precursor but not the interleukin-1 beta precursor. *J Biol Chem* 262, 2941-2944.
- Mosser, D.M., 2003. The many faces of macrophage activation. *J Leukoc Biol* 73, 209-212.
- Mosser, D.M., Edwards, J.P., 2008. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 8, 958-969.
- Murray, C., Sanderson, D.J., Barkus, C., Deacon, R.M., Rawlins, J.N., Bannerman, D.M., Cunningham, C., 2010. Systemic inflammation induces acute working memory deficits in the primed brain: relevance for delirium. *Neurobiol Aging* 33, 603-616 e603.
- Myers, G.J., Davidson, P.W., Cox, C., Shamlaye, C.F., Palumbo, D., Cernichiari, E., Sloane-Reeves, J., Wilding, G.E., Kost, J., Huang, L.S., Clarkson, T.W., 2003. Prenatal methylmercury exposure from ocean fish consumption in the Seychelles child development study. *Lancet* 361, 1686-1692.

-N-

- Najjar, S., Pearlman, D.M., Alper, K., Najjar, A., Devinsky, O., 2013. Neuroinflammation and psychiatric illness. *J Neuroinflammation* 10, 43.
- Nakagawa, Y., Chiba, K., 2014. Role of microglial m1/m2 polarization in relapse and remission of psychiatric disorders and diseases. *Pharmaceuticals* 7, 1028-1048.
- Nakagawa, Y., Chiba, K., 2015. Diversity and plasticity of microglial cells in psychiatric and neurological disorders. *Pharmacology & therapeutics* 154, 21-35.
- Nguon, K., Baxter, M.G., Sajdel-Sulkowska, E.M., 2005a. Perinatal exposure to polychlorinated biphenyls differentially affects cerebellar development and motor functions in male and female rat neonates. *Cerebellum* 4, 112-122.
- Nguon, K., Ladd, B., Baxter, M.G., Sajdel-Sulkowska, E.M., 2005b. Sexual dimorphism in cerebellar structure, function, and response to environmental perturbations. *Progress in brain research* 148, 341-351.
- Niho, Y., Niiro, H., Tanaka, Y., Nakashima, H., Otsuka, T., 1998. Role of IL-10 in the crossregulation of prostaglandins and cytokines in monocytes. *Acta haematologica* 99, 165-170.
- Niiro, H., Otsuka, T., Ogami, E., Yamaoka, K., Nagano, S., Akahoshi, M., Nakashima, H., Arinobu, Y., Izuhara, K., Niho, Y., 1998. MAP kinase pathways as a route for regulatory mechanisms of IL-10 and IL-4 which inhibit COX-2 expression in human monocytes. *Biochemical and biophysical research communications* 250, 200-205.
- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., Helmchen, F., 2005. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 308, 1314-1318.
- Nishimura, M., Kuno, S., Kaji, R., Kawakami, H., 2005. Influence of a tumor necrosis factor gene polymorphism in Japanese patients with multiple system atrophy. *Neurosci Lett* 374, 218-221.

-O-

- OECD-Organization for Economic Co-operation and Development (2007). OECD guideline for the testing of chemicals. Developmental Neurotoxicity Study
- Oitzl, M.S., van Oers, H., Schobitz, B., de Kloet, E.R., 1993. Interleukin-1 beta, but not interleukin-6, impairs spatial navigation learning. *Brain research* 613, 160-163.
- Ohgidani, M., Kato, T.A., Sagata, N., Hayakawa, K., Shimokawa, N., Sato-Kasai, M., Kanba, S., 2016. TNF- α from hippocampal microglia induces working memory deficits by acute stress in mice. *Brain Behav Immun* 55, 17-24.
- Oken, E., Radesky, J.S., Wright, R.O., Bellinger, D.C., Amarasiriwardena, C.J., Kleinman, K.P., Hu, H., Gillman, M.W., 2008. Maternal fish intake during pregnancy, blood mercury levels, and child cognition at age 3 years in a US cohort. *Am J Epidemiol* 167, 1171-1181.

- Oken, E., Wright, R.O., Kleinman, K.P., Bellinger, D., Amarasiriwardena, C.J., Hu, H., Rich-Edwards, J.W., Gillman, M.W., 2005. Maternal fish consumption, hair mercury, and infant cognition in a U.S. Cohort. *Environ Health Perspect* 113, 1376-1380.
- Orito, K., Gotanda, N., Murakami, M., Ikeda, T., Egashira, N., Mishima, K., Fujiwara, M., 2007. Prenatal exposure to 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB126) promotes anxiogenic behavior in rats. *Tohoku J Exp Med* 212, 151-157.
- Osgood, R.S., Upham, B.L., Hill, T., 3rd, Helms, K.L., Velmurugan, K., Babica, P., Bauer, A.K., 2013. Polycyclic aromatic hydrocarbon-induced signaling events relevant to inflammation and tumorigenesis in lung cells are dependent on molecular structure. *PLoS One* 8, e65150.

-P-

- Pace, T.W., Mletzko, T.C., Alagbe, O., Musselman, D.L., Nemeroff, C.B., Miller, A.H., Heim, C.M., 2006. Increased stress-induced inflammatory responses in male patients with major depression and increased early life stress. *Am J Psychiatry* 163, 1630-1633.
- Pacheco, R., Contreras, F., Prado, C., 2012. Cells, Molecules and Mechanisms Involved in the Neuro-Immune Interaction. In: Gowder, S. (Ed.), *Biochemistry, Genetics and Molecular Biology » "Cell Interaction"*, DOI: 10.5772/48367
- Painter, R.C., Osmond, C., Gluckman, P., Hanson, M., Phillips, D.I., Roseboom, T.J., 2008. Transgenerational effects of prenatal exposure to the Dutch famine on neonatal adiposity and health in later life. *BJOG* 115, 1243-1249.
- Painter, R.C., Roseboom, T.J., Bleker, O.P., 2005. Prenatal exposure to the Dutch famine and disease in later life: an overview. *Reprod Toxicol* 20, 345-352.
- Palanza, P., Nagel, S.C., Parmigiani, S., Vom Saal, F.S., 2016. Perinatal exposure to endocrine disruptors: sex, timing and behavioral endpoints. *Curr Opin Behav Sci* 7, 69-75.
- Paliwoda, R.E., Newbigging, A.M., Wang, Z., Le, X.C., 2016. Benefits and risks associated with consumption of Great Lakes fish containing omega-3 fatty acids and polychlorinated biphenyls (PCBs). *J Environ Sci (China)* 41, 1-5.
- Palumbo, D.R., Cox, C., Davidson, P.W., Myers, G.J., Choi, A., Shamlaye, C., Sloane-Reeves, J., Cernichiari, E., Clarkson, T.W., 2000. Association between prenatal exposure to methylmercury and cognitive functioning in Seychellois children: a reanalysis of the McCarthy Scales of Children's Ability from the main cohort study. *Environ Res* 84, 81-88.
- Peng, S., Zhang, Y., Zhang, J., Wang, H., Ren, B., 2010. ERK in learning and memory: a review of recent research. *Int J Mol Sci* 11, 222-232.
- Perdiguerro, E.G., Klapproth, K., Schulz, C., Busch, K., de Bruijn, M., Rodewald, H.R., Geissmann, F., 2015. The Origin of Tissue-Resident Macrophages: When an Erythro-myeloid Progenitor Is an Erythro-myeloid Progenitor. *Immunity* 43, 1023-1024.
- Perry, S.W., Dewhurst, S., Bellizzi, M.J., Gelbard, H.A., 2002. Tumor necrosis factor-alpha in normal and diseased brain: Conflicting effects via intraneuronal receptor crosstalk? *Journal of neurovirology* 8, 611-624.
- Perry, V.H., Cunningham, C., Holmes, C., 2007. Systemic infections and inflammation affect chronic neurodegeneration. *Nat Rev Immunol* 7, 161-167.
- Perry, V.H., Holmes, C., 2014. Microglial priming in neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol* 10, 217-224.
- Perry, V.H., Nicoll, J.A., Holmes, C., 2010. Microglia in neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol* 6, 193-201.
- Perry, V.H., O'Connor, V., 2010. The role of microglia in synaptic stripping and synaptic degeneration: a revised perspective. *ASN neuro* 2, e00047.
- Plusquellec, P., Muckle, G., Dewailly, E., Ayotte, P., Begin, G., Desrosiers, C., Despres, C., Saint-Amour, D., Poitras, K., 2010. The relation of environmental contaminants exposure to behavioral indicators in Inuit preschoolers in Arctic Quebec. *Neurotoxicology* 31, 17-25.

- Porsolt, R.D., Le Pichon, M., Jalfre, M., 1977. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* 266, 730-732.
- Postal, M., Appenzeller, S., 2015. The importance of cytokines and autoantibodies in depression. *Autoimmunity reviews* 14, 30-35.

-Q-

- Quintana, A., Ertz, M., Ferrer, B., Comes, G., Giralt, M., Hidalgo, J., 2013. Astrocyte-specific deficiency of interleukin-6 and its receptor reveal specific roles in survival, body weight and behavior. *Brain Behav Immun* 27, 162-173.

-R-

- Ransohoff, R.M., Cardona, A.E., 2010. The myeloid cells of the central nervous system parenchyma. *Nature* 468, 253-262.
- Ransohoff, R.M., Engelhardt, B., 2012. The anatomical and cellular basis of immune surveillance in the central nervous system. *Nat Rev Immunol* 12, 623-635.
- Ransohoff, R.M., Perry, V.H., 2009. Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. *Annual review of immunology* 27, 119-145.
- Ravelli, A.C., van der Meulen, J.H., Michels, R.P., Osmond, C., Barker, D.J., Hales, C.N., Bleker, O.P., 1998. Glucose tolerance in adults after prenatal exposure to famine. *Lancet* 351, 173-177.
- Ravelli, A.C., van Der Meulen, J.H., Osmond, C., Barker, D.J., Bleker, O.P., 1999. Obesity at the age of 50 y in men and women exposed to famine prenatally. *Am J Clin Nutr* 70, 811-816.
- Ravelli, G.P., Stein, Z.A., Susser, M.W., 1976. Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy. *N Engl J Med* 295, 349-353.
- Ravichandran, K.S., 2010. Find-me and eat-me signals in apoptotic cell clearance: progress and conundrums. *The Journal of experimental medicine* 207, 1807-1817.
- Reichenberg, A., Yirmiya, R., Schuld, A., Kraus, T., Haack, M., Morag, A., Pollmacher, T., 2001. Cytokine-associated emotional and cognitive disturbances in humans. *Arch Gen Psychiatry* 58, 445-452.
- Renaud, J., Therien, H.M., Plouffe, M., Martinoli, M.G., 2015. [Neuroinflammation: Dr Jekyll or Mr Hyde?]. *Medecine sciences : M/S* 31, 979-988.
- Roifman, I., Beck, P.L., Anderson, T.J., Eisenberg, M.J., Genest, J., 2011. Chronic inflammatory diseases and cardiovascular risk: a systematic review. *The Canadian journal of cardiology* 27, 174-182.
- Rose-John, S., Scheller, J., Elson, G., Jones, S.A., 2006. Interleukin-6 biology is coordinated by membrane-bound and soluble receptors: role in inflammation and cancer. *J Leukoc Biol* 80, 227-236.
- Rossi, S., Studer, V., Motta, C., Polidoro, S., Perugini, J., Macchiarulo, G., Giovannetti, A.M., Pareja-Gutierrez, L., Calo, A., Colonna, I., Furlan, R., Martino, G., Centonze, D., 2017. Neuroinflammation drives anxiety and depression in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Neurology* 89, 1338-1347.
- Roegge, C.S., Wang, V.C., Powers, B.E., Klintsova, A.Y., Villareal, S., Greenough, W.T., Schantz, S.L., 2004. Motor impairment in rats exposed to PCBs and methylmercury during early development. *Toxicol Sci* 77, 315-324.

-S-

- Sagiv, S.K., Thurston, S.W., Bellinger, D.C., Altshul, L.M., Korrick, S.A., 2012. Neuropsychological measures of attention and impulse control among 8-year-old children exposed prenatally to organochlorines. *Environ Health Perspect* 120, 904-909.
- Sagiv, S.K., Thurston, S.W., Bellinger, D.C., Tolbert, P.E., Altshul, L.M., Korrick, S.A., 2010. Prenatal organochlorine exposure and behaviors associated with attention deficit hyperactivity disorder in school-aged children. *Am J Epidemiol* 171, 593-601.

- Samuelsson, A.M., Ohrn, I., Dahlgren, J., Eriksson, E., Angelin, B., Folkow, B., Holmang, A., 2004. Prenatal exposure to interleukin-6 results in hypertension and increased hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in adult rats. *Endocrinology* 145, 4897-4911.
- Santiago-Rivera, A.L., Skawenio Morse, G., Haase, R.F., McCaffrey, R.J., Tarbell, A., 2007. Exposure to an environmental toxin, quality of life and psychological distress. *J. Environ. Psychol* 27, 33-43.
- Schantz, S.L., Levin, E.D., Bowman, R.E., 1991. Long-term neurobehavioral effects of perinatal polychlorinated biphenyl (PCB) exposure in monkeys. *Environ Toxicol Chem* 10, 741-756.
- Sawada, M., Suzumura, A., Hosoya, H., Marunouchi, T., Nagatsu, T., 1999. Interleukin-10 inhibits both production of cytokines and expression of cytokine receptors in microglia. *Journal of neurochemistry* 72, 1466-1471.
- Schafer, D.P., Lehrman, E.K., Kautzman, A.G., Koyama, R., Mardinly, A.R., Yamasaki, R., Ransohoff, R.M., Greenberg, M.E., Barres, B.A., Stevens, B., 2012. Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. *Neuron* 74, 691-705.
- Schafer, D.P., Lehrman, E.K., Stevens, B., 2013. The "quad-partite" synapse: microglia-synapse interactions in the developing and mature CNS. *Glia* 61, 24-36.
- Schafer, D.P., Stevens, B., 2010. Synapse elimination during development and disease: immune molecules take centre stage. *Biochemical Society transactions* 38, 476-481.
- Scheller, J., Ohnesorge, N., Rose-John, S., 2006. Interleukin-6 trans-signalling in chronic inflammation and cancer. *Scandinavian journal of immunology* 63, 321-329.
- Scheller, J., Rose-John, S., 2006. Interleukin-6 and its receptor: from bench to bedside. *Medical microbiology and immunology* 195, 173-183.
- Schobitz, B., de Kloet, E.R., Sutanto, W., Holsboer, F., 1993a. Cellular localization of interleukin 6 mRNA and interleukin 6 receptor mRNA in rat brain. *The European journal of neuroscience* 5, 1426-1435.
- Schobitz, B., Holsboer, F., Kikkert, R., Sutanto, W., De Kloet, E.R., 1992a. Peripheral and central regulation of IL-6 gene expression in endotoxin-treated rats. *Endocrine regulations* 26, 103-109.
- Schobitz, B., Van Den Dobbelsteen, M., Holsboer, F., Sutanto, W., De Kloet, E.R., 1993b. Regulation of interleukin 6 gene expression in rat. *Endocrinology* 132, 1569-1576.
- Schobitz, B., Voorhuis, D.A., De Kloet, E.R., 1992b. Localization of interleukin 6 mRNA and interleukin 6 receptor mRNA in rat brain. *Neurosci Lett* 136, 189-192.
- Schwarz, J.M., Hutchinson, M.R., Bilbo, S.D., 2011. Early-life experience decreases drug-induced reinstatement of morphine CPP in adulthood via microglial-specific epigenetic programming of anti-inflammatory IL-10 expression. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31, 17835-17847.
- Scott, A., Khan, K.M., Cook, J.L., Duronio, V., 2004a. What is "inflammation"? Are we ready to move beyond Celsus? *British journal of sports medicine* 38, 248-249.
- Scott, A., Khan, K.M., Roberts, C.R., Cook, J.L., Duronio, V., 2004b. What do we mean by the term "inflammation"? A contemporary basic science update for sports medicine. *British journal of sports medicine* 38, 372-380.
- Sierra, A., Abiega, O., Shahraz, A., Neumann, H., 2013. Janus-faced microglia: beneficial and detrimental consequences of microglial phagocytosis. *Frontiers in cellular neuroscience* 7, 6.
- Sierra, A., Encinas, J.M., Deudero, J.J., Chancey, J.H., Enikolopov, G., Overstreet-Wadiche, L.S., Tsirka, S.E., Maletic-Savatic, M., 2010. Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis. *Cell stem cell* 7, 483-495.
- Singhal, A., Lucas, A., 2004. Early origins of cardiovascular disease: is there a unifying hypothesis? *Lancet* 363, 1642-1645.
- Simen, A.A., Bordner, K.A., Martin, M.P., Moy, L.A., Barry, L.C., 2011. Cognitive dysfunction with aging and the role of inflammation. *Ther Adv Chronic Dis* 2, 175-195.
- Sipka, S., Eum, S.Y., Son, K.W., Xu, S., Gavalas, V.G., Hennig, B., Toborek, M., 2008. Oral administration of pcbs induces proinflammatory and prometastatic responses. *Environ Toxicol Pharmacol* 25, 251-259.

- Sitarek, K., Gralewicz, S., 2009. Early developmental effects of separate or combined perinatal exposure to methylmercury (MeHg) and 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl (PCB 153) in the rat. *Int J Occup Med Environ Health* 22, 89-105.
- Soualeh, N., Dridi, I., Eppe, G., Nemos, C., Soulimani, R., Bouayed, J., 2017a. Perinatal programming of depressive-like behavior by inflammation in adult offspring mice whose mothers were fed polluted eels: Gender selective effects. *Brain Behav Immun* 63, 137-147.
- Soualeh, N., Soulimani, R., Bouayed, J., 2017b. Hippocampal-dependent memory deficit induced by perinatal exposure to polluted eels in middle-aged offspring mice: Sex differential effects. *Toxicol Lett* 280, 247-258.
- Spencer, S.J., 2013a. Perinatal nutrition programs neuroimmune function long-term: mechanisms and implications. *Front Neurosci* 7, 144.
- Spencer, S.J., 2013b. Perinatal programming of neuroendocrine mechanisms connecting feeding behavior and stress. *Front Neurosci* 7, 109.
- Spencer, S.J., Hyland, N.P., Sharkey, K.A., Pittman, Q.J., 2007. Neonatal immune challenge exacerbates experimental colitis in adult rats: potential role for TNF-alpha. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292, R308-315.
- Spencer, S.J., Martin, S., Mouihate, A., Pittman, Q.J., 2006. Early-life immune challenge: defining a critical window for effects on adult responses to immune challenge. *Neuropsychopharmacology* 31, 1910-1918.
- Spencer, S.J., Tilbrook, A., 2009. Neonatal overfeeding alters adult anxiety and stress responsiveness. *Psychoneuroendocrinology* 34, 1133-1143.
- Stein, A.D., Kahn, H.S., Rundle, A., Zybert, P.A., van der Pal-de Bruin, K., Lumey, L.H., 2007. Anthropometric measures in middle age after exposure to famine during gestation: evidence from the Dutch famine. *Am J Clin Nutr* 85, 869-876.
- Stein, C.E., Fall, C.H., Kumaran, K., Osmond, C., Cox, V., Barker, D.J., 1996. Fetal growth and coronary heart disease in south India. *Lancet* 348, 1269-1273.
- Stroemer, R.P., Rothwell, N.J., 1998. Exacerbation of ischemic brain damage by localized striatal injection of interleukin-1beta in the rat. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 18, 833-839.
- Steru, L., Chermat, R., Thierry, B., Simon, P., 1985. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 85, 367-370.
- Strom, M., Hansen, S., Olsen, S.F., Haug, L.S., Rantakokko, P., Kiviranta, H., Halldorsson, T.I., 2014. Persistent organic pollutants measured in maternal serum and offspring neurodevelopmental outcomes--a prospective study with long-term follow-up. *Environ Int* 68, 41-48.
- Sugawara, N., Ohba, T., Nakai, K., Kakita, A., Nakamura, T., Suzuki, K., Kameo, S., Shimada, M., Kurokawa, N., Satoh, C., Satoh, H., 2008. Effects of perinatal coexposure to methylmercury and polychlorinated biphenyls on neurobehavioral development in mice. *Arch Toxicol* 82, 387-397.
- Sullivan, E.L., Grayson, B., Takahashi, D., Robertson, N., Maier, A., Bethea, C.L., Smith, M.S., Coleman, K., Grove, K.L., 2010. Chronic consumption of a high-fat diet during pregnancy causes perturbations in the serotonergic system and increased anxiety-like behavior in nonhuman primate offspring. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30, 3826-3830.
- Suzumura, A., 2013. [Microglia in pathophysiology of neuroimmunological disorders]. *Nihon rinsho. Japanese journal of clinical medicine* 71, 801-806.
- Szlinder-Richert, J., Usydus, Z., Pelczarski, W., 2010. Organochlorine pollutants in European eel (*Anguilla anguilla* L.) from Poland. *Chemosphere* 80, 93-99.

-T-

- Takeuchi, O., Akira, S., 2010. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 140, 805-820.

- Talarowska, M., Szemraj, J., Galecki, P., 2015. Myeloperoxidase gene expression and cognitive functions in depression. *Adv Med Sci* 60, 1-5.
- Taylor, N., Candotti, F., Smith, S., Oakes, S.A., Jahn, T., Isakov, J., Puck, J.M., O'Shea, J.J., Weinberg, K., Johnston, J.A., 1997. Interleukin-4 signaling in B lymphocytes from patients with X-linked severe combined immunodeficiency. *J Biol Chem* 272, 7314-7319.
- Tetta, C., Cavaillon, J.M., Schulze, M., Ronco, C., Ghezzi, P.M., Camussi, G., Serra, A.M., Curti, F., Lonnemann, G., 1998. Removal of cytokines and activated complement components in an experimental model of continuous plasma filtration coupled with sorbent adsorption. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 13, 1458-1464.
- Thornberry, N.A., Bull, H.G., Calaycay, J.R., Chapman, K.T., Howard, A.D., Kostura, M.J., Miller, D.K., Molineaux, S.M., Weidner, J.R., Aunins, J., et al., 1992. A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature* 356, 768-774.
- Thompson, C., Syddall, H., Rodin, I., Osmond, C., Barker, D.J., 2001. Birth weight and the risk of depressive disorder in late life. *Br J Psychiatry* 179, 450-455.
- Thomson, L.M., Sutherland, R.J., 2005. Systemic administration of lipopolysaccharide and interleukin-1beta have different effects on memory consolidation. *Brain Res Bull* 67, 24-29.
- Tian, Y.H., Hwan Kim, S., Lee, S.Y., Jang, C.G., 2011. Lactational and postnatal exposure to polychlorinated biphenyls induces sex-specific anxiolytic behavior and cognitive deficit in mice offspring. *Synapse* 65, 1032-1041.
- Tofoli, S.M., Baes, C., Martins, C.M., Jurueña, M.F., 2011. Early life stress, HPA axis, and depression *Front Psychiatry* 4, 229-234.
- Tremblay, M.E., Lowery, R.L., Majewska, A.K., 2010. Microglial interactions with synapses are modulated by visual experience. *PLoS biology* 8, e1000527.
- Tremblay, M.E., Stevens, B., Sierra, A., Wake, H., Bessis, A., Nimmerjahn, A., 2011. The role of microglia in the healthy brain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31, 16064-16069.
- Tsukamoto, K., Kuroki, M., 2014. *Eels and humans*, Springer, Tokyo.

-V-

- Vaccarino, V., Brennan, M.L., Miller, A.H., Bremner, J.D., Ritchie, J.C., Lindau, F., Veledar, E., Su, S., Murrah, N.V., Jones, L., Jawed, F., Dai, J., Goldberg, J., Hazen, S.L., 2008. Association of major depressive disorder with serum myeloperoxidase and other markers of inflammation: a twin study. *Biol Psychiatry* 64, 476-483.
- Van Dam, A.M., Bol, J.G., Gaykema, R.P., Goehler, L.E., Maier, S.F., Watkins, L.R., Tilders, F.J., 2000. Vagotomy does not inhibit high dose lipopolysaccharide-induced interleukin-1beta immunoreactivity in rat brain and pituitary gland. *Neurosci Lett* 285, 169-172.
- Veenendaal, M.V., Painter, R.C., de Rooij, S.R., Bossuyt, P.M., van der Post, J.A., Gluckman, P.D., Hanson, M.A., Roseboom, T.J., 2013. Transgenerational effects of prenatal exposure to the 1944-45 Dutch famine. *BJOG* 120, 548-553.
- Verney, C., Monier, A., Fallet-Bianco, C., Gressens, P., 2010. Early microglial colonization of the human forebrain and possible involvement in periventricular white-matter injury of preterm infants. *Journal of anatomy* 217, 436-448.
- Verner, M.A., Plusquellec, P., Muckle, G., Ayotte, P., Dewailly, E., Jacobson, S.W., Jacobson, J.L., Charbonneau, M., Haddad, S., 2010. Alteration of infant attention and activity by polychlorinated biphenyls: unravelling critical windows of susceptibility using physiologically based pharmacokinetic modeling. *Neurotoxicology* 31, 424-431.
- Veyrand, B., Brosseaud, A., Sarcher, L., Varlet, V., Monteau, F., Marchand, P., Andre, F., Le Bizec, B., 2007. Innovative method for determination of 19 polycyclic aromatic hydrocarbons in

food and oil samples using gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry based on an isotope dilution approach. *J Chromatogr A* 1149, 333-344.

- Viggiano, D., 2008. The hyperactive syndrome: metanalysis of genetic alterations, pharmacological treatments and brain lesions which increase locomotor activity. *Behav Brain Res* 194, 1-14.
- Vilhardt, F., 2005. Microglia: phagocyte and glia cell. *The international journal of biochemistry & cell biology* 37, 17-21.
- Von Zahn, J., Möller, T., Kettenmann, H., Nolte, C., 1997. Microglial phagocytosis is modulated by pro - and anti-inflammatory cytokines. *Neuroreport* 8, 3851-3856.
- Vorhees, C.V., Williams, M.T., 2006. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nat Protoc* 1, 848-858.
- Vyskocil, A., Cizkova, M., Tejnorova, I., 1995. Effect of prenatal and postnatal exposure to lead on kidney function in male and female rats. *J Appl Toxicol* 15, 327-328.

-W-

- Wake, H., Fields, R.D., 2011. Physiological function of microglia. *Neuron glia biology* 7, 1-3.
- Wake, H., Moorhouse, A.J., Jinno, S., Kohsaka, S., Nabekura, J., 2009. Resting microglia directly monitor the functional state of synapses in vivo and determine the fate of ischemic terminals. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29, 3974-3980.
- Wake, H., Moorhouse, A.J., Nabekura, J., 2011. Functions of microglia in the central nervous system--beyond the immune response. *Neuron glia biology* 7, 47-53.
- Wang, P., Wu, P., Siegel, M.I., Egan, R.W., Billah, M.M., 1995. Interleukin (IL)-10 inhibits nuclear factor kappa B (NF kappa B) activation in human monocytes. IL-10 and IL-4 suppress cytokine synthesis by different mechanisms. *J Biol Chem* 270, 9558-9563.
- Wang, Z., Yu, G., Cascio, C., Liu, Y., Gingrich, B., Insel, T.R., 1999. Dopamine D2 receptor-mediated regulation of partner preferences in female prairie voles (*Microtus ochrogaster*): a mechanism for pair bonding? *Behav Neurosci* 113, 602-611.
- Wang, X., Athayde, N., Trudinger, B., 2003. A proinflammatory cytokine response is present in the fetal placental vasculature in placental insufficiency. *American journal of obstetrics and gynecology* 189, 1445-1451.
- Ward, R.J., Dexter, D.T., Crichton, R.R., 2015. Ageing, neuroinflammation and neurodegeneration. *Front Biosci (Schol Ed)* 7, 189-204.
- Weinstein, J.R., Koerner, I.P., Moller, T., 2010. Microglia in ischemic brain injury. *Future neurology* 5, 227-246.
- Whitten, W.K., 1959. Occurrence of anoestrus in mice caged in groups. *J Endocrinol* 18, 102-107.
- Wilson, C.J., Finch, C.E., Cohen, H.J., 2002. Cytokines and cognition--the case for a head-to-toe inflammatory paradigm. *J Am Geriatr Soc* 50, 2041-2056.
- Wilson, P.W., 2008. Evidence of systemic inflammation and estimation of coronary artery disease risk: a population perspective. *The American journal of medicine* 121, S15-20.

-Z-

- Zamanian, J.L., Xu, L., Foo, L.C., Nouri, N., Zhou, L., Giffard, R.G., Barres, B.A., 2012. Genomic analysis of reactive astrogliosis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32, 6391-6410.
- Zhang, A., Hao, S., Bi, J., Bao, Y., Zhang, X., An, L., Jiang, B., 2009. Effects of catalpol on mitochondrial function and working memory in mice after lipopolysaccharide-induced acute systemic inflammation. *Exp Toxicol Pathol* 61, 461-469.
- Ziko, I., De Luca, S., Dinan, T., Barwood, J.M., Sominsky, L., Cai, G., Kenny, R., Stokes, L., Jenkins, T.A., Spencer, S.J., 2014. Neonatal overfeeding alters hypothalamic microglial profiles and central responses to immune challenge long-term. *Brain Behav Immun* 41, 32-43.

Annexe



Contents lists available at ScienceDirect

Hormones and Behavior

journal homepage: 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 (J. Bouayed).

2007). In Inuit 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., 2016; 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 dosage, (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 ng/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; Elnar 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 Dietex, St Gratien, France) and were maintained on standard 12-h light/dark cycles (lights “on” starting at 8:00 p.m.), temperature-controlled conditions ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), and a relative humidity of $55 \pm 10\%$. The parturition day was considered to be post-natal 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 obtained by the effects of the all-female environment (crowded females) leading to the suppression of estrus due to a prolonged diestrus (Marsden and Bronson, 1965; Whitten, 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 stranger 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 4 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 Lorraine (authorization number CELMEA-2013-0010).

2.2. Perinatal 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-PCB indicators constitute around 56%, whereas DL-PCBs represent only 9% (Bhavsar et al., 2007; Elnar 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%) (Elnar et al., 2012; Karl et al., 2010; Naso 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 PCBs (30 mg) in 2 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°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 mono-fonction Seb Valentin 8553, France). Vigorous mixing was employed to ensure complete mixing, following protocols that were established in earlier investigations (Soualeh et al., 2017; Dridi et al., 2014). The obtained homogenous paste was heated at 37°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 as 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 polyvinyl plastic, including walls that permitted its division into three equal chambers (left, center, and right each of dimension 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 analyses

For the biochemical analyses, a total of six middle-aged mice (offspring) per sex and group were randomly selected from 10 l/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 #ab155458; 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 Ellman et al. (1961). In brief, 0.85 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 (8.25 mM) to the mixture. Acetylcholinesterase activity was assessed at 412 nm (at 20 °C) by kinetic measurement using the molar extinction coefficient [ϵ] 13,6 mM⁻¹ 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 unexposed 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*-tests or Mann-Whitney *U* tests. The results are reported as the mean ($\pm$ SEM).

Effect size comparisons were performed for ANOVA (partial eta-squared, η_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 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).

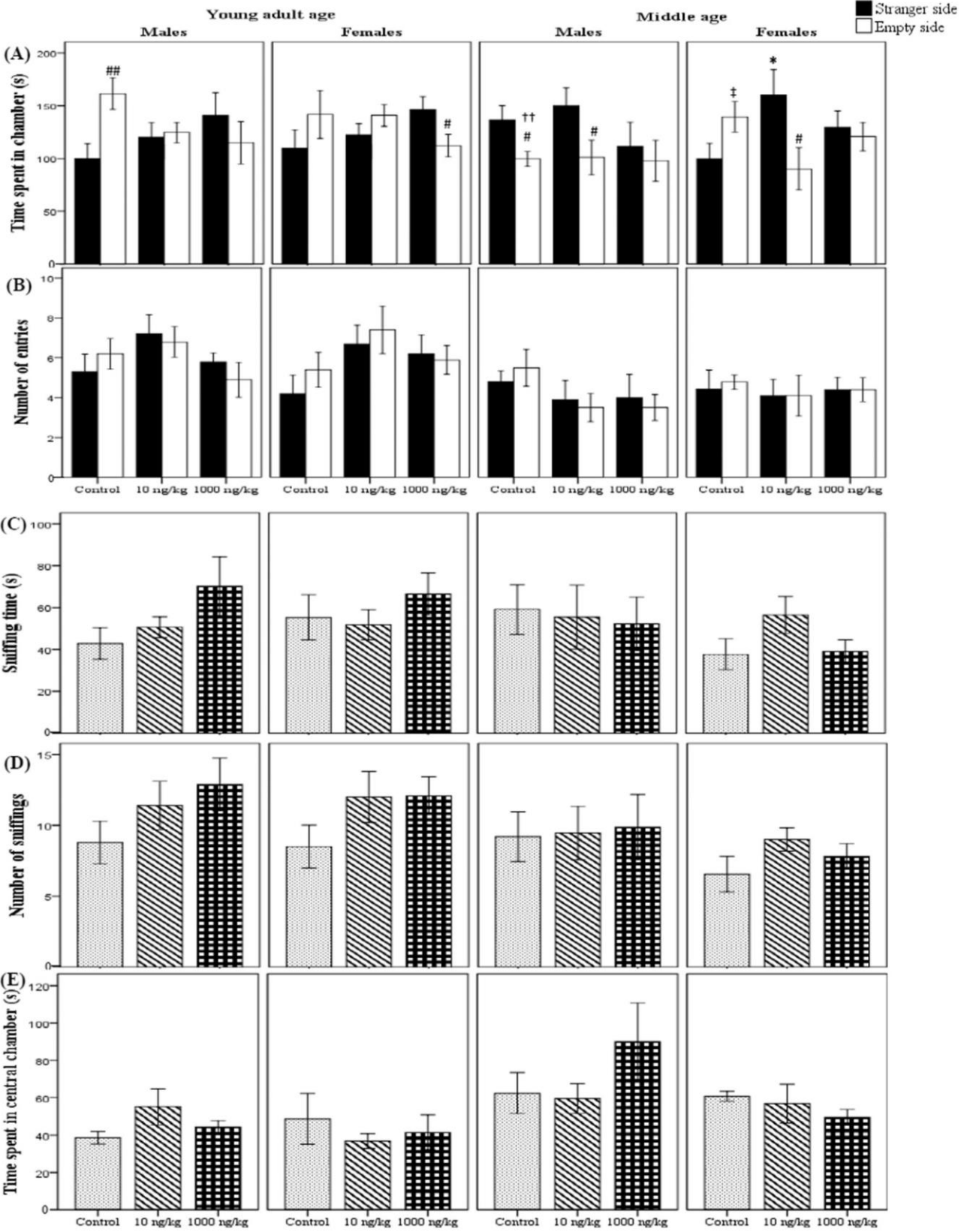
3. Results

3.1. Social behavior

3.1.1. Sociability assay

Three-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: $F(2, 104) = 2.92$, $p \leq 0.05$, $\eta_p^2 = 0.05$].

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).



(caption on next page)

Fig. 1. Effects of perinatal exposure to PCBs at 10 and 1000 ng/kg b.w. on the behavioral performances of young adult and middle-aged male and female offspring mice ($n = 8–10$) 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 at stranger, an unfamiliar conspecific. (D) Number of sniffings at 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 comparisons); # $p \leq 0.05$ and ## $p < 0.01$: significantly different within-group comparison between stranger side and empty side; † $p < 0.05$: significantly different between middle-aged males and female counterparts; ‡ $p < 0.01$: 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 ($t = 2.07$, $p \leq 0.05$, $d = 0.92$) 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 ($t = 2.09$, $p \leq 0.05$, $d = 0.93$) (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 ($p < 0.05$, $d = -0.98$) 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 congener ($t = -2.04$, $p \leq 0.05$, $d = 0.93$) (Fig. 2C).

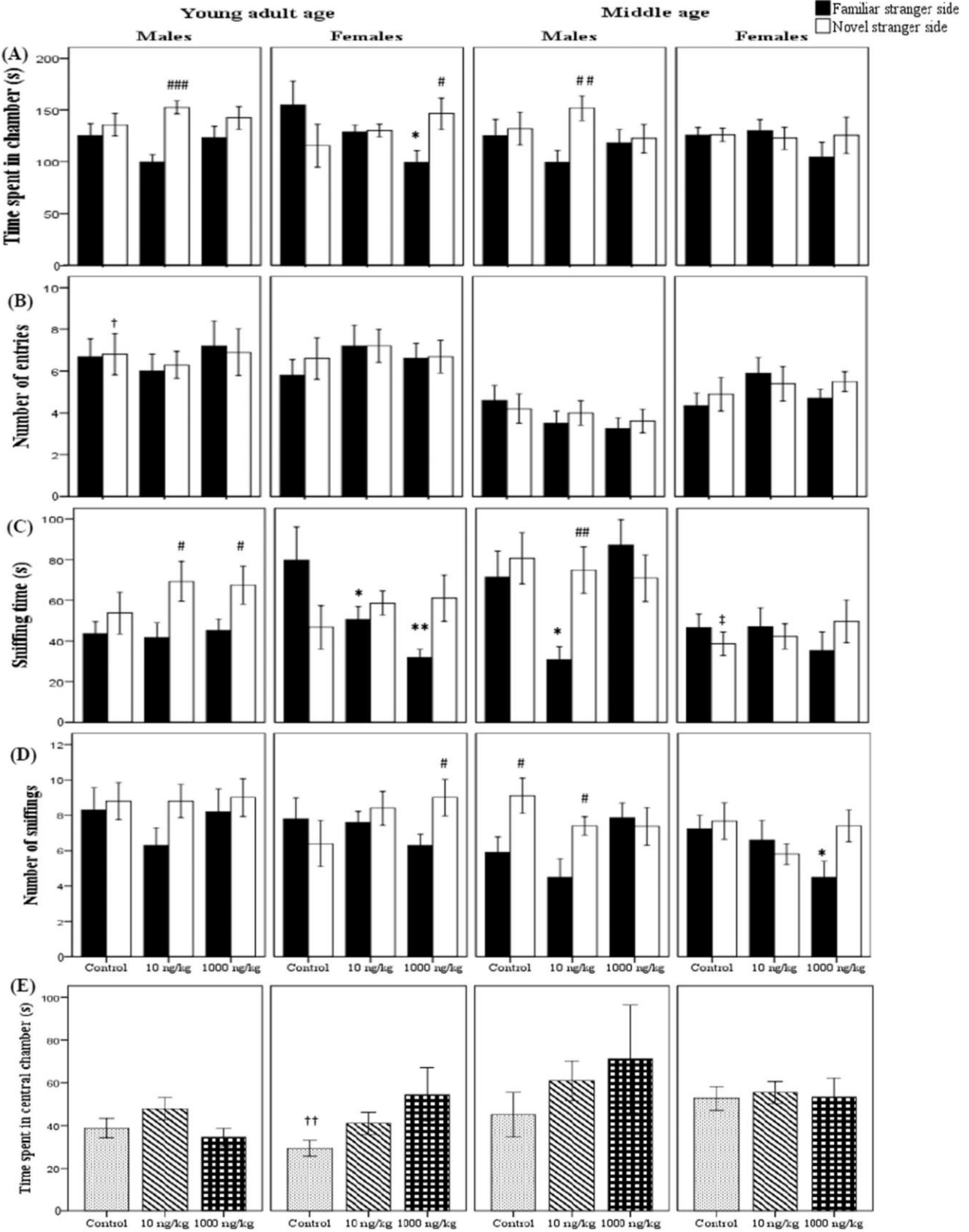
Post hoc analyses demonstrated that middle-aged females perinatally exposed to PCBs at 1000 ng/kg showed a significant decrease in the sniffing frequency of the familiar conspecific relative to controls ($p \leq 0.05$, $d = -1.09$) (Fig. 2D). Within-group comparisons demonstrated a significant increase in the sniffing frequency of the novel stranger over the familiar conspecific in middle-aged male control mice ($t = -2.42$, $p < 0.05$, $d = 1.08$) (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 congener (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. 2B). 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



(caption 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 ($n = 8–10$) 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, a 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 test apparatus. Data are reported as mean $\pm$ SEM. * $p \leq 0.05$ and ** $p < 0.01$: significantly different from the control (between-group comparisons); $^{\#}p \leq 0.05$, $^{\#\#}p < 0.01$ and $^{\#\#\#}p < 0.001$: significantly different within-group comparison between familiar side and novel stranger side; $^{\ddagger}p < 0.05$: significantly different between middle-aged males and female counterparts; $^{\dagger}p < 0.05$ and $^{\dagger\dagger}p < 0.01$: 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-NDLs were studied in both the sociability assay, which evaluates mouse preferences between an unfamiliar congener 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 50) 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.

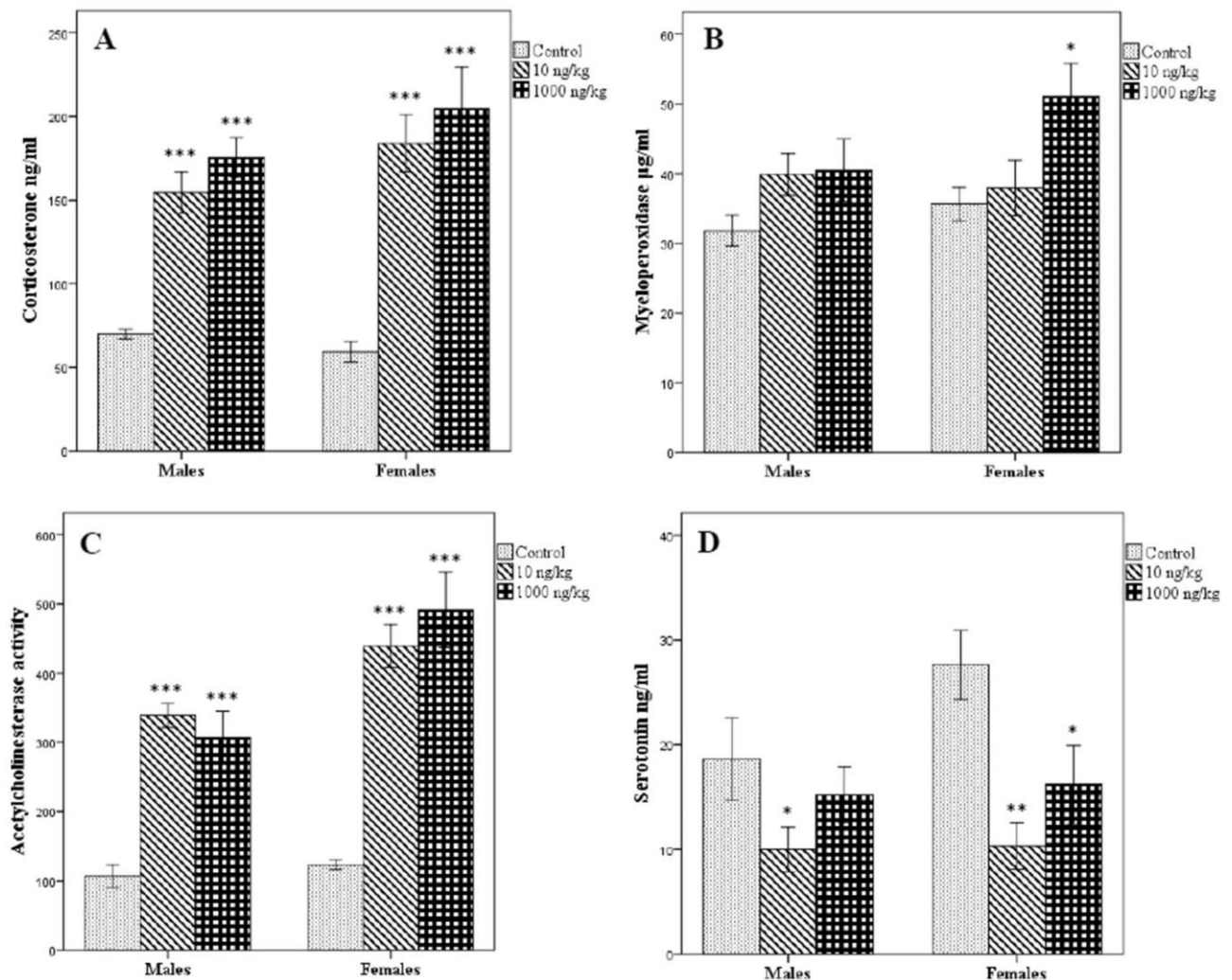


Fig. 3. Effects of perinatal exposure to PCBs at 10 and 1000 ng/kg on the plasma markers assessed in male and female middle-aged offspring mice ($n = 6$). (A) Corticosterone, expressed at ng/ml. (B) Myeloperoxidase (MPO), expressed at μg/ml. (C) Acetylcholinesterase activity, expressed at nmol acetylcholine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

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; Gioiosa 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 interacts 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 Handa, 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 indicators, 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 b.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 PCBs-NDL 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 Peiffer 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 Relevant Maximum Levels for Nondioxin-like Polychlorobiphenyls (NDL-PCB) in Some Foodstuffs. Afssa - Request No. 2006-SA-0305 1–27.
- Allen, N.B., Lewinsohn, P.M., Seeley, J.R., 1998. Prenatal and perinatal influences on risk for psychopathology in childhood and adolescence. *Dev. Psychopathol.* 10, 513–529.
- Andersen, S.L., 2003. Trajectories of brain development: point of vulnerability or window of opportunity? *Neurosci. Biobehav. Rev.* 27, 3–18.
- Apfelbach, R., Engelhart, A., Behnisch, P., Hagenmaier, H., 1998. The olfactory system as a portal of entry for airborne polychlorinated biphenyls (PCBs) to the brain? *Arch. Toxicol.* 72, 314–317.
- Bell, M.R., 2014. Endocrine-disrupting actions of PCBs on brain development and social and reproductive behaviors. *Curr. Opin. Pharmacol.* 19, 134–144.
- Bell, M.R., Thompson, L.M., Rodriguez, K., Gore, A.C., 2016. Two-hit exposure to polychlorinated biphenyls at gestational and juvenile life stages: 1. Sexually dimorphic effects on social and anxiety-like behaviors. *Horm. Behav.* 78, 168–177.
- Bhavsar, S.P., Fletcher, R., Hayton, A., Reiner, E.J., Jackson, D.A., 2007. Composition of dioxin-like PCBs in fish: an application for risk assessment. *Environ. Sci. Technol.* 41, 3096–3102.
- Boix, J., Cauli, O., Leslie, H., Felipo, V., 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. *Neurochem. Int.* 58, 69–77.
- Bouayed, J., Desor, F., Rammal, H., Kiemer, A.K., Tybl, E., Schroeder, H., Rychen, G., Soulimani, R., 2009a. Effects of lactational exposure to benzo[a]pyrene (B[a]P) on postnatal neurodevelopment, neuronal receptor gene expression and behaviour in mice. *Toxicology* 259, 97–106.
- Bouayed, J., Rammal, H., Soulimani, R., 2009b. Oxidative stress and anxiety: relationship and cellular pathways. *Oxidative Med. Cell. Longev.* 2, 63–67.
- Cauli, O., Piedrafitra, B., Llansola, M., Felipo, V., 2012. Gender differential effects of developmental exposure to methyl-mercury, polychlorinated biphenyls 126 or 153, or its combinations on motor activity and coordination. *Toxicology* 311, 61–68.
- Chen, Y.C., Yu, M.L., Rogan, W.J., Gladen, B.C., Hsu, C.C., 1994. A 6-year follow-up of behavior and activity disorders in the Taiwan Yu-cheng children. *Am. J. Public Health* 84, 415–421.
- Colciago, A., Casati, L., Mornati, O., Vergoni, A.V., Santagostino, A., Celotti, F., Negri-Cesi, P., 2009. Chronic treatment with polychlorinated biphenyls (PCB) during pregnancy and lactation in the rat part 2: effects on reproductive parameters, on sex behavior, on memory retention and on hypothalamic expression of aromatase and 5 α -reductases in the offspring. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 239, 46–54.
- Collins, C.M., Kloeck, J., Elliott, J.M., 2013. Parallel changes in serotonin levels in brain and blood following acute administration of MDMA. *J. Psychopharmacol.* 27, 109–112.
- Cummings, J.A., Clemens, L.G., Nunez, A.A., 2008. Exposure to PCB 77 affects partner preference but not sexual behavior in the female rat. *Physiol. Behav.* 95, 471–475.
- Dridi, I., Leroy, D., Guignard, C., Scholl, G., Bohn, T., Landoulsi, A., Thome, J.P., Eppe, G., Soulimani, R., Bouayed, J., 2014. Dietary early-life exposure to contaminated eels does not impair spatial cognitive performances in adult offspring mice as assessed in the Y-maze and the Morris water maze. *Nutr. Res.* 34, 1075–1084.
- Dridi, I., Soualeh, N., Bohn, T., Soulimani, R., Bouayed, J., 2017. Chemically contaminated eel fed to pregnant and lactating mouse dams causes hyperactivity in their offspring. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 1–12. <http://dx.doi.org/10.1024/1422-4917/a000288>.
- Edwards, H.E., MacLusky, N.J., Burnham, W.M., 2000. The effect of seizures and kindling on reproductive hormones in the rat. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 24, 753–762.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres Jr., V., Feather-Stone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88–95.
- Elnar, A.A., Diesel, B., Desor, F., Feidt, C., Bouayed, J., Kiemer, A.K., Soulimani, R., 2012. Neurodevelopmental and behavioral toxicity via lactational exposure to the sum of six indicator non-dioxin-like-polychlorinated biphenyls (Σ 6 NDL-PCBs) in mice. *Toxicology* 299, 44–54.
- Elnar, A.A., Desor, F., Marin, F., Soulimani, R., Nemos, C., 2015. Lactational exposure to low levels of the six indicator non-dioxin-like polychlorinated biphenyls induces DNA damage and repression of neuronal activity, in juvenile male mice. *Toxicology* 328, 57–65.
- Eriksson, P., Fredriksson, A., 1996. Developmental neurotoxicity of four ortho-substituted polychlorinated biphenyls in the neonatal mouse. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 1, 155–165.
- Flacker, J.M., Lipsitz, L.A., 1999. Serum anticholinergic activity changes with acute illness in elderly medical patients. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 54, M12–16.
- Gillette, R., Reilly, M.P., Topper, V.Y., Thompson, L.M., Crews, D., Gore, A.C., 2016. Anxiety-like behaviors in adulthood are altered in male but not female rats exposed to low dosages of polychlorinated biphenyls in utero. *Horm. Behav.* 87, 8–15.

- Gioiosa, L., Parmigiani, S., Vom Saal, F.S., Palanza, P., 2013. The effects of bisphenol A on emotional behavior depend upon the timing of exposure, age and gender in mice. *Horm. Behav.* 63, 598–605.
- Habila, N., Inuwa, H.M., Aimola, I.A., Lasisi, O.I., Chechet, D.G., Okafor, I.A., 2012a. Correlation of acetylcholinesterase activity in the brain and blood of wistar rats acutely infected with *Trypanosoma congolense*. *J. Acute Dis.* 26–30.
- Habila, N., Inuwa, H.M., Aimola, I.A., Lasisi, O.I., Muhammad, A., Okafor, I.A., Williams, I.S., 2012b. Acetylcholinesterase Activity in the Brain and Blood of Mice Infected With *Naja Nigricolis* Venom Biological Segment 3, BS/1565–1575.
- Harada, M., 1976. Intrauterine poisoning: clinical and epidemiological studies and significance of the problem. *Bull. Inst. Const. Med.* 25 (Suppl), 1–60.
- Hsieh, L.S., Wen, J.H., Miyares, L., Lombroso, P.J., Bordey, A., 2017. Outbred CD1 mice are as suitable as inbred C57BL/6J mice in performing social tasks. *Neurosci. Lett.* 637, 142–147.
- Jacobson, S.W., Fein, G.G., Jacobson, J.L., Schwartz, P.M., Dowler, J.K., 1985. The effect of intrauterine PCB exposure on visual recognition memory. *Child Dev.* 56, 853–860.
- Jolous-Jamshidi, B., Cromwell, H.C., McFarland, A.M., Meserve, L.A., 2010. Perinatal exposure to polychlorinated biphenyls alters social behaviors in rats. *Toxicol. Lett.* 199, 136–143.
- Kaidanovich-Beilin, O., Lipina, T., Vukobradovic, I., Roder, J., Woodgett, J.R., 2011. Assessment of social interaction behaviors. *J. Vis. Exp.*
- Karl, H., Bladt, A., Rottler, H., Ludwigs, R., Mathar, W., 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, 106–112.
- Kavlock, R.J., Daston, G.P., DeRosa, C., Fenner-Crisp, P., Gray, L.E., Kaattari, S., Lucier, G., Luster, M., Mac, M.J., Maczka, C., Miller, R., Moore, J., Rolland, R., Scott, G., Sheehan, D.M., Sinks, T., Tilson, 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.
- Klaric, T.S., Jaehne, E.J., Koblar, S.A., Baune, B.T., Lewis, M.D., 2017. Alterations in anxiety and social behaviour in Npas4 deficient mice following photochemically-induced focal cortical stroke. *Behav. Brain Res.* 316, 29–37.
- Kuriyama, S.N., Chahoud, I., 2004. In utero exposure to low-dose 2,3',4',4',5-pentachlorobiphenyl (PCB 118) impairs male fertility and alters neurobehavior in rat offspring. *Toxicology* 202, 185–197.
- Lee, H.J., Caldwell, H.K., Macbeth, A.H., Tolu, S.G., Young 3rd, W.S., 2008. A conditional knockout mouse line of the oxytocin receptor. *Endocrinology* 149, 3256–3263.
- Lesmana, R., Shimokawa, N., Takatsuru, Y., Iwasaki, T., Koibuchi, N., 2014. Lactational exposure to hydroxylated polychlorinated biphenyl (OH-PCB 106) causes hyperactivity in male rat pups by aberrant increase in dopamine and its receptor. *Environ. Toxicol.* 29, 876–883.
- Li, A.A., Baum, M.J., McIntosh, L.J., Day, M., Liu, F., Gray Jr., L.E., 2008. Building a scientific framework for studying hormonal effects on behavior and on the development of the sexually dimorphic nervous system. *Neurotoxicology* 29, 504–519.
- Lofgren, J.L., Erdman, S.E., Hewes, C., Wong, C., King, R., Chavarria, T.E., Discua, A.R., Fox, J.G., Maurer, K.J., 2012. Castration eliminates conspecific aggression in group-housed CD1 male surveillance mice (*Mus musculus*). *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 51, 594–599.
- Marsden, H.M., Bronson, F.H., 1965. The synchrony of oestrus in mice: relative roles of the male and female environments. *J. Endocrinol.* 32, 313–319.
- McGivern, R.F., Handa, R.J., 1996. Prenatal exposure to drugs of abuse: methodological considerations and effects on sexual differentiation. *NIDA Res. Monogr.* 164, 78–124.
- Mesa-Gresa, P., Ramos-Campos, M., Redolat, R., 2016. Corticosterone levels and behavioral changes induced by simultaneous exposure to chronic social stress and enriched environments in NMRI male mice. *Physiol. Behav.* 158, 6–17.
- Moy, S.S., Nadler, J.J., Perez, A., Barbaro, R.P., Johns, J.M., Magnuson, T.R., Piven, J., Crawley, J.N., 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., Nadler, J.J., Young, N.B., Perez, A., Holloway, L.P., Barbaro, R.P., Barbaro, J.R., Wilson, L.M., Threadgill, D.W., Lauder, J.M., Magnuson, T.R., Crawley, J.N., 2007. Mouse behavioral tasks relevant to autism: phenotypes of 10 inbred strains. *Behav. Brain Res.* 176, 4–20.
- Moy, S.S., Nadler, J.J., Young, N.B., Nonneman, R.J., Segall, S.K., Andrade, G.M., Crawley, J.N., Magnuson, T.R., 2008. Social approach and repetitive behavior in eleven inbred mouse strains. *Behav. Brain Res.* 191, 118–129.
- Moy, S.S., Nadler, J.J., Young, N.B., Nonneman, R.J., Grossman, A.W., Murphy, D.L., D'Ercole, A.J., Crawley, J.N., Magnuson, T.R., Lauder, J.M., 2009. Social approach in genetically engineered mouse lines relevant to autism. *Genes Brain Behav.* 8, 129–142.
- Mussi, C., Ferrari, R., Ascari, S., Salvioli, G., 1999. Importance of serum anticholinergic activity in the assessment of elderly patients with delirium. *J. Geriatr. Psychiatry Neurol.* 12, 82–86.
- Naso, B., Perrone, D., Ferrante, M.C., Bilancione, M., Lucisano, A., 2005. Persistent organic pollutants in edible marine species from the Gulf of Naples, Southern Italy. *Sci. Total Environ.* 343, 83–95.
- Olivier, B., 2015. Serotonin: a never-ending story. *Eur. J. Pharmacol.* 753, 2–18.
- Orito, K., Gotanda, N., Murakami, M., Ikeda, T., Egashira, N., Mishima, K., Fujiwara, M., 2007. Prenatal exposure to 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB126) promotes anxiogenic behavior in rats. *Tohoku J. Exp. Med.* 212, 151–157.
- Palanza, P., Nagel, S.C., Parmigiani, S., Vom Saal, F.S., 2016. Perinatal exposure to endocrine disruptors: sex, timing and behavioral endpoints. *Curr. Opin. Behav. Sci.* 7, 69–75.
- Pearson, B.L., Defensor, E.B., Blanchard, D.C., Blanchard, R.J., 2010. C57BL/6J mice fail to exhibit preference for social novelty in the three-chamber apparatus. *Behav. Brain Res.* 213, 189–194.
- Perkins, A.E., Doremus-Fitzwater, T.L., Spencer, R.L., Varlinskaya, E.I., Conti, M.M., Bishop, C., Deak, T., 2016. A working model for the assessment of disruptions in social behavior among aged rats: the role of sex differences, social recognition, and sensorimotor processes. *Exp. Gerontol.* 76, 46–57.
- Plusquellec, P., Muckle, G., Dewailly, E., Ayotte, P., Begin, G., Desrosiers, C., Despres, C., Saint-Amour, D., Poitras, K., 2010. The relation of environmental contaminants exposure to behavioral indicators in Inuit preschoolers in Arctic Quebec. *Neurotoxicology* 31, 17–25.
- Pobbe, R.L., Pearson, B.L., Blanchard, D.C., Blanchard, R.J., 2012. Oxytocin receptor and Mecp2 308/Y knockout mice exhibit altered expression of autism-related social behaviors. *Physiol. Behav.* 107, 641–648.
- Provenzano, G., Chelini, G., Bozzi, Y., 2016. Genetic control of social behavior: lessons from mutant mice. *Behav. Brain Res.*
- Rammal, H., Bouayed, J., Younos, C., Soulimani, R., 2008. The impact of high anxiety level on the oxidative status of mouse peripheral blood lymphocytes, granulocytes and monocytes. *Eur. J. Pharmacol.* 589, 173–175.
- Rammal, H., Bouayed, J., Falla, J., Boujedaini, N., Soulimani, R., 2010. The impact of high anxiety level on cellular and humoral immunity in mice. *Neuroimmunomodulation* 17, 1–8.
- Reilly, M.P., Weeks, C.D., Topper, V.Y., Thompson, L.M., Crews, D., Gore, A.C., 2015. The effects of prenatal PCBs on adult social behavior in rats. *Horm. Behav.* 73, 47–55.
- Sagiv, S.K., Thurston, S.W., Bellinger, D.C., Tolbert, P.E., Altshul, L.M., Korrick, S.A., 2010. Perinatal organochlorine exposure and behaviors associated with attention deficit hyperactivity disorder in school-aged children. *Am. J. Epidemiol.* 171, 593–601.
- Sagiv, S.K., Thurston, S.W., Bellinger, D.C., Altshul, L.M., Korrick, S.A., 2012. Neuropsychological measures of attention and impulse control among 8-year-old children exposed prenatally to organochlorines. *Environ. Health Perspect.* 120, 904–909.
- Schantz, S.L., Levin, E.D., Bowman, R.E., 1991. Long-term neurobehavioral effects of perinatal polychlorinated biphenyl (PCB) exposure in monkeys. *Environ. Toxicol. Chem.* 10, 741–756.
- Soualeh, N., Dridi, I., Eppe, G., Nemos, C., Soulimani, R., Bouayed, J., 2017. Perinatal programming of depressive-like behavior by inflammation in adult offspring mice whose mothers were fed polluted eels: gender selective effects. *Brain Behav. Immun.* 63, 137–147.
- Sugawara, N., Nakai, K., Nakamura, T., Ohba, T., Suzuki, K., Kameo, S., Satoh, C., Satoh, H., 2006. Developmental and neurobehavioral effects of perinatal exposure to polychlorinated biphenyls in mice. *Arch. Toxicol.* 80, 286–292.
- Szlinger-Richert, J., Barska, I., Mazerski, J., Usydus, Z., 2009. 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.
- Tian, Y.H., Hwan Kim, S., Lee, S.Y., Jang, C.G., 2011. Lactational and postnatal exposure to polychlorinated biphenyls induces sex-specific anxiolytic behavior and cognitive deficit in mice offspring. *Synapse* 65, 1032–1041.
- Veenit, V., Cordero, M.I., Tzanoulinou, S., Sandi, C., 2013. Increased corticosterone in peripubertal rats leads to long-lasting alterations in social exploration and aggression. *Front. Behav. Neurosci.* 7, 26.
- Vreugdenhil, H.J., Lanting, C.I., Mulder, P.G., Boersma, E.R., Weisglas-Kuperus, N., 2002. Effects of prenatal PCB and dioxin background exposure on cognitive and motor abilities in Dutch children at school age. *J. Pediatr.* 140, 48–56.
- Wang, Z., Yu, G., Cascio, C., Liu, Y., Gingrich, B., Insel, T.R., 1999. Dopamine D2 receptor-mediated regulation of partner preferences in female prairie voles (*Microtus ochrogaster*): a mechanism for pair bonding? *Behav. Neurosci.* 113, 602–611.
- Wang, X.Q., Fang, J., Nunez, A.A., Clemens, L.G., 2002. Developmental exposure to polychlorinated biphenyls affects sexual behavior of rats. *Physiol. Behav.* 75, 689–696.
- Wang, R., Xu, X., Zhu, Q., 2016. Pubertal exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate influences social behavior and dopamine receptor D2 of adult female mice. *Chemosphere* 144, 1771–1779.
- Whitten, W.K., 1959. Occurrence of anoestrus in mice caged in groups. *J. Endocrinol.* 18, 102–107.
- Winneke, G., Ranft, U., Wittsiepe, J., Kasper-Sonnenberg, M., Furst, P., Kramer, U., Seitner, G., Wilhelm, M., 2014. Behavioral sexual dimorphism in school-age children and early developmental exposure to dioxins and PCBs: a follow-up study of the Duisburg Cohort. *Environ. Health Perspect.* 122, 292–298.

Résumé

Dans ce travail de thèse, nous avons évalué les effets inflammatoires, comportementaux et cognitifs de l'exposition périnatale des souris à trois matrices alimentaires d'anguilles, reflétant 3 niveaux de pollution (faible, moyenne et haute), tout en considérant le sexe de la progéniture ainsi que les différentes phases d'âges. Les réponses inflammatoires ont été évaluées, aussi bien au niveau cérébral, y compris dans les cellules de la microglie, qu'au niveau périphérique, à 4 stades de vie distincts, et ce dès la naissance jusqu'à l'âge moyen. Chez les souriceaux, mâles et femelles, dont leurs génitrices ont consommé de l'anguille contaminée, durant la période gestationnelle et lactationnelle, vs les témoins dont leurs mères ont consommé uniquement la diète standard, nos résultats ont montré une neuro-inflammation précoce et prononcée, ainsi qu'une production accrue des marqueurs pro-inflammatoires par les cellules de la microglie durant la période néonatale et postnatale. Cette réponse pro-inflammatoire a été chronique puisqu'elle a été à nouveau détectée même à un âge avancé (âges adulte et moyen). Nos résultats mettraient en évidence l'activation et la polarisation des cellules de la microglie depuis la naissance, chez les animaux exposés, vers le phénotype M1, susceptible d'induire les effets neurotoxiques apparus beaucoup plus tard dans les stades de la vie. En effet, un comportement dépressif-like a été observé à l'âge adulte uniquement chez les mâles. Cette altération sexe dépendante du comportement de résignation a été attribuée à l'hyperactivation de l'axe de stress, l'axe hypothalamique pituitaire surrénalien, mise en évidence par une forte production de la corticostérone chez les mâles à l'âge adulte. Chez les femelles, nous avons mis en évidence le développement d'un comportement hyperactif dès l'âge adulte, et d'un déclin cognitif à l'âge moyen. Nos résultats suggèrent que le déficit de la mémoire de rétention des femelles d'âge moyen exposées périnatalement à des anguilles moyennement et hautement contaminées serait lié à la diminution significative de l'activation à la fois d'ERK 1/2 et du NF- κ B ainsi qu'à la réduction significative du taux d'acétylcholine, détectées au niveau de l'hippocampe de ces souris.

A partir de ces données et de celles obtenues par d'autres membres de notre équipe, il apparaît de plus en plus pertinent de prendre en considération le risque du couplage des effets neuro-oxydatif et neuro-inflammatoire dans la genèse de nombreux troubles cognitifs et comportementaux surtout de manière tardive et irréversible. Cela pourrait également être à l'origine d'une fragilité et d'une imprégnation précoce de différentes populations cellulaires qui conduiraient tardivement à une dégénérescence précoce des cellules en particulier au niveau neuronal et glial.

En conclusion, nos résultats suggèrent une programmation périnatale sexe-dépendante des troubles, mis en évidence aussi bien sur le plan comportemental que sur le plan cognitif chez les souris dont leurs mères ont consommé de l'anguille polluée, via des mécanismes inflammatoires. Cela laisse supposer un impact endocrino-dépendant dont il faudrait confirmer la réalité et les mécanismes.

Mots clés : Age; Anguilles polluées; Axe HPA; Comportement; Déficit mnésique; Effet dépressif-like; Effet Sexe; Hyperactivité; Exposition périnatale; Inflammation; Mémoire à long terme; Microglie; Programmation périnatale.

Abstract

Several lines of evidence indicate that early-life inflammation may predispose to mental illness in later-life. In our study, we investigated the impact of perinatal exposure to polluted eels on the brain and microglia inflammation in a lifespan approach as well as on the resignation behavior, the locomotor activity and the cognitive performances in the later life of male and female offspring mice. The effects of maternal standard diet (laboratory food) were compared to the same diet enriched with low, intermediate, or highly polluted eels. Our results showed a chronic brain inflammation in male and female offspring mice compared to controls, as assessed at the birth, up weaning, adulthood and middle-age. Activated microglia produced pro-inflammatory markers across the lifespan of male as well as female exposed offspring. The plasmatic level of myeloperoxidase was found to be significantly higher in both adult and middle-aged males and females vs. control offspring. However, high corticosterone levels were only found in adult male offspring mice perinatally exposed to polluted eels, suggesting a sex-selective dysregulation of the adult hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis. Sex selective differences were also found in adulthood, with regard to the offspring resignation behavior. Indeed, depressive-like symptoms were only found in adult male mice perinatally exposed to polluted eels. On the middle-age, sex selective effects were found with regard to memory and locomotor activity. Indeed, hyperactive phenotype was only detected in females. In addition, impaired long-term memory was only detected in middle-aged females, perinatally exposed to either intermediately or highly polluted eels. This deficit was related to decreases in ERK1/2 and p65 activation, and acetylcholine levels that were only detected in female hippocampus exposed to either intermediately or highly polluted eels.

In conclusion, our results indicated that early-life inflammatory insults were the plausible causative factor that programmed the behavior impairments and cognitive deficit in the later-life of offspring, and suggested that sex played an important role in the determination of nature of the appeared alterations.

Keywords: Cognitive deficit; Depressive-like behavior; Early-life exposure; HPA axis; Hyperactivity; Inflammation; Later-life; Long-term memory; Maternal diet; Microglia; Perinatal programming; Polluted eels; Sex effect
