

Remerciements

« La connaissance est la seule chose qui s'accroît lorsqu'on la partage ».

Avant toute chose, je remercie Dieu, le tout puissant, pour m'avoir donnée la force et la patience de faire ce travail.

J'adresse tout d'abord mes sincères remerciements à mon encadrante Madame CHIGR Fatiha qui a mis en place toute cette étude et qui m'a appris comment travailler en me faisant partager ses expériences et ses connaissances scientifiques. Je la remercie pour sa disponibilité et pour toute sa confiance, son soutien et aussi pour m'avoir supportée et encouragée durant toutes ces années. Merci bien Madame.

Je souhaite également remercier très chaleureusement le professeur Mohamed NAJIMI Directeur du laboratoire Génie Biologique pour sa grande disponibilité et son aide dans toutes les étapes de cette étude.

J'exprime ensuite mon estime et mes sincères remerciements aux membres de jury de thèse:

Madame Zehor AIT YACINE, Professeur à la Faculté des Sciences et Techniques, Béni Mellal, qui a accepté gentiment de présider ce jury.

Merci également à Madame Nadra LEKOUCH, Professeur à la Faculté des Sciences et Techniques Béni Mellal, d'avoir bien voulu accepté de siéger dans ce jury et de juger ce travail, en dépit d'un agenda bien chargé.

Merci à Madame Rachida ROKY, Professeure à la Faculté des Sciences Ain Chock Casablanca, pour s'être donné la peine d'expertiser le présent travail de se déplacer pour siéger dans ce jury.

De même, mes remerciements vont à Monsieur Abdelhalim MESFIOUI, Professeur à la Faculté des Sciences Kénitra qui malgré ses préoccupations professionnelles et familiales a répondu présent.

Enfin, que Madame Fatima-Zahra AZZAOUI, Professeur Habilitée à la Faculté des Sciences, Kénitra, trouve ici l'expression de ma profonde gratitude et de mon respect.

Merci aussi au Docteur Hasna BALLAL pour m'avoir accueillie dans son laboratoire d'Anatomie Pathologique pour y réaliser les coupes histologiques et son aide pour la prise des photos et l'interprétation des résultats histologiques et surtout son encouragement et sa bonne humeur. Merci bien Docteur.

Merci au professeur Samira BOULBAROUD pour son soutien et son aide et surtout son encouragement et sa profonde gentillesse.

Je tiens à remercier aussi mes camarades du laboratoire qui m'ont aidé à mener à bien les expérimentations pendant mon travail de thèse particulièrement Hammou ANARGHOU, Fatime zohra OUARDI, Nouhayla CHAOUI, Nabila OUASMI et Rachid HNINI.

Je remercie tous ceux qui ont participé de loin ou de près à la réalisation de ce travail.

Papa, maman, j'espère que vous êtes fières de moi. Merci infiniment pour vos encouragements, votre compréhension, vos aides et vos prières, j'espère que vous serez fières de moi.

Le grand merci à ma petite famille et surtout à mon mari, j'espère que vous serez aussi fières de moi.

Résumé

La contamination par le mercure constitue et reste un grand problème qui menace la santé humaine en particulier lors des périodes de développement. Ainsi, une intoxication très précoce peut avoir des effets néfastes sur le développement général de l'organisme et surtout sur le développement cérébral menant à des effets toxiques néfastes, qui sont parfois irréversibles.

La présente étude vise à évaluer la toxicité et la neuro-toxicité d'une faible dose de mercure inorganique à 40ppm (HgCl_2) chez la souris. Cette dose est administrée aux souris F1 durant la période de gestation, après naissance, à travers le lait maternel et après sevrage, dans l'eau de boisson jusqu'à l'âge adulte. Durant cette période d'intoxication nous avons étudié le statut antioxydant en plus de l'intégrité des organes cibles tels que le cerveau, le foie, les reins et les gonades. Au niveau central, en outre des paramètres biochimiques qui ont été analysés dans plusieurs structures cérébrales, une étude comportementale a été menée en parallèle.

Au niveau cérébral nos résultats ont montré une augmentation significative de la peroxydation lipidique (MDA) avec une dérégulation des activités enzymatiques antioxydantes (GPx, GST, SOD, CAT et TRxR) chez les souriceaux traités avec le HgCl_2 , et qui serait à l'origine des altérations du développement sensorimoteur et des performances comportementales après sevrage. A l'âge adulte les résultats révèlent les mêmes déficits comportementaux qu'après sevrage et qui seraient dues aux concentrations élevées de mercure dans les structures cérébrales des animaux traités et un stress oxydatif cérébral bien marqué par l'inhibition des activités enzymatiques et l'augmentation de la peroxydation lipidique. D'autre part les résultats au niveau hépatique et rénal ont montré chez les souriceaux traités une activation significative des activités enzymatiques antioxydantes au PN10 avec une peroxydation lipidique élevée au niveau du foie, alors qu'au niveau des reins, la peroxydation lipidique est élevée dans les deux postnatales étudiés et est concomitante à un comportement biphasique du statut anti-oxydant, inhibition de certaines enzymes antioxydantes et activation d'autres. A l'âge adulte, la peroxydation lipidique est élevée dans les deux organes et est accompagnée par l'inhibition de toutes les enzymes antioxydantes hépatiques et quelques enzymes antioxydantes rénales (SOD et GPx). Ces altérations biochimiques sont confirmées par l'augmentation des taux plasmatiques de l'AST et de la créatinine plasmatique et d'altérations histologiques bien évidentes. L'effet du HgCl_2 sur la reproduction est traduit par le niveau élevé de la peroxydation lipidique au niveau des gonades mâles et par l'inhibition des activités GPx et SOD et une altération histologique des tubes séminifères.

Cette série d'expériences a montré que le mercure inorganique même à une faible dose provoque des altérations à plusieurs niveaux centraux et périphériques.

Mots clés : HgCl_2 , cerveau, neurotoxicité, stress oxydatif, enzymes antioxydants, comportement maternel, développement sensorimoteur, anxiété et mémoire.

Abstract

Mercury contamination is a real problem that threatens human health, especially during pregnancy. Thus, mercury could reach the offspring through the blood exchange via the umbilical cord or through milking after delivery. This very early intoxication could have harmful effects on the general development of the organism and especially when cerebral development is considered as certain effects could be irreversible.

The present study aims to assess the toxicity and particularly neurotoxicity of inorganic mercury given at a low dose of 40 ppm (HgCl_2) in mice. This dose was administered to F1 mice during the gestational period, after delivery through breast milk and after weaning in drinking water until adulthood. During this period of intoxication, we studied the antioxidant status in addition to the histopathological features of target organs such as brain, liver, kidneys and gonads. In the brain, in addition to biochemical parameters measured in main brain structures, a behavioral investigation has been led to confirm any biochemical alterations.

The results at the cerebral level showed a significant increase in lipid peroxidation (MDA) accompanied by deregulation of the antioxidant enzymatic activities (GPx, GST, SOD, CAT and TRxR) in mice pups treated with HgCl_2 , which could strongly explain changes observed in sensorimotor development and behavioral performance after weaning. In adulthood, the results show the same behavioral deficits as after weaning, due certainly to the high concentrations of mercury assessed in brains of animals treated and the increase in cerebral oxidative stress by the inhibition of enzymatic activities and increase in lipid peroxidation. At hepatic and renal levels, we have shown that in mice pups a significant activation of the antioxidant enzymatic activities at PN10 with an increase in lipid peroxidation on the postnatal day (PN10) in the liver, while in the kidneys, the level of lipid peroxidation is high in the two postnatal studied with inhibition of certain antioxidant enzymes and activation of others. In adulthood lipid peroxidation was high in both organs and accompanied by the inhibition of all liver antioxidant enzymes and some renal antioxidant enzymes (SOD and GPx). These biochemical alterations were confirmed by the increase in plasma biochemical parameters (AST and creatinine) with very obvious histological alterations. The effect of HgCl_2 on reproduction was reflected by the high level of lipid peroxidation at the testicular level and by the inhibition of GPx and SOD activities and the histological alterations of the seminiferous tubes.

Taken together all these results have shown that inorganic mercury even administrated at a low dose causes alterations at central and peripheral levels.

Key words: HgCl_2 , brain, neurotoxicity, oxidative stress, antioxidant enzymes, maternal behavior, sensorimotor development, anxiety and memory.

ملخص

يمثل التلوث بالزئبق ، ولا يزال ، مشكلة كبيرة تهدد صحة الإنسان وخاصة خلال فترات النمو. وبالتالي ، فإن التسمم المبكر يمكن أن يكون له آثار ضارة على التطور العام للكائن الحي وخاصة على تطور الدماغ مما يؤدي إلى تأثيرات خطيرة على ه ذا العضو الحساس ، والتي لا يمكن علاجها في بعض الأحيان.

تهدف هذه الدراسة إلى تقييم السمية والسمية العصبية لجرعة منخفضة من الزئبق غير العضوي (HgCl₂) 40 ppm (40 جزء في المليون) لدى الفئران. تعطى هذه الجرعة للجيل الأول من الفئران (F1) خلال فترة الحمل و بعد الولادة من خلال حليب الام. لكن في فترة ما بعد الفطام تقدم هاته الجرعة مذابة في ماء الشرب ويستمر ذلك حتى فترة البلوغ. خلال فترة التسمم ه اتف درسنا حالة مضادات الأكسدة بالإضافة إلى سلامة الأعضاء المستهدفة مثل الدماغ والكبد والكلى والغدد التناسلية. أما على المستوى المركزي ، بالإضافة إلى التحاليل البيوكيميائية التي تم إجرائها في العديد من المناطق الدماغية ، تمت دراسة السلوك بالتوازي عند هاته الحيوانات.

على المستوى الدماغى ، أظهرت نتائجنا زيادة كبيرة في نسبة الدهون المؤكسدة (MDA) مع عدم استقرار في نشاط الأنزيمات المضادة للأكسدة (GPx ، GST ، SOD ، CAT و TRxR) عند الفئران حديثي الولادة و المسممة بـ HgCl₂ ، والتي سنؤدي إلى خلل في التطور الحسى والأداء السلوكى بعد الفطام. في مرحلة البلوغ تكشف النتائج عن نفس المشاكل السلوكية التي تم كشفها بعد الفطام والتي تعزى إلى تركيزات عالية من الزئبق في المناطق الدماغية للحيوانات المسممة بالزئبق والضغط التأكسدي الدماغى الذي يتميز بتنشيط الأنشطة الأنزيمية وزيادة الدهون المؤكسدة. من ناحية أخرى ، أظهرت النتائج على مستوى الكبد والكلى عند الفئران المسممة تنشيطاً كبيراً للأنزيمات المضادة للأكسدة في اليوم العاشر بعد الولادة PN10 مع ارتفاع في نسبة الهون المؤكسدة في الكبد ، بينما في الكلى ، تم إثبات ارتفاع في تركيز الدهون المؤكسدة و يصاحب ذلك سلوك ثنائي الطور للحالة المضادة للأكسدة وذلك بتنشيط بعض الإنزيمات المضادة للأكسدة وتفعيل البعض الأخرى. في مرحلة البلوغ ، تكون الدهون المؤكسدة مرتفعة في كلا الجهازين ويصاحبه تنشيط جميع إنزيمات الكبد المضادة للأكسدة وبعض الإنزيمات المضادة للأكسدة الكلوية (SOD و GPx) ، ويتم تأكيد هذه التغيرات البيوكيميائية بزيادة مستويات AST والكرياتينين والتغيرات النسيجية الواضحة للغاية. ينعكس تأثير HgCl₂ على الوظيفة التناسلية من خلال المستوى العالى من أكسدة الدهون في الغدد التناسلية الذكرية وتنشيط أنشطة الإنزيمات GPx و SOD والتغيير النسيجي للأنايبب المنوية.

وقد أظهرت هذه السلسلة من التجارب أن الزئبق غير العضوي حتى بجرعة منخفضة يسبب تغيرات على عدة مستويات مركزية ولا مركزية.

الكلمات الرئيسية: HgCl₂ (زئبق غير عضوي) ، الدماغ ، السمية العصبية ، الإجهاد التأكسدي ، الإنزيمات المضادة للأكسدة ، سلوك الأمهات ، النمو العصبى ، القلق والذاكرة.

Liste des Abréviations

5HT : La sérotonine

A

AChE : Acétylcholinesterase

ALT : Alanine amino-transferase

AST : Aspartate aminotransferase

AFSSPS : Association Française de Sécurité Sanitaires des Produits de Santé

B

BPCs : Biphenyles polychlores

BDNF: Brain-Derived Neurotrophic Factor

BuChE : la butyrylcholinesterase

C

CAT : Catalase

Cu : Le cuivre

D

DTNB: 5-5' dithionitrobenzoic acid

E

EDTA : Ethylenediaminetetraacetic acid

EPM : « elevated plus maze » ou labyrinthe en croix surélevé

ERO : Espèces réactives d'oxygène

F

FSH : L'hormone folliculo-stimulante

G

GABA : L'acide γ -aminobutyrique

GD : Jour de gestation

GSH-Px : Glutathion peroxydase

GSH/GSSG : Glutathion réduit/oxydé

GST : Glutathion S-Transférase

H

HgCl₂ : Chlorure de mercure

HgS : sulfure mercurique

HgSO₄ : sulfate mercurique

H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène

HDL : Lipoprotéine de haute densité (High Density Lipoprotein)

Hg : Mercure

HO° : hydroxyle

I

INERIS : L'Institut national de l'environnement industriel et des risques

LDL : Lipoprotéine de basse densité (Low Density Lipoprotein)

L

LOO° : Radical peroxyde

LOOH : Hydroperoxyde

LH : L'hormone lutéinisante

M

MDA: Malondialdehyde

Mn-SOD : Superoxyde dismutase associée au manganèse

MTs: Métallothionéine

O

1O₂ : L'oxygène singulier

O₂ : Dioxygène

O₂°- : Anion superoxyde

OH- : Ion hydroxyde

OH°: Radical hydroxyle

Pb : Plomb

P

PND : Jour postnatal

RL : Radicaux libres

R

RO°: Radical alkoxyde

ROH: Alcool

ROO°: Radical peroxyde

ROOH : Hydroperoxyde

ROS : Espèces réactives oxygénées (Reactive Oxygen Species)

S

SNC : système nerveux central

Se : Sélénium

-SH : Groupement sulfhydryle

SOD : Superoxyde dismutase

SOD(Mn) : Superoxyde dismutase à manganèse

T

TBA: Acide thiobarbiturique

TCA : Trichloroacétique

Liste des publications

- ✓ **Hafsa Malqui**, Hammou Anarghou, Fatima Zahra Ouardi, Nabila Ouasmi, Mohamed Najimi, Fatiha Chigr (2018). Continuous Exposure to Inorganic Mercury Affects Neurobehavioral and Physiological Parameters in Mice. *J Mol Neurosci.* 66:291–305
- ✓ Fatima Zahra Ouardi, Hammou Anarghou, **Hafsa Malqui**, Nabila Ouasmi, Mohammed Chigr, Mohamed Najimi, Fatiha Chigr (2018). Gestational and Lactational Exposure to Malathion Affects Antioxidant Status and Neurobehavior in Mice Pups and Offspring. *J Mol Neurosci.*

Liste des communications

Communications orales:

- ✓ **Malqui H.**, Ouasmi N., Anarghou H., Ouardi FZ., Merzouki M., Najimi M., Chigr F. (2018) "Effets neuro-développementaux du mercure inorganique chez la souris". « Symposium International des Jeunes Chercheurs en Neurosciences » du 18 au 20 Avril 2018, à la faculté Poly-disciplinaire Béni Mellal, Maroc.

Communications affichées:

- ✓ **Malqui H.**, Mellouki B., Chaoui N., Er-Raoui G., Najimi M., Chigr F. (2018). Effet du mercure inorganique sur le comportement chez des souris adultes traitées pendant la vie fœtale et postnatale jusqu'à l'âge adulte. « Symposium International des Jeunes Chercheurs en Neurosciences » du 18 au 20 Avril 2018, à la faculté Poly-disciplinaire Béni Mellal-Maroc.
- ✓ Chaoui N., Hnini R., **Malqui H.**, Anarghou H., Ait choui A., Najimi M., Chigr F. (2018). Effet de l'application d'un stress chronique chez la souris sur les aspects comportementaux et cognitifs. « Symposium International des Jeunes Chercheurs en Neurosciences » du 18 au 20 Avril 2018, à la faculté Poly-disciplinaire Béni Mellal-Maroc.
- ✓ El Mekhlouf Y., Khouyi A., **Malqui H.**, Boulbaroud S., Azzaoui F-Z., EL Montaser S., Ahami A., Najimi M., Chigr F. (2018). Effet de l'intoxication au chlorure de cadmium sur les performances neurocognitives chez le rat. « Symposium International

des Jeunes Chercheurs en Neurosciences » du 18 au 20 Avril 2018, à la faculté Poly-disciplinaire Béni Mellal-Maroc.

- ✓ Anarghou H., Mellouki B., **Malqui H.**, Ouasmi N Merzouki M., Najimi M., Chigr F. (2018). Effet de la toxicité chronique du plomb et de l'aluminium sur le comportement et la capacité amnésique chez le rat. « Symposium International des Jeunes Chercheurs en Neurosciences » du 18 au 20 Avril 2018, à la faculté Poly-disciplinaire Béni Mellal-Maroc.
- ✓ Ouardi FZ., Ouasmi N., **Malqui H.**, Anarghou H., Mellouki B., Chigr F., Najimi M., Chigr M. (2018). L'effet de l'exposition pré-natal et post-natal du malathion sur les paramètres développementaux chez la souris. « Symposium International des Jeunes Chercheurs en Neurosciences » du 18 au 20 Avril 2018, à la faculté Poly-disciplinaire Béni Mellal-Maroc.
- ✓ Ouasmi N., Anarghou H., **Malqui H.**, Mellouki B., Najimi M., Chigr F.(2018). Effets de l'exposition au cadmium a faible dose pendant la gestation et lactation sur le neurodeveloppement chez le rat. « Symposium International des Jeunes Chercheurs en Neurosciences » du 18 au 20 Avril 2018, à la faculté Poly-disciplinaire Béni Mellal-Maroc.
- ✓ Khouyi A., El Mekhlouf Y., **Malqui H.**, Boulbaroud S., Azzaoui F-Z., N'go P.K., Najimi M., Chigr F., Ahami A. (2018) Effect of polyphenols extracted from *CHRYSOPHYLLUM PERPULCHRUM* on locomotor activity and anxiety-like behavior in ovariectomized rats. « Symposium International des Jeunes Chercheurs en Neurosciences » du 18 au 20 Avril 2018, à la faculté Poly-disciplinaire Béni Mellal-Maroc.
- ✓ **H.Malqui**, B.Mellouki , K.Elmanja, G.Er-raoui ,M.Najimi, F.Chigr.(2015) “Chemical stress and developmental behavior in mouse: the case of mercury..International Symposium on stress, addiction and obesity, A Potential Link between Obesity and Addiction. 3-5 December à Marrakech-Maroc.
- ✓ N .Ouasmi, **H. Malqui**, G.Er-raoui, F.Chigr. (2015) Biological effects of a chemical stressor, case of cadmium.International Symposium on stress, addiction and obesity, A Potential Link between Obesity and Addiction. 3-5 December à Marrakech-Maroc.

- ✓ **H.Malqui**, K.El Manja, F. Chigr, M. Najimi. (2014). Évaluation de la toxicité chronique du plomb chez le rat au cours de développement. La première édition des journées doctorales. 10-11 juin. Béni Mellal-Maroc.
- ✓ Kacimi FZ, Boulbaroud S, Azzaoui FZ, Ahami AOT, Najimi M, CHigr F, **Malqui H**, Pacome N'go (2017). Phénolic coumpound of chrysophyllum family prevent ovariectomy-induced memory impairment in female wistar rats.Le premier colloque international: VEILLISSEMENT EN AFRIQUE: SANTE ET QUALITE DE VIE, organisé le 23-24 novembre à l'institut Supérieure des science de la santé de l'Université Hassan I de Settat-Maroc.

Participation aux événements scientifiques

- ✓ Participation à la “Third Mediterranean Neuroscience Society School of Neurosciences: Food intake regulation: from physiology to physiopathology”. 17-21 November 2014, Béni-Mellal-Maroc.
- ✓ Participation au conger en (2015): «THE FIRST MAGHREB COURSES ON PARKINSON’S DISEASES AND RELATED DISORDERS», à Marrakech-Maroc.

Liste des figures

Figure 1 : Métabolisme du mercure dans l'organisme.....	16
Figure 2 : Les principales cibles du mercure et les pathologies induites.....	17
Figure 3 : Décours temporel des différentes phases du développement du cerveau de rat.....	24
Figure 4 : Occurrence au cours du temps des phases de prolifération cellulaires pour la mise en place des grandes structures du cerveau.....	30
Figure 5 : Principaux éléments du comportement maternel chez les rongeurs.....	35
Figure 6 : Temps quotidien moyen passé hors du nid, pour boire et manger chez la souris....	36
Figure 7 : Schéma de la balance anti-oxydants/pro-oxydants représentant un stress Oxydant.....	37
Figure 8 : Schéma modifié de l'origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqué en biologie	39
Figure 9 : Réactions de la peroxydation lipidique	41
Figure 10 : Nature de quelques modifications des chaînes latérales, d'acides aminés des protéines après attaque radicalaire.....	42
Figure 11 : Types de lésions de l'ADN provoqués par les attaques radicalaires.....	43
Figure 12 : Régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène par les systèmes de défenses antioxydants.....	44
Figure 13 : Schéma résume le mécanisme de détoxification enzymatique	46
Figure 14 : Schémas explicatives du test de récupération des souriceaux.....	57
Figure 15 : Images explicatives du protocole du test surface righting reflex.....	58
Figure 16 : Dispositif explicatif du test Cliff avaindance.....	58
Figure 17 : Dispositif explicatif du test Negative geotaxis.....	58
Figure 18 : Dispositif explicatif du test Saut vers le bas avec le test de choix (Jumping down choice cage).....	59

Figure 19: Dispositif explicative du test du développement de la nage (swimming developpement).....	60
Figure 20: Dispositif expérimentale du test Champ ouvert (Open Field).....	60
Figure 21: Dispositif expérimentale du test Reconnaissance des Objets.....	61
Figure 22: Dispositif expérimentale du test labyrinthe en Y.....	62
Figure 23 : Dispositif expérimentale du test labyrinthe surélevé (EPM)	
Figure 24: Dispositif explicatif du test Interaction social.....	65
Figure 25: La fréquence des selles d'une heure.....	66
Figure 26 : La mise en cassette des échantillons.....	78
Figure 27: La déshydratation des échantillons.....	78
Figure 28: La mise en blocs des différents échantillons.....	79
Figure 29 : La microtomie et coloration des lames.....	80
Figure 30 : Effet du mercure sur (A) le poids, (B) la longueur du corps et (C) longueur de la queue chez les souriceaux F1 traitées et leurs témoins.....	84
Figure 31: Effet du chlorure de mercure administré durant la gestation et après mise bas sur l'allaitement des femelles F0 traitées mercure par rapport aux femelles témoins.....	86
Figure 32: Effet du chlorure de mercure administré durant la période de gestation et après mise bas sur les paramètres du test de récupération des souriceaux.....	88
Figure 33 : Résultats de l'effet du mercure sur le comportement des souriceaux traités et leurs témoins correspondants.....	89
Figure 34 : Effet du mercure sur les paramètres du test "Juming down choice cages".....	90
Figure 35: les paramètres du test développement de la natation.....	91
Figure 36: Résultats de l'effet du chlorure de mercure sur les paramètres du test "Open Field".....	92
Figure 37: Performance de Reconnaissance des objets des souriceaux F1 traités par le HgCl2 ainsi que leurs témoins.....	93
Figure 38: Performance d'alternance des souriceaux F1 traités et témoins dans le Labyrinthe en Y.....	94

Figure 39: Résultats du test labyrinthe surélevé (EPM).....	95
Figure 40: Performance des souriceaux F1 traités et témoins dans le test de l'Interaction Social.....	97
Figure 41: Performance des souris adultes témoins et traitées dans le test "Open Field".....	99
Figure 42: Effet du mercure inorganique sur la mémoire des souris traitées mercure et leurs témoins dans le test Reconnaissance d'Objet.....	100
Figure 43: Performance des souris traités HgCl ₂ et témoins dans le test de labyrinthe en Y.....	101
Figure 44: Résultats de l'étude de l'anxiété dans le test EPM des souris traitées F1 adultes et leurs témoins.....	102
Figure 45: Le comportement social des souris témoins et traitées adultes F1 par le HgCl ₂ dans le test de l'Interaction Social.....	104
Figure 46: Le poids relatif et la teneur en eau dans les selles des souris mâles traitées et témoins F1 adultes.....	106
Figure 47: Poids relatif du cerveau(A), du foie(B) et des reins(C) des souriceaux F1 traités et leurs témoins.....	107
Figure 48: Poids relatif du cerveau (A), du foie (B) et des reins (C) chez des souris F1 traitées adultes et leurs témoins.....	108
Figure 49: L'évolution de l'activité de Acétylcholinestérase chez les souriceaux F1 traités et témoins.....	109
Figure 50: L'évolution de l'activité Acétylcholinestérasique dans les différentes structures cérébrales.....	110
Figure 51: Variation du taux de MDA cérébral chez les souriceaux F1 traités HgCl ₂ et leurs témoins.....	111
Figure 52: Variation des taux des enzymes antioxydantes de la GPx , de la GST, de la SOD, de la Catalase et de la TRxR au niveau du cerveau des souriceaux F1 traités au HgCl ₂ et leurs témoins.....	112
Figure 53: Variation du taux de MDA au niveau des structures cérébrales.....	113

Figure 54: Variation du taux des enzymes antioxydantes de la GPx, de la GST, de la SOD, de la Catalase et de la TRxR de 8 structures cérébrales étudiés.....	117
Figure 55: Dosage du taux de MDA hépatique des souriceaux F1 traités au HgCl ₂ et leurs témoins.....	118
Figure 56: Variation du taux hépatique des enzymes antioxydantes de la GPx(A), de la GST, de la SOD, Catalase et de la TRxR des souriceaux.....	119
Figure 57: Dosage du la malondialdehyde (MDA) hépatique chez la souris F1 adulte traitée et leurs témoins.....	120
Figure 58: Variation de la capacité anti-oxydante hépatique de la GPx(A), de la GST, de la SOD, Catalase et de la TRxR chez la souris F1 adulte traité et leurs témoins.....	121
Figure 59: Variation du taux du MDA rénal des souriceaux F1 témoins et traités.....	122
Figure 60: Variation des activités enzymatiques antioxydantes au niveau des reins des souriceaux F1 traités et leurs témoins.....	123
Figure 61: Variation du taux de MDA rénal chez les souris F1 adultes traitées au HgCl ₂ et leurs témoins.....	124
Figure 62: Variation des taux des enzymes antioxydantes de la GPx(A), de la GST(B), de la SOD(C), de la Catalase (D) et de la TRxR(E) rénale chez les souris F1 adultes traitées et leurs témoins.....	125
Figure 63: Effet du mercure sur les marqueurs biochimiques plasmatiques hépatiques des souris F1 traitées HgCl ₂ et leurs témoins adulte.....	126
Figure 64: Effet du mercure sur les marqueurs plasmatiques rénaux des souris F1 traitées et témoins adultes.....	127
Figure 65: Effet du mercure sur le taux cérébral de Hg, Fe, Cu, Mg et Zn chez les souris F1 adultes traitées et leurs témoins.....	130
Figure 66 : Effet du mercure sur la variation de la concentration du calcium au niveau des structures cérébrale chez les souris traitées F1 adultes et leurs témoins.....	130
Figure 67: Effet de mercure sur la concentration des minéraux au niveau du foie de Ca, Fe, Zn, Cu chez la souris F1 adulte traitée et témoin.....	131
Figure 68: Effet de mercure sur la concentration des minéraux au niveau des reins de Ca, Fe, Zn, Cu chez la souris F1 adulte traitée et témoin.....	132

Figure 69: Evaluation microscopique du tissu de l'intestin grêle des souris témoins et traitées F1 adultes.....	133
Figure 70: Évaluation microscopique du foie des souris traitées au chlorure de mercure et leurs témoins.....	134
Figure 71: Évaluation microscopique des reins des souris mâles traitées avec du chlorure de mercure (Hg) et leurs témoins.....	135
Figure 72 : Le poids relatif des testicules des souris F1 traitées HgCl ₂	136
Figure 73: Effet du chlorure de mercure sur le taux de MDA testiculaire chez la souris adulte F1 traitée et témoin.....	137
Figure 74: Effet du traitement HgCl ₂ sur l'activité des enzymes antioxydantes de la GPx(A), de la GST(B), de la SOD(C), de la Catalase(D) et de la TRxR (E) au niveau des testicules chez la souris F1 adulte traité et témoin.....	138
Figure 75 : Évaluation microscopique des testicules des souris mâles F1 traitées HgCl ₂ et témoins.....	139
Figure76 : Le taux des minéraux au niveau testiculaire des souris F1 males traitées HgCl ₂	140
Figure 77: Poids relatif des organes des souris femelles F1 traitées au mercure et des femelles témoins.....	141
Figure 78: Le taux de triglycéride(A) et de cholestérol (B) des femelles traitées HgCl ₂ F1et leurs témoins.....	142

Liste des tableaux

Tableau 1 : La durée de traitement avec les différentes manipulations réalisées au cours de cette étude

Tableau 2: Calendrier des tests comportementaux chez les souriceaux.

Tableau 3 : Effet du chlorure de mercure sur la survie des souriceaux traités et témoins.

Tableau 4: Effet du mercure sur les paramètres physiques chez les souriceaux.

Tableau 5 : Effet du HgCl_2 sur le comportement maternel.

Tableau 6: Consommation d'eau chez les souris femelles gestantes témoins et traitées et la consommation de l'eau sucrée chez les souris mâles adultes F1 traitées et témoins.

Remerciements	
Résumé	
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des publicaions	
Liste des communications	

Sommaire

INTRODUCTION GENERALE	4
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	7
I-LE MERCURE	8
1. Historique	8
2. Propriétés chimiques et physiques du mercure	9
3. Les différentes formes de mercure	9
4. Source d'exposition au mercure	11
5. La Toxicocinétique du mercure	14
6. L'intoxication par le mercure	16
II- LA NEUROTOXICITE DEVELOPPEMENTALE	21
1. Les perturbateurs du développement du cerveau	21
2. Sensibilité particulière du cerveau en développement	22
3. Développement du cerveau et périodes de sensibilité à la toxicité développementale chez les mammifères	23
4. Les effets développementaux retardés	25
III-LE DEVELOPPEMENT DU SNC ET LES INTERFERENCES POSSIBLES AVEC LES SUBSTANCES NEUROTOXIQUES	25
1. Formations anatomiques	25
2. Formations cellulaires et tissulaires	27
3. Principales fonctions des différentes grandes structures du cerveau en relation avec le comportement	31
4. Role de l'Acétylcholinesterase dans le developpement cérébral	32
V-LE COMPORTEMENT MATERNEL	34
VI-LE STRESS OXYDANT	37
VII-OBJECTIF DE LA THESE	50
MATERIELS ET METHODES	52

I-ANIMAUX, TRAITEMENT ET MODALITES D'EXPOSITION	53
II-ETUDE DES PARAMETRES PHYSIQUES CHEZ LES SOURICEAUX	55
III-ETUDE DU COMPORTEMENT	55
1. Etude du comportement maternel	55
2. Test de récupération des souriceaux (Retrieval Test).....	56
3. Etude du comportement des souriceaux.....	57
4. Etude du comportement à l'âge de 25j postnatal et à l'âge adulte	60
V-LA CONSOMMATION DE L'EAU	65
VI-MESURE DE LA MOTILITE DU COLON PAR LA COLLECTION DES CROTTES D'UNE HEURE	65
VII- DETERMINATION DU POIDS RELATIF DES ORGANES.....	66
VIII-DOSAGE DE L'ACETYLCHOLINESTERASE.....	66
IX -DOSAGE DES MARQUEURS DU STRESS OXYDANT.....	67
X-DETERMINATION DES MARQUEURS BIOCHIMIQUES PLASMATIQUES DU FOIE ET DU REIN	73
XI –DOSAGE DES METAUX ET DES MINERAUX ESSENTIELS.....	77
XII-ANALYSE HISTOLOGIQUE	77
XIII- ANALYSE STAISTIQUE	80
RESULTATS ET DISCUSSION	81
RESULTATS	82
I-RESULTATS DE L'ETUDE DES PARAMETRES PHYSIQUES CHEZ LES SOURICEAUX	82
II-ANALYSE DU COMPORTEMENT.....	85
III-RESULTATS DE LA CONSOMMATION DE L'EAU CHEZ LES SOURIS	103
IV- RESULTATS DE LA MOTILITE DE COLON	105
V-EFFET DU HgCl ₂ SUR LE POIDS DES ORGANES.....	105
VI-RESULTATS DU DOSAGE DE L'ACETYLCHOLINESTERASE	108
VII-RESULTATS DU DOSAGE DES MARQUEURS DU STRESS OXYDANT	109
1. Dosage du stress oxydant au niveau cérébral	109
2. Analyse du stress oxydant hépatique	117
3. Analyse du stress oxydant rénal.....	121

4. Dosage des marqueurs biochimiques plasmatiques du foie et des reins	125
VIII-RESULTATS DU DOSAGE DU MERCURE ET DES MINERAUX ESSENTIELS	126
1. Dosage des minéraux au niveau des structures cérébrales	126
2. Dosage des métaux essentiels au niveau hépatique	130
3. Dosage des minéraux au niveau rénal	131
IX-RESULTATS DE L'ETUDE HISTOLOGIQUE.....	132
1. L'étude histologique au niveau de l'intestin des souris F1 adultes	132
2. L'étude histologique du foie des souris F1 adultes	133
3. L'étude histologique des reins des souris F1 adultes	134
X-EFFET DU MERCURE SUR LA REPRODUCTION DES SOURIS TRAITEES F1	135
DISCUSSION	142
CONCLUSION GENERAL	161
PERSPECTIVE	162
REFERENCES	163

INTRODUCTION GENERALE

De plus en plus d'évidences montrent que l'exposition permanente de l'homme à petites doses de métaux lourds tels que le cadmium (**Jarup et al., 1998**), le mercure (**Robin and Bernhoft, 2012**) ou encore le plomb (**Lockitch, 1993**) entraîne un certain nombre de maladies dont celles neurologiques, cardio-vasculaires et auto-immunes.

L'exposition aux métaux s'est fortement aggravée au cours des cinquante dernières années avec l'augmentation exponentielle de l'utilisation de métaux lourds dans les processus et produits industriels. Cette exposition aux métaux se fait généralement de manière latente et à petites doses quotidiennes dans différents composants naturels, aliments ou matériaux qui nous entourent (**Jean, 2011**).

Le mercure qui fait partie de cette panoplie, est un métal lourd largement utilisé dans les activités métallurgiques dès l'antiquité et redécouvert au moment de la révolution industrielle. Les effets de l'exposition à ce métal sur la santé dépendent de la forme chimique dans laquelle il se trouve (élémentaire, inorganique ou organique), de la voie d'exposition (inhalation, ingestion ou contact cutané) et du niveau d'exposition. Les vapeurs de mercure élémentaire liquide et le méthylmercure sont absorbés plus facilement que les sels de mercure inorganique et peuvent, de ce fait, être plus nocifs. Il importe de réduire, dans la mesure du possible, l'exposition à toute forme de mercure.

Ce métal pénètre essentiellement dans l'organisme par voie digestive et pulmonaire. Il est d'abord transporté par le sang où il peut être dosé aisément. Il s'accumule principalement dans le foie, les reins, les poumons et le cerveau (**Agarwal et al., 2007**). Il modifie la biologie de la cellule en perturbant de nombreuses voies métaboliques et différents processus physiologiques. Certaines études suggèrent que le mercure, même à des niveaux faibles, pourrait exercer un effet délétère sur la fonction cérébrale (**Uversky et al., 2001 ; Olivieri et al., 2002**), rénale (**Hua, 1993**) et hépatique (Exp : **Necib et al., 2013 ; Carmichael et Fowler., 1979 ; Al-Saleh et al., 2005**)

Pendant ces deux dernières décennies, les investigations toxicologiques ont été axées sur le stress oxydatif (SO) induit après exposition aux métaux lourds comme mécanisme possible de la toxicité. Suite à plusieurs études, les métaux lourds notamment le mercure, avec de telles propriétés, ont été montrés causer la surproduction d'espèces réactives oxygénées (ERO) dans les

espaces intra et extracellulaires (**Barja, 1999 ; Gassner et al., 1997**) ayant pour résultat la perturbation d'équilibre pro-oxydant/antioxydant cellulaire induisant de ce fait un état de stress oxydant.

Quand la formation de ces ERO surpasse la capacité de balayage par les défenses antioxydants, les radicaux libres nocifs s'accumulent et augmentent la probabilité des dommages oxydants aux biomolécules critiques tels que les enzymes, les protéines, les lipides membranaires et l'ADN (**Gutteridge, 1992 ; Curtin et al., 2002**).

L'exposition au mercure n'est pas seulement un problème de santé pour les adultes, mais a également été montrée comme génératrice d'effets délétères sur la santé du fœtus, du nouveau-né, de l'enfant et de l'adolescent (**Laamech et al., 2014**), âges correspondant aux phases de maturation cérébrale et par conséquent sensibles à tout effet toxique (**Jean et al., 2013**) ;

Les fœtus sont particulièrement sensibles aux incidences du mercure notamment sur le développement. L'exposition au mercure *in utero* peut résulter de la consommation par la mère de denrées alimentaires contaminées par le mercure. Elle est susceptible d'avoir des effets préjudiciables sur le cerveau et le système nerveux en développement de l'enfant (**Yoshida.,2002 ; Castoldi et al., 2008 ; Burbacher et al., 1984**). Le principal effet sanitaire du mercure est l'apparition de troubles du développement neurologique. Ainsi, la cognition, la mémoire, l'attention, le langage, la motricité fine et la vision dans l'espace peuvent être affectés chez des enfants ayant été exposés au mercure avant la naissance. (**Jean et al., 2013**).

Le but de la présente étude est d'évaluer les effets de l'intoxication chronique par le mercure inorganique (HgCl_2) administré à une faible dose chez des souris dès leur vie fœtale et au cours de la vie postnatale jusqu'à l'âge adulte. Pour ceci, nous nous sommes assignés les objectifs suivants :

-Evaluer les effets du HgCl_2 sur le cerveau en développement par le dosage des paramètres du stress oxydatif et de l'activité AChE durant la période d'allaitement et à l'âge adulte, ainsi que par l'étude du développement sensorimoteur chez les souriceaux, l'activité locomotrice et le comportement lié à la mémoire, à l'anxiété et la sociabilité après sevrage et à l'âge adulte.

-Etudier l'effet de HgCl_2 sur des paramètres hématologiques et biochimiques liés au stress oxydatif au niveau du foie et des reins chez les souriceaux comme chez l'adulte.

- Etudier l'effet du chlorure de mercure sur les paramètres du stress oxydatif au niveau des gonades mâles des souris F1 adultes afin d'approcher le lien toxicité du mercure-reproduction.

-Analyser l'histologie des organes précités pour mettre en évidence un effet éventuel du stress oxydatif associé à l'intoxication par le mercure.

-Analyser la distribution des métaux lourds essentiels au niveau du cerveau et des organes périphériques.

L'ensemble des données devra renseigner sur les mécanismes sous-jacents de la toxicité des faibles doses du mercure au niveau de l'organisme

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I-LE MERCURE

1. Historique

Le mercure (Hg) et son principal minéral, le cinabre (HgS), est utilisé dans une grande variété d'applications tout au long de l'histoire humaine. La première utilisation documentée du cinabre provient d'Italie et d'Espagne, où il a été utilisé comme conservateur pour les os humains au cours du Néolithique (environ 4000-3000 avant notre ère; **Götze (1924-1932)**, cité dans **Goldwater (1972)**, **Martín-Gil et al.1995**). La couleur rouge vif du cinabre en faisait également un pigment très recherché (vermillon) dans les temps anciens, et il était utilisé pour des choses telles que la décoration de tombes égyptiennes et de villas romaines, et pour la fabrication de rouges à lèvres et d'autres produits de beauté (**Bennett 1948**, **Putman 1972**). L'extraction du Hg élémentaire du cinabre via la distillation et la propriété de la fusion ont été documentées pour la première fois par l'écrivain romain Vitruvius au 1^{er} siècle avant notre ère (**Farrar et Williams 1977**). Ces activités d'extraction et de fusion ont libéré de grandes quantités de Hg dans l'atmosphère et ont également entraîné une contamination généralisée de l'eau, du sol, des sédiments et du biote à proximité de ces districts miniers (p. Ex. **Horvat et al.2002**, **Gray et al. 2004** , **Rytuba 2005**).

La toxicité du Hg était reconnue dans l'Antiquité, et la plupart des connaissances originales sur les effets sur la santé humaine de l'exposition au Hg étaient basées sur des études mineurs de Hg. Les premières techniques d'exploitation minière et métallurgique n'offraient aucune protection contre les vapeurs de Hg, et les esclaves romains et les criminels condamnés envoyés au travail dans les mines espagnoles seraient morts par milliers par exposition aux fumées de Hg (l'espérance de vie moyenne était de 3 ans) (**Hill 1946**, **D'Itri et D'Itri 1977**).

Au cours de cette même période, la reconnaissance croissante des impacts environnementaux associés aux activités d'extraction de Hg a également conduit les Romains à interdire l'extraction de Hg en Italie à la fin du deuxième siècle avant notre ère (**Farrar et Williams 1977**)

Au cours des derniers siècles, le Hg a également été largement utilisé dans diverses applications scientifiques, industrielles, médicales et agricoles, à commencer par le développement du baromètre en 1643 par Torricelli et du thermomètre Hg en 1720 par Fahrenheit (**Goldwater 1972**, **D'Itri et D'Itri 1977**, **Nriagu 1979b**). Ces produits variés (par exemple, peinture, piles, interrupteurs, lampes fluorescentes, explosifs et les applications (par exemple, la production de chlore-alcali, la dentisterie, les produits pharmaceutiques) ont

considérablement augmenté le potentiel d'exposition au Hg dans la population générale et ont entraîné une large distribution du Hg dans le monde (**Hylander et Meili 2005**). Les émissions de Hg de certaines de ces sources anthropiques ont contribué à une augmentation de la concentration de Hg mondial dans l'atmosphère (**Banic et al. 2005, Pacyna & Pacyna 2005**), et ont occasionnellement entraîné une grave pollution des écosystèmes locaux et des approvisionnements alimentaires humains. Les empoisonnements massifs au méthylmercure (MeHg) au Japon et en Irak entre les années 1950 et 1970 (**D'Itri 1972, Bakir et al.1973, Smith & Smith 1975, D'Itri & D'Itri 1977, Gupta et al., 2005**) ont attiré l'attention du monde sur le problème environnemental du mercure, et a conduit à une diminution de l'utilisation du mercure dans de nombreux produits et processus, et à des contrôles plus stricts des émissions de mercure (**Howland et al., 2005**). Au cours des 30 dernières années, la connaissance des sources, des mesures, des cycles et des effets du Hg dans l'environnement a considérablement augmenté.

2. Propriétés chimiques et physiques du mercure

Le mercure est un métal blanc argenté, brillant, très dense et très mobile. C'est le seul métal liquide à température ambiante, ce qui lui a valu son symbole (Hg) du mot grec latinisé hydrargyrum (argent liquide). Le mercure élémentaire ou mercure métal est volatil aux températures ambiantes habituelles (assez pour être à l'origine d'intoxication) et pratiquement insoluble dans l'eau. Il forme des amalgames avec de nombreux métaux. En plus de l'élément lui-même (Hg⁰), le mercure peut exister sous deux valences principales +1 et +2, correspondant aux composés mercurieux et mercuriques. De la spéciation dépendent la cinétique et la toxicité du mercure qui est un toxique cumulatif. Le mercure existe sous trois formes : le mercure élémentaire ou métallique, le mercure inorganique et le mercure organique. (**Lauwerys et al., 2007**)

3. Les différentes formes de mercure

3.1 Mercure élémentaire

C'est le mercure métallique Hg, élément non essentiel, seul métal liquide à température ambiante, blanc argenté, brillant, très dense. Il est qualifié de « lourd » dans la classification de Mendeleïev, car il possède une masse atomique de 200. Une de ses caractéristiques est de changer facilement de forme chimique et de propriétés. Il tient sa toxicité de son extrême volatilité et de

sa capacité à se lier à d'autres molécules. En effet c'est le plus volatil des métaux, à 20°C, d'où le fort risque d'exposition par inhalation, sa vapeur étant inodore, incolore et plus lourde que l'air. Il est insoluble dans l'eau et dans tous les solvants organiques usuels. La plupart des métaux (or, argent, étain...) se dissolvent dans le mercure pour donner des amalgames. Il existe en trois états d'oxydation :

- Le mercure métallique : Hg^0 (état d'oxydation 0).
- Le mercure mercurieux : Hg^+ (monovalent).
- Le mercure mercurique Hg^{++} (divalent).

Le mercure métal va donc se lier soit à d'autres métaux (ceux sont les amalgames) ou à des sels, c'est le mercure inorganique (existant sous forme liquide ou gazeuse Hg^0 , transformée par oxydation en forme ionique Hg^{++}); soit au carbone, c'est le mercure organique.

3.2. Les composés mercuriels

a) Le mercure inorganique

C'est le mercure associé à d'autres atomes.

Il existe :

- les composés mercurieux ou sels monovalents (Hg^+)

On retient le sulfate mercurieux, l'oxyde mercurieux, le chlorure mercurieux ou calomel (minéral rare utilisé en électrochimie, mais aussi comme diurétique et purgatif) et le nitrate mercurieux. Ils sont très volatils, comme le mercure métal, et très peu solubles.

- les composés mercuriques ou sels divalents (Hg^{++})

Ils sont représentés par le chlorure mercurique HgCl_2 ou sublimé (utilisé comme antiseptique), le sulfure mercurique HgS ou Cinabre (minerai rouge, aussi employé comme pigment sous le nom de vermillon), l'oxyde mercurique, le sulfate mercurique HgSO_4 (poudre cristalline blanche noircissant à la lumière) et l'iodure mercurique principalement. Ils sont à la fois solubles (sauf pour le cinabre) dans l'eau, et très volatils, donc encore plus toxiques que le mercure élémentaire ou les sels monovalents.

b) Le mercure organique

C'est le mercure contenu dans des composés à base de chaînes de carbone, représenté sous la formule générale $RHgX$ avec R un radical organique (alkyl, aryl ou alkoxyalkyl) et X un anion dissociable. L'exemple le plus probant étant est le chlorure de méthylmercure (alimentaire) qui représente 80% du mercure mesuré dans la nature.

Les propriétés des composés organiques sont en fonction du radical organique R. Leur solubilité est très variable, sont relativement stables dans l'air de part leur liaison carbone mercure avec une volatilité notable, par contre leur liposolubilité est forte. (**Bismuth *et al.*, 2000 ; Reichl *et al.*, 2004 ; Fiche toxicologique ., 1977)**)

4. Source d'exposition au mercure

4.1. Source d'exposition liée à l'environnement

Elle est essentiellement représentée par la consommation de denrées contaminées, par le dégazage naturel de l'écorce terrestre, ce dernier rejetant annuellement plusieurs tonnes de mercure, et par l'activité volcanique. Concernant l'exposition par ingestion de denrées contaminées. Il faut rappeler que la transformation du mercure minéral en méthylmercure a lieu dans les sédiments des rivières, de l'océan et autres terrains aquatiques ; ainsi c'est principalement le poisson qui est incriminé. En effet, les conditions anaérobies existant au fond de l'eau, le mercure inorganique est transformé en méthylmercure par l'action de microorganismes, qui est absorbé ensuite par le plancton, lui-même ingéré par les poissons. Le méthylmercure s'accumule donc dans les organismes aquatiques qui vont être consommé par la suite. Il s'impose se remémorer la « Maladie de Minamata » ou intoxication au mercure grave de nombreux pêcheurs de la baie de Minamata au Japon, suite à la consommation de poissons contaminés au mercure par le déversage dans la baie, entre 1953 et 1956, de déchets d'usine (produisant du chlorure de vinyle et utilisant le chlorure et le sulfate de mercure comme catalyseurs) (**Watts *et al.*, 2001**).

4.2 .En milieu professionnel

Les circonstances d'exposition varient en fonction de l'utilisation du mercure et de ses dérivés.

- ✓ Le mercure métal a trois grands domaines d'application :

-L'industrie électrique comme constituant des piles, de lampes, de redresseurs de courant ou de minuterie ;

- L'industrie chimique, il sert de cathode lors de la production par électrolyse de chlore et de soude caustique ;

-La fabrication d'appareils de mesure et de laboratoire (baromètres, manomètres, densimètres, aéromètres, pompes à mercure, thermomètres. . .).

-La préparation de nombreux amalgames, notamment dentaires, à la réalisation de miroir ou de dorure et à la récupération de métaux précieux.

✓ Les dérivés minéraux du mercure trouvent de nombreux usages, notamment:

-Composants de piles sèches, dans l'industrie chimique, la fabrication de différents composés du mercure et la préparation de dérivés organomercuriels.

-Employés comme pigments, dans les poudres détonantes des feux d'artifice, comme antiseptiques ou dans les crèmes et savons antiacnéiques ou éclaircissants cutanés.

✓ Les dérivés organiques ont été surtout employés comme antifongique dans le papier et les peintures latex, comme algicide et insecticide, ou comme antiseptique et dans les vaccins (thiomersal).

4. 3.L'agriculture

Elle utilise le mercure pour la préparation de fongicide, insecticide et bactéricide, pour la fabrication d'engrais et la conservation de semences. Il ne faut pas oublier l'empoisonnement de soldats en Irak (1956, 1960 et 1972), au Pakistan (1961) et au Guatemala (1963, 1964 et 1965) en consommant du pain confectionné avec des grains contaminés, fraîchement traités avec des organomercuriels, (**Brent., 2001**).

4.4. Amalgames dentaires

Les porteurs d'amalgames dentaires s'exposent de manière chronique au mercure. L'exposition résulterait de la corrosion, de la mastication ou du bruxisme. Il faut préciser que la plus grande partie du mercure libéré par les amalgames (association de deux métal dont le mercure, souvent étain ou argent) est déglutie et non inhalée (inhalation seulement uniquement lors de la pose ou de la restauration), donc est très peu toxique. En effet un groupe de travail

pluridisciplinaire portant sur la potentielle nocivité des amalgames dentaires a été mis en place en 2003 par l'AFSSPS (Association Française de Sécurité Sanitaires des Produits de Santé) (**Afssaps, 2005**) et le bilan, rendu en mars 2007, conclu que les données recueillies ne permettent d'établir aucune relation de causalité entre la présence d'amalgames en bouches et des symptômes ou pathologies systémiques.

D'autres études ont montré que les amalgames dentaires portés par la femme enceinte sont les principales sources du mercure des tissus infantiles et qui conduisent à une hausse concentration de mercure dans le corps du fœtus et de l'enfant, y compris dans le cerveau (**Drasch , 1994**). En outre, la charge de mercure dans le placenta, le fœtus est en corrélation avec le nombre d'amalgames portés par la mère (**Drasch et al., 1994 ; Ask et al., 2002 ; Yoshida et al., 2004**). Les niveaux de mercure dans le liquide amniotique (**Luglie et al., 2005**) et le lait maternel (**Drasch et al., 1998; Vimy et al., 1997**) sont également significativement corrélés au nombre d'amalgames en bouche de la mère.

4.5. Alimentation

Par consommation de poissons, en moyenne de 2 à 20µg/j avec des variations interindividuelles ; le mercure possède la capacité de s'accumuler dans les organismes (bioaccumulation) et de se concentrer tout au long des chaînes alimentaires (bioamplification), en particulier dans la chaîne alimentaire aquatique : les poissons (surtout les truites, brochets et perches d'eau douce), et mammifères marins prédateurs (requins, grands thons et espadons d'eau de mer) (**United Nation, 2002 ; Clarkson et al., 1998**). Plus un poisson se situe à un niveau élevé de la chaîne alimentaire, plus il a tendance à avoir un taux élevé de mercure.

4.6. Cosmétique

Il entre dans la composition de certaines crèmes et savons, sous forme de iodure de mercure, utilisés pour éclaircir la peau.

4.7. Le mercure en médecine

Ses propriétés d'antisepsie par voie externe étaient mises à profit dans le fameux mercurochrome. Il faut savoir que la marque commerciale mercurochrome continue de fabriquer des antiseptiques, mais sans mercure.

Autrefois, le mercure était utilisé sous la forme de calomel (Hg_2Cl_2) pour ses vertus purgatives et antisyphilitiques.

5. La Toxicocinétique du mercure

L'absorption, la distribution et le stockage du mercure dans l'organisme sont liés à l'espèce chimique en cause et aux propriétés physicochimiques des composés, en particulier de leur solubilité. Pour cette raison on différencie le devenir du mercure chez l'homme pour les différents composés :

Le mercure métallique, inorganique et le mercure organique (**Bensefat *et al.*, 2011**), (**Figure1**).

5.1. Absorption

a- Mercure métallique

La voie d'absorption prépondérante du mercure métallique est respiratoire par inhalation de vapeur, et porte sur 70 à 80% de la dose inhalée. Son absorption digestive est quasi nulle car il est insoluble (**Givica-Perez *et al.*, 2001**). Il est peu toxique localement.

b- Dérivés mercuriels

Pour le mercure organique, l'absorption digestive est majeure du fait de sa forte liposolubilité (pour la population générale, c'est le mode de contamination le plus fréquent car l'exposition est alimentaire). L'exposition respiratoire est cependant possible (c'est le cas des expositions professionnelles).

L'absorption respiratoire des dérivés inorganiques représente 45% de la dose inhalée, et leur absorption digestive (souvent par déglutition de microparticules inhalées, et surtout des sels bivalents) près de 10% de la dose ingérée. Ils sont localement très agressifs (**Givica-Perez *et al.*, 2001**).

5.2. Distribution et métabolisme

Au niveau plasmatique, le mercure, quelle que soit sa forme chimique, se distribue entre les hématies et protéines plasmatiques, mais dans des proportions différentes.

La liaison aux protéines plasmatiques du mercure métal est de 30% contre 75% pour les sels mercuriels. Les dérivés organiques se lient préférentiellement aux hématies. Le mercure

élémentaire Hg est oxydé par une catalase en ion mercurique Hg^{2+} , la forte affinité de ce dernier pour les groupements thiols SH des protéines fait qu'il est peu diffusible car en grande partie liée aux protéines cellulaires ou sanguines.

La distribution rapide concerne essentiellement les reins (80% de la charge corporelle), et en plus faible quantité le foie et le cerveau, à noter que les dérivés inorganiques s'accumulent très peu au niveau cérébral par rapport aux autres formes de mercure (les sels monovalents étant ceux qui s'y accumulent le moins).

5.3. Elimination

Elle se fait par voie rénale et fécale dans différentes proportions selon la forme chimique de mercure.

- ✓ Le mercure métal s'élimine autant dans les urines que dans les selles.
- ✓ L'excrétion du mercure organique est fécale à 90% (contamination digestive prédominante).
- ✓ La part rénale excrétée de mercure inorganique est discrètement supérieure à la part fécale. Il est à noter que dans les accidents aigus, une fraction de 7% environ, est éliminée par voie pulmonaire.

L'élimination de la fraction non-accumulée de mercure métal est lente (demi-vie biologique de 6 à 10 semaines). D'après un modèle pharmacocinétique compartimental, la demi-vie du méthylmercure dans l'organisme est de 44 jours (**Smith., 1994**).

La quantité maximale de mercure éliminé quotidiennement spontanément par l'organisme, toutes formes chimiques confondues, est de 20 $\mu g/j$.

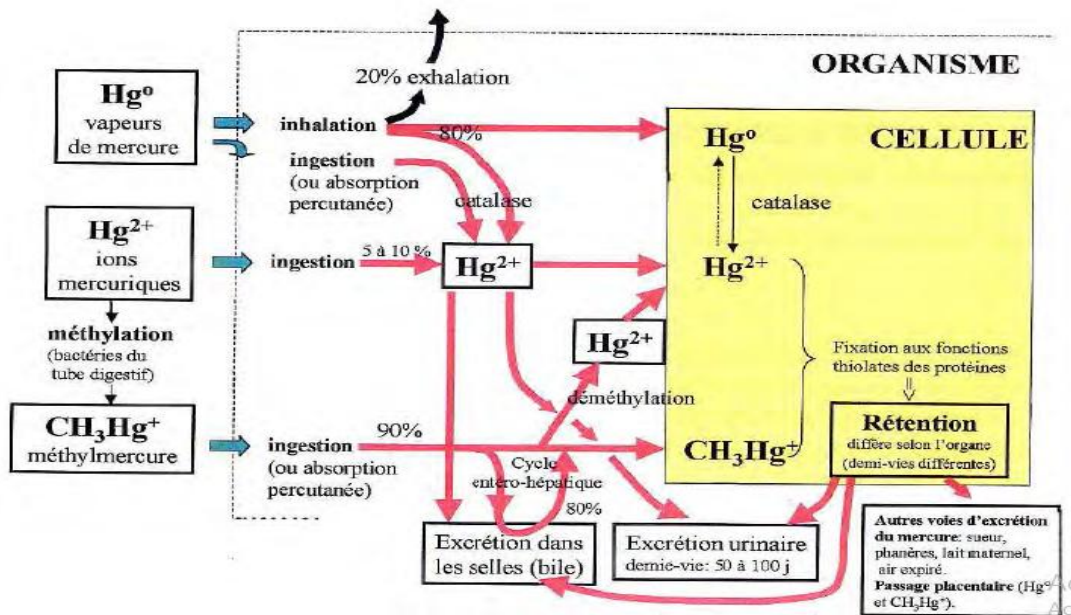


Figure 1: Métabolisme du mercure dans l'organisme. (Grosman, 2000).

6. L'intoxication par le mercure

6.1. L'intoxication aiguë

L'ingestion accidentelle ou volontaire de mercure métallique ne provoque pas d'intoxication, parce qu'il est très peu absorbé, mais peut se compliquer et entraîner une inhalation avec une atteinte pulmonaire. Les intoxications aiguës par ingestion publiées sont essentiellement liées à l'ingestion volontaire ou accidentelle de chlorure mercurique. Des douleurs abdominales, des vomissements sanglants, voire même des perforations digestives ont été observés (Garnier, 2000).

6.2. L'intoxication chronique

Chez l'homme, les deux principaux organes cibles du mercure élémentaire et du mercure inorganique sont le système nerveux central et le rein. Ainsi, les principaux symptômes d'hydrargyrisme chronique (intoxication par le mercure) sont d'ordre neurologique comme des troubles de la psychomotricité, des troubles cognitifs et des modifications de la personnalité (comme de l'irritabilité et l'anxiété). Le mercure atteint également les reins (lésions glomérulaires et tubulaires) et induit une protéinurie. Enfin, il est également observé des troubles cardiovasculaires (tachycardie, hypertension artérielle), respiratoires, hépatiques et immunologiques. Le mercure organique atteint essentiellement le cerveau, avec des paresthésies,

un malaise général, des modifications et des troubles sensoriels. Le méthylmercure induit la maladie de Minamata avec l'apparition de troubles neurologiques sévères. Le mercure organique provoque également des atteintes rénales. Les mêmes observations sont faites chez l'animal, et les organes cibles sont les mêmes (INERIS, 2010), Figure 2.

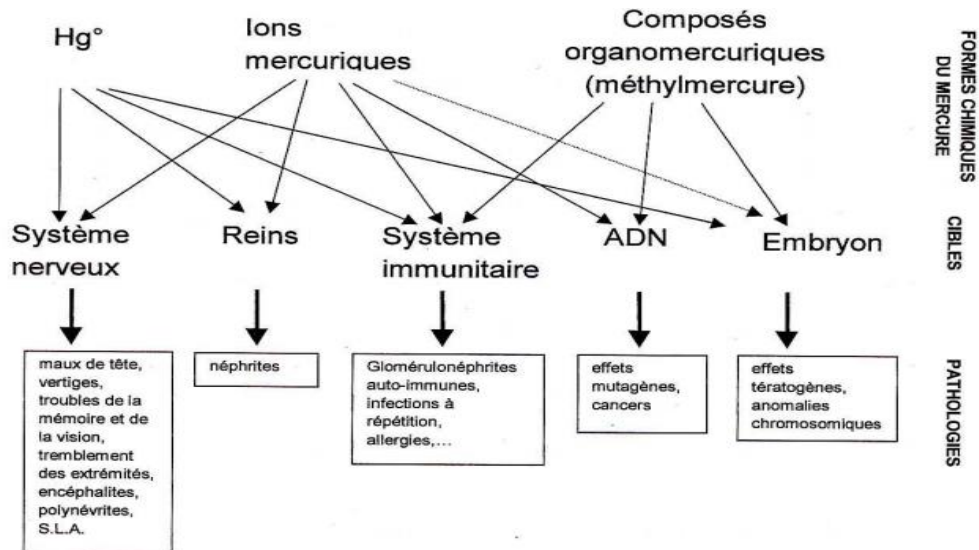


Figure 2: Les principales cibles du mercure et les pathologies induites (Grosman, 2000).

6.3. Effets sur le tube digestif

Le mercure est absorbé par les cellules épithéliales lorsqu'il est ingéré. Ce mercure absorbé peut provoquer diverses perturbations digestives, car il peut inhiber la production de enzymes digestifs ; trypsine, chymotrypsine et pepsine ainsi que la fonction de xanthine oxydase et dipeptyl peptidase IV (Vojdani *et al.*, 2003). Les effets de mercure sur le système gastro-intestinal généralement présent comme douleur abdominale, indigestion, maladie intestinale inflammatoire, ulcères et diarrhée sanglante. Chez les primates l'ingestion de mercure a également été associée à la destruction de la flore intestinale, ce qui peut augmenter la quantité de produits alimentaires non digérés dans le sang courant provoquant des réactions à médiation immunitaire et une résistance réduite aux infections pathogènes (Summers *et al.*, 1993).

6.4. L'effet de mercure sur le foie

Le foie est l'organe qui participe à la distribution, la détoxification et la transformation de contaminants. Il existe peu d'étude sur intoxication du foie chez l'être humain mais, plusieurs

études scientifiques chez l'animal ont montré une cytolysé hépatique avec d'autres anomalies histopathologique (Necib *et al.*, 2013 Carmichael et Fowler (1979) et Al-Saleh *et al.*, 2005).

6.5. L'effet de mercure sur les reins

Le mercure ionisé Hg_2^+ va s'accumuler au niveau des tubules proximaux du rein et la zone superficielle de la médullaire externe. Lors de fortes expositions au mercure élémentaire ou inorganique, des tubulopathies dose-dépendantes et des glomérulonéphrites à dépôts extramembraneux de mécanisme immunotoxique sont observées chez le rat (Hua, 1993). Les atteintes tubulaires semblent survenir au-delà d'un certain seuil d'exposition, classiquement lorsque l'excrétion urinaire du Hg dépasse 50 $\mu g/g$ de créatinine (Testud, 2005).

Chez l'homme le mercure peut causer des dommages aux reins et les preuves suggèrent un lien entre l'exposition au mercure et la nécrose tubulaire aiguë, l'insuffisance rénale chronique, le cancer du rein et le syndrome néphrotique (Tchounwou *et al.*, 2003 ; Li *et al.*, 2010 ; Oliveira *et al.*, 1987).

D'autres études ont montré que l'exposition au mercure peut entraîner diverses lésions rénales, notamment: le syndrome néphrotique par une intoxication subaiguë, le dysfonctionnement tubulaire, la glomérulosclérose segmentaire secondaire, la protéinurie, la maladie glomérulaire et glomérulonéphrite membraneuse (Miller *et al.*, 2013).

6.6. Effets du mercure sur la de reproduction

Chez les femmes le mercure peut causer des modifications physiopathologiques le long des axes hypothalamus-hypophyso-surrénalien et gonadique pouvant affecter la fonction de la reproduction en modifiant la circulation des taux d'hormone de stimulation du follicule (FSH), d'hormone lutéinisante (LH), d'inhibine, d'œstrogène et de progestérone.(Davis *et al.*, 2001 ; Schrag *et al.*, 1985). Une fertilité réduite chez les assistants dentaires exposés au mercure sur le lieu de travail a été notée (Rowland *et al.*, 1994 ; Colquitt, 1995). Il existe de bonnes preuves reliant le mercure à des troubles menstruels comprenant des saignements anormaux, des cycles courts, longs, irréguliers et des règles douloureuses (Davis *et al.*, 2001).

Chez l'homme des études menées à Hong Kong ont démontré qu'une augmentation des niveaux de mercure sont associée à la stérilité chez les hommes (Dickman *et al.*, 1998). Le mercure peut avoir des effets indésirables sur la spermatogenèse (Boujbiha *et al.*, 2009), le

nombre de spermatozoïdes épидидymaire et le poids des testicules. Il existe également des preuves établissant un lien entre le mercure et la dysfonction érectile (**Schrag *et al.*, 1985**).

6.7. L'effet du mercure sur le système immunitaire

Il a été démontré que le mercure (Hg) induit une auto-immunité rénale due à une néphrite induite par un auto-anticorps (auto-Ab), qui dépend de l'haplotype du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) (**Henry *et al.*, 1988; Hultman et Eneström, 1988; Hultman *et al.*, 1993**). Les différentes formes de Hg, par exemple le méthyl Hg (MeHg), l'éthyl Hg et le Hg inorganique (Hg₂₊) affectent différenciellement l'immunité (**Havarinasab et Hultman, 2005**).

6.8. L'effet de mercure sur le système nerveux

Les périodes vulnérables du développement du système nerveux sont sensibles aux agressions de l'environnement, car elles dépendent de l'émergence temporelle et régionale de processus critiques du développement (prolifération, migration, différenciation, synaptogenèse, myélinisation et apoptose).

De nombreuses sources démontrent que le développement des neurones s'étend de la période embryonnaire à l'adolescence. Différents domaines comportementaux (par exemple sensoriels, moteurs et diverses fonctions cognitives) sont régis par différentes zones du cerveau. La possibilité qu'une exposition développementale à des neurotoxiques puisse entraîner une accélération du déclin de la fonction lié à l'âge. (**Rice et Barone, 2000**).

6.8.1. L'effet du mercure sur le système nerveux chez le fœtus et l'enfant

En plus des problèmes de reproduction, le mercure est également associé avec la fœtotoxicité qui peut se présenter sous forme de fausse couche, d'avortements spontanés, de mortalité et de faible poids à la naissance chez le rat (**Yoshida, 2002**). Chez le nouveau-né, l'exposition au mercure pendant la grossesse est liée à des anomalies du tube neural, à des malformations craniofaciales, à un retard de croissance et à d'autres (**Yoshida, 2002**). Le mercure traverse le placenta, où il peut inhiber le développement du cerveau du fœtus, entraînant une paralysie cérébrale et un retard psychomoteur aux derniers stades de développement (**Castoldi *et al.*, 2001; Burbacher *et al.*, 1984**). Chez les primates, les concentrations sanguines de MeHg chez la mère sont modérément reliées à une augmentation du taux d'avortement et à une diminution du taux de grossesse (**Burbacher *et al.*, 1984**). Des effets embryopathiques de MeHg

chez l'homme ont également été rapportés. Les autopsies fœtales ont indiqué une hypoplasie généralisée du cervelet, une diminution du nombre de cellules nerveuses dans le cortex cérébral, une diminution marquée du poids total du cerveau, une migration anormale des neurones, ainsi que des centres cérébraux et une organisation en couche dérangée (**Choi et al., 1978; Mottet et al., 1985**). Le MeHg pénètre facilement à travers le placenta et endommage le cerveau du fœtus. De nombreux fœtus exposés développent une paralysie cérébrale infantile et il peut exister un lien avec le développement de la maladie de Minamata. Les bébés peuvent être nés avec une variété de malformations congénitales. Une étude réalisée sur 64 enfants exposés *in utero* au mercure et ont montré des dommages liés au mercure incluent les éléments suivants signes et symptômes: retard mental (100%), réflexes primitifs (100%), strabisme (77%), ataxie cérébelleuse (100%), dysarthrie (100%), chorée et athétose (95%), membres déformés (100%), hypersalivation (95%), crises d'épilepsie (82%) et troubles de la croissance (100%) (**Harada et al., 1999**).

La consommation maternelle pendant la grossesse de poisson contaminé au méthylmercure au Japon et de pain contaminé au méthylmercure en Iraq a provoqué un retard psychomoteur chez les enfants. Les mères qui consomment une alimentation contenant du mercure transmettent la substance toxique au fœtus (**Murata et al., 2004**) et au nourrisson par le lait maternel (**Grandjean et al., 1995**). Des performances diminuées dans les domaines de la motricité et de la mémoire ont été rapportées chez des enfants exposés à des concentrations présumées de mercure (**Grandjean et Weihe, 1998**). Des effets subtils détectables sur la fonction cérébrale dans les domaines du langage, de la mémoire et de la motricité sont apparus lors de l'exposition prénatale au méthylmercure, en particulier au cours du deuxième trimestre. Un dysfonctionnement neurocomportemental a été signalé même si la concentration du mercure au niveau des poils de la mère est de 6 µg / g et la valeur correspondante pour le sang étant d'environ 24 µg / l (**Grandjean et al., 1994**).

L'autisme est un trouble pouvant mener à une invalidité permanente. Bien que non prouvé, il existe un lien potentiel entre la toxicité du mercure et l'autisme chez les enfants (**Lee et al., 2003**). Des troubles neurologiques subtils chez les enfants après une exposition au mercure ont été largement rapportés (**Johnson, 2004; Counter et Buchanan, 2004**). L'examen neuropathologique du cerveau d'enfants exposés au mercure organique avant la naissance révèle

une dysplasie des cortex cérébraux et cérébelleux, de l'ectopie neuronale et de plusieurs autres troubles du développement (Geelen et Dormans, 1990).

6.8.2 L'effet de mercure sur le système nerveux chez l'adulte

Le mercure à faible dose affecte le système nerveux des adultes. De faibles concentrations de certains métaux, y compris le mercure, peuvent directement induire la formation de fibrilles de l'alpha-synucléine, constituant le principal des inclusions protéiques intracellulaires (Lewy bodies et Lewy neurites) dans les neurones dopaminergiques de la substance noire menant à la maladie de Parkinson (Uversky *et al.*, 2001).

De plus, de faibles concentrations de cobalt et de mercure peuvent induire un stress oxydatif, une cytotoxicité cellulaire et augmenter la sécrétion de β -amyloïde 1-40 et 1-42, pouvant conduire à des maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson (Olivieri *et coll*, 2002). Le mercure se lie aux groupes sulfhydryle des protéines et aux groupes disulfure des acides aminés, ce qui entraîne l'inactivation du soufre et bloque les enzymes apparentées (Mathieson, 1995; Markovich et James, 1999). En outre, il modifie également la perméabilité de la membrane cellulaire en se liant au radical sulfhydryle (SH) (Bapu *et al.*, 1994).

II- LA NEUROTOXICITE DEVELOPPEMENTALE

Il existe donc une autre forme de neurotoxicité, c'est-à-dire une autre manière de perturber le fonctionnement et l'intégrité du système nerveux central (SNC). Il s'agit de la neurotoxicité développementale (Rodier, 1995), du fait que le développement du cerveau est particulièrement sensible à une série de perturbateurs, et que cette perturbation peut mener à des d'altérations aussi bien structurales que fonctionnelles et qui de surcroît sont persistantes.

1. Les perturbateurs du développement du cerveau

Le développement du cerveau peut être perturbé par certains médicaments antiépileptiques, par l'éthanol provenant par exemple des boissons alcoolisées (Costa *et al.*, 2004), par la nicotine (Slotkin, 2004; Slotkin, 2008) et par les fluorures (contaminant naturel de l'eau) ainsi que par une série de substances industrielles telles que les pesticides, l'arsenic, les biphenyles polychlores (PCB), une série de solvants, le manganèse (agent antidétonant présent au départ dans les produits pétroliers et contaminant ensuite l'eau), le perchlorate d'ammonium (un

fuel solide propulseur pour les missiles et roquettes contaminant le sol) (**Grandjean and Landrigan, 2006**). Le développement du cerveau peut également être altéré par les contaminants environnementaux classiques, tels que le mercure et le Plomb qui demeurent omniprésents.

Le mercure parvient à traverser facilement la barrière placentaire et hématoencéphalique en se liant aux transporteurs d'acides aminés. D'ailleurs, le cerveau présente une grande affinité avec le MeHg, dont la concentration est estimée jusqu'à cinq fois supérieure à celle mesurée dans le sang (**Castoldi et al., 2008**). Ceci s'explique en partie par la retransformation du MeHg en Hg inorganique dans l'organisme, provoquant ainsi une exposition accrue pour le fœtus et le cerveau respectivement. La demi-vie du Hg dans l'organisme humain est estimée à 50 jours sous sa forme élémentaire et à 80 jours sous sa forme organique et inorganique (**Clarkson, 1993; Holmes, et al., 2009**). A noter aussi que de nombreux signaux et molécules impliqués dans la formation du SNC sont également impliqués dans le fonctionnement du SNC adulte (**Grandjean and Landrigan, 2006**).

2. Sensibilité particulière du cerveau en développement.

La sensibilité aux substances neurotoxiques provient du fait que ; premièrement la barrière hémato-méningée n'achève sa formation que tardivement : elle ne se termine chez l'Homme que 6 mois après la naissance, laissant la porte ouverte aux toxiques (**Adinolfi, 1985; Rodier, 1995**).

Deuxièmement, le rôle de la barrière placentaire s'avère également insuffisant pour empêcher l'entrée de nombreuses substances chimiques dans le corps et le cerveau du fœtus (**Andersen et al., 2000**).

Troisièmement, les capacités métaboliques et donc les mécanismes de détoxification atteignent leur maturité seulement après la naissance : fin de la 2^{ème} à la 3^{ème} semaine après la naissance chez le rat et du 2^{ème} au 3^{ème} mois après la naissance chez l'Homme (**Ginsberg et al., 2004**).

Quatrièmement, un autre phénomène lié à la détoxification génère une plus grande susceptibilité du cerveau en développement d'être atteint par des neurotoxiques ; c'est le sérum binding proteins qui permet par interaction avec les toxiques de diminuer leur capacité à atteindre

le cerveau (**Kousba et al., 2004**). Cependant, la concentration de ces protéines du sérum est faible durant le développement et augmente avec l'âge pour jouer un rôle plus efficace chez l'adulte.

Une autre raison de la sensibilité particulière du cerveau en développement aux toxiques relève de la complexité du développement et des très faibles capacités de réparation possible de cet organe. En effet durant la vie fœtale, quelques cellules ectodermiques dorsales embryonnaires doivent constituer rapidement des milliards de cellules spécialisées, fortement interconnectées. De plus, pour obtenir un développement optimal, les neurones doivent migrer selon des processus précis, depuis leur point d'origine vers un emplacement précis, assigné, pour y établir des connections nerveuses. Chacun de ces processus du développement du cerveau doit prendre place à la fois à un moment et dans un ordre précis (**Rodier 1995; Rice and Barone, 2000; Bjorling-Poulsen et al., 2008**). Toute perturbation de chacun des processus au cours du développement du cerveau peut mener à des troubles de son fonctionnement chez l'adulte, des troubles qui pourront s'avérer irréversibles et donc persistants (**Grandjean and Landrigan, 2006**).

3. Développement du cerveau et périodes de sensibilité à la toxicité développementale chez les mammifères

Chez l'Homme, une grande partie du développement du cerveau, comprenant les principales phases de prolifération des neurones, se réalise durant les 9 mois de la vie fœtale. Cependant, même si pratiquement tous les neurones sont formés à la naissance, le développement du cerveau doit encore se compléter par la synaptogenèse et par la mélanisation des neurones qui se déroulent donc encore après la naissance, et se prolongent même durant quelques années (**Rice and Barone, 2000**). (**Figure 3**).

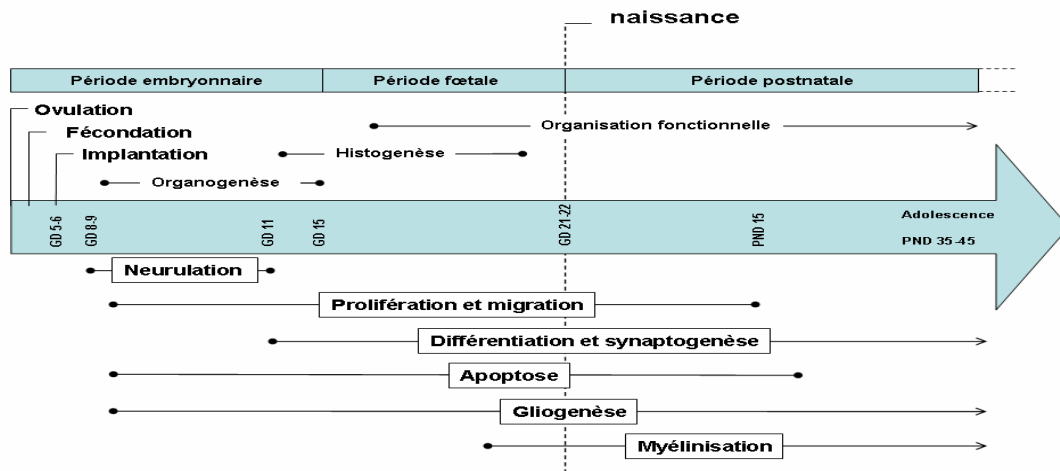


Figure 3 : Déroulé temporel des différentes phases du développement du cerveau de rat ; adapté de Rice and Barone (**Rice and Barone, 2000**).

En conséquence la période sensible à l'altération du développement du cerveau est une large période qui ne se limite pas à la période embryonnaire et fœtale, mais se prolonge à l'enfance et même à l'adolescence (**Rodier, 1995; Rice and Barone, 2000**). Le cerveau des rongeurs est utilisé comme modèle d'étude du développement du cerveau humain car leurs développements sont semblables en de nombreux points. En effet, le développement du cerveau comprend une succession d'étapes dont la séquence s'établit dans le même ordre chez l'Homme que chez les rongeurs (notamment chez le rat et la souris). Aussi, même si la vitesse du développement du cerveau est beaucoup plus rapide chez les rongeurs, la durée de ces étapes est proportionnelle, (**Rodier, 1995; Rice and Barone, 2000**).

Chez l'Homme la naissance se place plus tôt que chez les rongeurs dans la séquence des phases du développement du cerveau. Par exemple, il a été établi que la première semaine postnatale chez le rat correspond au troisième trimestre de grossesse chez l'Homme. Ce décalage du moment de la naissance devrait être pris en compte lors de l'évaluation des périodes critiques du développement (**Rice and Barone, 2000**). Donc, chez les rongeurs, seule une partie du développement du cerveau se réalise durant la période de gestation (22 jours chez le rat et 19 à 20 jours chez la souris), et le reste du développement se produit durant les premières semaines de la vie postnatale et même durant l'adolescence (**Rice and Barone, 2000**).

4. Les effets développementaux retardés

Les perturbations du programme du développement par des agents chimiques environnementaux, qui surviennent durant cette longue phase du développement du cerveau, c'est-à-dire durant la vie fœtale ou pendant l'enfance, peuvent créer des altérations au niveau du cerveau qui se révèlent être insuffisantes pour être perceptibles immédiatement, mais qui peuvent engendrer des problèmes fonctionnels qui émergeront plus tard dans la vie, lorsque des comportements seront sollicités (Costa *et al.*, 2004).

III-LE DEVELOPPEMENT DU SNC ET LES INTERFERENCES POSSIBLES AVEC LES SUBSTANCES NEUROTOXIQUES.

Le développement du cerveau est très complexe et se fait sur plusieurs plans en parallèle. En l'occurrence, il se fait sur un plan anatomique, tissulaire et cellulaire en même temps.

1. Formations anatomiques.

Au niveau anatomique, la formation du cerveau se réalise en 3 grandes phases : la formation de la plaque neurale, la formation du tube neural et sa différenciation pour former les grandes aires du cerveau adulte.

La toute première étape de la formation du système nerveux est un épaississement des cellules cylindriques de l'épithélium dorsal de l'ectoderme afin de former la plaque neurale. C'est la notochorde qui induit cette formation et donne un axe sagittal à l'ébauche du système nerveux central.

Une fois la plaque neurale formée, survient alors la neurulation qui se déroule à la troisième semaine de grossesse chez l'Homme, la plaque neurale va former des crêtes dorsales parallèles (axe longitudinal) dont la hauteur va grandir de manière à former une gouttière neurale sagittale à ouverture supérieure.

Les bords de la gouttière neurale vont progressivement se rapprocher puis se souder pour former un tube, recouverts par l'ectoderme dorsal. C'est à la fin de la troisième semaine de grossesse chez l'Homme que débute la fermeture de la gouttière neurale, au niveau du cerveau postérieur juste au dessus de l'extrémité antérieure de la notochorde. Cette fermeture va ensuite se propager vers l'avant et vers l'arrière à la manière d'une fermeture éclair. La progression vers l'avant crée un gradient de développement caudo-rostral au niveau de l'ébauche du futur cerveau.

La fermeture du tube neural (fermeture du neuropore antérieur) se déroule entre le jour de grossesse (GD) 24 et 26 chez l'Homme et au GD 10,5 chez le rat alors que la fermeture vers l'arrière se déroule entre le GD25 et 28 chez l'Homme et durant le GD 11,5 chez le rat (**DeSesso, 1996**).

Alors que le tube neural n'est qu'en formation, une population de cellules de l'ectoderme va se séparer du bord des gouttières de l'ectoderme pour former les crêtes neurales qui donneront les ébauches des ganglions sensitifs des nerfs craniaux et spinaux, les cellules de Swann (qui myeliniseront les nerfs périphériques), les méninges (qui couvriront le cerveau et la moelle épinière), et quelques autres éléments comme les structures squelettiques et musculaires du visage. Le tube neural se détache progressivement de l'ectoderme superficiel suite à des modifications des protéines d'adhésion entre cellules de l'ectoderme et du tube neural. Il s'agirait du remplacement progressif de N-cadherine par des N-CAM.

Dés le début de la deuxième semaine chez les rongeurs (rat : GD9, 5 ; souris : GD7) et dès le début du premier mois de grossesse chez l'Homme, le tube neural commence à se différencier dans sa partie antérieure pour former progressivement le cerveau et postérieurement la moelle épinière. En effet, dans sa partie antérieure, le tube neural forme des renflements et des rétrécissements qui sont les ébauches des ventricules latéraux et des différentes régions de l'encéphale qui l'entourent.

Au niveau du timing, les parties les plus postérieures du cerveau commencent à se distinguer en premier lieu, au cours de la fin de la deuxième semaine de gestation chez le rat (GD 10-16) et entre la 3^{ème} et la 7,5^{ème} semaine chez l'Homme. Une exception est le cervelet qui se développera beaucoup plus tard (**Rice and Barone, 2000**). Les structures prosencephaliques, le thalamus et l'hypothalamus débutent leur développement en fin de période embryonnaire et en début de période fœtale chez rongeurs et chez l'Homme.

Enfin, débute la mise en place des structures du cerveau antérieur : le néocortex et l'hippocampe. Ces deux formations du cerveau sont particulièrement complexes. En effet, elles adopteront une structure de type lamine. Leur formation débute par une première phase de développement avant la naissance donnant lieu à une ébauche primaire, alors qu'une autre phase de développement se déroulera après la naissance et formera progressivement les différentes couches superposées.

2. Formations cellulaires et tissulaires

Si la formation des différentes structures du cerveau se fait à des âges différents, elle requiert cependant toujours la même série de phénomènes successifs au niveau cellulaire : une phase de prolifération cellulaire, une phase de migration, une phase de différenciation, une phase de synaptogenèse et de myélinisation. Nous devons ajouter à ces séquences une phase de mort cellulaire programmée ou apoptose, ainsi qu'une phase de limitation du nombre de synapses.

Ces phases successives se déroulent donc, pour chaque type neuronal et pour chacune des structures qu'ils vont former, avec un certain décalage durant le développement (**Figure 3**).

L'ordre et le moment dans lequel se réalise la succession de ces événements est important pour le bon développement du cerveau et son fonctionnement. Aussi, l'interruption ou l'altération d'une séquence aura des conséquences sur le bon développement du cerveau (**Rodier, 1980; Rodier, 1995; Rice and Barone, 2000**).

a-Phases de Prolifération cellulaire.

La formation d'un type neuronal correspondant à une future structure spécifique débute donc par une phase de division cellulaire à partir de quelques cellules précurseur du tube neural : on parle de la neurogenèse. Le moment durant lequel se déroule chaque phase de prolifération mais aussi la durée et l'intensité de chaque phase de prolifération sont spécifiques au type neuronal et à la structure du cerveau que ces cellules formeront (**Figure 3**).

Les premières phases de prolifération correspondent à la formation du bulbe rachidien et au diencephale et sont relativement courtes au vu de la situation postérieure et de la relative simplicité de ces structures. Par contre, les phases de prolifération pour la formation des structures plus antérieures comme le cortex cérébral et l'hippocampe surviennent un peu plus tard dans le développement. Le cervelet est une exception car même s'il est en position postérieure, il se développe tard comparé aux autres structures aussi postérieures. La formation de ces structures complexes (cortex cérébral, hippocampe et cervelet) requiert plusieurs phases de prolifération (et également de migration), qui se déroulent jusqu'à quelques mois après la naissance chez l'Homme (**Rodier, 1980; Rodier, 1995**).

La première phase de prolifération cellulaire concernant la formation du cortex cérébral ou néocortex débute au 12^{ème} jour de gestation chez le rat à partir de précurseurs cellulaires

pseudostratifiées de la zone ventriculaire du tube neural. Juste après survient une seconde phase de prolifération des cellules de la zone subventriculaire. Ces phases de prolifération se déroulent principalement entre le GD 13 et 18 (rat), bien que certaines cellules continuent à se diviser jusqu'à la fin de la gestation (GD 21-22) chez le rat (**Bayer *et al.*, 1991; Rakic and Caviness, 1995**). Les phases de la prolifération qui donnent lieu à la formation du néocortex cérébral se déroulent entre la fin de la 5^{ème} semaine et la fin de la 19^{ème} semaine chez l'Homme (**Rice and Barone, 2000**).

La formation de l'hippocampe comporte une succession de phases de proliférations correspondant à la formation des différentes parties de celui-ci. Une première phase prénatale de prolifération (à partir de GD 15 jusqu'à la fin de la gestation chez le rat et fin de la 6ème semaine de gestation jusqu'à la 15^{ème} semaine de grossesse chez l'Homme) donnera le subiculum et les couches CA1 et CA3 de l'hippocampe alors qu'une seconde phase de prolifération plus tardive [fin de la gestation (GD 19) chez le rat et 10^{ème} semaine de grossesse chez l'Homme] et qui dure longtemps après la naissance concerne les cellules granulaires qui formeront la couche granulaire du gyrus dentèle de l'hippocampe (**Bayer, 1980; Rice et Barone, 2000**).

La formation du cervelet requiert une première phase de prolifération de cellules nerveuses qui migreront pour former le cervelet primaire et nécessite ensuite une seconde phase de prolifération cellulaire qui migreront pour former la couche granulaire externe du cervelet. La première phase de prolifération débute au GD 12 chez le rat et au début du premier mois de grossesse chez l'Homme alors que la seconde phase de prolifération commence après la naissance chez le rat et dans le troisième trimestre de grossesse et se prolonge après la naissance chez l'Homme (**Rice and Barone, 2000**).

Une perturbation de la prolifération des précurseurs cellulaires touchera donc un ou plusieurs types cellulaires particuliers, correspondant à une structure ou à plusieurs structures en fonction du moment précis et de la longueur de cette perturbation (**Costa *et al.*, 2004**).

Toute une série d'agents chimiques sont capables de perturber la prolifération cellulaire durant la gestation dont : l'éthanol (**Miller, 1996; Guerri, 1998**), organophosphorés (**Whitney *et al.*, 1995; Campbell *et al.*, 1997; Roy *et al.*, 1998a; Song *et al.*, 1998**) mais aussi des le mercure chez les rongeurs (**Rodier *et al.*, 1984; Ponce *et al.*, 1994**) et chez l'Homme (**Choi, 1989**).

b-Phase de Migration

Pour chaque type cellulaire, une phase de prolifération va être suivie par une phase de migration. On assistera donc au cours du temps à une ou plusieurs vagues de migration cellulaire pour chaque partie du cerveau (**Rodier, 1995**).

C'est durant cette phase de migration qu'une partie des cellules issues de la phase de prolifération va se déplacer selon un processus précis afin d'atteindre un endroit particulier du cerveau. L'endroit où doit migrer une cellule neuronale est stratégique pour l'obtention d'une fonction donnée car le contact et l'interaction entre les cellules sont importants pour la différenciation cellulaire et la construction de circuits complexes fonctionnels.

c-La différenciation cellulaire

Il s'agit du processus par lequel les neuroblastes vont trouver leur phénotype final. Ce processus débute de la dernière division et continue durant la migration. C'est au cours de la migration que des facteurs extracellulaires et intracellulaires vont influencer l'expression de gènes particuliers qui détermineront le phénotype final et donc une série de caractéristiques, comme la forme, la taille, la polarité, et l'expression de certains types de récepteurs et neurotransmetteurs.

Une série d'agents environnementaux peut altérer la différenciation : l'éthanol (**Laev et al., 1995; Valles et al., 1996; Valles et al., 1997; Lauder and Schambra, 1999**), certains Organophosphoré (**Song et al., 1998; Crumpton et al., 2000; Garcia et al., 2001**), le plomb (**Petit and Le Boutilier, 1979; Alfano and Petit, 1982; Petit et al., 1983; Barone et al., 1998**), la nicotine (**Frischer et al., 1988; Slotkin et al., 1993; Pennington et al., 1994; Cutler et al., 1996; Levitt, 1998; Audesirk and Cabell, 1999**) et le mercure (**Barone et al., 1998**).

Homme* (semaines)	3,5-4,0	4,1-5,2	5,3-5,7	5,8-6,6	6,7-7,0	7,1-7,4	7,5-7,9	8,0-9,9	10,0-11,9	12,0-14,9	15,0-18,9	19,0-23,9	24,0-27,9	28,0-31,9	32,0-35,9	36,0-40,0
Rats† (jours)	GD 11	GD 12	GD 13	GD 14	GD 15	GD 16	GD 17	GD 18	GD 19	GD 20	GD 21-22	PND 0-3	PND 4-7	PND 8-11	PND 12-15	PND 16-19
Moelle épinière	■	■	■	■	■	■										
Medulla	■	■	■	■	■	■										
Foot	■	■	■	■	■	■										
Cervelet		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Tegmentum mésencéphalique		■	■	■	■	■	■									
Tectum mésencéphalique		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■				
Thalamus			■	■	■	■	■	■								

Hypothalamus		■	■	■	■	■	■	■	■							
Pallidum		■	■	■	■	■										
Striatum				■	■	■	■	■	■	■	■	■	■			
Amygdale		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■				
Néocortex et cortex limbique				■	■	■	■	■	■	■	■	■				
Cortex pyriforme			■	■	■	■	■	■								
Cortex entorhinal				■	■	■	■									
Subiculum					■	■	■	■	■							
Hippocampe : couches CA1-3					■	■	■	■	■							
Hippocampe : gyrus dentelé									■	■	■	■	■	■	■	■

Moelle épinière et rhombencéphale ■ Mésencéphale ■ Diencéphale ■ Télencéphale ■

Figure 4 : Occurrence au cours du temps des phases de prolifération cellulaires pour la mise en place des grandes structures du cerveau (**Rice and Barone, 2000**)

* Temps estimé ; † données déterminées expérimentalement.

3. Principales fonctions des différentes grandes structures du cerveau en relation avec le comportement.

Bien qu'il existe une grande interconnexion entre les grandes structures du cerveau, et que la complexité des comportements fait participer plusieurs structures pour un comportement donné, il a été établi une certaine responsabilité spécifique de chacune des grandes structures du cerveau pour l'organisation des grandes fonctions assurées par le cerveau. Ces grandes structures ainsi que leurs fonctions trouvent de grandes similitudes chez l'Homme et les rongeurs.

Dans les grandes lignes, le bulbe rachidien est responsable des fonctions autonomes, des cycles éveil-sommeil. Les structures mesencéphaliques peuvent être impliquées dans les processus cognitifs et dans les processus d'attention. Le cervelet assure des fonctions motrices et participe à l'apprentissage moteur. Il a un rôle également dans certains processus cognitifs.

Certaines aires du cerveau antérieur sont également impliquées dans les fonctions motrices et dans certains types d'apprentissage. Le système limbique, qui se trouve dans le lobe temporal medial et qui comprend l'hippocampe, l'amygdale et les structures corticales environnantes est responsable de la mémoire à court terme et spatiale comme des formes d'apprentissage correspondantes.

Le néocortex, quant à lui se subdivise en plusieurs aires fonctionnelles motrices et sensibles spécifiques à de nombreuses fonctions incluant la vision, l'audition et de nombreuses modalités neurosensorielles. Chacun de ces aires se divise en cortex primaire qui reçoit les afférences thalamiques spécifiques et en nombreuses autres aires d'où partent des efférences responsables d'un plus haut niveau d'intégration. La taille relative et l'importance fonctionnelle des aires corticales préfrontales sont différentes chez l'Homme et les rongeurs et sont en relation avec l'importance des fonctions qu'elles traitent. Par exemple, les hommes ont des aires visuelles plus développées alors que les rongeurs ont des aires olfactives et auditives plus développées. Chez les rongeurs, le cortex préfrontal est nécessaire pour beaucoup de fonctions complexes, comme l'organisation temporelle et spatiale des comportements, la planification de comportements, l'inhibition des actions inappropriées, la capacité à changer de stratégie, le contrôle émotionnel, et joue des rôles dans les processus liés à l'attention (**Rice and Barone, 2000**). Une altération comportementale peut être donc associée à l'altération du fonctionnement d'une partie ou de plusieurs parties du cerveau.

4. Role de l'Acétylcholinesterase dans le développement cérébral

Les rôles des neurotransmetteurs dans la régulation du développement sont très complexes pour plusieurs raisons : chacun paraît intervenir dans différentes phases du développement, l'effet varie en fonction de l'avancement du développement, en fonction des types de récepteurs présents auxquels il se lie, ainsi qu'en fonction de la chaîne de signaux à laquelle le récepteur spécifique est couplé. La régulation du développement se complique un peu plus par une interaction entre l'action des différents neurotransmetteurs et celle des facteurs de croissance et nous citons ici le rôle de l'Acétylcholinesterase dans le développement cérébral ;

L'Acétylcholinesterase (AChE) est une enzyme qui assure le clivage de l'acétylcholine (un neurotransmetteur joue un rôle important aussi bien dans le système nerveux central, où elle est impliquée dans la mémoire et l'apprentissage, que dans le système nerveux périphérique, notamment dans l'activité musculaire et les fonctions végétatives) en ion acétate et choline dans les synapses et c'est une réaction nécessaire pour permettre aux neurones cholinergiques de revenir à l'état de repos après leur activation par des influx nerveux, par exemple dans les plaques motrices.

L'AChE est présente durant le début du développement du système nerveux principalement sous l'isoforme libre cytoplasmique (AChE-R) et devient principalement membranaire (AChE-S) durant la poussée axonale et juste avant la formation des synapses nerveuses matures du SNC (**Layzer and Willbold, 1994; Brimijoin and Koenigsberger, 1999; Grisar et al., 1999**). C'est cette forme S qui, en se liant à d'autres facteurs trophiques, participe à la régulation de la prolifération cellulaire, mais aussi au phénomène d'apoptose. Les mécanismes exacts de régulation sont encore à élucider. Néanmoins l'équilibre entre la présence de ces différentes isoformes S et R et la transition vers la forme R jouerait un rôle crucial dans la régulation du développement du SNC (**Jiang et Zhang, 2008**).

L'activité catalytique de l'AChE augmente progressivement dans le jeune âge pour atteindre son maximum à l'âge adulte. Chez le rat, elle est de 30% au jour post-natal 5 (PND5), passe à 50% au PND 12, monte encore à 75% au PND 21 et atteint son maximum au PND 60 (**Kousba et al, 2007**). Le rôle catalytique de l'AChE au niveau de la transmission de l'influx nerveux dans les synapses ne survient donc que lorsque les synapses sont établies et fonctionnelles.

L'enzyme joue un rôle dans le développement du cerveau bien auparavant. A cet égard, un certain nombre d'études ont démontré un rôle morphogénique de cette enzyme (**Brimijoin and Koenigsberger, 1999**). Elle jouerait en particulier le rôle de molécule d'adhésion lors du développement des processus neuronaux (**Sharma and Bigbee, 1998; Bigbee et al, 1999; Brimijoin and Koenigsberger, 1999; Grisaru et al, 1999**). L'interaction entre AChE et certaines neurexines (protéines transmembranaires localisées sur la membrane presynaptique des neurones) serait responsable des changements architecturaux menant à la poussée des processus neuronaux (**Grifman et al, 1998**). Le rôle morphogénique de l'enzyme serait également utile lors de la formation des synapses entre neurones (**Robertson, 1987**).

Plus récemment, Slotkin et collaborateurs ont montré que le rôle morphogénique de l'AChE, non-enzymatique, est étroitement lié au système catecholaminergique. En effet, un inhibiteur spécifique catecholaminergique détruisant les terminaisons nerveuses catecholaminergiques empêche l'AChE de jouer son rôle morphogénique qui favorise normalement la poussée des processus neuronaux cholinergiques chez les rats nouveau-nés (**Slotkin et al., 2009**).

Les récepteurs cholinergiques apparaissent progressivement au cours du temps selon un gradient caudo-ventral dans les différentes grandes structures du cerveau. Chez le rat, les récepteurs nicotiniques se présentent d'abord dans la moelle épinière (GD 12) et ensuite dans les régions plus antérieures comme le mésencéphale et diencéphale (GD 14) pour enfin survenir dans le néocortex en fin de gestation (GD 18). Les récepteurs muscariniques apparaissent également avec un décalage dans les différentes structures du cerveau : dans la moelle épinière et le bulbe rachidien (GD 16) ; dans le plateau cortical (GD 18) et dans le néocortex (GD22). Les neurones cholinergiques ont déjà migré vers le cortex en fin de gestation mais l'innervation cholinergique (synaptogenèse) du cortex ne se réalise qu'après la naissance. Les récepteurs muscariniques cholinergiques seraient impliqués dans la croissance axonale et dans des réarrangements cellulaires durant la morphogenèse du cortex (**Lauder and Schambra, 1999**).

Un signe du rôle morphogénique de l'AChE est son apparition transitoire au moment de la connexion synaptique, et ceci même au niveau des neurones non cholinergiques chez le rat (**Robertson, 1987; Brimijoin et Hammond, 1996**), comme chez l'Homme (**Kostovic et Goldman-Rakic, 1983**). Un autre signe de son rôle morphogénique est que l'AChE-S possède

des domaines impliqués dans le rôle d'adhésion de protéines membranaires. Ces domaines ont une grande proportion d'homologie (environ 60%) avec d'autres protéines transmembranaires morphogéniques non catalytiques de famille des neurexines (**Nguyen et Sudhof, 1997**) et seraient responsables de la régulation de la poussée des processus neuronaux (**Brimijoin et Koenigsberger, 1999; Grisaru et al., 1999**).

Elle est également synthétisée en cas de stress (**Kaufer et al, 1998**). La forme dimérique est associée à un lipide (glycosylphosphatidyl inositol) et reste ancrée à la membrane des érythrocytes. La forme tétramérique découle d'un assemblage de monomères (AChE-S) immatures, qui se sont associés à une protéine de type collagène (collagen-like) afin de s'ancrer dans la membrane postsynaptique (**Massoulie et al, 1993**). Cette forme n'apparaît que durant et après la formation des synapses fonctionnelles ou elle joue son rôle catalytique envers l'acétylcholine (**Drews, 1975; Layer and Sporns, 1987; Layer and Willbold, 1994**).

Il existe un autre cholinestérase que l'on retrouve chez l'adulte principalement dans le foie, les poumons, le plasma et la glie et paraît y jouer des fonctions catalytiques moins importantes que l'AChE : la butyrylcholinestérase (BuChE). Layer et collaborateurs ont montré à l'aide de leur modèle oiseau (poule) que durant le développement du cerveau, les neuroblastes expriment intensément la BuChE tant qu'ils se divisent, et que par contre, ils commencent à exprimer l'AChE dès qu'ils cessent de se diviser et qu'ils commencent à développer des processus axonaux. Cela suggère que ces deux molécules joueraient des rôles opposés dans la prolifération cellulaire et régulation des processus axonaux (**Layer and Sporns, 1987; Layer, 1990a; Layer, 1990b; Weikert et al., 1990; Layer and Willbold, 1994; Layer and Willbold, 1995**). Le même genre de phénomène dans lequel une expression transitoire de la BuChE et de l'AChE-S survient durant le développement du système nerveux chez le rat (**Koenigsberger et al., 1998**).

V-LE COMPORTEMENT MATERNEL

Le comportement social (agression, comportement maternel ...), et le comportement non social (exploration, mémoire...) sont l'ensemble des interactions qui peuvent avoir lieu entre l'animal et son environnement, ou au sein d'un groupe d'animaux. Elles sont étroitement associées au statut hormonal, à des facteurs génétiques mais aussi à d'autres facteurs environnementaux. Chez les rongeurs comme chez d'autres mammifères il existe des

comportements dits comportements reproducteurs «Reproductive Behaviors» qui présentent un dimorphisme sexuel. Un autre type de comportement dit «Non-Reproductive Behaviors» (comportement non reproducteur) présente aussi une différence mâle/femelle. Ce dimorphisme signifie l'implication des œstrogènes et des androgènes (Arnold et Gorski 1984). Ce comportement tient toute son importance du fait qu'il est nécessaire pour le développement postnatale à travers l'interaction de la mère avec la progéniture.

1. Attitudes du comportement maternel

Le comportement maternel est un comportement social. Il est défini comme l'ensemble des interactions (stimuli auditifs, olfactifs, ...etc.) qui peuvent avoir lieu entre la mère et le nouveau-né. Il est vital pour ce dernier car la mère est l'unique source de l'alimentation.

Le comportement maternel se manifeste par plusieurs activités de la mère par rapport à l'allaitement, à sa façon de transporter, de nourrir et aux soins donnés à sa progéniture [revue (Fleming et al, 1999)] (Figure 5).

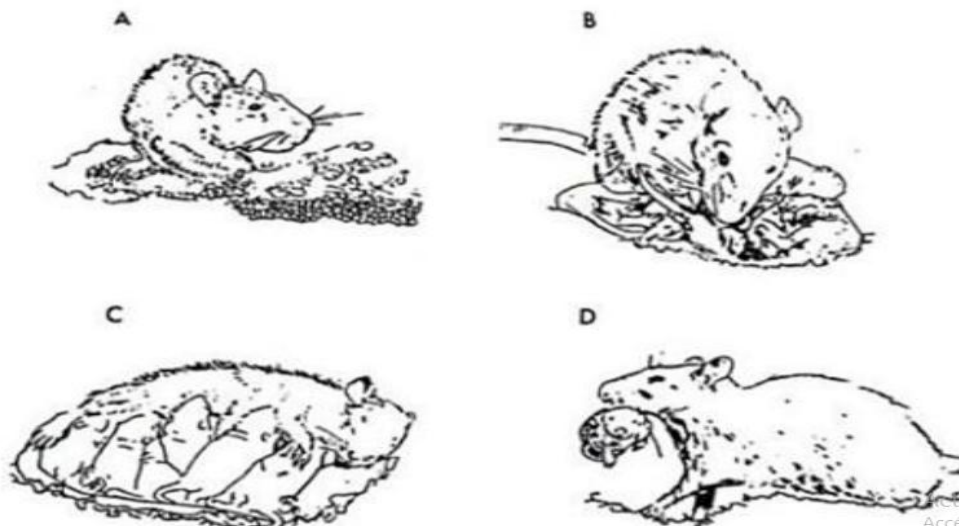


Figure 5: Principaux éléments du comportement maternel chez les rongeurs. A. La construction du nid, B. Le léchage, C. L'allaitement, D. Le transport des jeunes [D'après (Rosenblum et Moltz 1983)].

Une perturbation des stimuli émis par la mère vers le nouveau-né peut entraîner une altération au niveau du système neuroendocrinien des nouveau-nés et par conséquent une modification dans le comportement exprimé à l'âge adulte (Francis *et al.*, 1999).

- Le "Nest building" (ou construction du nid) : le nid permet d'entretenir une aire de repos, cette activité est présente tout le long de la vie, par contre la taille du nid, sa fonction son aspect varie en fonction du statut de la femelle (gestante, allaitante ou vide). La taille du nid varie également en fonction du temps, il atteint son maximum dans les dix premiers jours après la mise bas, et à l'intérieur on trouve les ratons ou souriceaux, collés les uns aux autres, ce qui permet de garder la chaleur car leur thermorégulation est encore déficiente.

- Le "resting" ("in-side", "out-side" "the nest") (ou repos) : c'est le temps passé en dehors (out-side) ou à l'intérieur du nid (in-side), il varie en fonction de l'état de la femelle (gestante, allaitante ou vide). Durant les deux derniers jours de la gestation, et les quatre premiers jours de la lactation, les femelles passent plus de temps à l'intérieur du nid, donc elles mangent et boivent moins (Figure 6). Pendant ce temps passé à l'intérieur du nid, une des fonctions principale des femelles est l'allaitement ("nursing").

- Le nursing (ou allaitement) : la femelles produit quotidiennement en moyenne de 10-20 ml, et le pic de lactation est enregistré aux alentours des PND 12-PND 14. Il existe trois principales positions d'allaitement : arched-nursing, blanket-nursing et passive-nursing. Les deux premières positions sont considérées comme un allaitement actif, tandis que la troisième position est considérée comme allaitement passif (**Slamberova et al., 2001**).

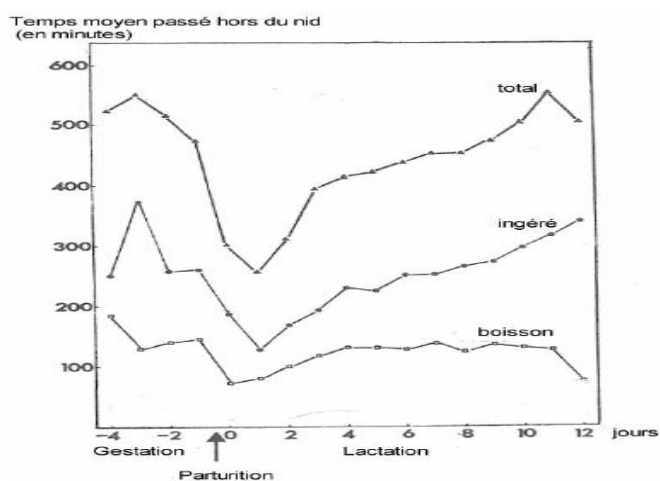


Figure 6: Temps quotidien moyen passé hors du nid, pour boire et manger chez la souris (**Barnett et Burn 1970**).

A la mise-bas, la mère aide les nouveaux nés à naître en les tirant puis elle consomme les placentas, nettoie les ratons ou souriceaux (pups licking) en léchant les tétines ce qui permet un développement normal de la glande mammaire des femelles. Durant cette période la mère est dans un état de réceptivité maximale de toutes les informations sensorielles néonatales ce qui permet de maintenir la réponse maternelle (Lévy *et al.*, 2001).

VI-LE STRESS OXYDANT

1. Définition

Le stress oxydatif, dénommé également stress oxydant, résulte d'un déséquilibre de la balance « pro-oxydants/antioxydants » en faveur des oxydants, ce qui se traduit par des dommages oxydatifs de l'ensemble des constituants cellulaires : les lipides avec perturbations des membranes cellulaires, les protéines avec l'altération des récepteurs et des enzymes, les acides nucléiques avec un risque de mutation et de cancérisation. Un stress oxydatif peut donc se développer suite à une surproduction des oxydants comme les espèces activées de l'oxygène et/ou à une diminution des systèmes de défense antioxydants (Sergent *et al.*, 2000).(Figure 7)

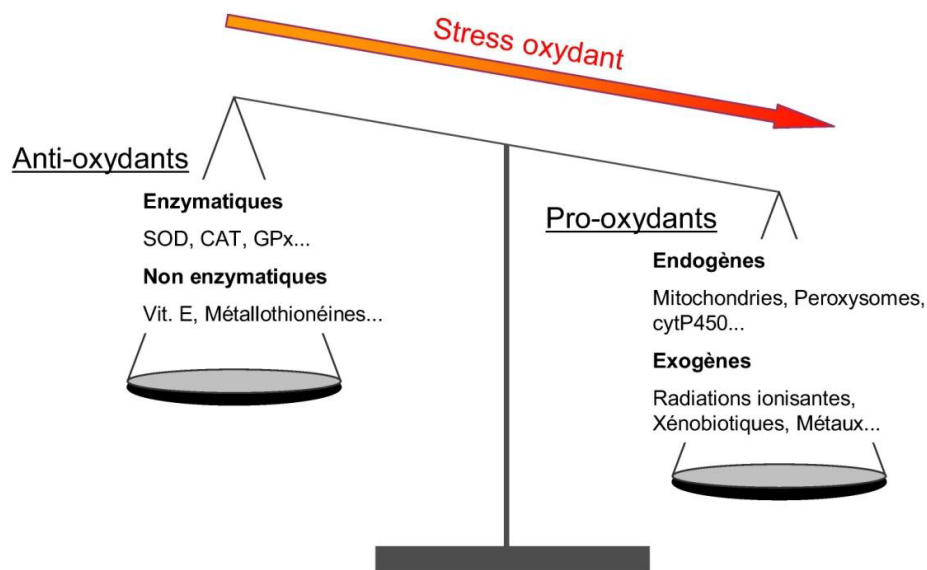


Figure 7 : Schéma de la balance anti-oxydants/pro-oxydants représentant un stress oxydant (Barillet, 2007).

2. Les espèces réactives de l'oxygène

L'oxygène est un élément indispensable à la vie des organismes aérobies. Ces organismes utilisent l'oxygène pour oxyder les substrats riches en carbone et en hydrogène. Cependant, quand on oxyde les molécules avec l'oxygène, ce dernier est réduit et forme des intermédiaires radicalaires, très réactifs connus sous le nom espèces réactives de l'oxygène (ERO). Les ERO sont des molécules contenant de l'oxygène mais dont la réactivité est bien supérieure à celle de la molécule d'O₂. Ces ERO comprennent des radicaux tels l'anion superoxyde (O₂^{°-}) ou le radical hydroxyle (HO[°]) et les espèces non radicalaires telles le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), l'oxygène singulet (1O₂) (Simonian et Coyle, 1996 ; Garrel *et al.*, 2007). L'anion superoxyde et le radical hydroxyle sont très instables par comparaison au peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) qui diffuse librement et possède une durée de vie plus longue. La réactivité d'un radical dépend de sa nature. Ainsi, parmi les radicaux formés chez les êtres vivants, l'anion radicalaire superoxyde (O₂^{°-}) n'est pas très réactif mais constitue un des radicaux précurseurs pouvant être activés en d'autres espèces plus réactives. Sa faible réactivité (O₂^{°-}) permet son utilisation par l'organisme comme médiateur régulant des fonctions biologiques. Par contre, les radicaux comme les peroxydes (ROO[°]) ou surtout le radical hydroxyle (HO[°]), sont extrêmement réactifs, et ce avec la plupart des molécules biologiques. Le peroxyde d'hydrogène est un oxydant faible et peu réactif en absence des métaux de transition.

Cependant, en présence du cuivre cuivreux ou du fer ferreux, le H₂O₂ peut se décomposer en HO⁻ et HO[°] selon la réaction de Fenton. Le radical HO[°] a une vitesse de réaction très grande avec la majorité des molécules, si bien qu'il réagit à l'endroit même où le métal catalyse sa formation (**Figure 8**) (Favier, 1997).

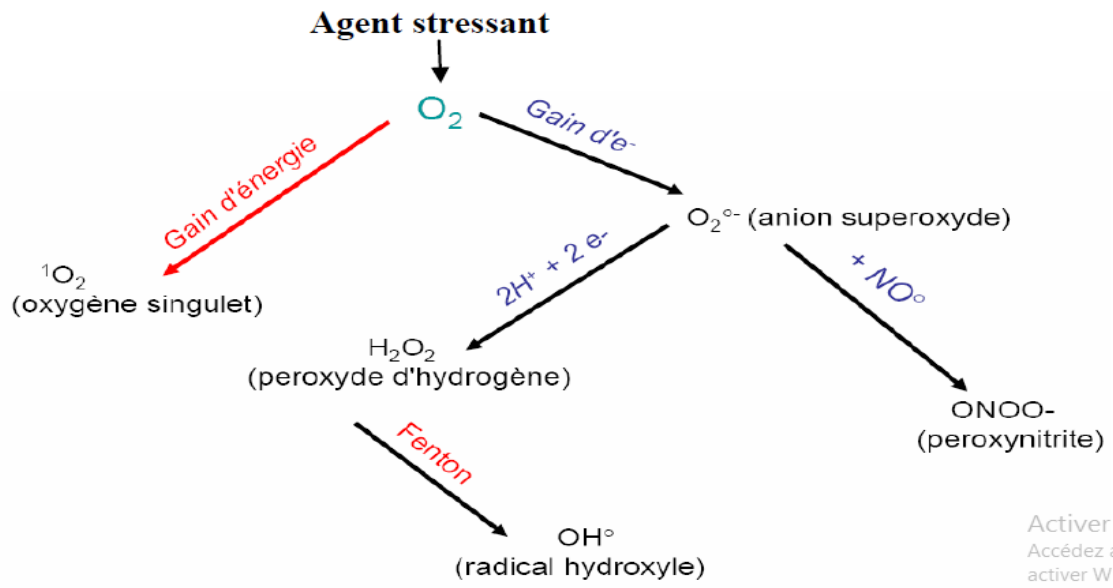


Figure 8 : Schéma modifié de l'origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqué en biologie (Favier, 2003)

L'oxygène singulet (1O_2) est une autre espèce oxygénée très réactive. C'est une molécule à l'état excité qui peut réagir avec différents accepteurs d'électrons pour produire des peroxydes. L'oxygène singulet n'apparaît que dans des cas particuliers comme pendant les processus de photosensibilisation où une molécule excitée transfère son énergie à l'oxygène et l'active en oxygène singulet. Il a pour cible biologique les membranes, les acides nucléiques et les protéines (Favier, 2003).

3. Les cibles biologiques du stress oxydant

L'équilibre entre les effets positifs et négatifs des radicaux libres est particulièrement fragile (Pincemail, 2003). La production de ces radicaux peut être régulée par l'organisme (Sies, 1991). Les systèmes de régulation se composent d'enzymes, de protéines, de molécules antioxydantes de petite taille et d'oligoéléments indispensables pour l'activité des enzymes. Un déséquilibre de la balance antioxydante en faveur de la production des ERO constitue le stress oxydant. Le stress oxydant va dénaturer les lipides, les protéines, l'ADN et provoquer des pathologies (Gutteridge, 1992 ; Curtin *et al.*, 2002).

a- Les lipides

Les premières cibles privilégiées de l'attaque radicalaire sont les lipides et principalement leurs acides gras polyinsaturés, qui sont très sensibles à l'oxydation en raison de leur degré élevé d'insaturation.

La peroxydation lipidique débute par une phase d'initiation qui implique l'attaque des espèces réactives surtout le radical hydroxyle ($^{\circ}\text{OH}$), entraînant l'arrachement d'un hydrogène de l'acide gras (LH), ceci aboutit à la formation d'un radical diène conjugué, qui après addition avec l'oxygène moléculaire donne le radical peroxyde (LOO°). Ensuite, ce radical peut réagir avec un autre acide gras polyinsaturé et former un hydroperoxyde (LOOH), c'est la phase « Propagation » de la peroxydation lipidique. Ces hydroperoxydes appartiennent à la famille des peroxydes lipidiques qui peuvent être soit réduits et neutralisés « phase de Terminaison » par la glutathion peroxydase et la vitamine E intercalée dans la bicouche lipidiques des membranes (**Esterbauer *et al.*, 1992 ; Beaudoux *et al.*, 2003 ; Favier, 2003**) (**Figure 9**). Ou continuer à s'oxyder et à se fragmenter en produits secondaires c'est-à-dire en aldéhydes très réactifs, pouvant être considérés comme des messagers secondaires toxiques qui augmentent les dommages initiaux dus aux radicaux libres. Parmi ces aldéhydes formés lors de la peroxydation lipidique, l'isoprostane, le malondialdéhyde (MDA), et le 4-hydroxynonéal (4-HNE), qui sont très étudiés comme marqueurs de la peroxydation lipidique, ces deux derniers produits (MDA, 4-HNE) réagissent avec les protéines et l'ADN, une fois fixé à la molécule d'ADN, le MDA semble être le produit le plus mutagène, alors que le 4-HNE est le produit le plus toxique pour la cellule (**Marnett, 1999**).

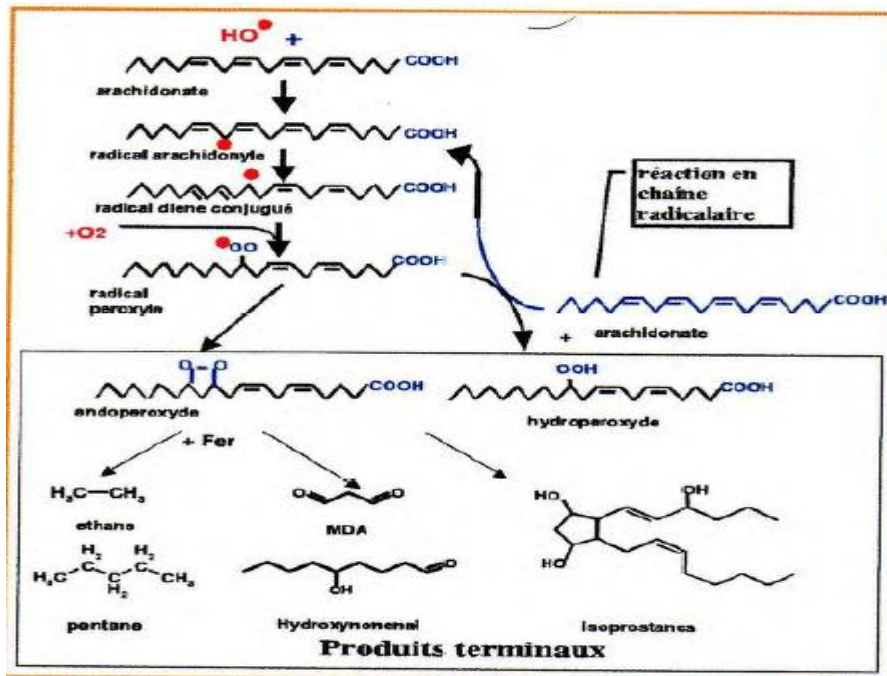


Figure 9 : Réactions de la peroxydation lipidique (Favier, 2003).

b- Les protéines

Tout comme les lipides, les protéines peuvent également être la cible des réactions radicalaires ou oxydatives et subir des modifications, par introduction d'un groupe carbonyle dans les protéines. Ces réactions d'oxydations sont fréquemment influencées par les cations métalliques comme le Cu^{2+} et le Fe^{2+} (Levine, 2002).

Nous pouvons classer les réactions d'oxydations des protéines en deux catégories : d'une part, celles qui cassent les liaisons peptidiques et modifient la chaîne protéique, et d'autre part, les modifications des peptides par l'addition des produits issus de la peroxydation lipidiques comme le 4-HNE. Ces changements sont celles qui conduisent généralement à une perte de la fonction catalytique, ou structurale des protéines affectées (Levine, 2002) (Figure 10). Les protéines comportant un pont sulfhydryque sont les plus sensibles aux attaques radicalaires, c'est le cas de nombreuses enzymes antioxydantes et les protéines de transport, qui contiennent très souvent des groupements thiols (SH) (Sen, 2001). Les protéines modifiées par l'oxydation, vont être prises en charge par des protéines spécifiques dites protéines de stress (Heat Shock Protein, HSP) connues pour leur rôle cytoprotecteur, où elles prennent en charge les protéines dénaturées

et participent à la restauration de la fonction de ces protéines (Welch, 1992). Les HSP permettent à la cellule de répondre à des stress de façon rapide, et la synthèse des HSP pourrait ainsi compléter les capacités de défenses antioxydantes lorsque les protéines intracellulaires sont endommagées par les ROS (Essig et Nosek, 1997).

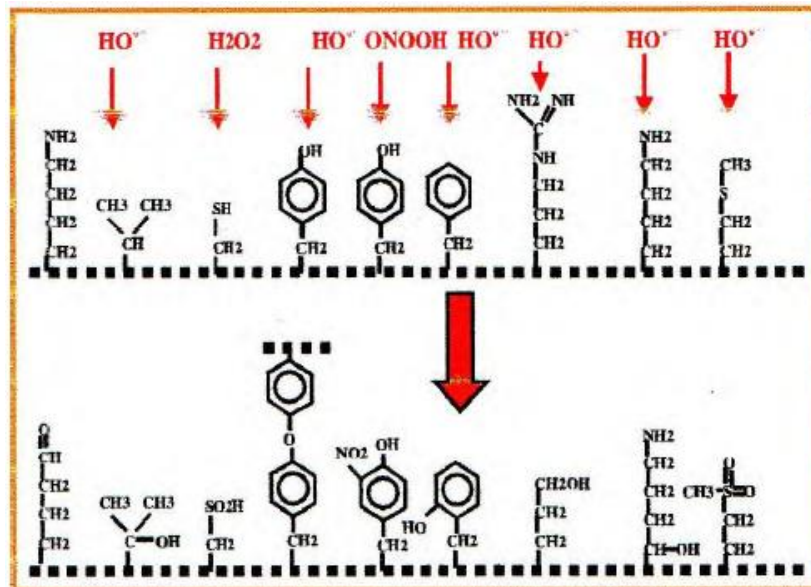


Figure 10: Nature de quelques modifications des chaînes latérales, d'acides aminés des Protéines après attaque radicalaire (Favier, 2003).

C- Les acides nucléiques

ADN mitochondrial est la cible privilégiée des oxydations par les ROS, du fait sa proximité directe de l'une des principales sources de ROS cellulaires : la chaîne respiratoire mitochondriale (Stevnsner, 2002).

Les réactions d'oxydation de l'ADN créant un grand nombre de dommages de l'ADN, et on peut noter quatre classes principales des dommages : les coupures simples et doubles brins, les bases modifiées comme la 8-OHdG (qui est un marqueur des dommages oxydatifs de l'ADN), les pontages ADN-ADN et les pontages ADN-protéines (Figure 11) (Hayakawa *et al.*, 1991). Les bases puriques sont plus sensibles aux ROS (surtout l' $^{\circ}OH$ et le peroxy-nitrite), en particulier la guanine (base qui présente le potentiel d'oxydation le plus bas), qui est facilement transformée en 8-hydroxy-2-déoxyguanosine (8-OHdG) qui est normalement éliminée par des enzymes de réparation de l'ADN. Si ces systèmes sont défectueux, La 8- OH dG s'accumulera au sein de

l'ADN (Cadet, 1999). Les aldéhydes réactifs issus de la peroxydation lipidique dont le MDA et le 4-HNE peuvent s'ajouter au groupe amine des bases de l'ADN et constituer ainsi une autre classe de dégâts oxydatifs de l'ADN (Marnett, 1999 ; Nair *et al.*, 1999).

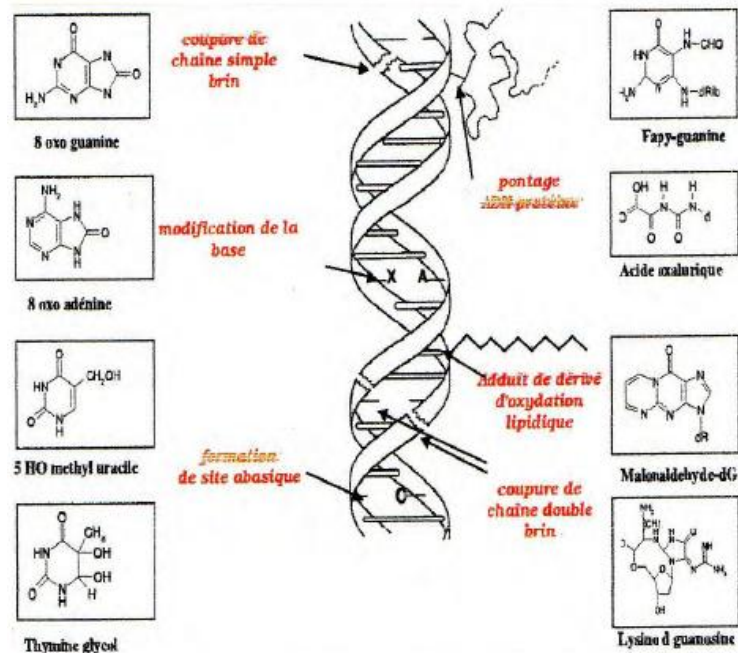


Figure 11 : Types de lésions de l'ADN provoqués par les attaques radicalaires (Favier, 2003)

D- Le stress oxydant et les pathologies

Le stress oxydant est potentiellement impliqué dans de nombreuses maladies comme facteur déclenchant, ou associé à des complications lors de leur évolution. Ces pathologies peuvent découler d'intoxications chimiques et médicamenteuses, d'exposition à des rayonnements, d'un syndrome d'hyperoxygénation, de phénomènes inflammatoires.

La multiplicité des conséquences médicales de ce stress oxydant vient du fait que de nombreux organes ou tissus peuvent devenir la cible d'un stress oxydant (Bonnefont- Rousselot *et al.*, 2001 ; Sohal *et al.*, 2002 ; Delattre *et al.*, 2005).

Le stress oxydant est impliqué dans le développement des maladies comme : le cancer, les maladies neurodégénératives et le vieillissement accéléré. Il est admis que le stress oxydant est un facteur potentialisant l'apparition de maladies multifactorielles comme les maladies cardiovasculaires, le diabète, et la maladie d'Alzheimer (Montagnier *et al.*, 1998).

Si le stress oxydant est réellement un facteur déclenchant ou participant au déclenchement de ces pathologies, il est logique de penser que la prise d'antioxydant peut retarder, prévenir l'apparition de telles maladies. De même, des études (**Holzenberger et al., 2003 ; Delattre et al., 2005**) ont montré que le vieillissement s'accompagne d'une diminution des défenses antioxydantes, d'une augmentation de la production des ROS, et d'une diminution des systèmes de réparation et de dégradation des constituants oxydés. Une étude épidémiologique (**Bonnefont-Rousslot, 2001**) a montré très clairement que la consommation régulière des antioxydants permet de diminuer l'incidence de l'apparition d'un stress oxydant et ces maladies.

4. Systèmes de défenses antioxydants

Le maintien d'un niveau non cytotoxique des EOR est assuré par des systèmes d'antioxydants. Un antioxydant peut être défini comme toute substance capable, à concentration relativement faible, d'entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables et ainsi retarder ou empêcher l'oxydation de ces substrats. Les cellules utilisent de nombreuses stratégies antioxydantes et consomment beaucoup d'énergie pour contrôler leurs niveaux d'espèces réactives de l'oxygène (**Figure 12**). La nature des systèmes antioxydants diffère selon les tissus et les types cellulaires et selon qu'on se trouve dans le milieu intracellulaire ou extracellulaire. Les défenses antioxydantes de notre organisme peuvent se diviser en systèmes enzymatiques et systèmes non enzymatiques (**Goudable et Favier, 1997**).

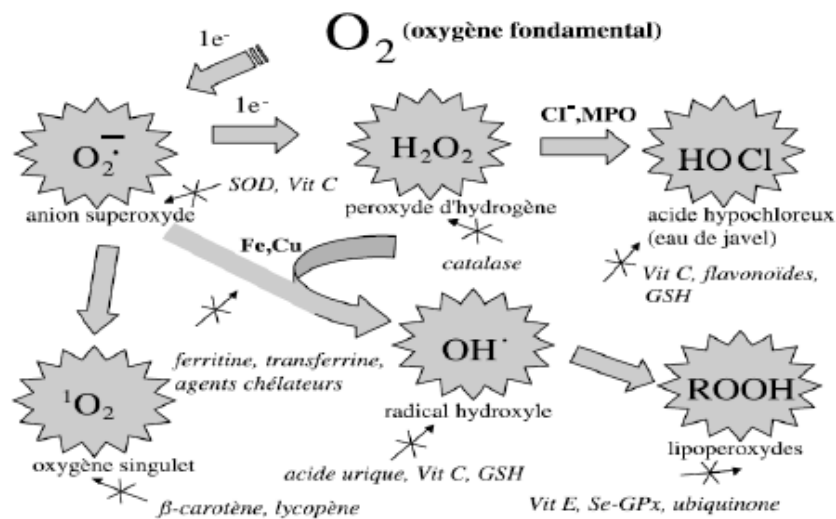


Figure 12 : Régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène par les systèmes de défenses antioxydants (**Milbury et Richer et al., 2008**).

4.1. Les systèmes enzymatiques

Il s'agit principalement de trois enzymes, (I) la superoxyde dismutase (SOD), (II) la catalase (CAT) et (III) la glutathion peroxydase (GPx). Ces enzymes ont une action complémentaire sur la cascade radicalaire au niveau de O_2 et du H_2O_2 , conduisant finalement à la formation de l'eau et de l'oxygène moléculaire (**Lehucher-Michel *et al.*, 2001**).

a- La Superoxyde dismutase

Comme l'indique son nom, la superoxyde dismutase (SOD) accélère la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène, Il existe plusieurs isoenzymes de SOD ; SOD ferreux (Fe-SOD), SOD à cuivre (Cu-SOD) et SOD à manganèse (Mn-SOD) qui diffèrent selon la localisation chromosomique du gène, leur contenu métallique, leur structure quaternaire et leur localisation cellulaire (**Zelko *et al.*, 2002**).

b- La catalase

Présente en particulier dans les hématies et les peroxysomes hépatiques. Elle agit en synergie avec la SOD puisque son rôle est d'accélérer la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire (**Sorg, 2004**).

c- Les glutathions peroxydases et réductases

Ces deux enzymes sont localisées dans le cytosol et dans les mitochondries. La glutathion peroxydase est une sélénoenzyme (Se-GPx) qui joue un rôle très important dans la détoxification du peroxyde d'hydrogène, mais aussi d'autres hydroperoxydes résultants de l'oxydation du cholestérol ou des acides gras en couplant la réduction de ces dérivés réactifs avec l'oxydation de substrats réducteurs comme le glutathion (GSH). La glutathion réductase (GR), quant à elle, a pour rôle de régénérer le GSH à partir du GSSG tout en utilisant le NADPH comme un cofacteur (**Martínez-Cayuela, 1995 ; Sorg, 2004**). Au total, le mécanisme réactionnel invoqué dans cette détoxification enzymatique peut être résumé dans le schéma suivant (**Figure13**)

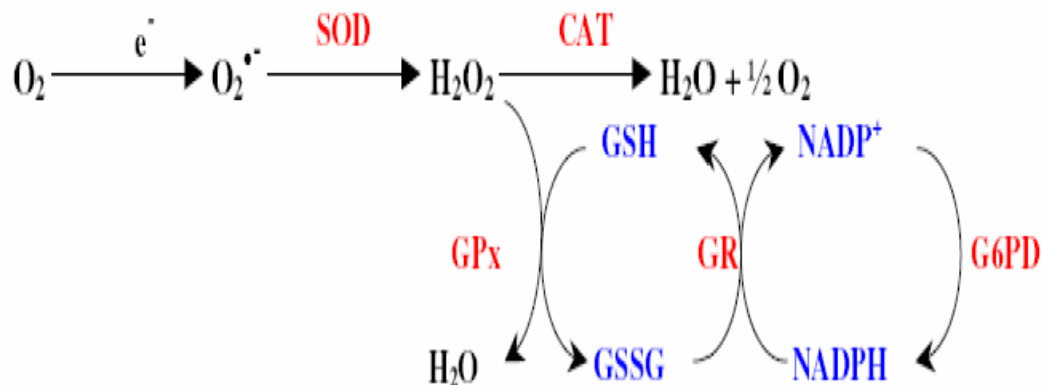


Figure 13 : Schéma résume le mécanisme de détoxification enzymatique (**Piquet et herbuterne, 2007**).

4.2. Les systèmes antioxydants non enzymatiques

Contrairement aux enzymes antioxydantes, la plupart de ces composants ne sont pas synthétisés par l'organisme et doivent être apportés par l'alimentation. Dans cette catégorie d'antioxydant nous retrouvons les oligoéléments, la glutathion réduct (GSH), l'ubiquinone, le Cytochrome C et les vitamines E et C (**Favier, 2003**).

a- Le Glutathion réduct (GSH)

Le glutathion réduct (GSH), réduit le peroxyde d'hydrogène et/ou les peroxydes organiques grâce à la réaction catalysée par la glutathion peroxydase (GSH-Px). Il peut aussi réduire les radicaux formés par l'oxydation des vitamine E et C, baissant ainsi les niveaux de peroxydation lipidique (**Packer et al., 1997 ;Power et Lennon, 1999**). Le rapport glutathion réduct/glutathion oxydé (GSH/GSSG) est souvent utilisé comme un marqueur du stress oxydant car plus le flux d' H_2O_2 est important, plus le glutathion réduct est consommé et le glutathion oxydé augmenté (**Ji et al., 1992**).

b- La Vitamine E

La vitamine E est le nom commun utilisé pour toutes les molécules possédant des activités biologiques identiques à celles de la famille des tocophérols. La forme naturelle de la vitamine E inclut quatre tocophérols isomères α , β , γ , δ , avec une activité antioxydante variable. L' α -tocophérol est la forme la plus active de la classe des tocophérols. Sa structure moléculaire comporte une extrémité hydrophile et une extrémité hydrophobe. Lors de l'initiation de la

peroxydation lipidique, suite à une attaque radicalaire, l' α -tocophérol, connu comme inhibiteur de la propagation de la peroxydation lipidique, cède son hydrogène situé dans le noyau phénolique, réduisant ainsi le radical RO₂ (**Singh et al., 2005**).

c- La Vitamine C

La vitamine C (acide ascorbique) n'est pas synthétisée par l'organisme. Elle est hydrosoluble à la concentration physiologique. La vitamine C empêche l'oxydation des LDL produites par divers systèmes générateurs d'espèces réactives de l'oxygène (neutrophiles activés, cellules endothéliales activées, myéloperoxydase). Lors de son oxydation en acide déhydroascorbique, elle prend une forme radicalaire intermédiaire (radical ascorbyl) qui joue un rôle essentiel dans la régénération de la vitamine E oxydée (**Singh et al., 2005**)

d- Les métallothionéines (MTs)

Les métallothionéines sont des protéines intracellulaires de faible poids moléculaire (6000-7000 Da) (**Kagi, 1993**). Ils possèdent une composition spéciale d'acides aminés. En effet, elles ne possèdent pas d'acides aminés aromatiques et dont le tiers des résidus sont des cystéines servent comme ligands aux métaux. La synthèse des MTs est induite par des facteurs divers, tels que les métaux, les glucocorticoïdes et les radiations ionisantes (**Cherian, 1995**).

Les MTs sont supposées jouer des rôles physiologiques multiples, incluant la détoxification des métaux potentiellement toxiques (Pb, Cd, Ni...), la régulation des métaux essentiels à l'état de traces, tels que le zinc, le cuivre et le chrome et la participation dans les systèmes cellulaires de défense antioxydante (**Diana, 1999**). A cause de leur teneur élevée en groupements sulfhydriques, les MT peuvent réagir avec les radicaux libres ERO et les électrophiles (**Lazo et pitt, 1995**).

5. Risque des antioxydants

Un antioxydant peut devenir prooxydant et avoir l'effet contraire de celui escompté à partir du moment où la dose ingérée est trop importante. Par exemple, La vitamine C est principalement antioxydante, mais en doses trop élevées et dans le processus de défense immunitaire, elle peut exercer un action pro-oxydante à travers son habilité à réduire l'ion ferrique (Fe³⁺) en ion ferreux (Fe²⁺) qui est un puissant catalyseur de plusieurs réaction redox comme la réaction de Fenton/Haber-Weiss. En augmentant la disponibilité du fer ferreux, la

vitamine C pourrait favoriser les dommages causés à l'ADN et paradoxalement stimuler la réparation de l'ADN oxydé (**Duarte et al, 2007**). En excès la vitamine A pourrait agir comme pro-oxydants, et favoriser l'oxydation de l'ADN (**Helden et al, 2009**). L'augmentation de l'acide urique peut aussi avoir des conséquences pro-oxydantes... (**Baillie et al, 2007**).

6. Effets du stress oxydatif sur le développement embryonique

Le stress oxydatif peut modifier de nombreuses réactions importantes qui affectent le développement embryonnaire de manière positive ou négative. Cela se produit par la modification de l'expression des gènes, la signalisation du facteur de transcription et les altérations du cycle cellulaire. L'embryon est plus susceptible aux effets du stress oxydatif aux périodes clés du développement, et les défenses antioxydantes jouent un rôle important dans la modulation des événements médiés par le stress oxydatif. Une meilleure compréhension de ces réactions et de leurs conséquences est essentielle pour optimiser le développement embryonnaire in vitro et assurer un développement normal in vivo.

6.1 Rôle du stress oxydatif dans le développement normal

Dans l'utérus, au début de la période post-implantatoire, l'environnement est relativement hypoxique. Ceci est important pour l'organogenèse précoce, moment auquel l'embryon est le plus sensible au stress oxydatif de l'environnement. Une fois la circulation utéro-placentaire établie, l'embryon devient plus résistant au stress oxydatif grâce à des défenses anti-oxydantes améliorées. Chez la souris, autour du jour embryonnaire 9,5 (E9,5) et E11.0, le sac vitellin du placenta régresse et l'allantoïne définitive du placenta assure la nutrition et les échanges respiratoires. Il en résulte une exposition aiguë à des concentrations plus élevées d'oxygène chez l'embryon (**New et Coppola, 1970; Morriss, 1979; Chen et al., 1999**). Le niveau de tonalité oxydative et les fluctuations programmées de cette tonalité, appelées commutation redox, modifie le destin des cellules de l'embryon vers la prolifération, la différenciation, l'apoptose ou la nécrose. Un état très réduit conduit à la prolifération, une oxydation douce conduit à la différenciation et une oxydation supplémentaire à la mort cellulaire (**Schafer et Buettner, 2001**). Pour illustrer ceci, les préadipocytes non différenciés présentent un taux élevé de glutathion (GSH), tandis que le niveau baisse et que les taux de glutathion oxydé (GSSG) augmentent précipitamment une fois la différenciation opérée (**Takahashi et Zeydel, 1982**). Dans une autre étude utilisant des lignées cellulaires d'odontoblastes et d'ostéoblastes, des concentrations de

H₂O₂ inférieures à 0,3 mM / litre ont entraîné une augmentation significative de l'activité de la phosphatase alcaline et de la matrice osseuse minéralisée dans les cellules odontoblastiques. Ces marqueurs indiquent une différenciation cellulaire (Lee *et al.*, 2006). Enfin, dans un modèle d'embryon de poulet, les antioxydants ont évité la mort neuronale, mais des niveaux excessifs de ces antioxydants ont été tout aussi néfastes, suggérant qu'il existe un point de référence pour l'état d'oxydo-réduction aux périodes critiques du développement et que le stress réducteur est aussi dangereux que le stress oxydatif (Castagne *et al.*, 1999).

6.2 Les défenses contre le stress oxydatif et leur effet sur développement

De nombreux chercheurs ont évalué les effets des antioxydants sur le développement embryonnaire. En général, les antioxydants réduisent l'abondance de ROS hautement réactives en se radicalisant. Le plus abondant, le glutathion, existe sous deux formes oxydées (GSSG) et réduite (GSH). Le sélénium et les sélénoprotéines constituent un autre groupe important d'antioxydants (Brigelius *et Flohe et al.*, 2003). Une sélénoprotéine bien connue, la thiorédoxine, surexprimée chez les embryons les rend plus résistants aux pressions élevées en oxygène (Kobayashi M *et al.*, 2002), alors que les mutants nuls pour la thiorédoxine sont mortels au début de la période post-implantatoire, autour de 7,5. Ceci est dû à une prolifération considérablement réduite de la masse cellulaire interne (Matsui *et al.*, 1996). Ceci suggère un rôle important de la thiorédoxine dans la survie de la masse cellulaire interne. De plus, les souris déficientes en hydroperoxyde phospholipidique de sélénoprotéine GSH peroxydase (GPX4) meurent in utero à la mi-gestation et ne présentent pas de compartimentation structurale normale (Yant *et al.*, 2003). Les lignées cellulaires dérivées de ces souris sont nettement sensibles aux inducteurs de stress oxydatif par rapport aux témoins de type sauvage (Ran *et al.*, 2003). La GPx4 étant la seule enzyme antioxydante majeure à réduire directement les hydroperoxydes phospholipidiques dans les membranes et les lipoprotéines agissant conjointement avec la vitamine E pour inhiber la peroxydation lipidique (Imai *et Nakagawa*, 2003), elle peut jouer un rôle important dans le développement embryonnaire normal. Enfin, dans le système nerveux en développement, les muscles squelettiques et le cœur des souris, la sélénoprotéine W est exprimée à des niveaux élevés dans les cellules en prolifération. En fait, la sélénoprotéine W a été détectée pour la première fois dans les embryons nouvellement implantés au stade E6. Au stade E8, la sélénoprotéine W est exprimée dans les tissus dérivés de l'endoderme et de l'ectoderme et dans le neuroépithélium. Au stade E9, le cerveau, les tubes neuraxiaux et les arcs branchiaux expriment la

sélénoprotéine W, ainsi que les tissus dérivés du mésoderme tels que le cœur et les membres (Jeong *et al.*, 2004). Pendant la prolifération cellulaire, la sélénoprotéine W est nécessaire à des niveaux élevés, mais lorsque les cellules quittent le cycle cellulaire et entrent dans la voie de différenciation, ce composé n'est plus nécessaire (Loflin *et al.*, 2006).

De ces données, il apparaît clairement que les contaminants environnementaux tels que les métaux lourds en traces vont générer un état de stress oxydatif, pouvant affecter l'homéostasie en général mais aussi sur la biologie du développement.

7. Rôle de mercure dans la génération du stress oxydatif

D'une part, l'affinité des ions Hg^{2+} pour les groupements thiols SH entraîne le blocage des fonctions thiols des protéines (modifiant ainsi leur structure tertiaire et quaternaire), des peptides (glutathion) ou des acides aminés soufrés (cystéine). Les protéines inactivées peuvent être des enzymes (des enzymes thiol-dépendantes au niveau des lysosomes et des mitochondries), des protéines membranaires des organites cellulaires, des protéines membranaires impliquées dans les transports ioniques (ATPase Na-K, canaux calciques) ou encore la tubuline et la myéline, ce qui provoque de graves perturbations dans la conduction de l'influx nerveux. D'autre part, le mercure inhibe les systèmes de protection cellulaire (les anti-oxidants) contre les radicaux libres. Le mercure provoque aussi la lyse des membranes cellulaires, sans doute en catalysant l'oxydation d'un phospholipide membranaire particulier, le mercure aussi inhibe les enzymes à zinc du fait d'une compétition entre ces deux métaux (même colonne dans le tableau de classification des éléments) (INRS, 1997).

VII-OBJECTIF DE LA THESE

Des études de la neurotoxicité portant sur le mercure en général et le mercure inorganique en particulier ont utilisé différents modèles expérimentaux d'exposition, notamment pendant une période particulière de gestation (Chehimi *et al.*, 2012) et / ou pendant la période postnatale avant le sevrage (Peixoto *et al.*., 2007), alors que d'autres (Oliveira *et al.* 2012) ont étudié la neurotoxicité chez l'adulte pour une courte période avec des doses fortes. Bien que très intéressantes, ces études ne décrivent qu'une période d'intoxication limitée et ne représentent pas la réalité en cours. Dans notre étude, nous avons essayé de refléter les conditions environnementales humaines courantes avec un approvisionnement continu en mercure

inorganique via l'alimentation pendant les périodes gestationnelles, postnatales et continue jusqu'à l'adulte.

L'un des buts de cette étude est d'évaluer les effets du mercure inorganique sur les comportements liés à l'anxiété, la sociabilité et la mémoire, ainsi que son effet sur l'activité locomotrice à plusieurs phases de développement.

Un deuxième but est d'étudier la participation du stress oxydatif au niveau cérébral dans les mécanismes des troubles du comportement déjà cités produites par une exposition à long terme au mercure avec la contribution de l'AChE dans des éventuels effets sur l'activité locomotrice.

Un troisième but est d'évaluer l'effet du mercure inorganique sur quelques organes périphériques tels que le foie et les reins, ainsi que sur les gonades mâles par l'évaluation du statut du stress oxydatif comme marqueur de la toxicité au niveau de ces organes.

MATERIELS

ET

METHODES


I-ANIMAUX, TRAITEMENT ET MODALITES D'EXPOSITION

Des souris suisses mâles et femelles adultes (F0) sont obtenues auprès de l'élevage de la Faculté des Sciences et Techniques de Beni Mellal au Maroc. Les animaux sont hébergés dans des cages en plexiglas standard (30 cm × 15 cm × 12 cm) (4 à 5 animaux par cage) avec un accès libre à la nourriture et à l'eau selon un cycle de 12 h (lumière) / 12 h (obscurité). Deux souris femelles et une souris mâle (F0) sont choisies au hasard, hébergées dans une cage et exposées à de l'eau contenant du HgCl₂ à 40ppm (groupe traité) ou de l'eau douce sans HgCl₂ (groupe témoin). Les souris mâles sont retirées des cages après la vérification du bouchon vaginale (24h après accouplement). Les souris femelles gestantes sont ensuite isolées et exposées au HgCl₂ dissout dans l'eau potable (40 ppm) *ad libitum*, pendant toute la période de gestation (groupe traité) ou non (groupe témoin). Après la mise bas, les souriceaux (F1) sont restés avec leurs mères jusqu'à l'âge de 21 jours. Les souriceaux du groupe traité sont alimentés en HgCl₂ par l'allaitement maternel, et le 21^{ème} jour postnatal, la progéniture est séparée par sexe et logée au hasard. Le groupe traité était toujours exposé à de l'eau contenant du HgCl₂ et le groupe témoin à de l'eau douce sans HgCl₂ jusqu'à l'âge adulte (9 à 10 semaines, moyenne de 30 g).

La durée de traitement avec les différentes manipulations réalisées au cours de cette étude sont résumées dans le tableau ci-dessous (**Tbleau1**) :

Tableau 1 : La durée de traitement avec les différentes manipulations réalisées au cours de cette étude

Traitement par le HgCl₂



Gestation	Allaitement (21 jours après naissance)	Après sevrage (PN25)	Age adulte (9 à 10 semaines)
<p>-La consommation de l'eau chez les femelles gestantes</p>	<p>-Etude du comportement maternel du (PN1-PN22) ;</p> <p>-Comptage du nombre des souriceaux par fratrie avec le pourcentage des mâles par portée ;</p> <p>-Tests neuro-développementaux du PN5-PN21 ;</p> <p>-Evaluation du poids corporel et paramètres du développement corporel du PN0-PN21 ;</p> <p>-Evaluation du stress oxydatif au niveau du cerveau, foie et reins au PN5, PN10, PN15 et PN21 ;</p> <p>-Dosage de l'ACHé cérébral au PN5, PN10, PN15 et PN21.</p>	<p>-Evaluation du comportement (EPM, Open Field, Reconnaissance d'Objets, Y-Maze, Interaction Social).</p>	<p>- Evaluation du comportement (EPM, Open Field, Reconnaissance d'Objets, Y-Maze, Interaction Social)</p> <p>- Evaluation du stress oxydatif au niveau du cerveau, foie et reins et au niveau des gonades mâles ;</p> <p>-Dosage de l'ACHé cérébral</p> <p>-Dosages des paramètres biochimiques plasmatiques (AST, ALT, Urée, Créatinine, AcP, Triglycérides, Cholestérol)</p> <p>-Etude de la consommation de l'eau et la préférence au sucre</p>

II-ETUDE DES PARAMETRES PHYSIQUES CHEZ LES SOURICEAUX

Au jour de la naissance (PN0), tous les souriceaux (vivants et morts) sont comptés; les descendants vivants sont pesés puis examinés pour des éventuelles malformations externes. Les paramètres physiques suivants ont été observés: apparition des poils, éruption des incisives, et l'ouverture bilatérale des yeux. Ces paramètres sont des indicateurs qui renseignent sur le développement fœtal des souriceaux.

III-ETUDE DU COMPORTEMENT

1. Etude du comportement maternel

Le comportement maternel est observé quotidiennement pendant 50 min dans la cage de chaque femelle avec sa portée entre PN01 et PN22.

Les observations sont faites au début du jour: entre 08:00 et 09:00 heure. Au cours de chaque séance de 50 minutes, chaque femelle et sa portée sont observées 10 fois pendant 5 s à des intervalles de 5 minutes. Onze types d'activités présentées par les femelles et les trois postures d'allaitement sont enregistrés pendant chaque session. Ainsi, chaque femelle et sa portée sont observées 220 fois (22 jours * 10 observations / séance). Lors de chaque observation, le score " 1 " est attribué si un comportement s'est produit et un score de " 0 " si ce n'est pas le cas.

Tout d'abord, deux types d'allaitement sont notés: (a) L'allaitement actif: est quand la femelle est cambrée sur ses souriceaux avec les jambes écartées; b) l'allaitement passif: se produit lorsque la femelle est au-dessus de sa litière, mais qu'elle n'a pas le dos cambré et qu'il n'y a pas d'extension évidente de ses jambes ou lorsque la mère est couchée sur le côté ou sur le dos avec un ou plusieurs petits. En plus de l'allaitement, onze autres activités des femelles sont enregistrées lors de chaque session:

- (1) femelle dans ou hors du nid,
- (2) femelle en contact avec l'un de ses souriceaux,
- (3) femelle léchant ou toilettant l'un de ses souriceaux,
- (4) femelle portant des souriceaux,
- (5) femelle manipulant des copeaux de nid,
- (6) femelle reposant les yeux fermés,

- (7) femelle mangeant,
- (8) femelle buvant,
- (9) auto-toilettage de la femelle,
- (10) l'exploration (rearing),
- (11) le reniflage (sniffing) de la femelle avec la tête levée. (**Slamberova et al., 2001**)

2. Test de récupération des souriceaux (Retrieval Test)

Les mêmes femelles et leurs souriceaux utilisés pour le comportement maternel sont testés pour le test de récupération qui est effectué quotidiennement entre 9 :00 heures et 10 :00 heures entre le PN01 et PN12, de sorte que chaque femelle et chaque portée doit être testées 12 fois.

Tous les souriceaux sont retirés de leurs cages de maternité et placés dans une autre cage pendant 5 min. Après cette brève séparation, tous les souriceaux sont remis à leur mère dans la cage de maternité et les souriceaux sont répartis autour de la cage. Le comportement de leur mère est alors observé pendant 10 minutes et les mesures suivantes sont relevées:

- A) le temps nécessaire pour porter le premier souriceau,
- B) le temps nécessaire pour ramener le premier souriceau dans le nid
- C) le temps nécessaire pour ramener tous les petits au nid.

Tout comportement inhabituel, tel que le retraitage d'un souriceau précédemment ramené, de prendre soin des souriceaux autour de la cage avant de les placer dans le nid ou de perturber considérablement les copeaux du nid. Au cours de chaque observation, le score «1» est attribué si un comportement s'est produit et un score de «0» s'il n'est pas produit (**Slamberova et al., 2001**) (**Figure 14**).

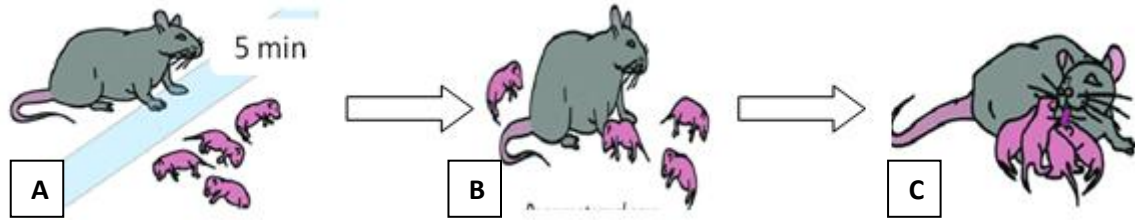


Figure 14 : Images explicatives du test de récupération des souriceaux :A) Séparer la femelles et ses souriceaux, B) Remettre les souriceaux dans la cage de maternité, C) Ramener tous les souriceaux au nid.

3. Etude du comportement des souriceaux

Le comportement chez les souriceaux est un indicateur efficace de l'adaptation du nouveau-né à la vie extra-utérine pendant les premiers stades du développement. Des réflexes retardés pourraient être un résultat de troubles neurologiques.

Pendant la période de sevrage, tous les souriceaux sont soumis aux tests comportementaux suivants (les tests et les âges sont rapportés dans le **tableau 2**).

Tableau 2: Calendrier des tests comportementaux chez les souriceaux.

Procédure	Age du test (jour PN)
Surface righting reflex	05-07
Cliff avoidance	06
Negative geotaxis	07-09-13
Jumping down choice cages	15-17
Swimming development	10-12-21

a-Surface réflexe de redressement (Surface righting reflex)

Chaque souriceau est placé sur son dos sur une surface plate. Le temps écoulé pour retourner et avoir les 4 pattes au contact avec la surface est enregistré (**Figure 15**).

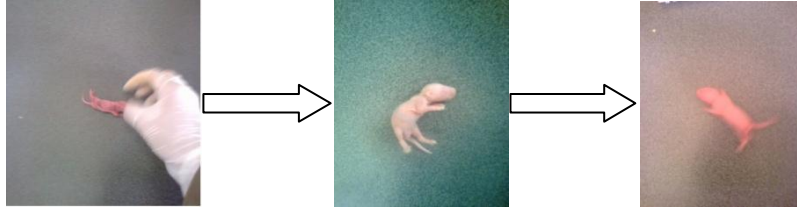


Figure 15 : Images explicatives du protocole du test "surface righting" reflex

b- Évitement de la falaise ("Cliff avoidance")

Le souriceau est placé sur un bord d'une table avec les pattes antérieures et le nez sur le bord. Le temps mis pour détourner avec un angle de 180° du bord de la table et éviter la chute est enregistré (**Figure16**).

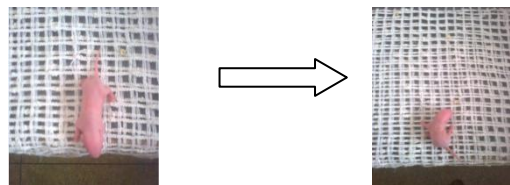


Figure 16 : Dispositif pour le déroulement du test "Cliff avoidance".

c-Géotaxie négative ("négatif géotaxis")

"Négative Géotaxis" est un test qui reflète la fonction vestibulaire, le développement moteur et de l'activité. Les souriceaux sont placés sur une surface inclinée de 45 ° avec la tête vers le bas, Le temps nécessaire pour tourner à 90 ° puis à 180 ° est enregistré. Les animaux sont testés pour un maximum de 120 sec, (**Figure17**).

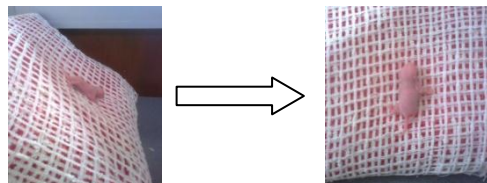


Figure 17 : Dispositif explicatif du test "Negative geotaxis"

d- Saut vers le bas avec le test de choix ("Jumping down choice cage")

Le souriceau est placé sur une plate-forme surélevée de 25 cm placés au-dessus des deux cages; l'une contient la fratrie et l'autre vide. Le temps écoulé pour descendre d'un bond dans l'une des cages ainsi que le choix sont enregistrés. La durée maximale du test est de 120 sec,(**Altman et al., 1975**), (**Figure18**).



Figure 18 : Dispositif explicatif du test Saut vers le bas avec le test de choix (Jumping down choice cage)

e- Le développement de la natation ("Swiming developpement")

Ce test mesure le développement de la coordination neuro-motrice et la capacité de nage et qu'est décrit par Kihara (**Kihara et al., 2000; Kihara, 1991**). Chaque souriceau est placé individuellement dans un réservoir d'eau (28 °C) pendant 10s. La direction, l'angle et l'utilisation des membres sont observés.

Si on considère la direction : lorsque le souriceau coule, le score est de 0 points, il est de 1 point lorsqu'il flotte, 2 points s'il tourne en faisant un cercle et de 3 lorsque le souriceau nage tout droit ou presque tout droit.

Pour l'angle de la nage ; le score est de 0 si la tête reste sous l'eau, il est de 1 point si le nez est à la surface de l'eau et de 2 si le nez et le sommet de tête sont au-dessus de la surface de l'eau, mais les oreilles sont toujours sous l'eau. Le score est de 3 si la moitié des oreilles est au-dessus de la surface et il est de 4 si les deux oreilles sont complètement hors de l'eau.

Concernant l'utilisation des membres, le score est de "0" est attribué lorsque l'animal n'utilise pas ses membres, il est de "1" lorsque le souriceau patauge avec les membres postérieurs et antérieures et de "2" lorsqu'il nage uniquement avec les membres antérieures, les membres postérieures restent fixes, (**Figure 19**).

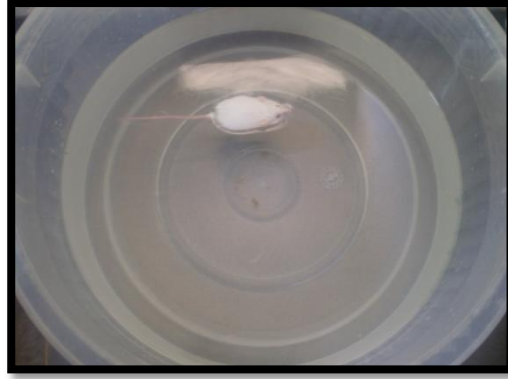


Figure 19: Dispositif explicative du test du développement de la nage ("swimming development")

4. Etude du comportement à l'âge de 25j postnatal et à l'âge adulte

a- Test Champ ouvert (Open Field)

L'activité locomotrice des souris traitées et témoins est contrôlés en utilisant un dispositif à champ ouvert. Les souris sont mises au début du test au milieu du dispositif. En effet chaque souris testée est déplacée de sa cage domestique vers le carré central (10 x 10 cm) du dispositif (50 x 50 x 50 cm) qui est divisé en 25 carrés égaux. Les mesures comportementales enregistrées pendant 5 min sont : (1) le nombre de passages par les carreaux centraux et ls carreaux périphériques, (2) le nombre total de carreaux et (3) le pourcentage des carreaux centraux (Goulet *et al.*, 2003), (Figure 20).

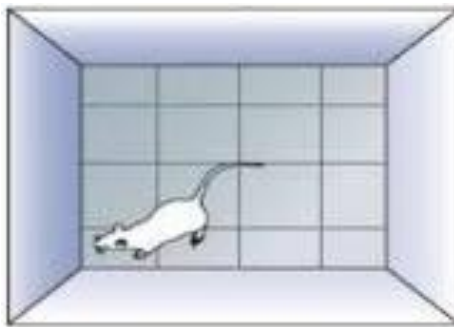


Figure 20: Dispositif expérimental du test champ ouvert ("Open Field")

b- Test Reconnaissance des objets

Au début du test, chaque animal est autorisé à explorer le dispositif librement pendant 5 minutes en l'absence de tout objet. 24 heures plus tard, l'animal doit explorer deux objets identiques (A1 et A2) placés à deux coins adjacents du dispositif à 10 cm des murs, pendant 5 minutes; c'est la session "acquisition". On ne parle d'exploration que lorsque le nez de la souris est dirigé vers l'objet à moins de "1" cm, alors que le "grignotage" et le marquage des objets ne sont pas considérés comme exploration.

Après un délai de 2h (lorsqu'il s'agit d'évaluer l'effet sur la mémoire à court terme), la souris est placée une autre fois dans l'appareil, mais cette fois, l'un des 2 objets identiques est remplacé par un autre B et la souris est autorisée à explorer les deux objets différents pendant 5 minutes: Les deux objets utilisés sont rincés avec le sol par 10% d'éthanol pour éliminer toute trace laissée par l'animal dans l'appareil, (Ennaceur *et al.*, 1988), (Figure 21).

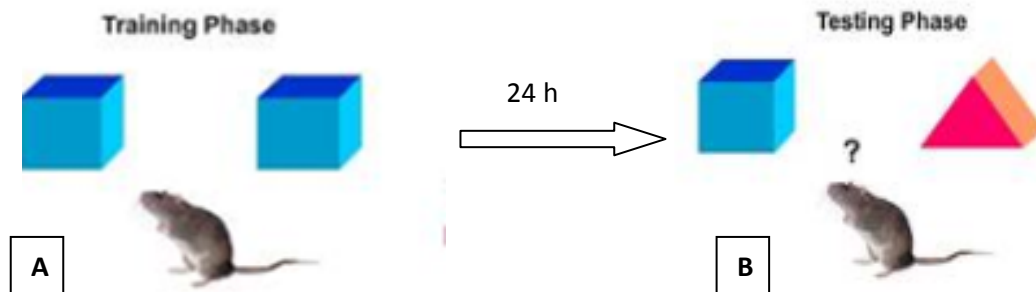


Figure 21: Dispositif expérimental du test "Reconnaissance des objets" : **A** : dispositif avec deux objets similaires A1 et A2 (phase acquisition), **B** : Le dispositif avec deux objets différents (A1 ou A2) et B.

c- Test Labyrinthe en Y (Y-Maze)

Le test de l'alternance spontanée du labyrinthe en Y repose sur la tendance naturelle des rongeurs à explorer un nouvel environnement. Lorsqu'elles sont placées dans le labyrinthe en Y, les souris normales préfèrent explorer le bras le moins récemment visité et ont donc tendance à alterner les visites entre les trois bras. Une souris dont la mémoire de travail est altérée ne peut se rappeler de quelle branche elle vient ni celle où elle doit de se rendre et montre donc une alternance spontanée réduite (Nagahara et McGaugh, 1992). L'appareil en forme de labyrinthe

en Y en plexiglas possède 3 bras identiques (40x9x16 cm) placés à 120 ° les uns des autres. Chaque souris est placée à l'extrémité de l'un des trois bras et laissée explorer l'appareil pendant 5 minutes. L'alternance est définie de manière opérationnelle comme étant successive dans chacun des trois bras en tant qu'ensembles de triplets se chevauchant (c'est-à-dire, ABC, BCA ...). Le pourcentage d'alternances spontanées est calculé comme indice des performances de la mémoire de travail. Les entrées totales dans les trois bras sont également notées comme des indices d'activité ambulatoire. (Nagahara *et al.*, 1992), (Figure 22).

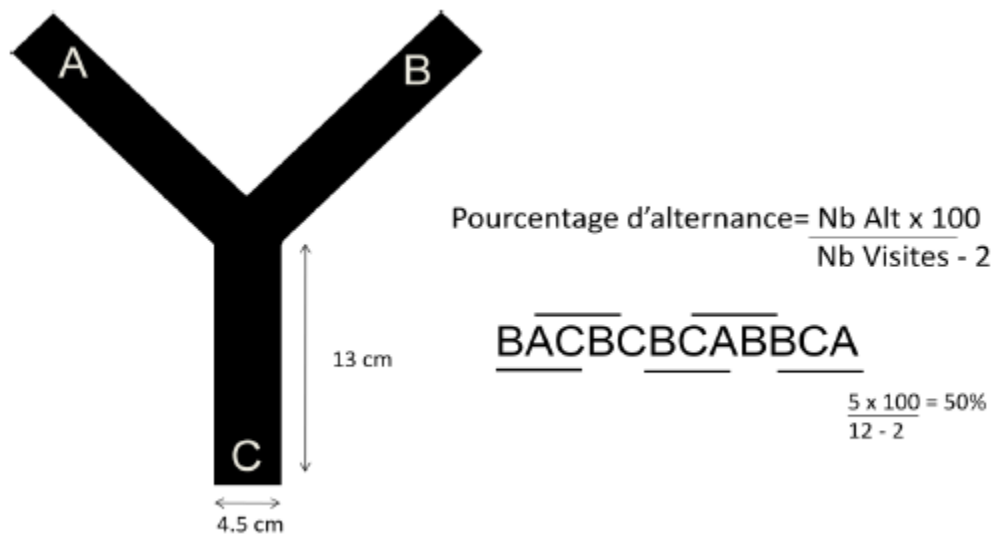


Figure 22: Dispositif expérimental du test labyrinthe en Y avec la formule adaptée pour calculer le pourcentage d'alternance et un exemple de comptage du pourcentage d'alternance.

d- Test Labyrinthe en Croix surélevé (EPM test)

L'équipement utilisé consiste en un labyrinthe avec deux bras ouverts opposés (50 cm * 10 cm) et deux bras fermés (50 cm * 10 cm * 40 cm), s'étalant depuis une plate-forme centrale (10 * 10), décrit par **Pellow et al. (1985)**. Le labyrinthe étant élevé à une hauteur de 50 cm du sol et, afin de minimiser la chute accidentelle de l'animal par les bras ouverts, ceux-ci étaient entourés d'une bordure en plexiglas de 1 cm de haut. L'appareil était situé dans une pièce lumineuse. Les souris ont été placées individuellement au centre de l'EPM, face à l'un des bras fermés, et sont autorisés à explorer l'appareil pendant 5 minutes. Après avoir analysé la vidéo, on note: (a) la fréquence des entrées aux bras ouverts, OAE; b) la fréquence des entrées aux bras

fermés, EAE; (c) le temps passé dans les bras ouverts, OAT; et (d) le temps passé dans les bras fermés, EAT. Une entrée est comptée chaque fois que l'animal place les quatre pattes sur chaque bras. Le labyrinthe est nettoyé avec une solution d'EtOH (10%, v / v) et séché après chaque animal testé. Les pourcentages d'OAE (% d'OAE) et d'OAT (% d'OAT) sont calculés selon la formule: ouvert / total * 100. Les effets anxiogènes sont définis comme une diminution de la proportion d'entrées aux bras ouverts divisée par le nombre total d'entrées dans ces bras, et le temps passé aux bras ouverts par rapport au temps total passé sur les deux bras. (Pellow S et al 1985), (Figure 23).



Figure 23 : Dispositif expérimental du test de labyrinthe surélevé

e- Test de l'interaction social

La sociabilité des souris traitées par le mercure et leurs témoins est étudiée en utilisant le système de test à trois chambres développé par Crawley et ses collègues, (Crawley *et al.*, 2004).

Les souris à tester et les souris stimulantes sont placées dans la salle d'essai pendant 30 min avant le début du test. Des souris même sexe et âge que les souris à tester sont utilisées comme souris stimulus. Chaque souris stimulus est utilisée une fois par jour. La durée du test est de 25 minutes pour chaque souris.

✓ phase d'adaptation:

Isoler les compartiments droit et à gauche en utilisant les murs en plexiglas de démarcation et placer des tasses vides de confinement métallique au milieu de la chambre à droite et à gauche (un pour chaque chambre) et puis placer la souris à tester au centre de la chambre du milieu pour l'adaptation et laisser pendant 5 min.

✓ Aspect de l'appartenance sociale (session I) : (La durée de la session I est de 10 minutes).

Dans un premier temps, l'une des souris stimulus (Stranger 1) est placée à l'intérieur d'une tasse de confinement métallique qui se trouve dans l'une des chambres latérales. Le placement de (Stranger 1) dans le côté droit ou gauche de la chambre est systématiquement changé entre les essais, et après les murs sont retirés entre les compartiments, afin de permettre un libre accès pour la souris testée à explorer chacune des trois chambres. Immédiatement, on commence à surveiller et enregistrer les paramètres suivants:

-la durée et le nombre des contacts directs (actif) entre la souris testés et la tasse vide ou bien contenant le (Stranger 1) pour chaque chambre individuelle. Le contact direct entre la souris testée et la tasse de confinement, ou étirement du corps de la souris dans une zone soumise 3-5 cm autour de la tasse est compté comme un contact actif ainsi le temps passé dans les trois compartiments.

-la durée et le nombre d'autres comportements par la souris testée dans chaque compartiment, y compris l'auto-toilettage, absence de mouvements du corps pour plus de 5 secondes (le «gel»), ainsi que des comportements inhabituels, comme le saut, etc;

✓ Nouveauté sociale / préférence : session de l'épreuve (session II) : (La durée de la session II est à 10 minutes)

Une 2^{ème} souris stimulus (Stranger 2) est placé à l'intérieur de la 2^{ème} tasse vide de confinement identique dans la chambre de l'autre côté (qui est vide durant la Session I) et surveiller les mêmes paramètres décrits précédemment, la différenciation des comportements de la souris testée à la présence de la souris (Stranger 1) par rapport à la souris (Stranger 2), **(Figure24)**.

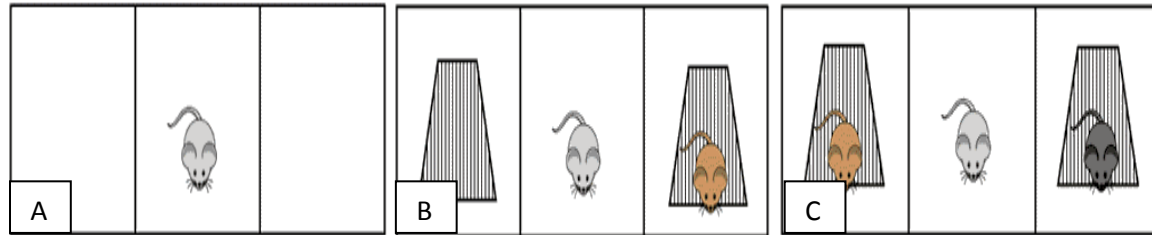


Figure 24: Dispositif explicatif du test interaction social : A : phase d'habituatation, B : appartenance sociale avec une seule souris étranger (stranger1), C : Nouveauté sociale / préférence avec deux souris (stranger1 et stranger2).

V-LA CONSOMMATION DE L'EAU

La consommation d'eau potable chez les souris témoins et la solution de mercure chez leurs équivalents traitées est mesurée quotidiennement chez les femelles gestantes F0.

Dans la deuxième expérience chez les souris F1 traitées et leurs témoins. En effet les souris témoins ont accès à deux bouteilles: l'une remplie d'eau du robinet et l'autre contenant 1% de saccharose alors que les souris traitées avaient accès à une bouteille contenant une solution de HgCl_2 et l'autre contenant 1% de saccharose. L'emplacement des bouteilles est inversé toutes les 24 h et la quantité d'eau et de la solution sucrée consommée sont enregistrée. Deux jours avant le début de l'expérience, les souris n'ont qu'accès à la solution sucrée dans les deux bouteilles pour éviter tous effets de nouveauté.

VI-MESURE DE LA MOTILITE DU COLON PAR LA COLLECTION DES CROTTES D'UNE HEURE

La fréquence des selles d'une heure est mesurée chez des souris F1 traitées par le mercure à l'âge de 2 mois et leurs témoins une fois par semaine pendant cinq semaines. Les manipulations sont effectuées entre 9h00 et 11h00. Chaque animal est retiré de sa cage d'origine et placé dans une cage en plastique propre et transparente sans nourriture et sans eau pendant une heure. Les selles sont recueillies et placées dans des tubes scellés de 1,5 ml. Les selles totales sont pesées pour obtenir un poids humide, puis séchées pendant une nuit à 65°C et pesées à nouveau pour obtenir un poids sec. La teneur en eau des selles est calculée à partir de la différence entre le poids des selles mouillées et sèches. Les résultats sont normalisés au poids corporel de l'animal (Li *et al.*, 2006; Greene *et al.*, 2009), (Figure 25).



Figure 25: La fréquence des selles d'une heure. (A) mise en place de la souris dans une cage individuelle, (B) mise en place des selles dans des tubes scellés de 1,5 ml, (C) Séchage dans l'étuve à 65°C.

VII- DETERMINATION DU POIDS RELATIF DES ORGANES

Le poids des organes est exprimé en pourcentage du poids vif de l'animal obtenu pendant la dernière pesée. Le poids relatif des organes est déterminé par la formule suivante:

$$\text{Poids relatif de l'organe(g)} = \frac{\text{Poids de l'organe (g)} * 100}{\text{poids vif final de l'animal}}$$

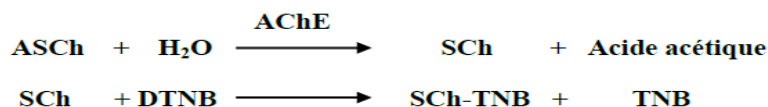
VIII-DOSAGE DE L'ACETYLCHOLINESTERASE

Le dosage de l'acétylcholinestérase est effectué pendant les 21 jours après la naissance au niveau du cerveau entier à différents jours postnataux (PN05, PN10, PN15 et PN21) chez les souriceaux traités et leurs témoins. A l'âge adulte les dosages sont effectués au niveau des structures cérébrales (Cortex cérébral, Hippocampe, Hypothalamus, Bulbe olfactif, Mésencéphale, Pont, Bulbe Rachidien et Cervelet).

-Principe

La méthode utilisée est une méthode colorimétrique décrite par **Ellman *et al.*, (1961)**. Ainsi l'acétylcholinestérase contenue dans la fraction des tissus va réagir avec l'acétylthiocholine (ASCh) en libérant l'acétate et la thiocholine (SCh). Cette dernière réagit à son tour avec le 5-5'-Dithio-bis (2-nitrobenzoate) (DTNB) en donnant du TNB produit de couleur jaune qui absorbe à 412 nm et dont la concentration est proportionnelle à la quantité d'enzymes présente dans le milieu.

La réaction peut se décliner comme suit :



-Mode opératoire

La procédure expérimentale du dosage, est la suivante :

- Prélever 1000 ml du tampon phosphate (PBS)(0.1 M, pH 7.4)
- Ajouter 50 ml du DTNB
- Ajouter 50ml du substrat acetylthiocholine iodide(ASCh)
- Ajouter 50ml de l'homogenat
- Les tubes sont bouchés puis agiter ;
- La lecture de l'absorbance se fait à 412 nm à un intervalle de temps de 25 min (lecture de la DO chaque 3min) contre la solution blanc.

- Calcul de l'activité de l'AChE

L'activité de l'AChE est exprimée en nanomoles par minute par milligramme de protéines (nmol/min/mg prot) selon la formule suivante :

$$\text{AChE (nmol/min/mg prot)} = \frac{\Delta \text{DO} / \Delta t \times 1691.18}{P}$$

- $\Delta \text{DO} / \Delta t$: variation de la densité optique par minute ;

-P : Concentration des protéines en mg/ml.

IX -DOSAGE DES MARQUEURS DU STRESS OXYDANT

1. Préparation de l'homogénat

0,4 g de foie, rein, testicules ou du cerveau de souris des différents groupes étudiés, a été broyé et homogénéisé dans 4 ml de TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4), puis

centrifugation de la suspension cellulaire (9000 tours/min, 4°C, 15 min). Le surnageant obtenu est aliquoté dans des tubes eppendorfs puis conservés à -20°C en attendant d'effectuer les dosages des paramètres du stress oxydant.

2. Dosage du Malondialdéhyde (MDA)

Le MDA peut être détecté par une réaction colorimétrique à l'aide de l'acide thiobarbiturique (TBA). La détection du MDA issue de la dégradation des acides gras polyinsaturés à 3 ou 4 double liaison peroxydées. Le dosage du MDA est réalisé selon la méthode d'ésterbauer *et al* (1992).

-Principe

Le principe de ce dosage est basé sur la condensation de MDA en milieu acide et à chaud avec l'acide thiobarbiturique, pour former un pigment (rose). Ce chromogène peut être donc mesuré par spectrophotométrie d'absorption à 530 nm.

-Mode opératoire

La procédure expérimentale du dosage, est la suivante :

- Prélever 375µl de l'homogénat (surnageant)
- Ajouter 150µl de la solution tampon phosphate (0.1M, PH=7.8)
- Ajouter 375µl de la solution TCA-BHT
- Vortexer et centrifuger à 1000 tours/min pendant 10min
- Prélever 400µl du surnageant
- Ajouter 80µl du HCl 0.6M
- Ajouter 320µl de la solution tris-TBA

Mélanger et incuber au bain marie à une température de 80°C pendant 10 minutes. la densité optique est enregistrée à $\lambda=530\text{nm}$. L'absorbance est directement proportionnelle à la quantité de MDA formé, donnant ainsi une évaluation précise des lipides peroxydés.

- Calcul de la concentration du MDA

La concentration du MDA est calculée selon la loi de Beer-lambert ($DO=E.C.L$).

$$[\text{MDA}] (\text{nmol/mgprotein}) = \frac{DO \times 10^6}{\varepsilon \times L \times \chi \times Fd}$$

3. Dosage de l'activité de la Superoxyde Dismutase (SOD)

Le dosage du superoxyde dismutase (SOD) est réalisé selon la méthode de **Asada *et al* (1974)**.

-Mode opératoire

La procédure expérimentale du dosage du superoxyde dismutase est la suivante :

- Prélever 0.1 ml de mélange (méthionine et Na₂EDTA).
- Ajouter 0.8922ml de tampon phosphate (50mM, pH=7.8).
- Ajouter 0.05ml du surnageant.
- Ajouter 0.95ml de tampon phosphate.
- Ajouter 0.0852ml de NBT.
- Ajouter 0.0226ml de riboflavine.

La réduction du NBT est estimée à une longueur d'onde 580nm contre le blanc.

- Calcul de la concentration

Le pourcentage (Y) contre unité de SOD (quantité des protéines enzymatiques capable d'inhiber 50% de NBT) peut être calculé selon l'équation suivante :

$$Y = \left[\frac{DO_{\text{étalon}} - DO_{\text{échant}}}{DO_{\text{étalon}}} \times 100 \right] \times \frac{20}{C}$$

20 : Facteur de dilution de l'échantillon dans le milieu réactionnel.

C : la concentration des protéines dans l'échantillon (mg/ml).

4. Dosage de la glutathion peroxydase (GSH-Px)

L'activité enzymatique du glutathion peroxydase (GSH- Px) est mesurée par la méthode de **Flohe et Gunzler (1984)**.

-Principe

Cette méthode est basée sur la réduction de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en présence de glutathion réduit (GSH), ce dernier est transformé en (GSSG) sous l'influence de la GSHPx selon la réaction suivante :



-Mode opératoire

Nous avons procédé aux étapes suivantes :

- Prélever 200µl de l'homogénat (surnageant).
- Ajouter 200µl de GSH.
- Ajouter 200µl de la solution tampon phosphate.
- Ajouter 400µl de H₂O₂.
- Incubation pendant une minute à 37°c
- Ajouter 500µl de TCA (5%) pour arrêter la réaction.
- Centrifuger durant 5 minutes à 1500 tours /minutes.
- Prélever 200µl du surnageant.
- Ajouter 500µl de la solution tampon phosphate.
- Ajouter 500µl de mélange surnageant-tampon phosphate.
- On note les densités optiques à 412 nm pendant 5min

- Calcul de la concentration

La détermination de l'activité enzymatique de la GSH-Px se fait à l'aide de la formule suivante :

$$GPX = Y/X$$

$$Y = [DO_{\text{Blanc}} - DO_{\text{Echantillon}}] / 6.22$$

X = Quantité de protéine dans 200µl de l'échantillon (mg/ml).

L'activité de GPX est exprimée en nmol de GSH consommé/min/mg de protéine.

5. Dosage de la glutathion-S-transferase (GSTs)

La mesure de l'activité des GST, consiste à fournir à l'enzyme un substrat en général du (CDNB) 1-chloro-2,4-dinitrobenzène, qui réagit facilement avec de nombreuses formes de GST et du glutathion. La réaction de conjugaison de ces deux produits entraîne la formation d'une molécule nouvelle qui absorbe la lumière à 340nm de longueur d'onde, La méthode utilisée dans cette étude pour doser les GSTs est celle de **Habig et al (1974)**.

-Principe

Celle-ci consiste à faire agir les GSTs contenues dans l'homogénat sur un mélange (GSH+CDNB) à une température de 37°C. La variation de la densité optique, due à l'apparition du complexe GSH-CDNB, est mesurée pendant 1 minute durant 5 minutes à une longueur d'onde de 340nm.

-Mode opératoire

La procédure expérimentale du dosage de la glutathion-S-transferase (GSTs) est la suivante :

- Prélever 830ml du tampon phosphate (0.1M, pH6.5)
- Ajouter 50ml du CDNB.
- Ajouter du 100ml du GSH.

-Ajouter 20 ml de l'homogénat

- Calcul de la concentration

La valeur de la densité optique du blanc (conjugaison spontanée du substrat) a été ensuite retranchée à la valeur de chaque essai afin de mesurer la variation due uniquement à l'activité de l'enzyme. La concentration de la GST est obtenue par la formule suivante :

$$\text{GST (nmolGST/min/mg protein)} = \frac{DO_{\text{éch}} / \text{min} - DO_{\text{blanc}} / \text{min}}{9.6 \times \text{mgprot}}$$

DO : densité optique de l'échantillon /min

DO/min blanc : densité optique du blanc/min

9.6 : coefficient d'extinction du GSH-CDNB exprimé en Mm.cM

6. Dosage de la catalase

L'activité catalase (CAT) est mesurée selon la méthode de **Aebi (1984)** à 240nm à l'aide d'un spectrophotomètre par la variation de la densité optique consécutive à la dismutation du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Les catalases sont présentés dans un grand nombre de tissus. Ce sont des enzymes tétramériques, chaque unité portant une molécule d'hème et une molécule de NADPH. Ces enzymes interviennent dans la défense de la cellule contre le stress oxydant en éliminant les dérivés actifs de l'oxygène et en accélérant la réaction spontanée de dismutation du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en eau et en oxygène.

-Principe

La réaction se fait en deux étapes :



-Mode opératoire

-En faisant réagir dans 790ml de tampon phosphate (100 mM) pendant 1 minute à pH 7.4.

-Ajouter 200µl de H₂O₂.

-Ajouter 20µl du surnageant, à une température d'incubation de 25°C.

Les résultats ont été exprimés en µmol d' H₂O₂ par mg de protéines et la lecture de l'absorbance se fait après 15 secondes de délai et durant 60 secondes de mesure.

-Calcul de l'activité Catalase

L'activité CAT est calculée selon l'équation suivante :

$$\text{Activité de la catalase } (\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 / \text{min} / \text{mg prot}) = \frac{\Delta DO}{\varepsilon \times L \times \chi \times Fd}$$

ε : Coefficient d'extinction (= 0.043 mM⁻¹.cm⁻¹).

L : La longueur de la cuve utilisée (1 cm).

X : La quantité des protéines mg/ml.

Fd : 0.02 (facteur de dilution pour le H₂O₂ dans le tampon).

λ : 240 nm.

7. Dosage des protéines tissulaires

Les concentrations des protéines des différents tissus sont dosées par la méthode de **Lowry et al., (1951)** à l'aide d'une gamme d'étalonnage avec le sérum albumine bovine comme étalon.

X-DETERMINATION DES MARQUEURS BIOCHIMIQUES PLASMATIQUES DU FOIE ET DU REIN

1. Détermination de l'activité plasmatique des transaminases AST, ALT au niveau du foie et l'Urée et Créatinine au niveau des reins

Le dosage des paramètres biochimiques AST, ALT, Urée et Créatinine sont accompli au sein d'un laboratoire d'analyse médicale à Béni Mellal à l'aide d'un automate analyseur sanguin automatisé.

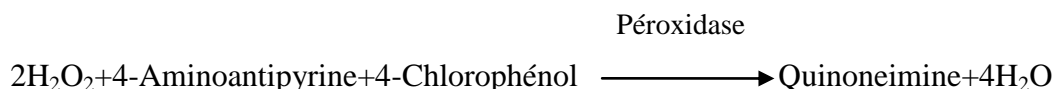
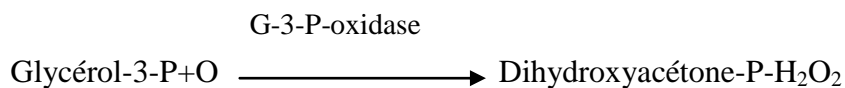
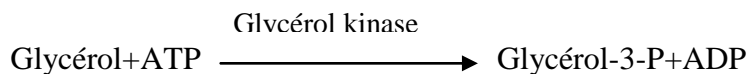
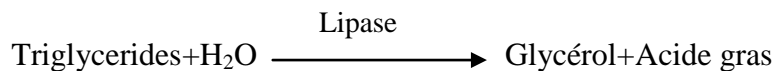
2. Détermination du taux des triglycérides, Cholestérol Total et la phosphatase acide

Ces dosages sont faits à l'aide d'utilisation des kits

a- Dosage des triglycérides

-Principe de la méthode

Les triglycérides présents dans l'échantillon donnent un complexe coloré quantifiable par spectrophotométrie selon les réactions décrites ci-dessous.



-Réactifs

-Réactif(A)

-Etalon(S)

-Mode opératoire

-Placer les réactifs à température ambiante

-Pipeter dans des tubes à essais selon le tableau suivant :

	Blanc	Etalon	Echantillon
Etalon de triglycérides	-	10µl	-
Echantillon	-	-	10µl
Réactif (A)	1ml	1ml	1ml

-Bien agiter et incuber les tubes pendant 15 min à température ambiante (16-25°C) ou pendant 5 minutes à 37°C.

-Lire l'absorbance (A) de l'Etalon et de l'Echantillon face au Blanc à 500nm. La couleur est stable au moins 2 heures.

-Calcul de l'activité

La concentration en triglycérides de l'échantillon est calculée selon la formule suivante :

$$\frac{A_{\text{Echantillon}}}{A_{\text{Etalon}}} \times C_{\text{Etalon}} = C_{\text{Echantillon}}$$

-Calcul de la concentration

$$\frac{A_{\text{Echantillon}}}{A_{\text{Etalon}}} \times 200 = \text{mg/dl triglycérides.}$$

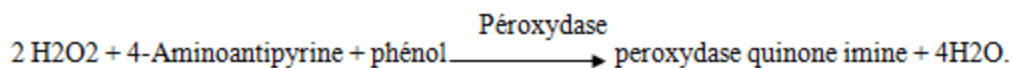
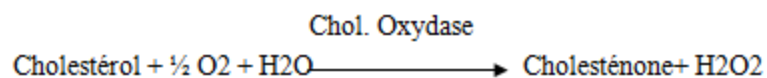
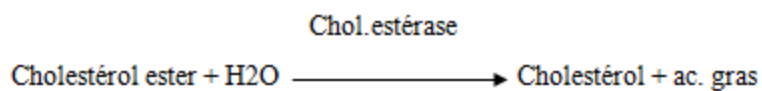
Ou

$$\frac{A_{\text{Echantillon}}}{A_{\text{Etalon}}} \times 2.26 = \text{nmol/l triglycérides.}$$

b-Dosage du cholestérol total

Le cholestérol libre ainsi que le cholestérol estérifié présents dans l'échantillon, donnent, selon les réactions couplées décrites ci-dessous, un complexe coloré quantifiable par spectrophotométrie.

-Principe



-Réactifs

-Réactif(A)

-Etalon(S)

-Mode opératoire

1. Placer les réactifs à température ambiante
2. Pipeter dans des tubes à essais selon le tableau suivant :

	Blanc	Etalon	Echantillon
Etalon de triglycérides	-	10 μ l	-
Echantillon	-	-	10 μ l
Réactif (A)	1ml	1ml	1ml

3. Agitation et incubation 10 min à température ambiante (16-25°C) ou 5 min à 37°C

4. Lire l'absorbance à 500nm

-Calcul de la concentration du cholestérol

La concentration en Cholestérol de l'échantillon est calculée selon la formule suivante :

$$\frac{A_{\text{Echantillon}}}{A_{\text{Etalon}}} \times 200 = \text{mg/dl triglycérides.}$$

Ou

$$\frac{A_{\text{Echantillon}}}{A_{\text{Etalon}}} \times 5.18 = \text{nmol/l triglycérides.}$$

XI –DOSAGE DES METAUX ET DES MINERAUX ESSENTIELS

Les structures cérébrales disséquées, le foie, les reins et les gonades mâles sont séchées pendant 48 h. Pour la digestion des tissus, les échantillons séchés sont pesés et broyés avant de les placer dans des fioles coniques de 10 ml avec des couvercles en polypropylène contenant 3 ml de HNO₃ (65%) à la température ambiante jusqu'à ce que la solution devienne claire. Ensuite, 1 ml de H₂O₂ à 30% est ajouté aux échantillons. Une fois l'effervescence terminée, les échantillons sont chauffés à 80 °C jusqu'à évaporation du HNO₃. Les échantillons sont ensuite refroidis à la température ambiante. Le volume final est amené à 10 ml de HNO₃ à 2%. Les taux de mercure (Hg), de fer (Fe), de cuivre (Cu), de magnésium (Mg), de zinc (Zn) et de calcium (Ca) dans le cerveau, le foie, les reins et les testicules sont déterminés à l'aide d'une spectrométrie d'absorption atomique (ICP-AES; Optima 8000-PerkinElmer, USA). (**Langkammer et al., 2010**).

XII-ANALYSE HISTOLOGIQUE

Elle comporte les étapes suivantes :

a-Fixation

La fixation des échantillons (foie et rein) est faite dans le formol, les organes sont retirés de formol et sont coupés à l'aide de couteaux tranchant à fin de réaliser des prélèvements pour l'étude histologique avec une surface de 1 à 2 cm² et une épaisseur proche de 1.5 mm. Les prélèvements réalisés sont alors mis dans des cassettes spéciales à parois tournées afin de permettre le passage des liquides, (**Figure 26**).



Figure 26 : La mise en cassette des échantillons

b-Déshydratation des échantillons

Les échantillons sont ensuite déshydratés pendant 12 heures au minimum pour éliminer l'eau des tissus et cette opération nécessite le passage du tissu dans des bains d'éthanol de concentration croissante (70%,80%,90% et 100%). La déshydratation peut être accélérée par l'agitation rapide grâce à des automates spéciaux, (**Figure 27**).



Figure 27: La déshydratation des échantillons

c-L'inclusion et réalisation des blocs

Les tissus sont alors plongés dans des bains de paraffine liquide (sous l'effet de la chaleur). Les tissus étant maintenus et imbibés de paraffine, viennent alors l'étape de l'enrobage qui consiste à inclure le tissu imprégné dans un bloc de paraffine qui, en se solidifiant, va permettre sa coupe. Cette opération fait appel à des appareils « dits à inclusion » refermant un réservoir de paraffine maintenue à l'état liquide par un système de chauffage, un petit robinet et une plaque métallique réfrigérée pour obtenir la solidification rapide du bloc de paraffine contenant le tissu, (**Figure 28**).



Figure 28: La mise en blocs des différents échantillons

d-Les coupes et la coloration histologique des échantillons

Les coupes sériées sont réalisées à l'aide d'un microtome (l'épaisseur est de 4 à 7 microns). Ces coupes sont étalées et fixées sur la lame par l'utilisation d'une eau gélatineuse chauffée à 2%.

Pour la coloration, nous avons utilisé la technique à l'Hématoxyline-Eosine (ou Hématoxylène- Eosine) qui nécessite la présence de l'alcool acide (100 ml d'alcool éthylique à 70% + 50 ml d'acide HCl), eau ammoniacale (100ml d'eau distillée + 2 ml d'ammoniaque) et solution d'Eosine (100ml Eosine solution aqueuse à 3%, 125 ml alcool éthylique à 95%, 375ml eau distillée et 2 gouttes d'acide acétique) selon les étapes suivantes :

- Déparaffiner et hydrater les lames à l'eau du robinet puis rincer à l'eau distillée.
- Immerger dans un bain d'Hématoxyline de Harris (15 minutes) qui colore en bleu violacée les structures basophiles (noyaux).
- Différencier les coupes dans l'alcool acide (1 à 2 plongées), déposer ensuite les lames dans un bain d'eau du robinet.
- Immerger dans un bain d'Eosine (15 secondes à 2 minutes) qui colore les structures acidophiles (cytoplasme).
- Enfin déshydrater, éclaircir et monter les lames à Eukitt. Tous ces bains sont séparés par des lavages à l'eau du robinet. Les préparations sont ensuite séchées puis observées au microscope optique et photographiées à l'aide d'un appareil photo, (**Figure 29**).



Figure 29 : microtomie et coloration des lames

XIII- ANALYSE STAISTIQUE

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ($X \pm SEM$). La comparaison entre les moyennes des différents groupes est effectuée par le test t de student alors que le calcul des pourcentages dans le test "jumping down choice cages" est effectuée par Z-test

*: Différence significative comparant au témoin ($P \leq 0,05$).

** : Différence hautement significative comparant au témoin ($P \leq 0,01$).

*** : Différence très hautement significative comparant au témoin ($P \leq 0,001$).

RESULTATS

ET

DISCUSSION

RESULTATS

I- L'ETUDE DES PARAMETRES PHYSIQUES CHEZ LES SOURICEAUX

1. Caractéristiques de la portée, nombre de survivants par fratrie et le pourcentage des mâles par fratrie

Tableau 3 : Effet du chlorure de mercure sur la survie des souriceaux traités et témoins au PN0 (premier jour de naissance) et PN5 (jour de commencement des tests neurodéveloppementaux) avec l'analyse du nombre des mâles dans les fratries traitées et témoins. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm S.E.M. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ et *** $p < 0.001$, (Student *t*-test), témoin (n=12 fratries) vs. traitées (n=11 fratries) ; témoin (n=68 souriceaux) vs. traités (n=70 souriceaux).

	Témoin	Traité
Souriceaux vivants PN0	7.182 \pm 0.377 (5 à 9)	7.333 \pm 0.512 (5 à 10)
Souriceaux vivants PN5	6.667 \pm 0.236 (5 à 8)	5.917 \pm 0.452 (5 à 9)
Souriceaux mâles /Fratrie	3.625 \pm 0.324	2.250 \pm 0.313**

Le comptage des souriceaux traités et témoins dans chaque portée n'a pas montré de différence significative entre le groupe témoin et le groupe traité avec HgCl₂, (**Tableau 3**). Au jour PN0, la moyenne du nombre de souriceaux est de 7,333 \pm 1,775 chez les sujets traités contre 7,182 \pm 1,25 chez les témoins et de 5 917 \pm 1,564 contre 6,667 \pm 0,707 au jour PN5 ($t = 1,333$, $p = 0,198$). D'autre part l'analyse du nombre des souriceaux mâles par rapport au nombre total des souriceaux est significativement faible dans les fratries traitées au HgCl₂ que dans les fratries témoins.

2. Le poids, la longueur du corps et de la queue des souriceaux

Le poids à la naissance des souriceaux exposés au HgCl₂ est inférieur par rapport aux témoins (**figure A- 30**). En effet, l'exposition prénatale au HgCl₂ a diminué de manière significative le poids corporel des souriceaux traités par rapport aux témoins au jour postnatal

PN5 ($t = 3,400$, $p < 0,001$), 12 ($t = 3,401$, $< 0,001$), 15 ($t = 2,284$, $p = 0,024$) et 17 ($t = 3,271$, $p = 0,001$). Cependant, au jour PN21, nous n'avons pas remarqué une différence significative entre le groupe témoin et le groupe traité ($t = -0,216$, $p = 0,830$).

Comme le montre la **Figure B-30**, l'exposition au chlorure de mercure entraînait une diminution de la longueur corporelle des souriceaux aux jours postnataux PN12 ($t = 2,278$, $p = 0,025$) et PN21 ($t = 2,425$, $p = 0,017$), mais aucune différence significative n'a été enregistrée au jour PN5 ($t = 0,042$, $p = 0,965$), au PN15 ($t = -0,841$, $p = 0,403$) et au PN17 ($t = 0,703$, $p = 0,484$).

Concernant la longueur de la queue, le $HgCl_2$ a entraîné une diminution significative de ce paramètre au jour PN5 ($t = 2,986$, $p = 0,003$), alors qu'aux jours PN12, PN15 et PN17, la différence n'est pas significative (PN12: $t = 0,0664$, $p = 0,947$; PN15: $t = 1,498$, $p = 0,137$; PN17: $t = -0,0630$, $p = 0,950$; PN21: $t = 0,228$, $p = 0,820$), (**Figure C-30**).

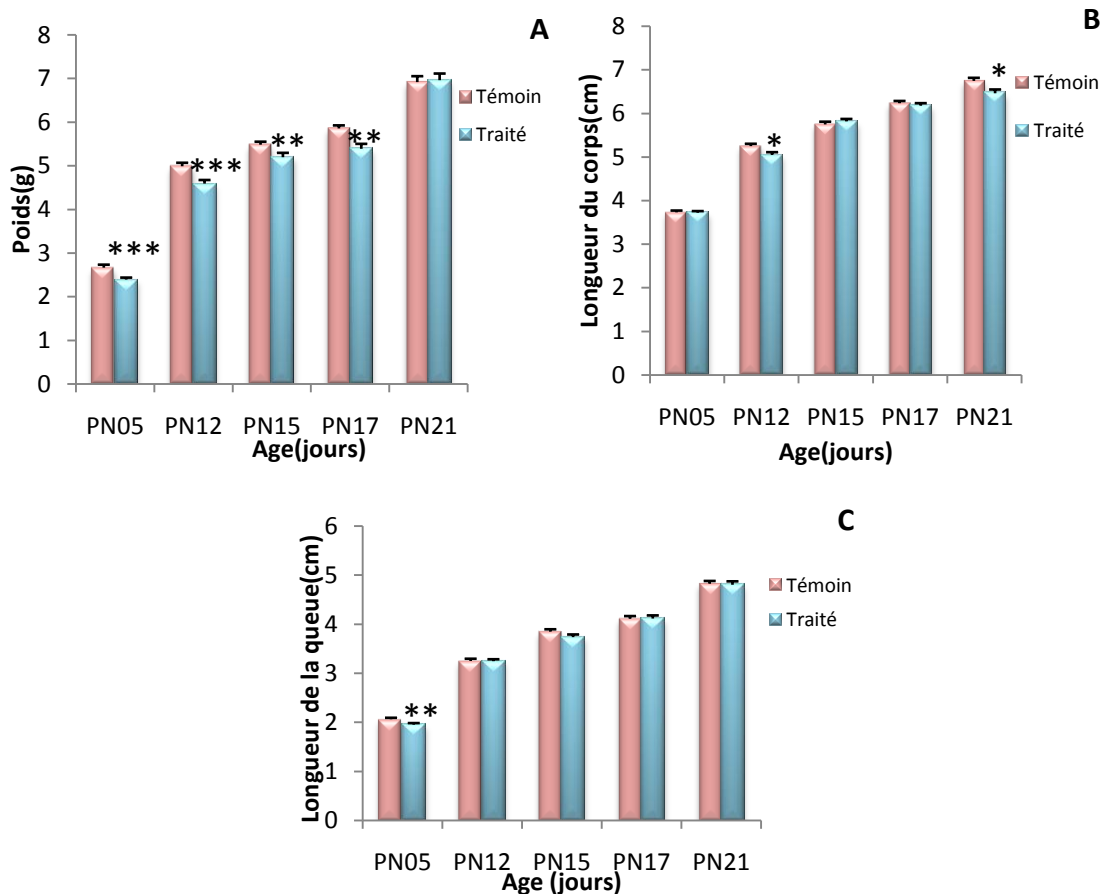


Figure 30: L'évolution du poids (A), de la longueur du corps (B) et de la longueur de la queue (C) chez les souriceaux F1 traités et leurs témoins aux PN5, PN12, PN15, PN17 et PN21 ; Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm S.E.M. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$. traités (n=68) vs. témoins (n=70), (Student *t*-test).

3. Résultats des autres paramètres physiques étudiés

Une maturation tardive de l'apparition des poils, l'éruption des incisives et l'apparition du sexe chez les souriceaux traités au HgCl_2 et sont respectivement: $7,029 \pm 0,0203$ vs $6,867 \pm 0,0512$, $p < 0,01$; $11,643 \pm 0,0646$ vs $11,36 \pm 0,117$, $p < 0,05$ et $11,089 \pm 0,0646$ contre $10,778 \pm 0,11$, $p < 0,05$). Au contraire, les souriceaux traités ont montré un détachement des pavillons des deux oreilles significativement précoce comparée aux souriceaux témoins ($4,439 \pm 0,0616$ contre $4,652 \pm 0,0793$, $p < 0,05$), (Tableau 4)

Tableau 4 : Effet du chlorure de mercure sur les paramètres physiques des souriceaux: détachement des oreilles, apparition des poils, éruption des incisifs, apparition du sexe et ouverture des yeux chez les souriceaux F1 traités mercure et leurs témoins. Les résultats sont présentés sous forme moyenne \pm S.E.M. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ et *** $p < 0.001$. Traité vs. Témoin, (Student *t*- test).

Effet du mercure sur la maturation physique des souriceaux				
	Témoin		Traité	
	Moyenne	SEM	Moyenne	SEM
1 ^{er} jour de détachement des oreilles	4,652	0,0793	4,439*	0,0616
1 ^{er} jour d'apparition des poils	6,867	0,0512	7,029**	0,0203
1 ^{er} jour d'éruption des incisifs	11,36	0,117	11,643*	0,0646
1 ^{er} jour d'apparition du sexe	10,778	0,117	11,089*	0,0646
1 ^{er} jour d'ouverture des yeux	14,774	0,113	14,982	0,179

II-ANALYSE DU COMPORTEMENT

1. Comportement maternel

Les résultats du comportement maternel ont montré que les femelles traitées HgCl₂ allaitent plus passivement que les femelles témoins ($p = 0,032$; $t = -2,407$), alors qu'elles ne présentent aucune différence significative concernant l'allaitement actif et l'allaitement total, (**Figure 31**).

D'autre part nous avons montré que les autres activités maternelles des femelles traitées au HgCl₂ sont diminuées significativement telles que les paramètres contact et manipulation des souriceaux ($p = 0,021$; $t = 3,087$, $p = 0,044$; $t = 2,342$ respectivement) et une abondance significative des activités non maternelles telles que, le temps passé pour se nourrir et pour renifler autour de la cage ($p = 0,030$; $t = -2,580$, $p = 0,039$; $t = -2,368$ respectivement).

a-Score d'allaitement

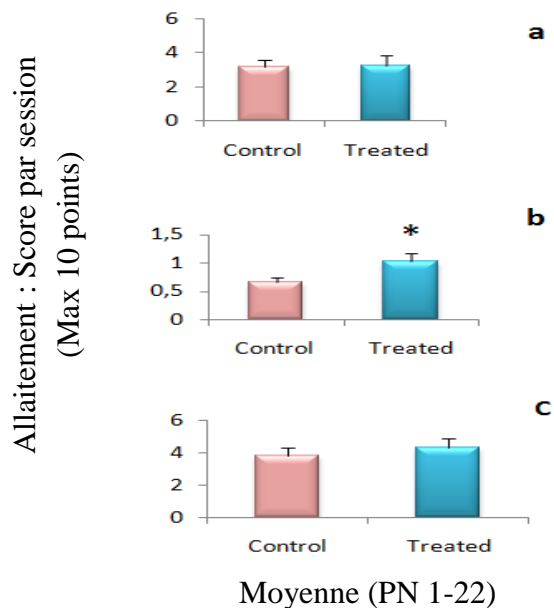


Figure 31: Effet du chlorure de mercure administré durant la gestation et après mise bas sur l'allaitement des femelles F0 traitées par le HgCl₂ par rapport aux femelles témoins du jour PN1 au jour PN22. Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne \pm SEM; témoins (n=8 fratries) vs. traités (n=7 fratries). Allaitement actif(a), Allaitement passif (b) et Allaitement total (c). *p<0.05 (Student *t-test*).

Tableau 5: Les activités maternelles et non maternelles des femelles F0 traités HgCl₂ par le chlorure mercure durant la gestation et après mise bas. Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne± SEM; témoins (n=8) vs. traités (n=7). *p<0.05, (student *t-test*). NA : non analysé

	Témoin	HgCl ₂
Activités maternelles		
-Dans le nid	4.462 ±0.471	3.757 ±0.538
-Contact avec les souriceaux	0.42±0.0598	0.227 ±0.0186*
-Toilettage des des souriceaux	0.166±0.0491	0.144 ±0.0377
-Porte les les souriceaux	NA	NA
- Manipulation des souriceaux	0.222±0.0405	0.102±0.0279*
Les activités non Maternelles		
-Femelle mange	3.127±0.309	4.216± 0.287*
-Femelle boit	0.563±0.0815	0.587±0.193
-Auto-toilettage de la femelle	0.716±0.0562	0.756±0.0555
-Femelle se repose avec les yeux fermés	NA	NA
-Rearing	0.185±0.0491	0.221±0.107
-Reniflement (Sniffing)	0.417±0.0819	0.778±0.128*

2. Résultats du test récupération des souriceaux (Retrieval Test)

Les résultats du test de récupération ont montré que les femelles traitées prennent un temps plus élevé que les témoins pour contacter leurs souriceaux ($p = 0,025$; $t = -2,445$), pour récupérer le premier souriceau au nid ($p = 0,037$; $t = -2,229$) et pour récupérer tous les souriceaux ($p = 0,010$; $t = -2,809$) au nid.

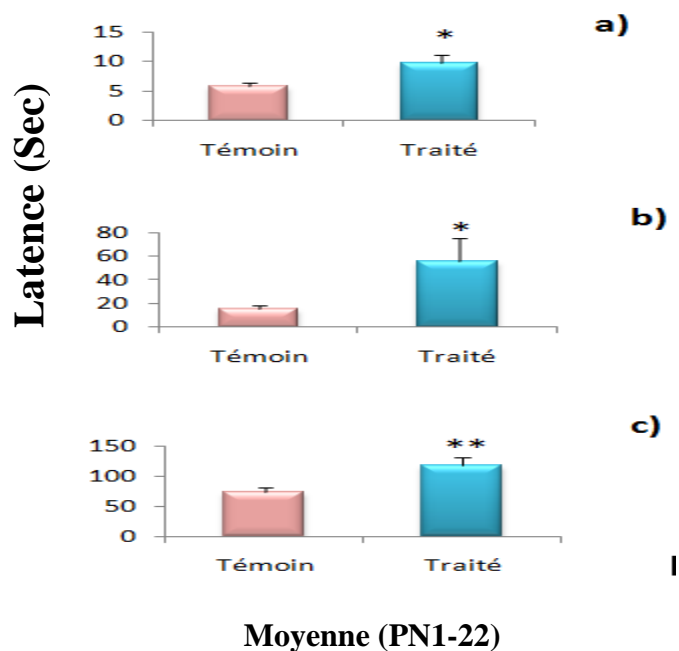


Figure 32: Effet du HgCl₂ administré durant la période de gestation et après mise bas sur les paramètres du test de récupération des souriceaux durant les 12 premiers jours postnataux. Temps pour contacter le premier souriceau (a), Temps pour récupérer le premier souriceau jusqu'au nid (b) et Temps pour récupérer tous les souriceaux au niveau du nid (c). Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne \pm SEM; témoins (n=8) vs. traités (n=7). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, (student *t*-test).

3. Résultats de l'étude du neurodéveloppement chez les souriceaux F1

a- les tests "Surface righting reflex", "Negative geotaxis" et "cliff avoidance."

Les tests "surface righting reflex", "negative geotaxis" et le test "cliff avoidance" sont des tests neurodéveloppementaux qui reflètent les fonctions cérébrales liés à l'adaptation avec l'environnement extérieur. Cependant nous avons montré que le chlorure de mercure a entraîné

une réponse tardive pour tourner avec un angle de 120° au bord de la table dans le test "clif avoidance" ($p = 0,002$; $t = -3,096$). Le même retard a été évalué dans le test "Negative geotaxis" pour les trois jours postnataux PN7 ($p = 0,003$; $t = -3,012$) ; PN9 ($p = 0,002$; $t = -3,114$) et PN13 ($p = 0,025$; $t = -2,262$), alors qu'au niveau du test "surface rithing reflex" le retard n'est significatif qu'au PN5 ($p = 0,05$; $t = -1,922$).

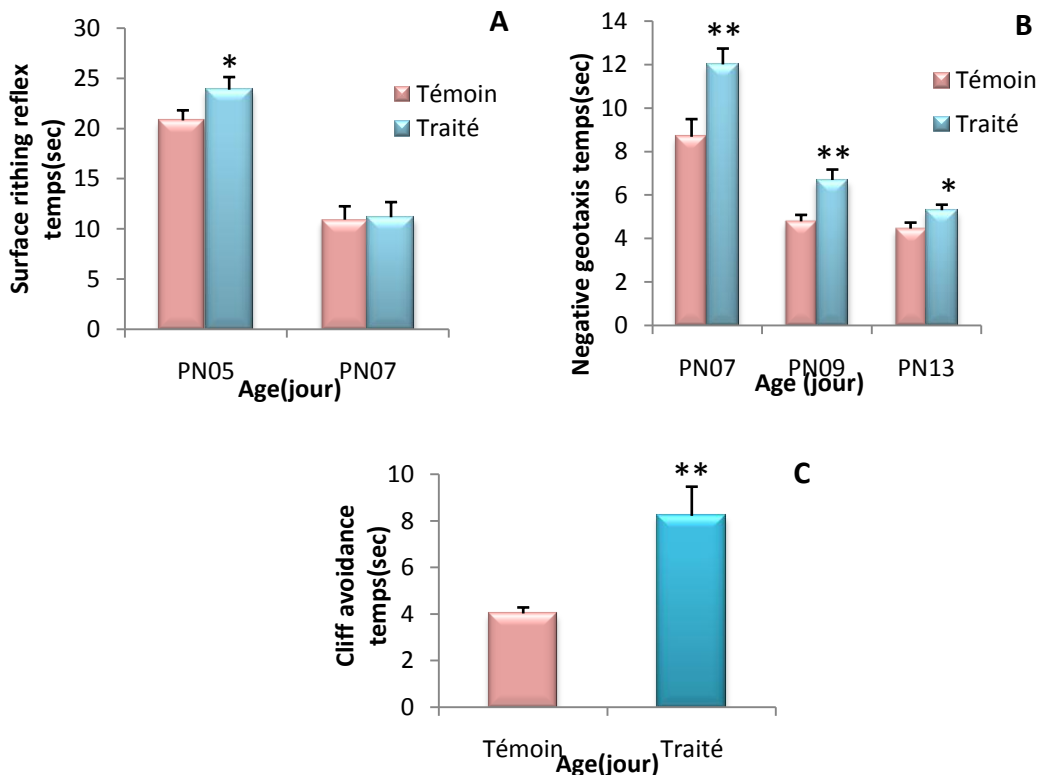


Figure 33 : Analyse du neurodéveloppement des souriceaux traités et leurs témoins correspondants, (A) Surface rithing reflex, (B) Negative geotaxis et (C) Cliff avoidance. Résultats sont présentés comme moyenne \pm S.E.M. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. traité ($n = 68$) vs. témoin ($n = 70$), (Student *t*-test).

b-Le test "Saut vers le bas avec le test de choix" (Jumping down choice cage)

Les souriceaux témoins et traités n'ont montré aucune différence significative pour sauter dans l'une des deux cages (vide ou la cage de la fratrie). Il est à noter que l'analyse par Z-test a montré que le pourcentage de saut dans la cage vide est toujours important chez les souriceaux traités (environ 71%) par rapport au groupe témoin (moins de 5%) au jour postnatal 17 ($z = 4,223$; $p < 0,001$) alors que les souriceaux témoins choisissent de sauter dans la cage de la fratrie

(95%) significativement par rapport aux souriceaux traités (29%) ($z = 4,220$; $p = <0,001$), (Figure 34).

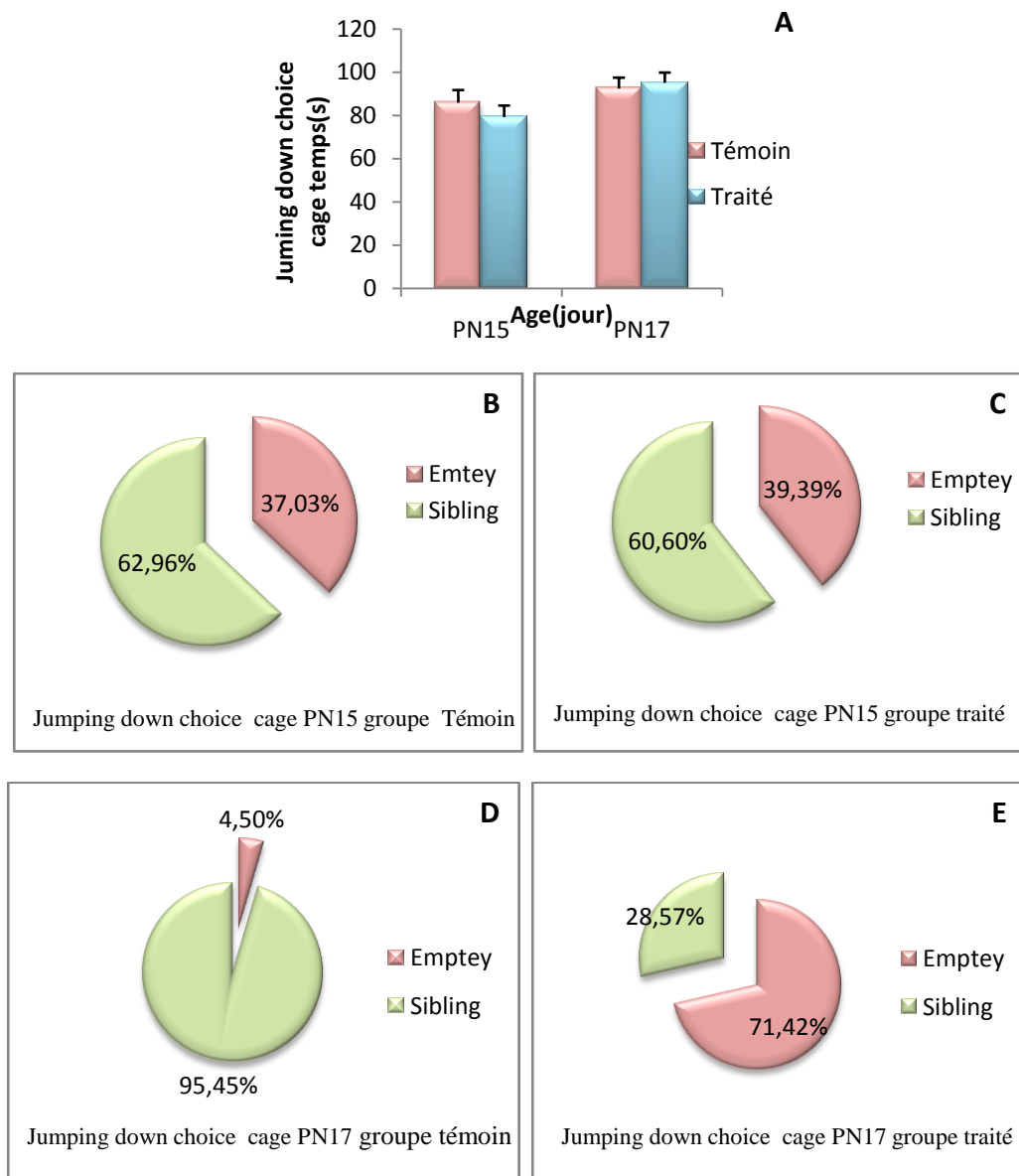


Figure 34 : Effet du mercure sur les paramètres du test "Jumping down choice cages", (A) latence pour sauter dans l'une des deux cages, (B) le choix des souriceaux témoins pour sauter dans les deux cages au PN15, (C) le choix des souriceaux traités pour sauter dans les deux cages au PN15, (D) le choix des souriceaux témoins pour sauter dans les deux cages au PN17, (E) le choix des souriceaux traités pour sauter dans les deux cages au PN17. (student t-test pour analysée la latence pour sauter dans les deux cages) et (Z- test pour analysé le pourcentage du choix), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

c- Le test développement de la natation "Swiming developpement"

En ce qui concerne la direction de la nage et le score utilisation des membres, le groupe traité n'a montré aucune différence significative par rapport aux témoins. Concernant le score angle, le groupe traité a présenté un score significativement inférieur à celui du groupe témoin au jour PN 10 ($t = 3,604$, $p < 0,001$), (Figure 35).

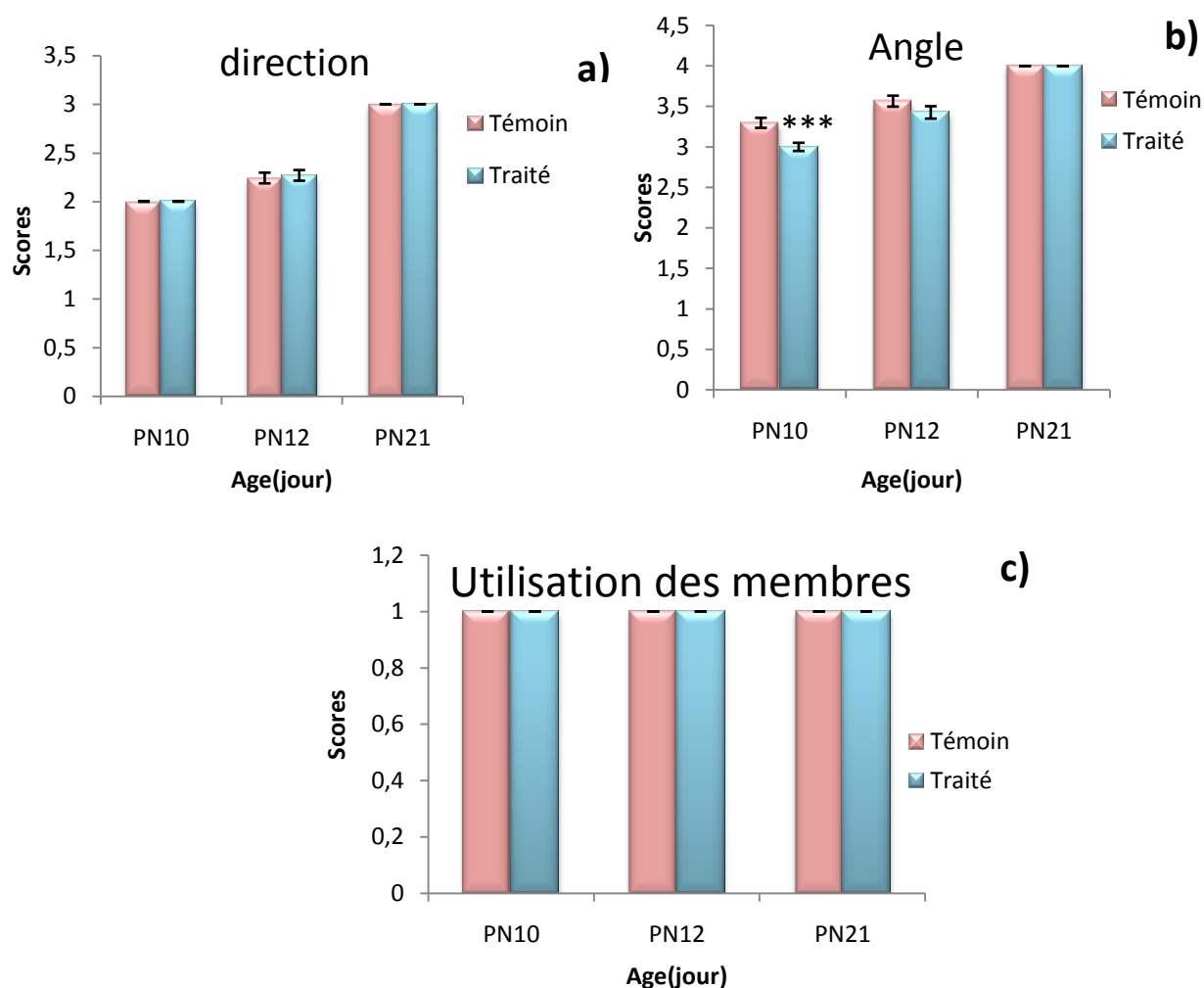


Figure 35: les paramètres du test "développement de la natation". (a) score direction, (b) score angle et (d) score utilisation des membres. Résultats sont présenté comme moyenne \pm S.E.M. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. traité ($n=68$) vs. témoin ($n=70$), (Student t- test).

4. Résultats de l'étude du comportement des souriceaux F1 après sevrage

a- Test Champ ouvert "Open Field"

D'après la figure ci-dessous (**Figure 36-A-B-C**) nous constatons que les souriceaux traités ont montré une diminution significative du pourcentage des carreaux centraux ($p = 0,001$; $t = 4,271$) et du temps au centre ($p = 0,016$; $t = 2,909$) avec une augmentation significative du temps ($p = 0,016$; $t = -2,909$) et des carreaux périphériques ($p = 0,043$; $t = -2,209$) comparées aux témoins.

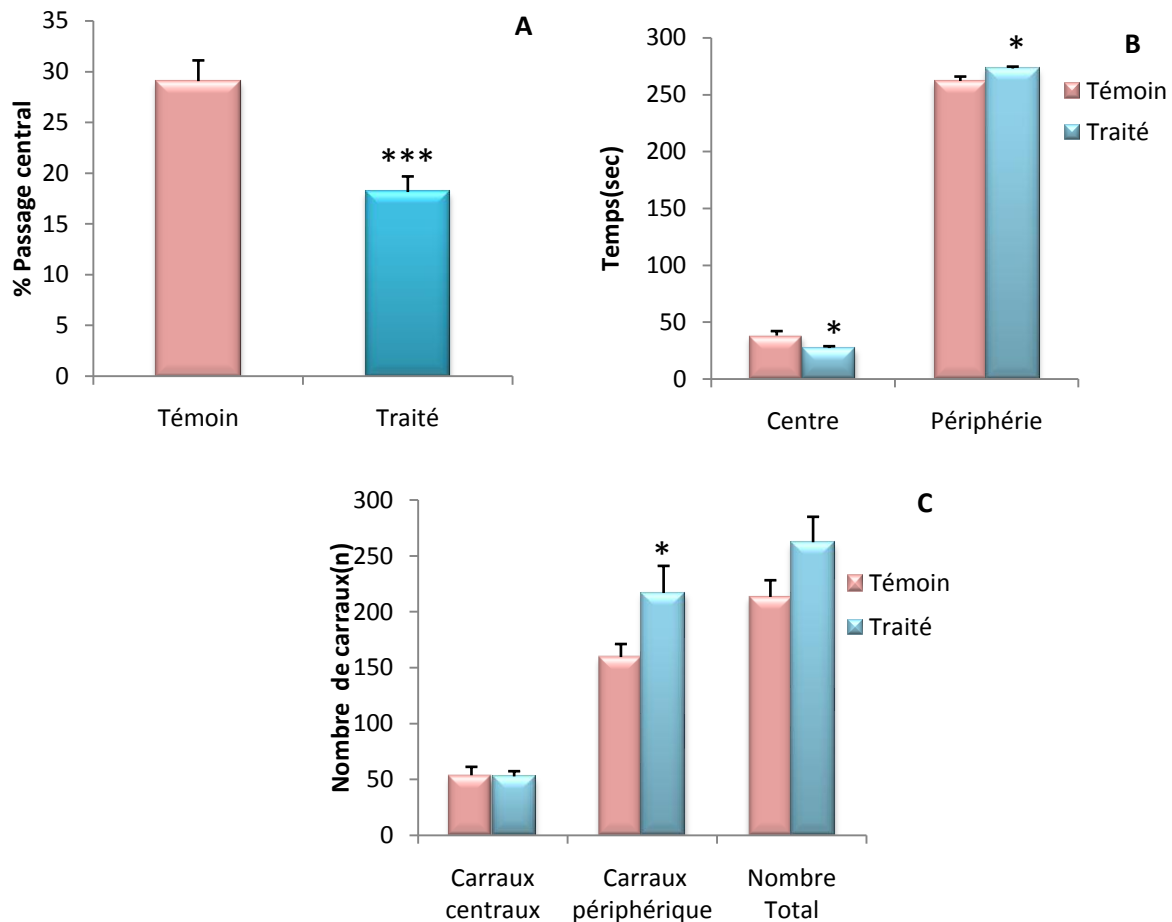


Figure 36 : Résultats de l'effet du $HgCl_2$ sur les paramètres du test "open Field" : (A) Pourcentage des carreaux centraux, (B) Temps dans le centre et la périphérie, (D) Nombres des carreaux centraux, périphériques et des carreaux totaux traversés par les souriceaux traités par le mercure et leurs témoins. Les valeurs sont présentés sous forme de moyenne \pm SEM; témoins ($n=10$) vs traités ($n=10$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, (student t -test).

b-Test reconnaissance des objets

Ce test nous a permis d'évaluer les effets du chlorure de mercure sur le temps d'exploration des deux objets présentés, A et B, et sur l'indice de reconnaissance chez des souris traitées et leurs témoins. Nos résultats ont montré que le temps d'exploration du nouvel objet et l'indice de reconnaissance sont significativement plus faibles chez le groupe traité que celui du groupe témoin ($p = 0,023$; $t = 2,909$, $p = 0,020$; $t = 3,161$) (**Figure 37**).

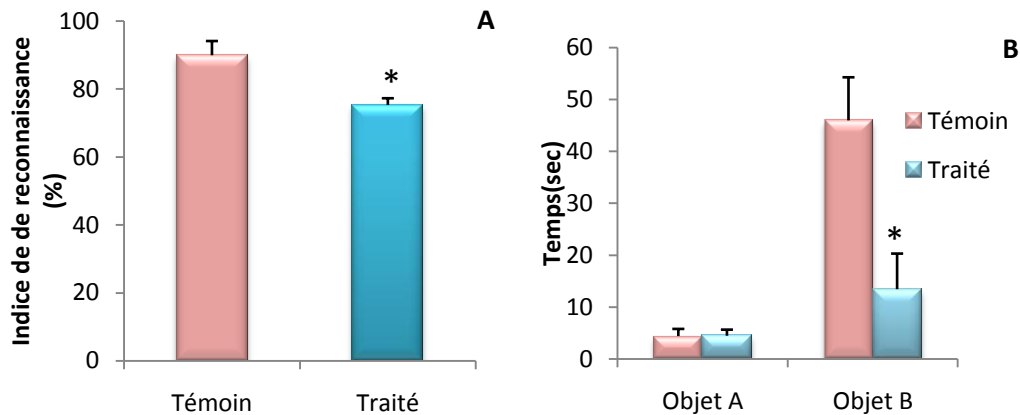


Figure 37: Performance de reconnaissance des objets des souris F1 traitées par le HgCl_2 ainsi que leurs témoins: (A) l'indice de reconnaissance, (B) Le temps passé près de chaque objet A et B. Les valeurs sont présentées en moyenne \pm SEM. Témoins ($n=10$) vs. Traités ($n=10$) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, (student *t*-test).

c-Test Labyrinthe en Y " Y-Maze"

Les résultats de l'effet du chlorure de mercure sur l'alternance spontanée des souris dans le labyrinthe en Y ont montré que le pourcentage d'alternance ($p = 0,014$; $t = 3,027$) et le nombre d'entrées ($p = 0,016$; $t = 3,299$) dans les trois bras est significativement plus faibles chez les souris traitées par rapport aux témoins. (**Figure 38**).

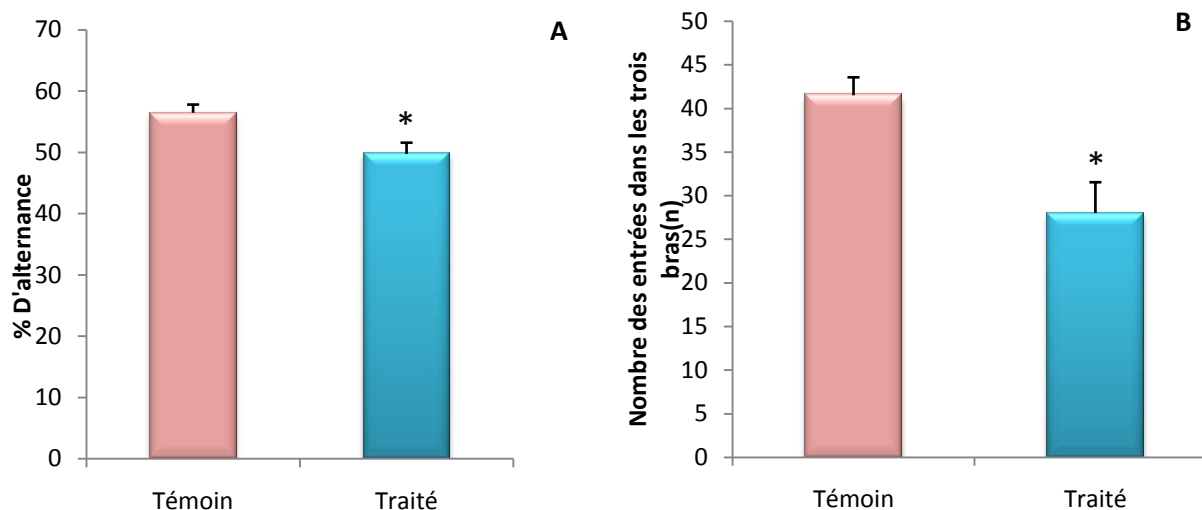


Figure 38: Performance d'alternance des souriceaux F1 traités et témoins dans le labyrinthe en Y. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm SEM, (A) Pourcentage d'alternance, (B) Nombre des entrées dans les trois bras. témoins (n=10), traités (n=10)* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, (student *t*-test).

d-Test Labyrinthe en croix surélevée " EPM"

Les résultats de cette expérience montrent que le HgCl_2 a un effet anxiogène sur des souriceaux âgés de 25 jours postnatals et qui sont intoxiqués durant la vie fœtale et pendant la période postnatale via le lait maternel. En effet l'analyse des résultats du test " EPM" a montré un indice d'anxiété élevé ($p = 0,043$; $t = -2,407$), accompagné par une diminution du pourcentage du temps dans les bras ouverts ($p = 0,024$; $t = 2,711$) et une diminution du pourcentage des entrées dans les bras ouverts ($p = 0,042$; $t = 2,375$) chez les souriceaux traités par rapport aux témoins.

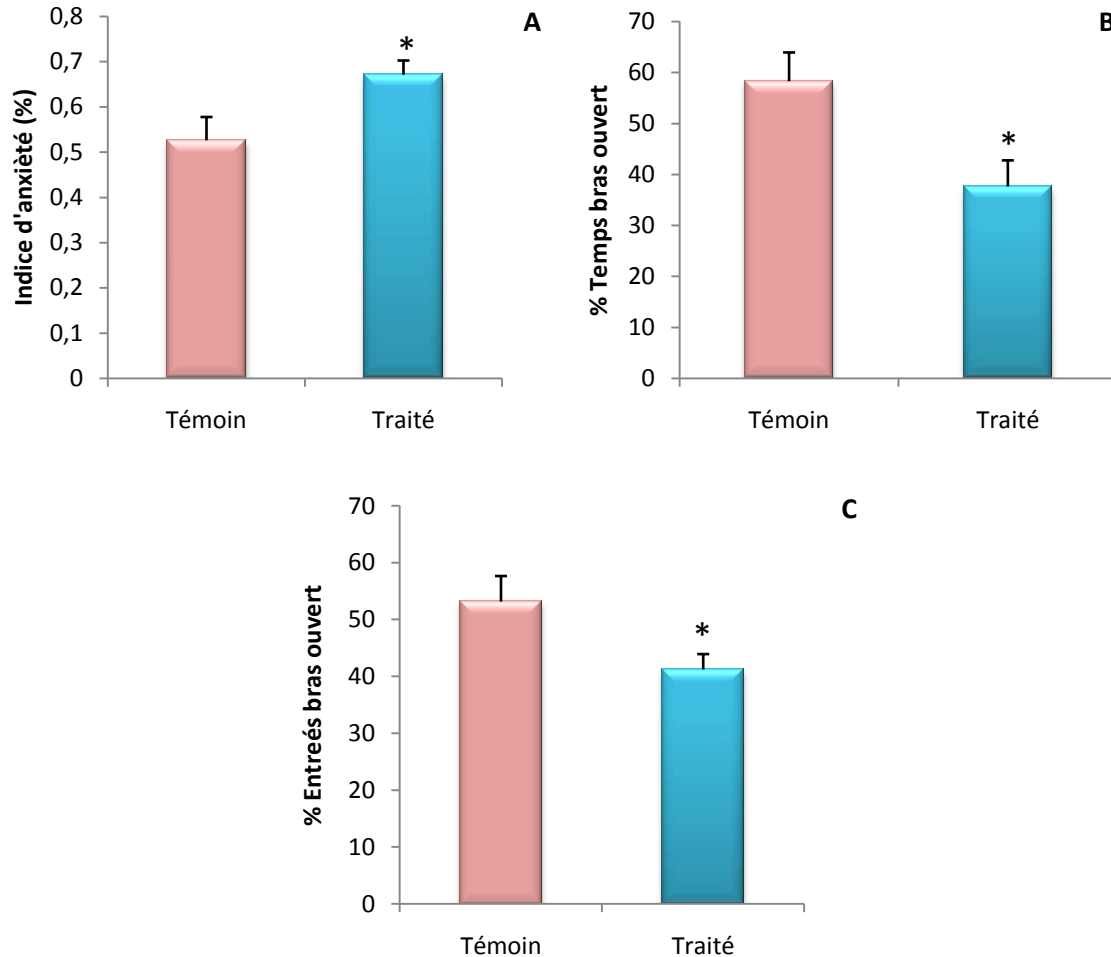


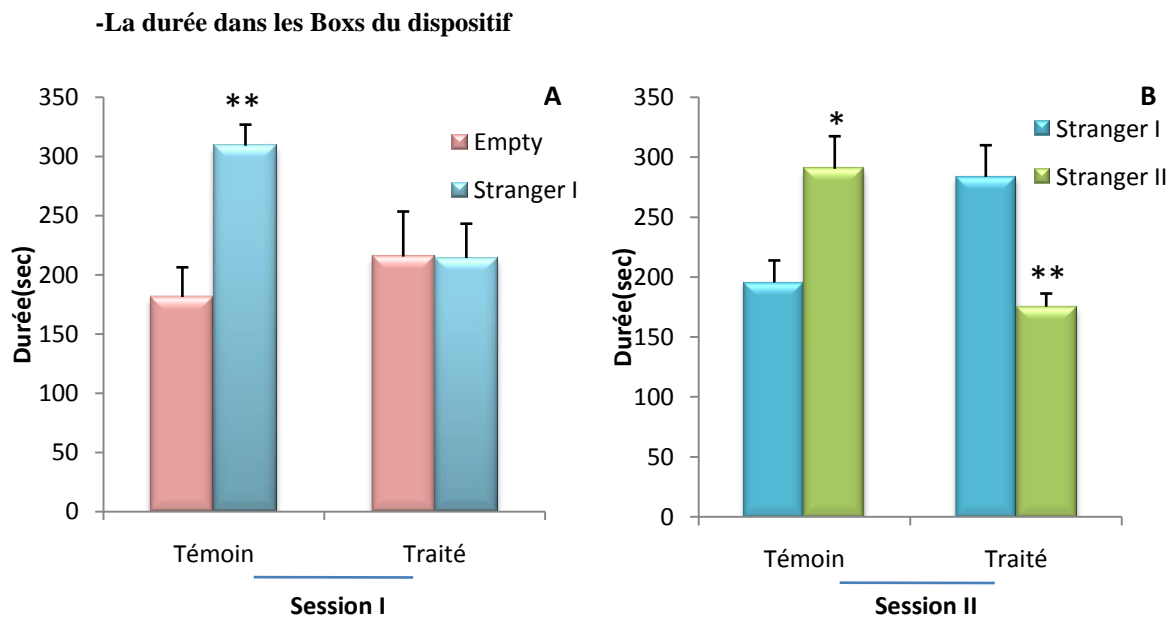
Figure 39 : Résultats du test labyrinthe surélevé (EPM) : (A) Indice d'anxiété, (B) pourcentage du temps dans les bras ouverts et (C) pourcentage des entrées dans les bras ouverts chez les souriceaux F1 traités et témoins. Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne \pm SEM; témoins (n=10) vs. Traités (n=10). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, (student *t-test*).

e-Test Interaction Social

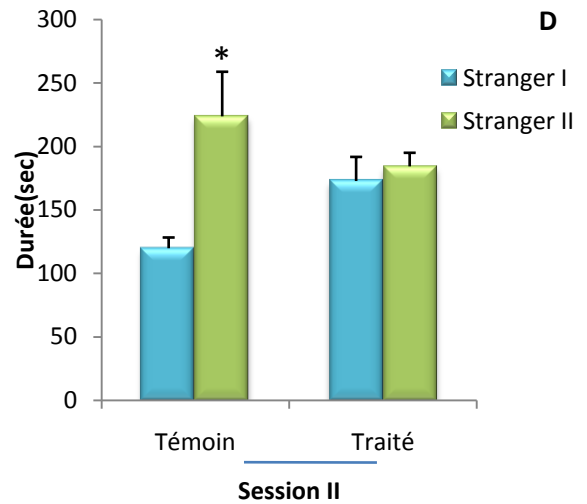
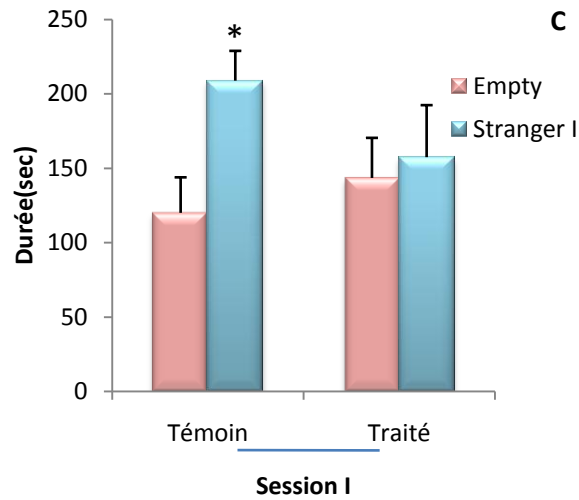
Ce test montre la sociabilité des souriceaux vis-à-vis des souris étrangers pendant deux sessions. Nos résultats montrent que le chlorure de mercure a diminué la sociabilité des souriceaux traités d'une part par la diminution du temps passé dans le box du souriceau "étranger 2" par rapport au souriceau "étranger 1" dans la deuxième session ($p = 0,005$; $t = -3,553$) alors qu'ils n'ont pas montré de différence significative dans la première session. Les souriceaux témoins ont passé plus de temps dans le box de "l'étranger 1" dans la première session ($p = 0,002$; $t = 4,020$) et plus de temps dans le box de "l'étranger 2" dans la deuxième session ($p =$

0,015 ; $t = 2,979$). D'autre part le temps de contact entre les souriceaux traités et les étrangers 1 et 2 dans les deux sessions n'est pas significatif alors que les témoins passent plus de temps au contact des souriceaux étrangers 1 et 2 dans les deux sessions ($p = 0,015$; $t = 2,853$, $p = 0,037$; $t = -2,565$ respectivement).

En outre de la sociabilité, le test "interaction social" peut renseigner sur l'état d'anxiété chez les souriceaux par le paramètre "grooming". Les souriceaux traités par le $HgCl_2$ ont montré un temps de "grooming" significativement élevé dans la première session ($p = 0,028$; $t = -2,533$) et ceci confirme les résultats obtenus par les tests "EPM" et "Open Field".



-La durée en contact des grilles des souriceaux



-La durée de Grooming

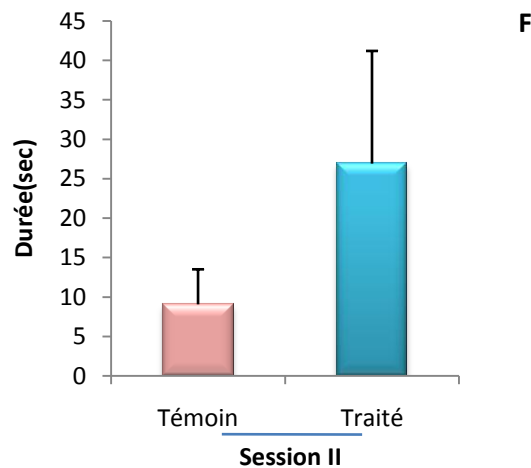
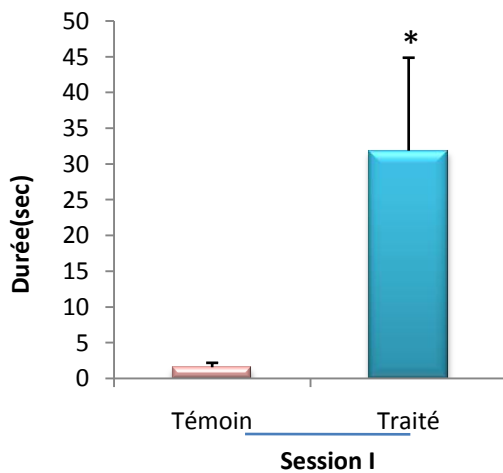


Figure 40 : Performance des souriceaux F1 traités et témoins dans le test "interaction social", (A) et (B) la durée dans les deux boxes du dispositif (**session I et II**), (C) et (D) la durée des souriceaux en contact des deux grilles des souris étrangers (**session I et II**), (E) et (F) durée de grooming dans les deux (**sessions I et II**). Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne \pm SEM; témoins (n=10). vs traités (n=10). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, (student *t-test*).

5. Résultats de l'étude du comportement à l'âge adulte

a- Test Champ ouvert "Open Field"

L'analyse des résultats du test "open field" chez la souris adulte a révélé un effet significatif du traitement par HgCl₂ au niveau de ce test. Ainsi, le temps passé à la périphérie est significativement plus élevé chez le groupe traité que chez le groupe témoin ($272,461 \pm 2,64$ vs. $259,129 \pm 3,766$; $p = 0,009$) (**Figure 41-B**). De plus, le nombre de carreaux périphériques est plus élevé chez les animaux traités que chez les témoins ($211,71 \pm 7,831$ contre $147,286 \pm 13,016$; $p = 0,004$) (**Figure 41-C**), alors que le pourcentage des carreaux centraux traversés par les témoins est plus élevé que celui des souris traitées (**Figure 41-A**). Concernant l'activité locomotrice totale, nous n'avons constaté aucune différence significative entre les souris traitées et les souris témoins.

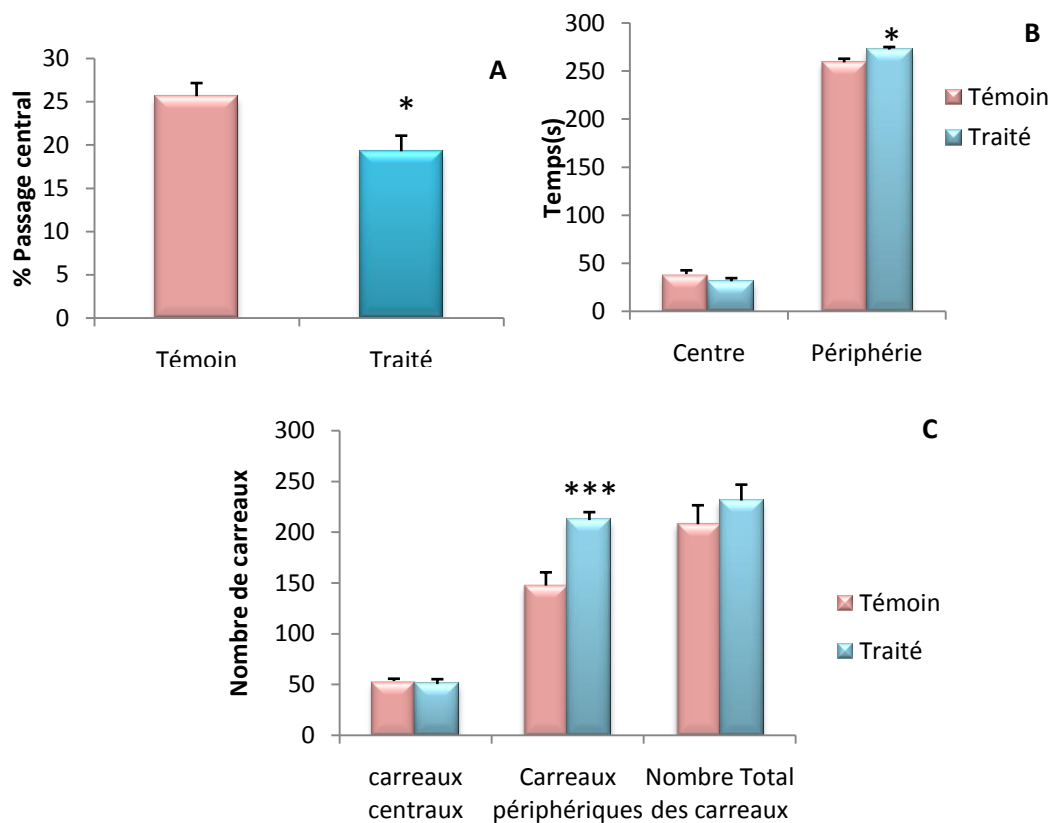


Figure 41: Performance des souris adultes témoins et traitées dans le test "open field". (A) pourcentage des carreaux centraux, (B) Temps passé dans le centre et la périphérie et (C) Nombre

des carreaux traversés. Les valeurs sont présentés comme moyenne \pm SEM; témoins (n=10) vs traités (n=10). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, (student *t-test*).

b- Test Reconnaissance des objets

Dans ce test nous avons étudié l'effet du mercure sur le temps d'exploration des deux objets A et B et sur l'indice de reconnaissance des souris F1 adultes traitées mercure et leurs témoins. Les résultats obtenus montrent que le mercure diminue significativement l'indice de reconnaissance chez les souris traitées par rapport aux témoins (p= 0,047 ; t = 2,156), alors que le temps d'exploration des deux objets (familier et nouvel) diffèrent significativement entre les deux groupes (Objet familier, t = - 2.375, p = 0.032, nouvel objet, t= 2.947, p = 0.026), (**Figure 42**).

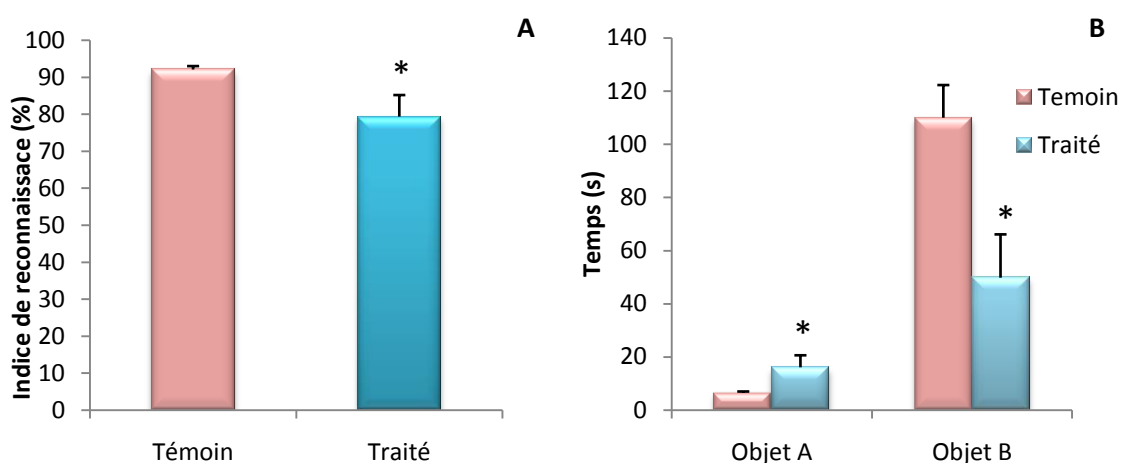


Figure 42: Effet du HgCl₂ sur (A) l'indice de reconnaissance, (B) Le temps de contact des objets A et B des souris traitées par le chlorure de mercure et leurs témoins. Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne \pm SEM; témoins (n=10).vs traités (n=10). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, (student *t-test*).

c- Test labyrinthe en "Y-Maze"

Dans ce test nous avons mesuré l'effet du HgCl₂ sur l'alternance spontanée des souris F1 adultes dans le test Y-maze. Nos résultats ont montré la diminution du pourcentage d'alternance (p = 0,011 ; t = 3,054) et d'activité locomotrice par une diminution du nombre des entrées dans les trois bras du dispositif (p = 0,026 ; t = 2,435) chez les souris traitées par rapport aux témoins.

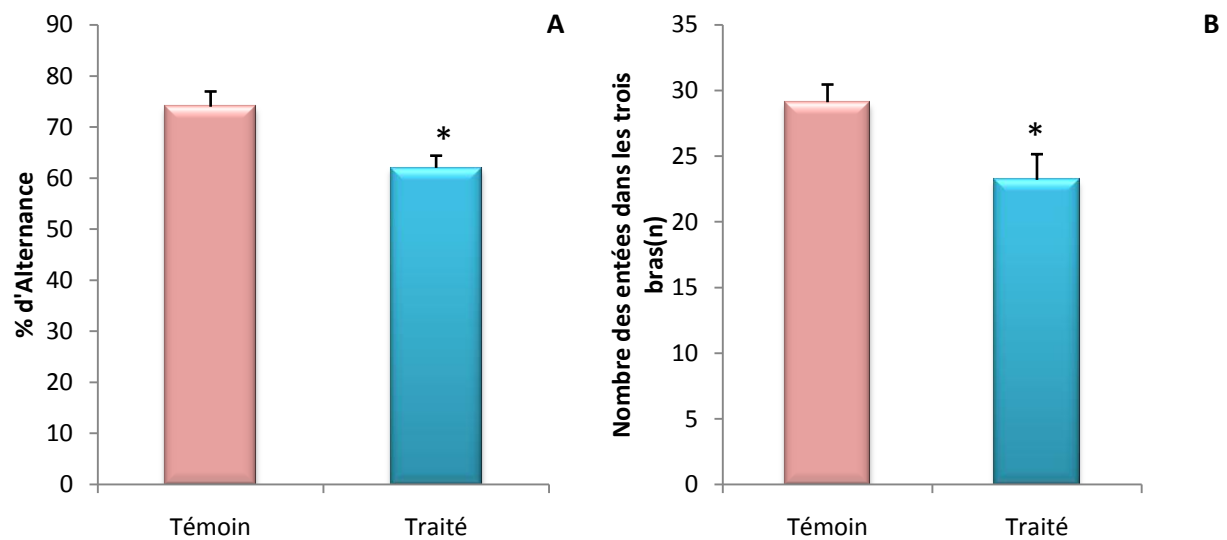


Figure 43 : Performance des souris traitées par le HgCl_2 et leurs témoins dans le test de labyrinthe en Y, **(A)** Pourcentage d'Alternance, **(B)** Nombre des entrées dans les trois bras du dispositif. Les valeurs sont présentées sous forme moyenne \pm SEM; témoins (n=10) vs. traités (n=10. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, (student *t*-test).

d- Test Labyrinthe en Croix surélevé "EPM test"

L'analyse des paramètres obtenue au niveau de l'EPM a montré un effet significatif du chlorure de mercure sur les souris F1 adultes traitées. Dans cette expérience les souris traitées ont montré un indice d'anxiété élevée par rapport aux témoins ($t = -2.445$, $p = 0.050$) et un temps d'exploration faible au niveau des bras ouverts ($t = 2.573$, $p = 0.030$). Nous avons également observé un pourcentage réduit d'entrées dans les bras ouverts après le traitement par le HgCl_2 dans ce test comportemental ($t = 2,637$, $p = 0,030$), **(Figure 44)**.

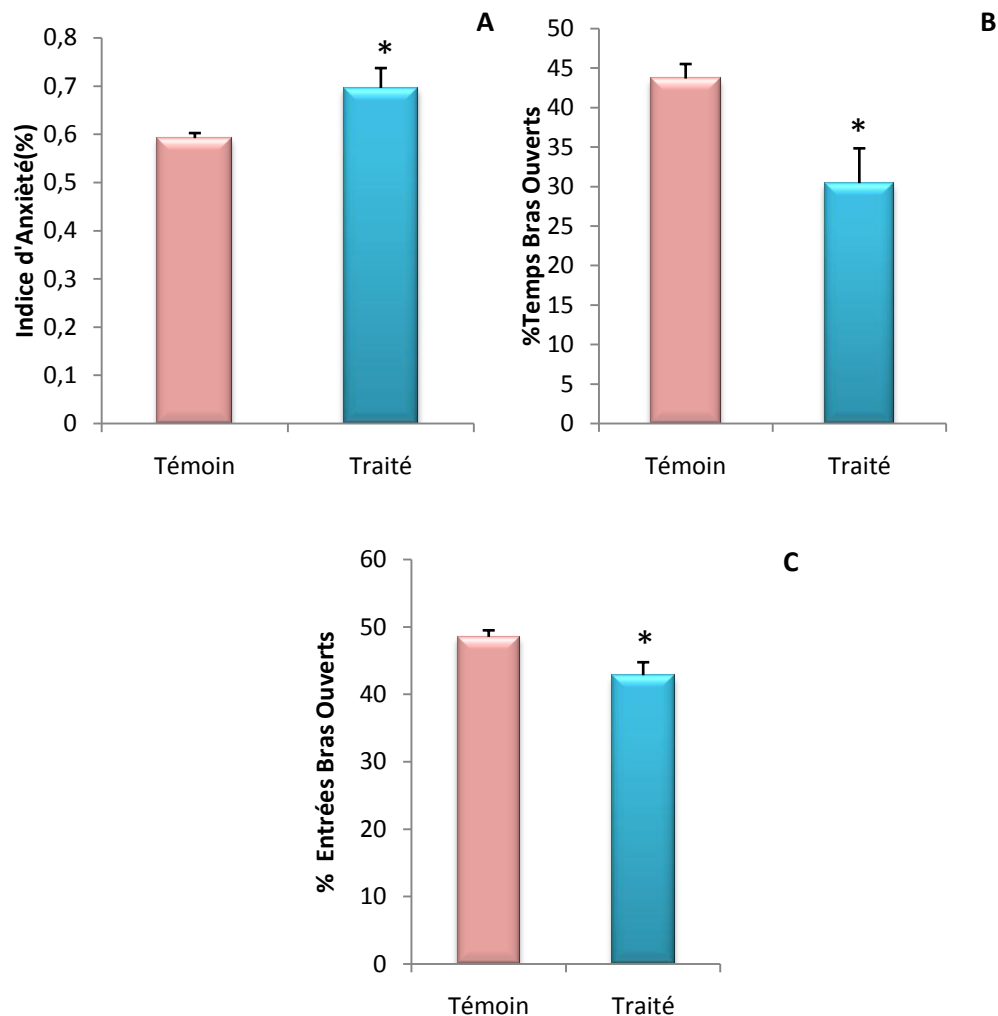


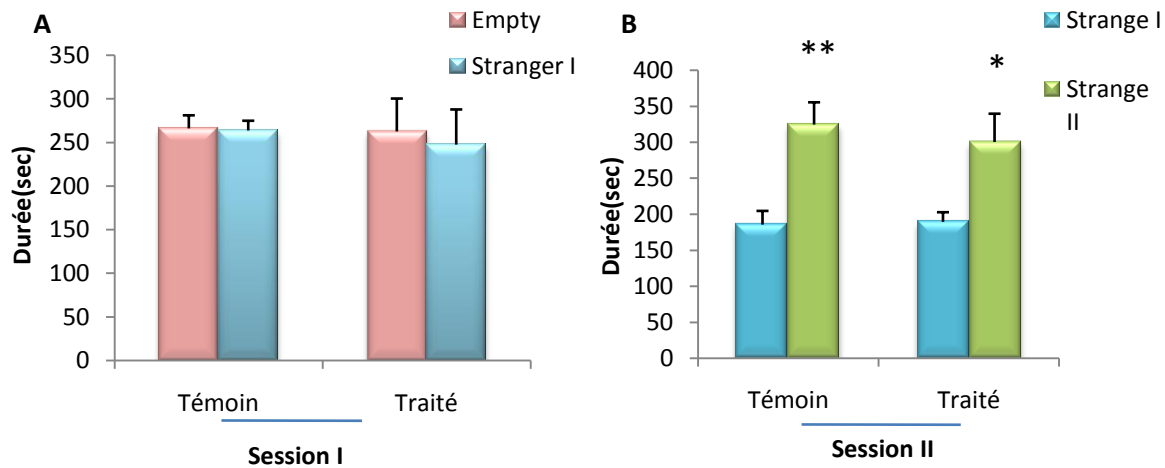
Figure 44 : Résultats de l'étude de l'anxiété par le test "EPM" chez les souris traitées F1 adultes et leurs témoins. (A) Indice d'anxiété, (B) Pourcentage du temps dans les bras ouverts et (C) Pourcentage des entrées dans les bras ouverts. Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne \pm SEM; témoins (n=10) vs. traités (n=10), (student *t-test*).

e- Test de l'interaction sociale

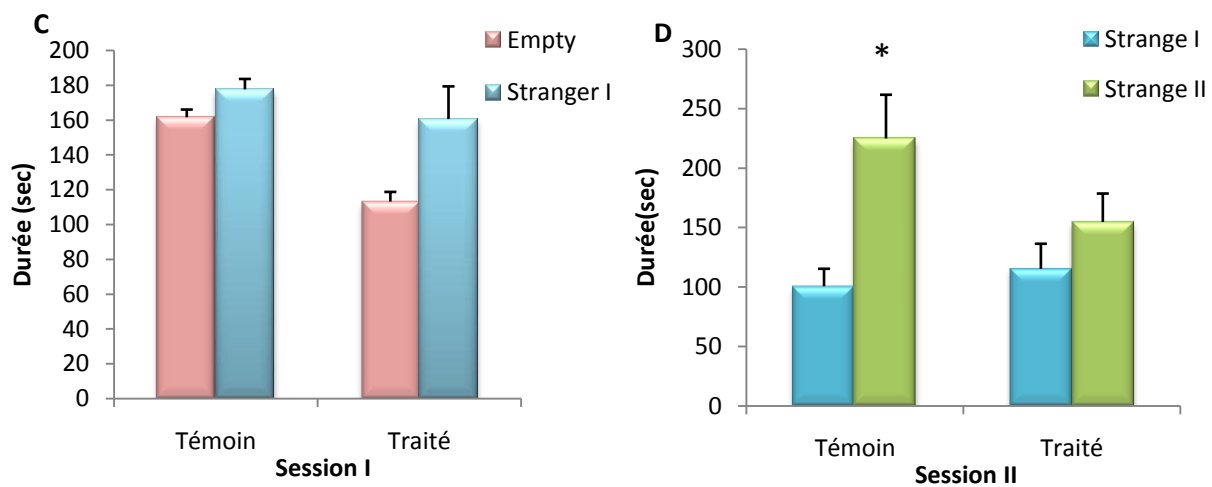
La sociabilité des souris F1 adultes traitées au chlorure de mercure a été évaluée dans le dispositif du test de comportement social à trois chambres. Pour cette procédure, nous avons utilisé des souris de même âge, et le temps passé dans chaque compartiment (avec ou sans souris étranger) et le temps de l'auto-toilettage (grooming) ont été mesurés. Les résultats obtenus ont montré un déficit de ce comportement chez les souris F1 adultes traitées avec du chlorure de mercure. Ainsi, les souris témoins ont passé significativement plus de temps à explorer la

nouvelle souris étrangère (stranger 2) que la première souris étrangère (stranger 1) ($t = -3.134$, $p = 0.014$) dans la deuxième session, alors que les souris traitées n'ont montré aucune préférence d'exploration entre les deux souris étrangères ($t = -1,235$, $p = 0,263$). En ce qui concerne l'auto-toilettage (grooming), le traitement par le $HgCl_2$ a augmenté significativement le temps de grooming répétitif au cours des deux sessions analysées ($t = -3,081$, $p = 0,027$ et $t = -2,736$, $p = 0,034$) chez les souris traitées par rapport aux témoins (**Figure 45**).

-La durée dans les boxs du dispositif



-La durée du contact des souris étrangères



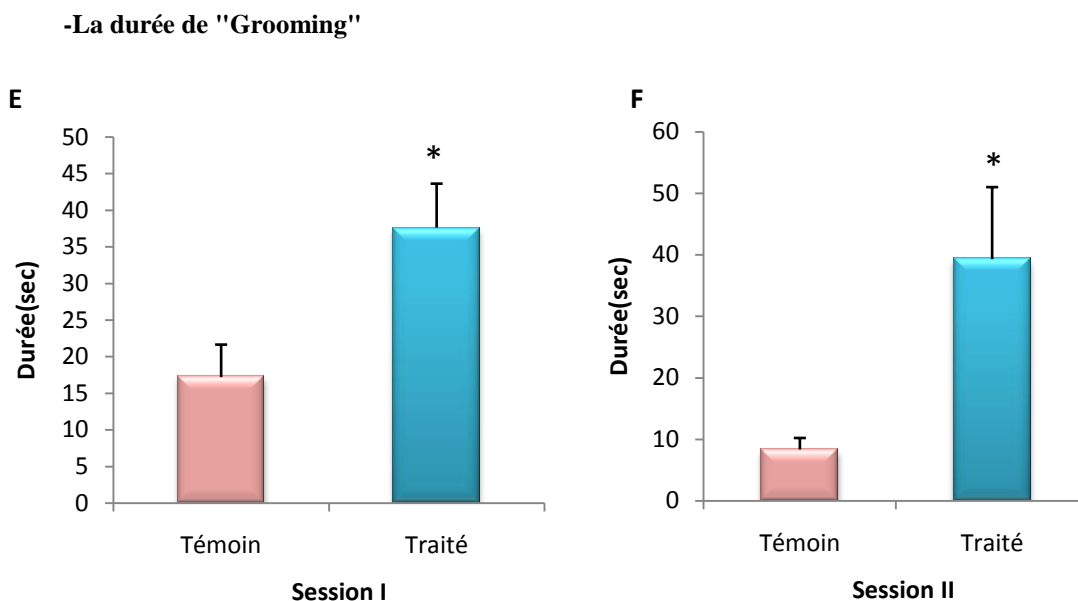


Figure 45 :Le comportement social des souris témoins et traitées adultes F1 par le mercure dans le test de l'interaction social, (A) et (B) la durée dans les deux boxes du dispositif (**session I et II**), (C) et (D) la durée des souris en contact des deux grilles des souris étrangers (**sessions I et II**), (E) et (F) "grooming" dans les deux **sessions I et II**. Les valeurs sont présentés comme moyenne \pm SEM); Témoins (n=10) Traités (n=10) *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, (student *t-test*).

III-RESULTATS DE LA CONSOMMATION DE L'EAU CHEZ LES SOURIS

1. La consommation d'eau chez les femelles gestantes F0 et la préférence au sucre chez les souris adultes F1

En raison du goût particulier du mercure, nous avons d'abord évalué son impact sur la consommation d'eau par le groupe expérimental ayant reçu du HgCl_2 dans l'eau, et nous n'avons constaté aucune différence statistique concernant la consommation quotidienne d'eau entre les souris femelles F0 traitées et leurs témoins pendant la gestation ($7,73 \pm 0,56$ ml vs $7,39 \pm 0,49$ ml; $t = 0,451$, $p = 0,655$).

Dans un autre groupe expérimental, chez des souris F1 adultes, nous avons mesuré la quantité consommée d'une solution sucrée (eau contenant 1% de saccharose) et nous l'avons comparée à la consommation standard d'eau douce (de robinet chez les témoins) ou à une solution de HgCl_2 (chez les traitées). La quantité consommée de la solution sucrée est de $4,91 \pm$

0,242 contre $3,423 \pm 0,432$ chez les témoins et de $8,037 \pm 0,245$ contre $1,22 \pm 0,192$ de solution de HgCl_2 chez les souris traitées (**tableau 6**).

Tableau 6: La consommation d'eau des femelles gestantes témoins (n=6) et du traitement HgCl_2 des femelles traitées F0 (n=6) avec la consommation de l'eau sucrée des mâles adultes F1 traités (n=6) et témoins (n=6). Les valeurs sont présentés comme moyenne \pm SEM. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, (student *t-test*).

Effet du mercure sur la consommation d'eau chez les femelles F0 gestantes et chez les souris F1 adultes		
	Témoin	Traité
La consommation d'eau ou du traitement chez les femelles gestantes:		
	7,39 \pm 0,49	7,73 \pm 0,56
La consommation d'eau chez les males adultes F1 :		
L'eau normale (de robinet) ou le traitement HgCl_2	3,42 \pm 0,432	1,22 \pm 0,192***
L'eau sucrée	4,91 \pm 0,242	8,037 \pm 0,245***

IV- RESULTATS DE LA MOTILITE DE COLON

Les résultats de cette expérience ont montré que le chlorure de mercure n'a pas d'effet sur la motilité du colon chez les souris F1 adultes traitées, cependant on remarque une augmentation de cette motilité chez les souris traitées comparés aux témoins mais qui est n'est pas significative.

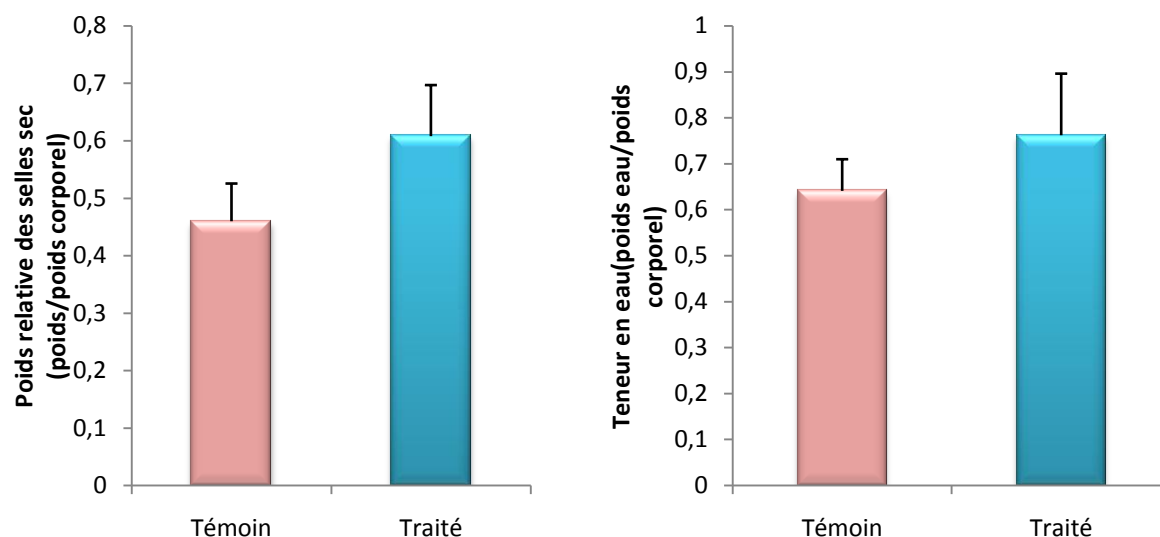


Figure 46 : Le poids relatif et la teneur en eau dans les selles des souris mâles traitées F1 et témoins adultes. Les valeurs sont présentées comme moyenne \pm SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. témoin (n=6) vs. traité (n=6), (student *t-test*).

V-EFFET DU HgCl₂ SUR LE POIDS DES ORGANES

1. Résultats du poids relatif des organes des souriceaux

Les résultats du poids relatif du cerveau des souriceaux F1 traités par le HgCl₂ ont montré une augmentation significative au PN5 ($p = 0,05$; $t = -2,042$), qui est devenue très hautement significative au PN10 ($p = 0,004$; $t = 3,169$) et très significative au PN15 ($p = 0,014$; $t = 2,817$) alors qu'au jour PN21 nous n'avons pas marqué de différence significative.

Le poids relatif du foie des souriceaux traités et témoins durant les 21 jours postnataux a montré que le traitement par le HgCl₂ a augmenté significativement le poids du foie par rapport au poids corporel au jour PN5 ($p = 0,019$; $t = -2,525$). Cependant au jour PN15 ce pourcentage a été inversé et devenue significativement faible ($p = 0,022$; $t = 2,572$).

La présence du mercure au niveau rénal a augmenté significativement le poids relatif des reins au jour PN21 ($p = 0,003$; $t = -3,804$) chez les souriceaux traités comparé aux témoins alors qu'il n'est pas significatif au jour PN15, (**Figure 47**).

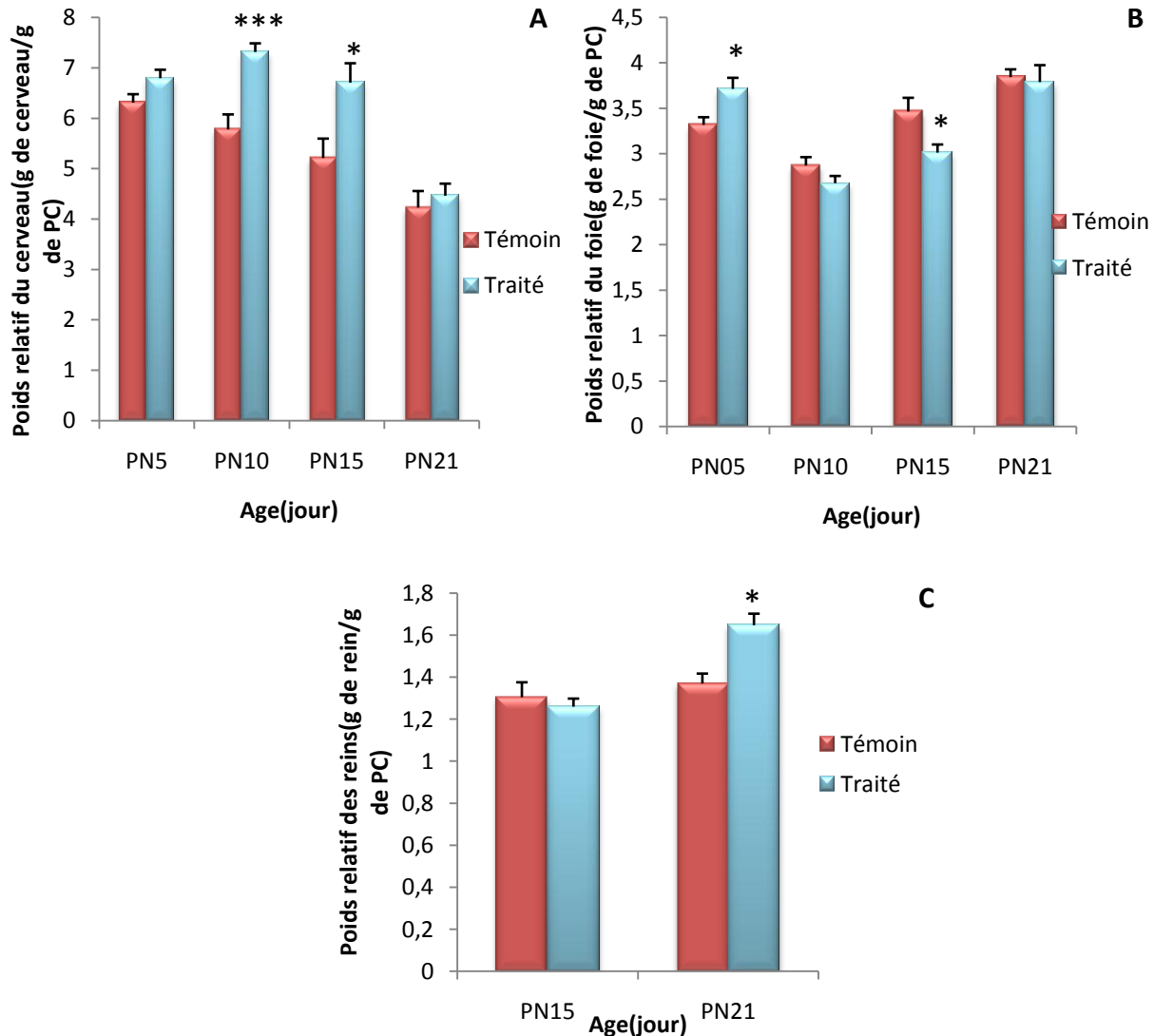


Figure 47: Poids relatif du cerveau(A), du foie(B) et des reins(C) chez les souriceaux F1 traités et leurs témoins. Le cerveau et le foie (PN05 ; PN10 ; PN15 ; PN21) et (PN15 et PN21) pour les reins. Les valeurs sont présentées comme moyenne \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, (student *t-test*).

2. Poids relatif des organes chez les souris F1 adultes

Les organes des souris F1 adulte traitées par le HgCl₂ ont montré un poids relatif significativement élevé que les témoins au niveau du cerveau ($p = 0,003$; $t = -4,332$), Foie ($p = 0,05$; $t = -2,676$) et au niveau des reins ($p = 0,044$; $t = -2,449$), (**Figure 48**).

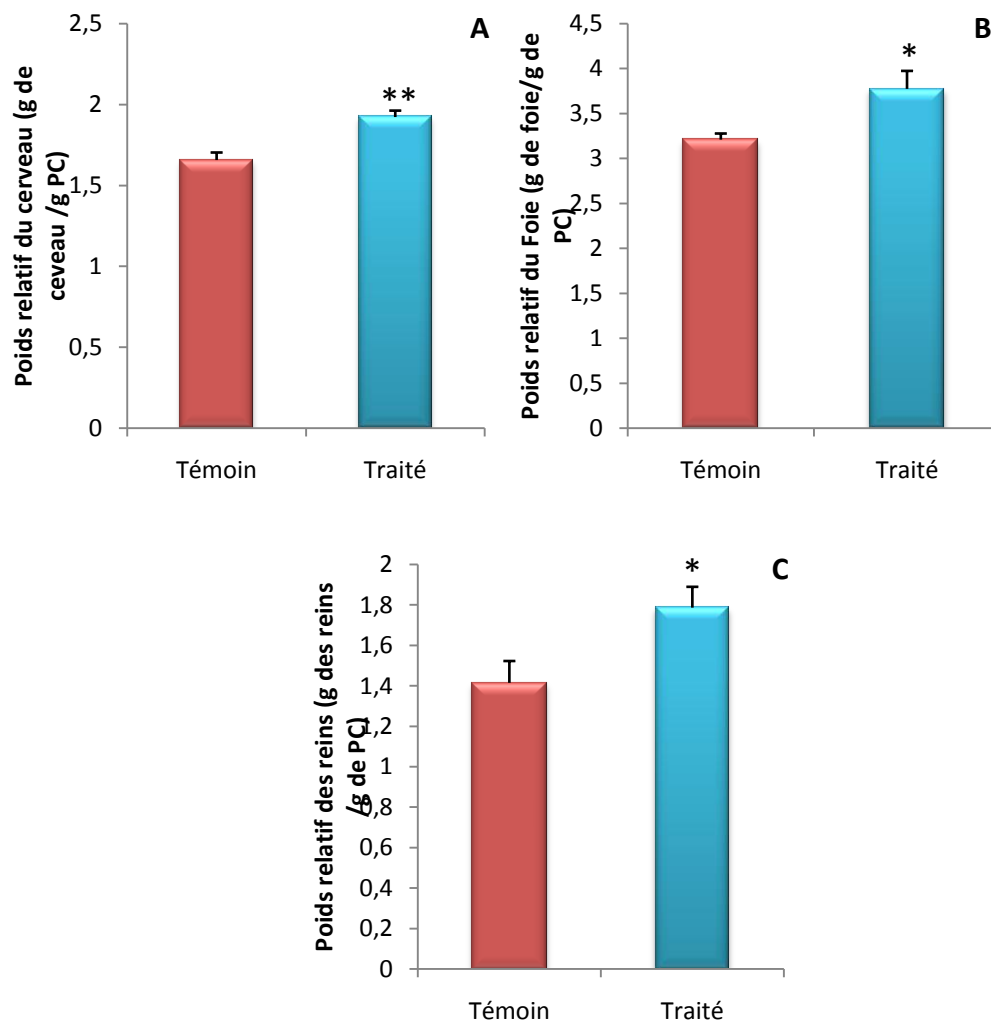


Figure 48: Poids relatif du cerveau (A), du foie (B) et des reins (C) chez des souris F1 traitées adultes et leurs témoins. Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne \pm SEM; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, (student *t-test*).

PC : poids corporel

VI-RESULTATS DU DOSAGE DE L'ACETYLCHOLINESTERASE

a-Chez les souriceaux

L'activité acétylcholinestérasique chez les souriceaux témoins est en évolution normale du jour postnatal PN5 jusqu'au jour PN21 alors que les souriceaux traités par le HgCl_2 ont montré une suractivation significativement importante au jour PN10 ($p = 0,016$; $t = -2,948$) et cette valeur est devenu stable dans les jours postnatales suivants, (**Figure 49**).

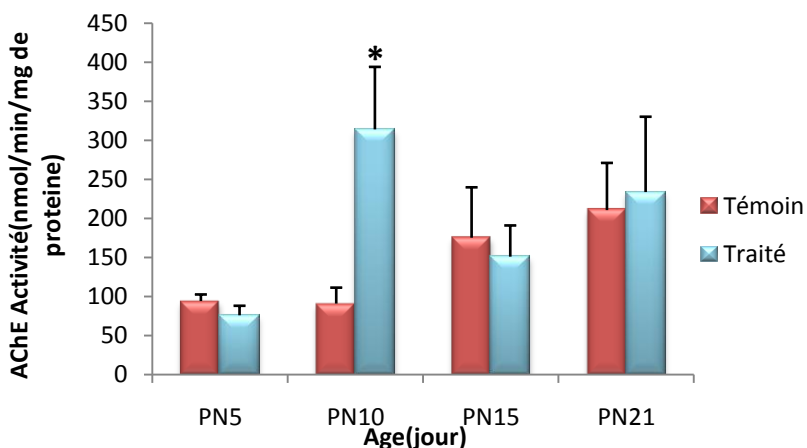


Figure 49: L'évolution de l'activité acétylcholinestérasique chez les souriceaux F1 traités et témoins aux postnataux PN5, PN10, PN15 et PN21. Les valeurs sont présentés comme moyenne \pm SEM; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, (student *t-test*).

b-Chez les souris adultes F1

Parmi les huit structures cérébrales analysées chez les souris traitées au HgCl_2 et les contrôles correspondants, une diminution significative de l'activité de l'AChE de 25 à 42% est observée dans le bulbe olfactif, l'hypothalamus, l'hippocampe, le mésencéphale et le cervelet. Une diminution marquée est observée dans le bulbe rachidien (jusqu'à 80%); Cependant, le test *t* de Student a révélé que l'inhibition n'est significative que dans le cervelet ($p = 0,034$; $t = 3,157$) et dans le bulbe rachidien ($p = 0,017$; $t = 3,915$) après le traitement par rapport aux souris témoins (**Figure 50**). Dans le cortex et le pont des souris exposées au HgCl_2 , l'activité de l'AChE est en revanche supérieure à celle des témoins ($t = -3,3333$, $p = 0,029$ et $t = -2,372$, $p = 0,077$ respectivement).

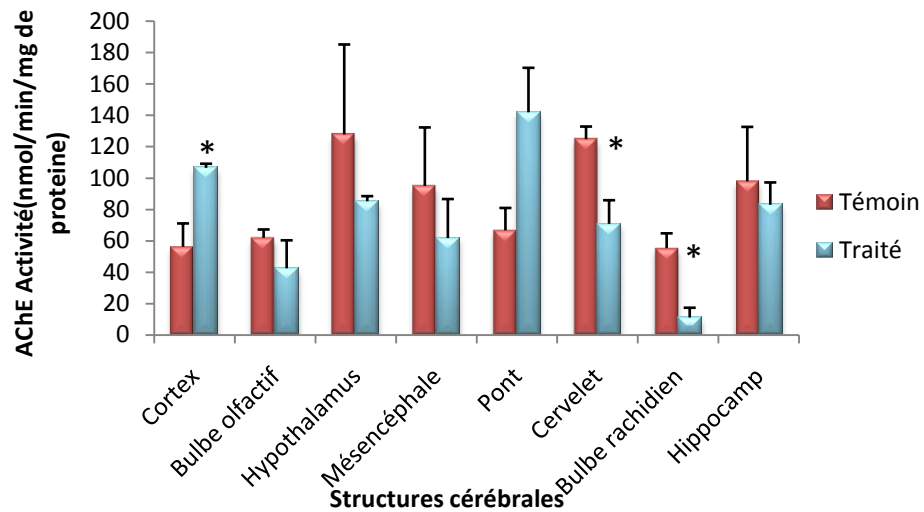


Figure 50: L'évolution de l'activité acétylcholinestérasique dans les différentes structures cérébrales (Cortex cérébrale, Bulbe olfactif, Hypothalamus, Mésencéphale, Pont, Cervelet, Bulbe rachidien et Hippocampe) chez les souris traitées F1 par le $HgCl_2$ et leurs témoins. Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne \pm SEM; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, (student *t-test*).

VII-RESULTATS DU DOSAGE DES MARQUEURS DU STRESS OXYDANT

1. Dosage du stress oxydant au niveau cérébral

a- Chez les souriceaux F1

- Dosage de Malondialdéhyde (MDA)

La peroxydation lipidique cérébrale des souriceaux F1 traités au $HgCl_2$ est élevée dans les quatre jours postnatales mais elle n'est significative qu'au jour PN5 ($p = 0,024$; $t = -2,646$) et PN10 ($p = 0,005$; $t = -4,758$). Cependant nous n'avons pas marqué une différence significative aux jours PN15 et PN21, (**Figure 51**).

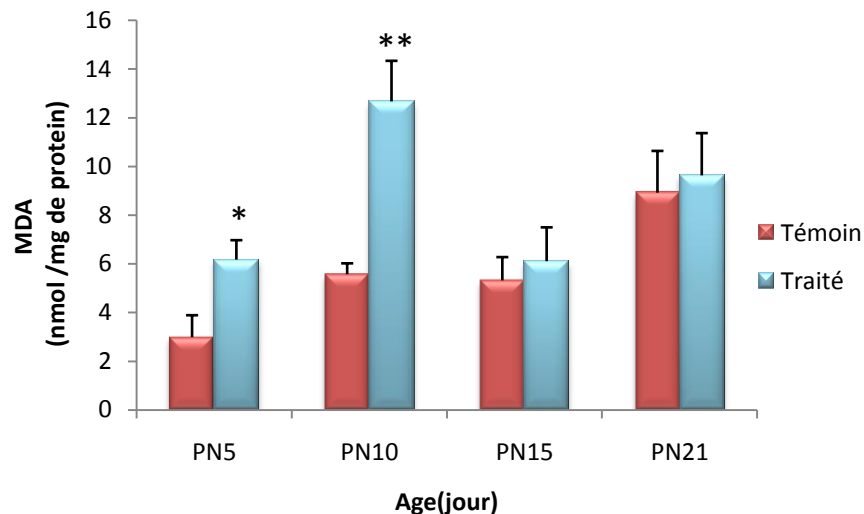


Figure 51 : Variation du taux de MDA cérébral chez les souriceaux F1 traités HgCl₂ et leurs témoins aux jours PN5, PN10, PN15 et PN21 après la naissance. Les valeurs sont présentés sous forme de moyenne±SEM;*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, (student *t-test*).

-Dosage de la glutathion peroxydase (GPx), de la glutathion transférase (GST), du superoxyde dismutase (SOD), de la Catalase et de la theoredoxine réductase (TRxR).

D'après les graphes ci-dessous nous constatons que les taux des enzymes antioxydants cérébraux chez les souriceaux témoins suivent un rythme de d'évolution normal depuis la naissance jusqu'au le 21^{ème} jour postnatal, au contraire les souriceaux traités montre une instabilité des concentrations de ces enzymes. En effet le taux de la GST cérébrale chez les souriceaux traités est très significativement faible au PN5 ($p = 0,001$; $t = 4,696$) par rapport aux témoins. Des résultats similaires sont prouvés pour l'activité Catalase au jour PN5 ($p = 0,010$; $t = 3,189$) et au PN21 ($p = 0,017$; $t = 2,872$). En revanche une augmentation surprenante des taux de GST, Catalase et TRxR au PN10 ($p = 0,007$; $t = -3,790$, $p = 0,039$; $t = -2,380$, $p = <0,001$; $t = -5,226$ respectivement) a été identifié (**Figure 52**).

Les taux de GPx et de SOD n'ont montré aucune différence significative entre les témoins les traités durant les quatre points du dosage.

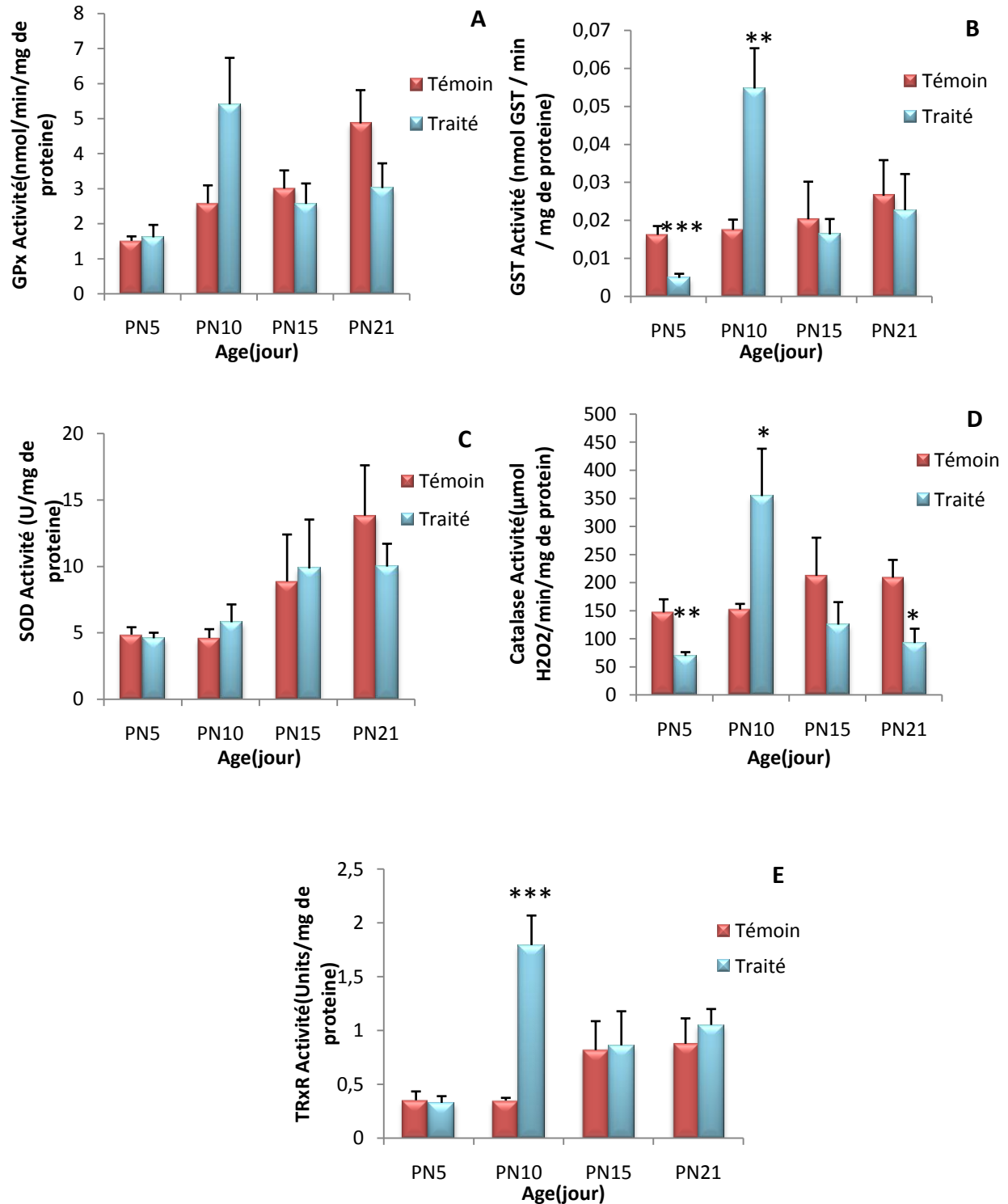


Figure 52: Variation des taux des enzymes antioxydantes de la GPx (A), de la GST (B), de la SOD (C), de la Catalase (D) et de la TRxR (E) au niveau cérébral chez les souriceaux F1 traités au HgCl₂ et leurs témoins aux cours des 21 jours après naissance (PN5, PN10, PN15 et

PN21). Les valeurs sont présentés sous forme de moyenne±SEM.*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, (student *t-test*), témoin (n=6) vs. traité (n=6).

b- Chez les souris F1 adultes

- Le Malondialdéhyde (MDA)

Pour estimer la peroxydation lipidique cérébrale, le taux de MDA est mesuré au niveau de huit structures cérébrales, le cortex cérébral, le bulbe olfactif, l'hypothalamus, l'hippocampe, le mésencéphale, le pont, le cervelet et le bulbe rachidien des souris traitées avec le HgCl₂ et leurs témoins correspondants. Nous avons montré que le taux de MDA est significativement élevé chez le groupe traité au niveau du cortex cérébral (p = 0,003; t = - 6,480), l'hippocampe (p = 0,048 ; t = -2,478), le pont (p = 0,039 ; t = 3,025) et le cervelet (p = 0,050 ; t = - 2,332), par rapport au groupe témoin. Ce taux est également élevé dans le mésencéphale mais il n'a pas atteint un niveau significatif, (**Figure 53**).

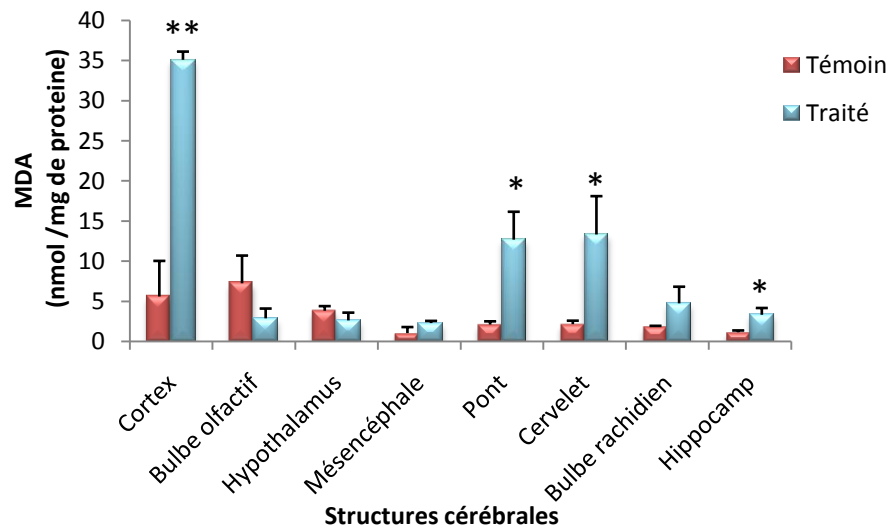


Figure 53: Variation du taux de MDA au niveau des structures cérébrales (Cortex cérébral, Bulbe olfactif, Hypothalamus, Mésencéphale, Pont, Cervelet, Bulbe rachidien et Hippocampe) des souris F1 témoins et traités au HgCl₂. Les valeurs sont présentés comme moyenne±SEM;*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, (student *t-test*).

-Dosage de la glutathion peroxydase (GPx), de la glutathion transférase (GST), du superoxyde dismutase (SOD), de la Catalase et de la theoredoxine réductase (TRxR)

✓ **L'activité Glutathione Peroxidase**

L'activité de GPx est caractérisée par des effets contrastés dans les différentes structures cérébrales analysées. Ainsi, nous avons constaté une augmentation significative au niveau du mésencéphale (36%) ($p = 0,004$; $t = - 4,4446$) et du bulbe rachidien (17%) ($p = 0,013$; $t = - 3 460$), alors qu'une légère mais significative diminution est observée dans le pont (19%) ($p = 0,048$; $t = 2,484$) et une diminution significative et importante au niveau de l'hypothalamus (64%) ($p < 0,001$; $t = 14,251$), (**Figure 54-A**).

✓ **L'activité Glutathione S-Transferase**

L'activité de la glutathion S-transférase (GST) est inhibée sous l'effet de $HgCl_2$ dans toutes les structures cérébrales analysées. Les diminutions les plus importantes sont observées au niveau de l'hypothalamus ($t = 2,770$, $p = 0,050$) et du mésencéphale ($p = 0,042$; $t = 2,576$) avec des diminutions de l'ordre de 90 et 80% respectivement, alors que les autres structures, notamment le cervelet ($p = 0,021$; $t = 3,688$), pont ($p = 0,043$; $t = 2,548$), et le bulbe rachidien ($p = 0,045$; $t = 2,279$) ont montré une diminution maximale de 75% (**Figure 54-B**). Les diminutions observées dans l'hippocampe et le cortex cérébral ne sont pas statistiquement significatives.

✓ **L'activité Superoxyde Dismutase**

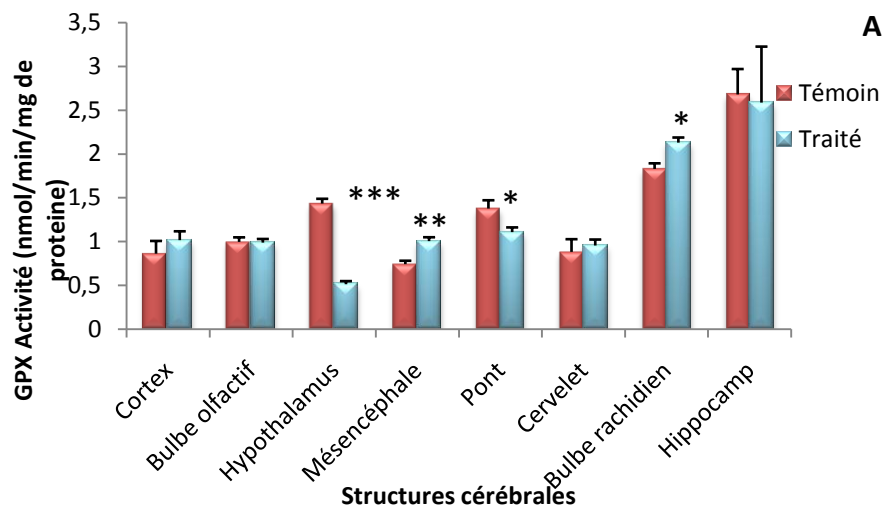
Une diminution significative de l'activité de la SOD de l'ordre de 76% est observée chez les souris exposées au niveau de l'hypothalamus ($t = 15,130$, $p < 0,001$) et le pont ($t = 2,362$, $p = 0,047$), (**Figure 54-C**), alors qu'au niveau des autres structures cérébrales cette activité n'a montrée aucune différence significative.

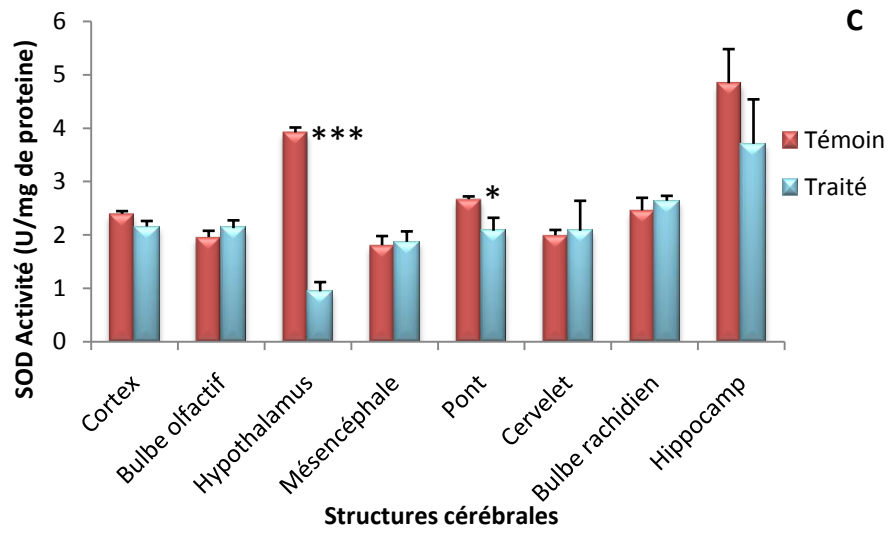
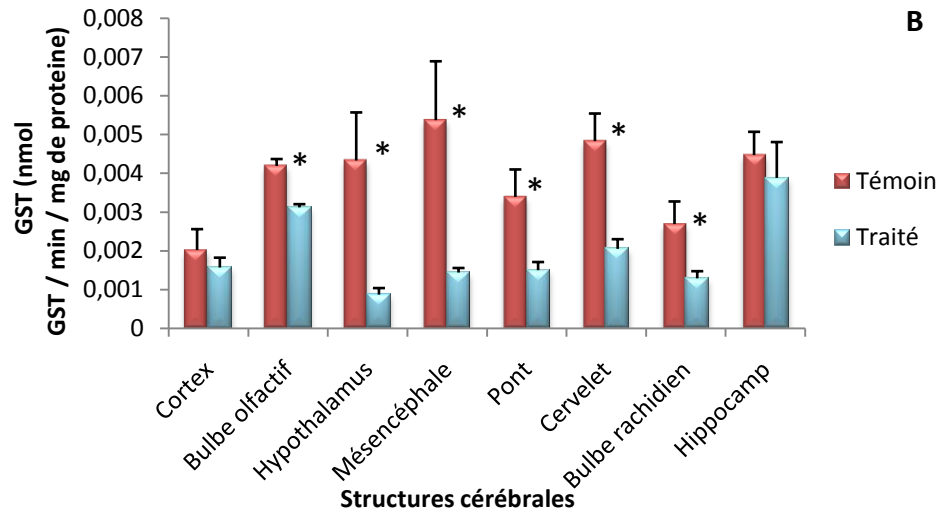
✓ L'activité Catalase

L'activité catalase (CAT) a montré une diminution spectaculaire dans la majorité des structures cérébrales analysées, notamment l'hypothalamus et le tronc cérébral. La plus forte diminution est observée au niveau de l'hypothalamus ($p = 0,006$; $t = 13,092$), le mésencéphale ($p = 0,009$; $t = 4,188$) et le bulbe rachidien ($p = 0,015$; $t = 4,111$) alors que d'autres structures telles que le cervelet ($p = 0,028$; $t = 3,375$) et le pont ($p = 0,015$; $t = 4,117$) ont présenté des diminutions maximales de 75%, (**Figure 54-D**).

✓ L'activité Thioredoxin Réductase

Après exposition au $HgCl_2$, l'activité de la TRxR est significativement réduite dans le bulbe olfactif et l'hippocampe ($p = 0,033$; $t = 5,337$, $p = 0,01$; $t = 7,864$, respectivement) et très hautement significative au niveau de l'hypothalamus ($p < 0,001$; $t = 17,536$), (**Figure 54-E**).





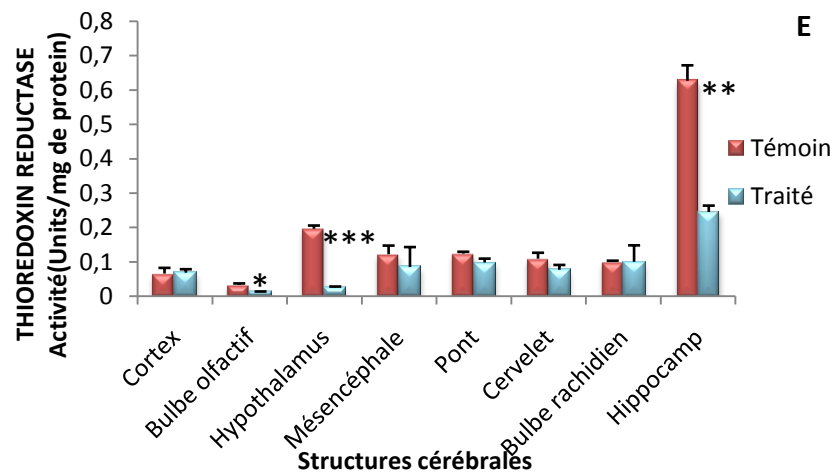
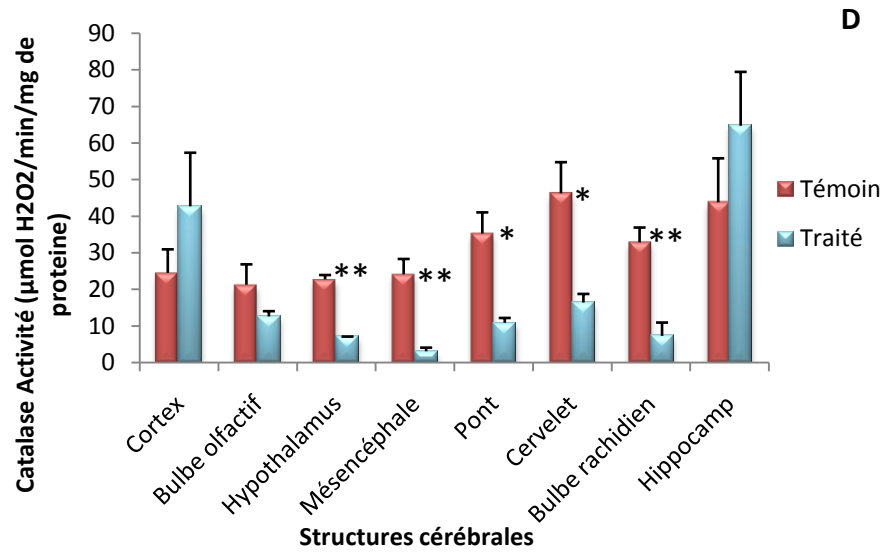


Figure 54 : Variation du taux des enzymes antioxydantes GPx(A), GST(B), SOD(C), Catalase(D) et la TRxR (E) de huit structures cérébrales (Cortex cérébral, Bulbe olfactif, Hypothalamus, Mésencéphale, Pont, Cervelet, Bulbe rachidien et Hippocampe) chez des souris F1 témoins et traitées au HgCl₂. Les valeurs sont présentés comme moyenne± SEM;*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, (student *t-test*). témoin (n=6) vs. traité (n=6).

2. Analyse du stress oxydant hépatique

a- Chez les souriceaux

- Le malondialdéhyde (MDA)

Le taux de MDA hépatique est très significativement élevé au jour PN10 ($p < 0,001$; $t = -7,128$) chez les souris traitées F1 par le $HgCl_2$ alors qu'il n'est pas significative dans les autres jours postnataux, (**Figure 55**).

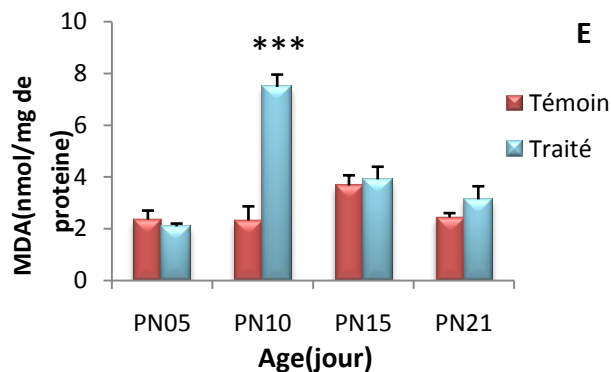


Figure 55: Dosage du taux de MDA hépatique des souriceaux F1 traités au $HgCl_2$ et leurs témoins durant les premiers 21 jours postnataux aux PN5, PN10, PN15 et PN21. Les valeurs sont présentés comme moyenne \pm SEM; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, (student *t-test*).

-Dosage de la GPx, de la GST, de la SOD, de la Catalase et de la TRxR hépatique

Nos résultats révèlent une augmentation significative des concentrations des enzymes antioxydantes hépatique chez les souriceaux traités au PN10: GST ($p = 0,002$; $t = -5,919$), SOD ($p = 0,007$; $t = -5,016$), TRxR ($p = 0,050$; $t = -2,350$) et la Catalase ($p = 0,050$; $t = -2,783$). En revanche la catalase est inhibée significativement au jour PN21 par rapport aux témoins ($p = 0,003$; $t = 4,790$), (**Figure 56**).

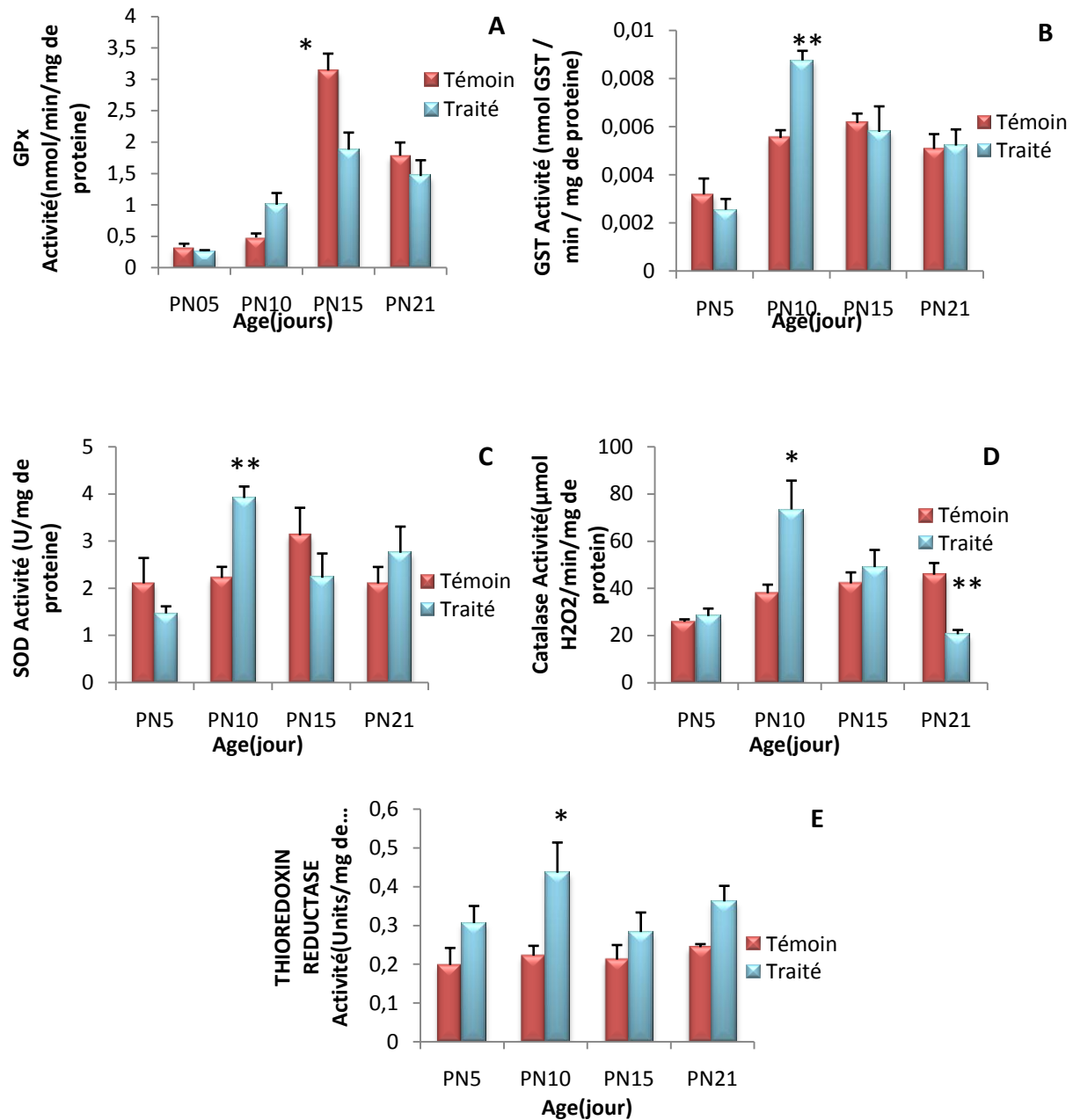


Figure 56: Variation du taux des activités enzymatiques antioxydantes hépatiques: GPx(A), GST(B), Catalase(C), SOD(D) et la TRxR(E) aux jours postnataux PN5, PN10, PN15 et PN21 chez des souriceaux traités F1 et témoins. Les valeurs sont présentés comme moyenne± SEM; * p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, (student *t-test*).

b- Chez les souris adultes F1

- Le malondialdéhyde (MDA)

Nos résultats montrent que le traitement par HgCl_2 pendant une longue durée a provoqué une augmentation significative du taux de la peroxydation lipidique en augmentant la concentration de MDA hépatique chez les souris traitées comparé aux témoins ($p = 0,002$; $t = -4,141$), (**Figure 57**).

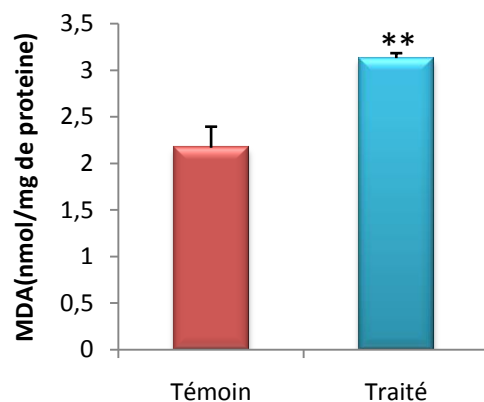


Figure 57: Dosage du malondialdéhyde (MDA) hépatique chez les souris F1 adulte traitées et leurs témoins. Les valeurs sont présentés comme moyenne \pm SEM; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, (student *t-test*). témoin ($n=6$) vs. traité ($n=6$).

-Dosage de la GPx, de la GST, SOD, de la Catalase et de TRxR hépatique

La défense antioxydante des enzymes GPx, GST, SOD et de la Catalase hépatique est inhibé significativement chez les souris traitées F1 adulte par rapport aux témoins .GPx ($p = 0,040$; $t = 2,393$), GST ($p = 0,065$; $t = 2,532$), SOD ($p = 0,045$; $t = 2,874$), Catalase ($p = 0,040$; $t = 2,750$) alors que la TRxR n'a pas montré de difference significatif ($p = 0,182$; $t = 1,612$), (**Figure 58**).

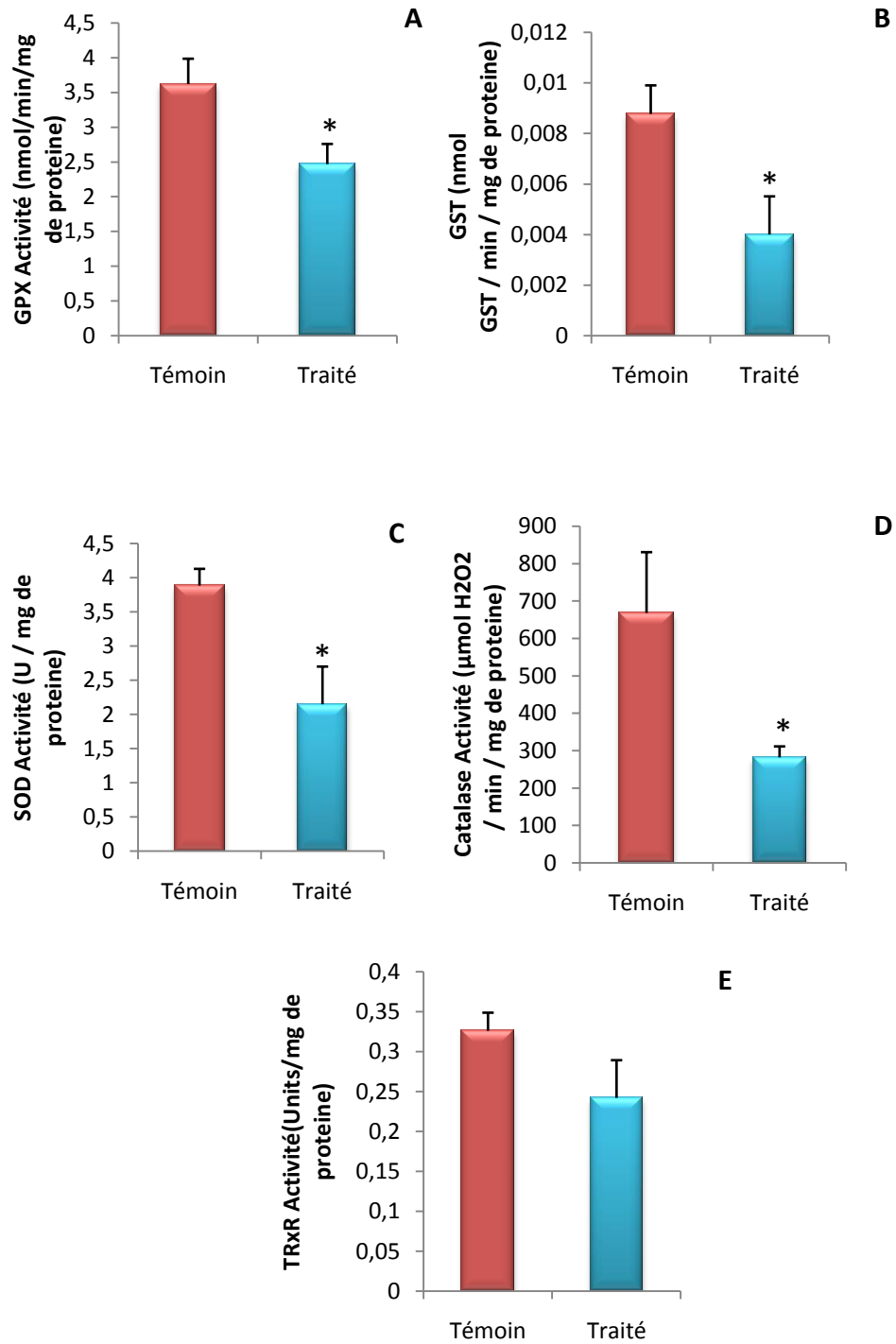


Figure 58: Variation de la capacité anti-oxydante hépatique de GPx(A), de GST(B), de SOD(C), de Catalase(D) et de la TRxR(E). Les valeurs sont présentés sous forme moyenne \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, (student *t-test*). témoin (n=6) vs. traité (n=6).

3. Analyse du stress oxydant rénal

a- Chez les souriceaux F1

-Le malondialdéhyde (MDA)

Le résultat ci-dessous montre que le taux de peroxydation lipidique (MDA) rénal est élevé significativement durant dans les jours postnataux PN15 et PN21 ($p = 0,05$; $t = -2,275$, $p = 0,012$; $t = -3,546$ respectivement) chez les souriceaux traités par le $HgCl_2$ par rapport à leurs témoins, (**Figure 59**).

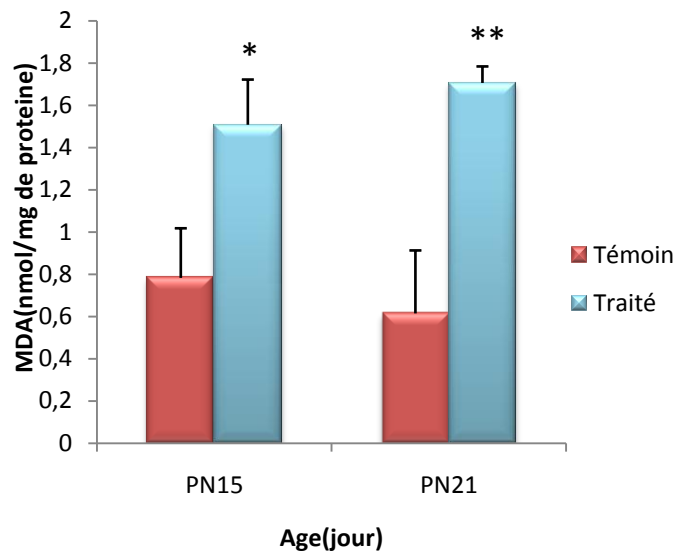


Figure 59: Variation du taux du MDA rénal des souriceaux F1 témoins et traités dans les deux jours postnataux PN15 et PN21. Les valeurs sont présentés comme moyenne \pm SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, (student *t-test*). témoin ($n=6$) vs. traité ($n=6$).

-Dosage du GPx, de la GST, de la SOD, de la Catalase et de la TRxR rénal

Les résultats de l'effet du mercure sur les taux des enzymes antioxydantes ont montré une diminution significative du taux de la SOD aux jours PN15 ($p = 0,047$; $t = 2,496$) et PN21 ($p = 0,032$; $t = 2,587$), de la catalase au jour PN15 ($p = 0,039$; $t = 2,771$) et PN21 ($p = 0,004$; $t = 6,162$) et la TRxR au PN15 ($p = 0,002$; $t = 5,175$). A l'inverse les activités de la GPx au PN15 ($p < 0,001$; $t = -7,277$), et de la GST au PN15 ($p = 0,050$; $t = -2,770$) sont plus élevé sous l'effet de $HgCl_2$ accumulé au niveau des reins, (**Figure 60**).

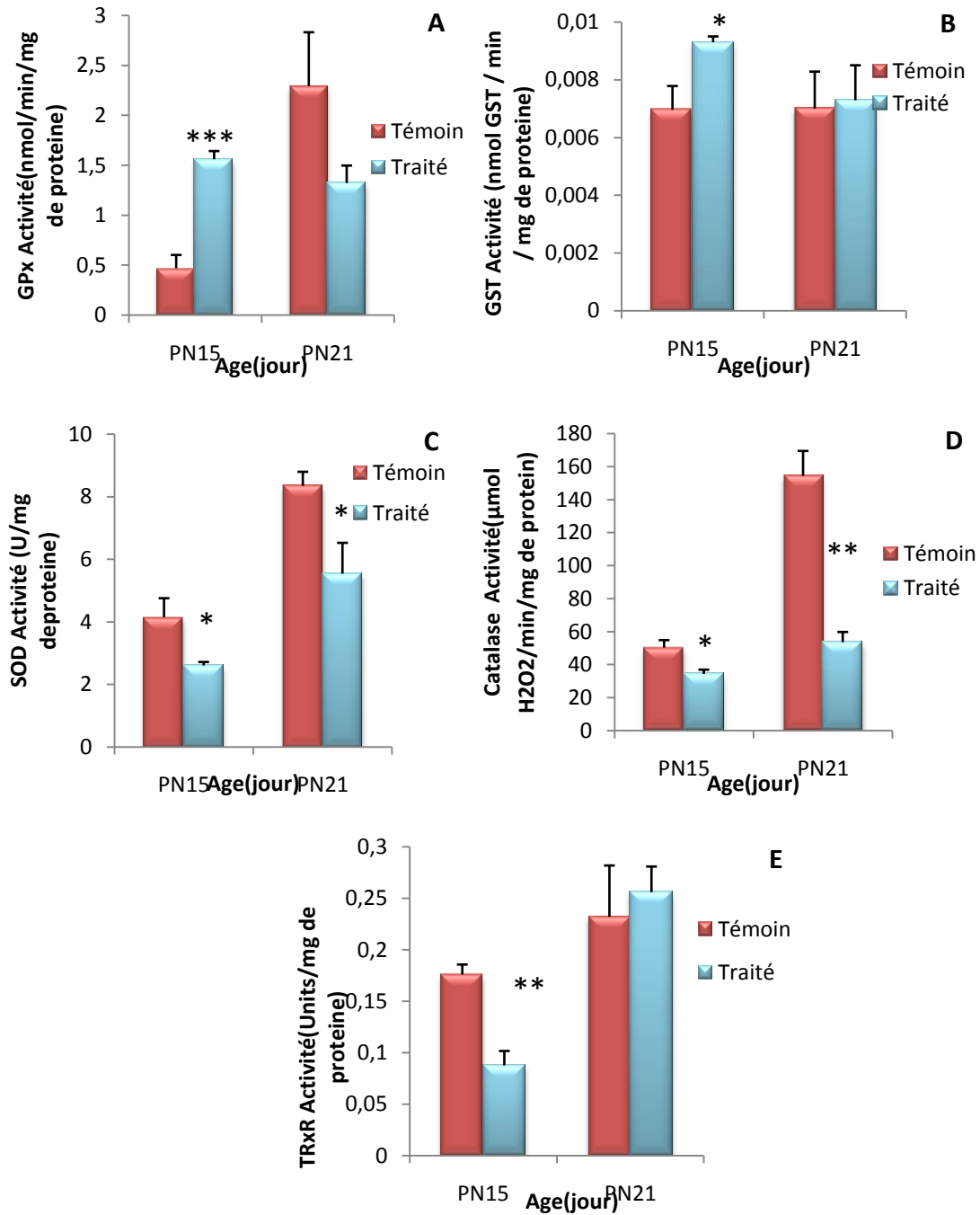


Figure 60: Variation des activités enzymatiques antioxydantes au niveau des reins des souriceaux F1 traités et leurs témoins aux deux jours postnataux PN15, PN21. Les valeurs sont présentés comme moyenne \pm SEM; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, (student *t*-test).

b- Chez les souris adultes F1

- Le Malondialdéhyde (MDA)

Le taux de MDA rénal chez les souris adultes intoxiquées par le HgCl_2 est significativement plus élevé par rapport aux témoins ($p = 0,032$; $t = -3,229$), (**Figure 61**).

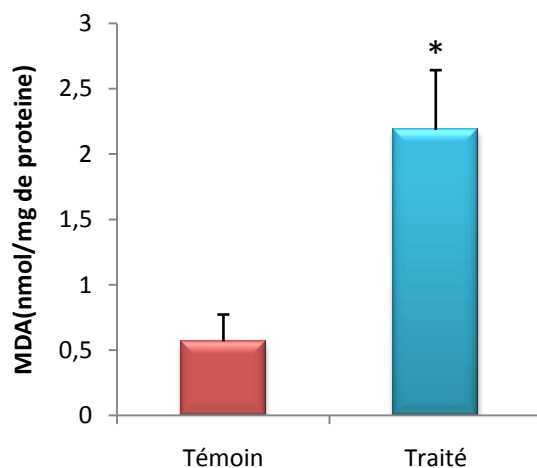


Figure 61: Variation du taux de MDA rénal chez les souris F1 adultes traitées au HgCl_2 et leurs témoins. Les valeurs sont présentés sous forme de moyenne \pm SEM; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. (student *t-test*).

-Dosage de la GPx, de la GST, de la SOD, de la Catalase et de la TRxR rénal.

Les graphes ci-dessous ont montré que la présence du mercure au niveau rénal a inhibé significativement les activités de la GPx ($p = 0,015$; $t = 3,380$) et de la Catalase ($p = 0,029$; $t = 2,647$) chez les souris traitées par rapport aux témoins alors que les autres activités de la GST, de la SOD et de la TRxR n'ont montré aucune différence significative entre les deux lots, (**Figure 62**).

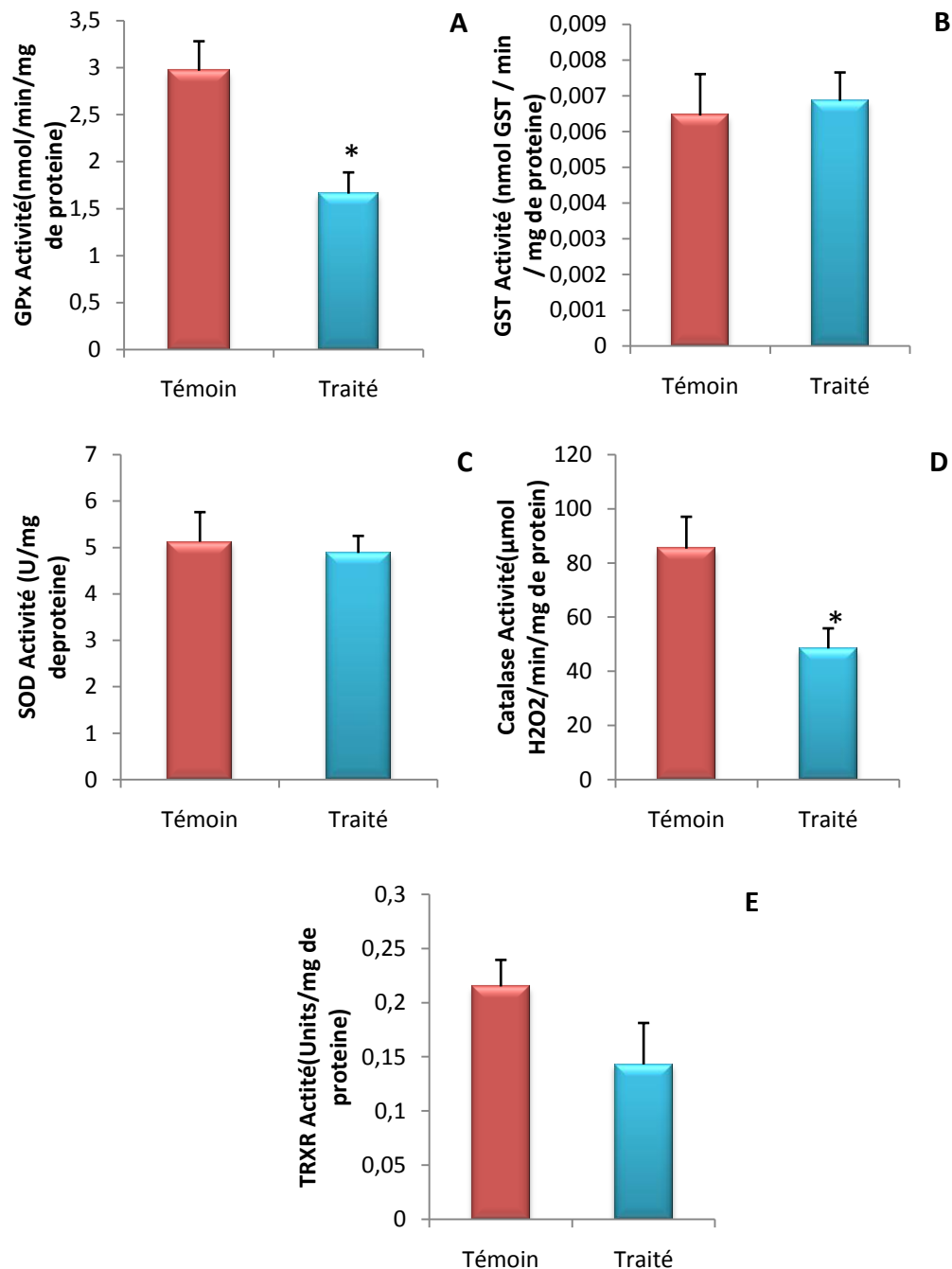


Figure 62: Variation des activités des enzymes antioxydantes de la GPx(A), de la GST(B), de la SOD(C), de la Catalase (D) et de la TRxR(E) rénale. Les valeurs sont présentés comme moyenne± SEM; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, (student *t-test*). témoin (n=6) vs. traité (n=6).

4. Dosage des marqueurs biochimiques plasmatiques du foie et des reins

a- Les marqueurs biochimiques plasmatiques hépatiques

Nos résultats montrent que l'exposition au mercure a augmenté significativement le taux de l'AST ($p= 0,022$; $t = -3,293$) chez les souris traitées par rapport aux témoins alors qu'il n'a pas d'effet sur le taux de l'ALT, d'autre part le dosage des lipides plasmatiques a montré une augmentation significative du taux de cholestérol ($p= 0,050$; $t = -2,448$), alors que le taux des triglycérides et du phosphatase alcaline n'a pas montré de différence significative, (**Figure 63**).

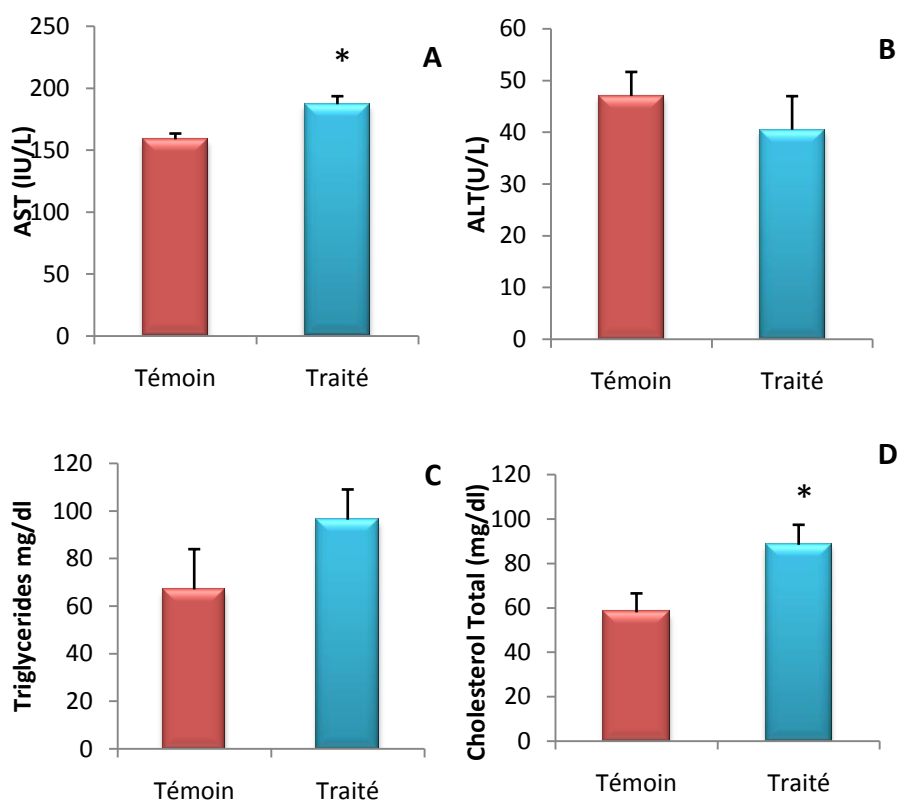


Figure 63: Effet du chlorure de mercure sur les marqueurs biochimiques plasmatiques hépatiques des souris F1 traitées par le $HgCl_2$ et leurs témoins adultes. (A) AST, (B) ALT, (C) Triglycérides, (D) Cholestérol total, (E) AcP (phosphatase acide). Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne \pm SEM; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, (student *t-test*). témoin ($n=6$) vs. traité ($n=6$)

b- Les marqueurs biochimiques plasmatiques rénaux

Les graphes ci-dessous montrent que le mercure a altéré significativement la filtration rénale par augmentation du taux de la créatinine plasmatique ($p = 0,005$; $t = -4,047$), (**Figure 64**).

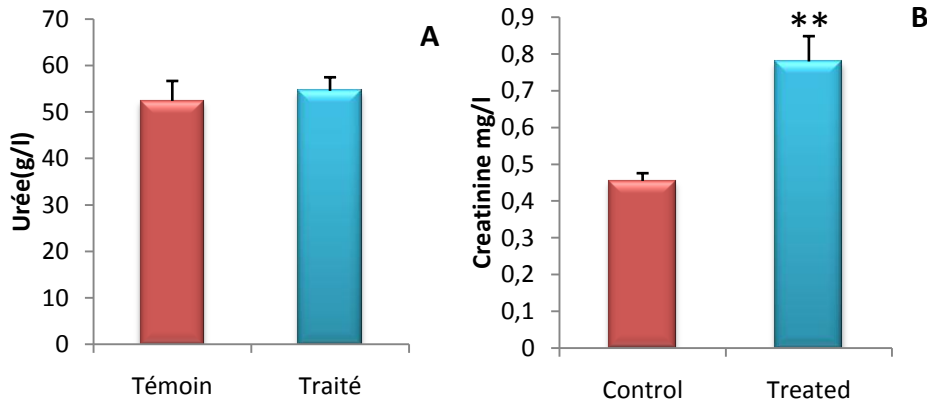


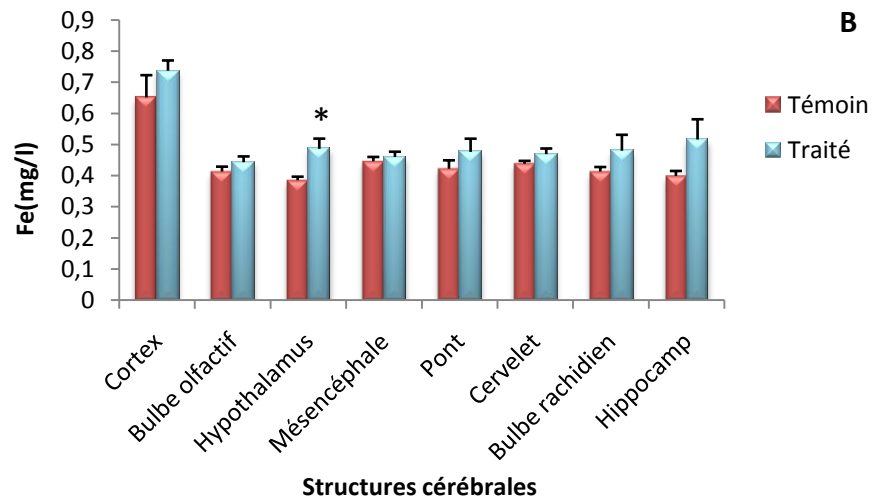
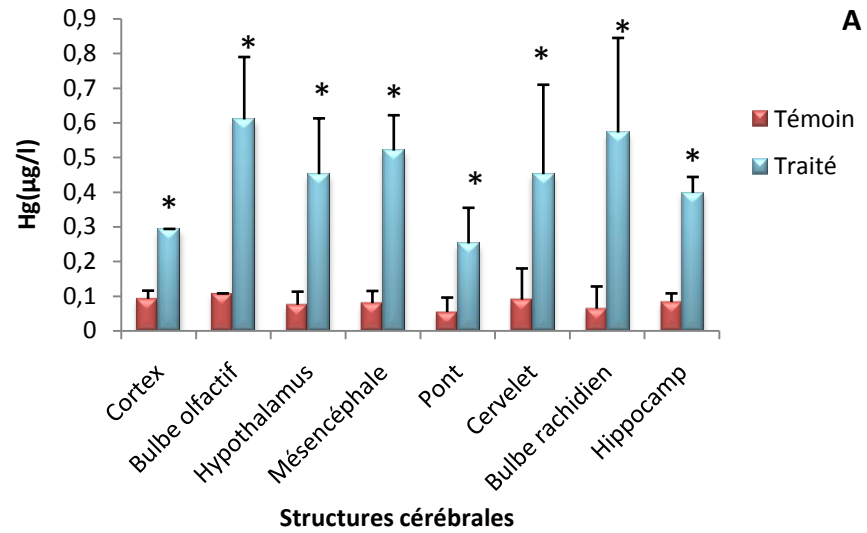
Figure 64: Effet du chlorure de mercure sur les marqueurs plasmatiques rénaux : urée (A) et créatinine (B) des souris F1 traitées et témoins adultes. Les valeurs sont présentées comme moyenne \pm SEM; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, (student *t*-test). témoin ($n = 6$) vs. traité ($n = 6$).

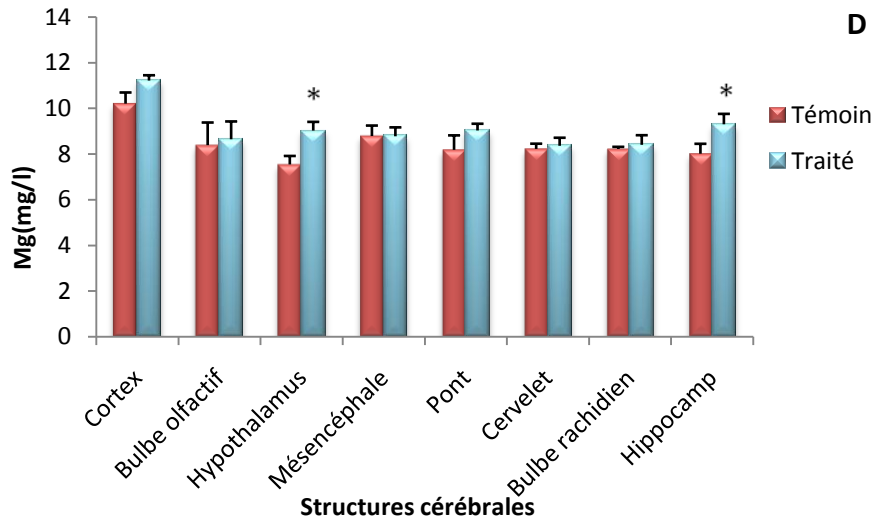
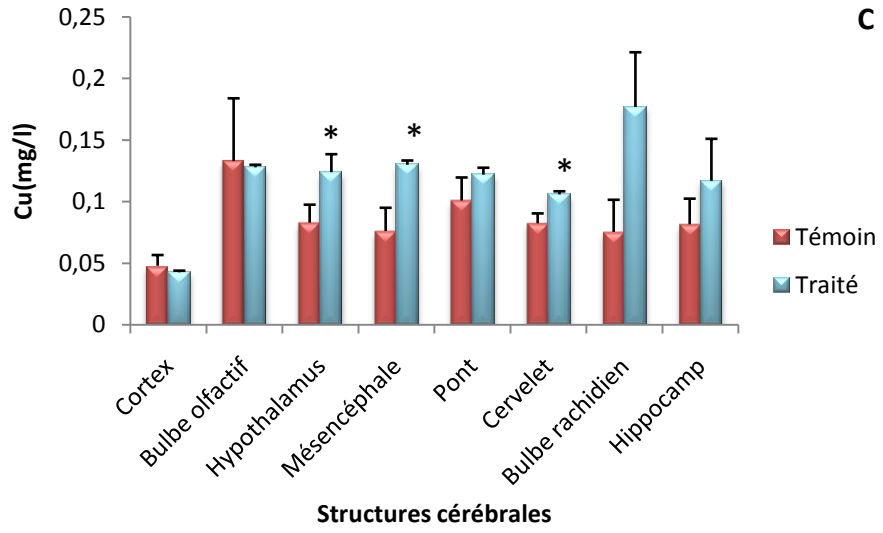
VIII-RESULTATS DU DOSAGE DU MERCURE ET DES MINERAUX ESSENTIELS AU NIVEAU DES ORGANES

1. Au niveau des structures cérébrales

Les concentrations du Hg, Fe, Cu, Mg et Zn dans le tissu cérébral sont déterminées par ICP-AES, et les résultats sont illustrés sur la Figure (65 A–E). L'évaluation du mercure (Hg) a révélé la présence de concentrations significativement plus élevées au niveau de nombreuses structures cérébrales des animaux traités par rapport aux témoins (**Figure 65-A**). L'ingestion de HgCl_2 par l'eau de boisson a entraîné une élévation significative du fer (Fe) au niveau de l'hypothalamus ($t = -3,3321$, $p = 0,021$) et de l'hippocampe ($t = -2,039$, $p = 0,097$) et du cuivre (Cu) au niveau de l'hypothalamus ($t = -2,756$, $p = 0,033$), le mésencéphale ($t = -2,803$, $p = 0,031$), le cervelet ($t = -2,769$, $p = 0,032$) et le bulbe rachidien ($t = -2,769$, $p = 0,096$) (**Figure 65 B et C**). Une augmentation générale des concentrations de Mg et de Zn est également observée chez les souris traitées, mais la signification statistique n'est retrouvée que dans le bulbe olfactif

pour le Zn ($t = -2,492$, $p = 0,047$) (**Figure 65 D et E**). Enfin, les concentrations de calcium mesurées dans les différentes structures cérébrales ont montré une tendance marquée à la diminution mais n'ont pas atteint la signification statistique chez les souris traitées par rapport aux souris témoins (**Figure 66**).





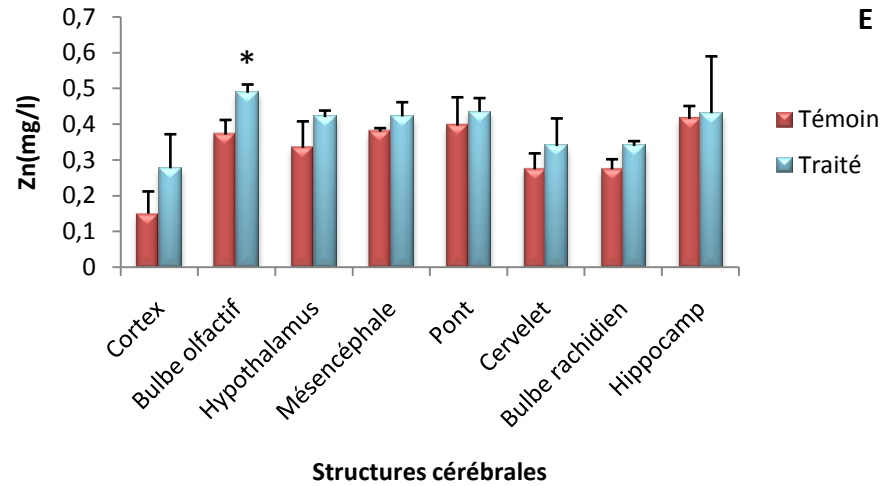


Figure 65: Effet du mercure sur le taux cérébral de (A) Hg, (B) Fe, (C) Cu, (D) Mg et (E) Zn. Les valeurs sont présentés sous forme de moyenne \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. (student *t-test*). témoin (n=6) .vs traité (n=6).

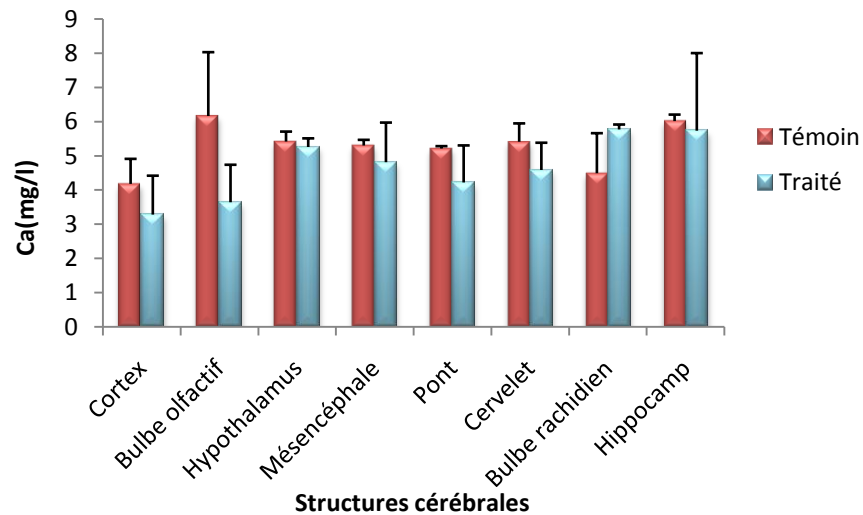


Figure 66: Effet du mercure sur la variation de la concentration du calcium au niveau des structures cérébrale chez les souris traitées F1 adultes et leurs témoins. Les valeurs sont présentés sous forme de moyenne \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, (student *t-test*). témoin (n=6) et traité (n=6).

2. Au niveau hépatique

Le dosage des minéraux au niveau du foie des souris traitées par le mercure et leurs témoins a montré qu'il y a une augmentation significative des concentrations du calcium ($p = 0,031$; $t = -2,794$), du Fer ($p = 0,045$; $t = -2,521$), et du Zinc ($p = 0,045$; $t = -2,881$) .(Figure 67).

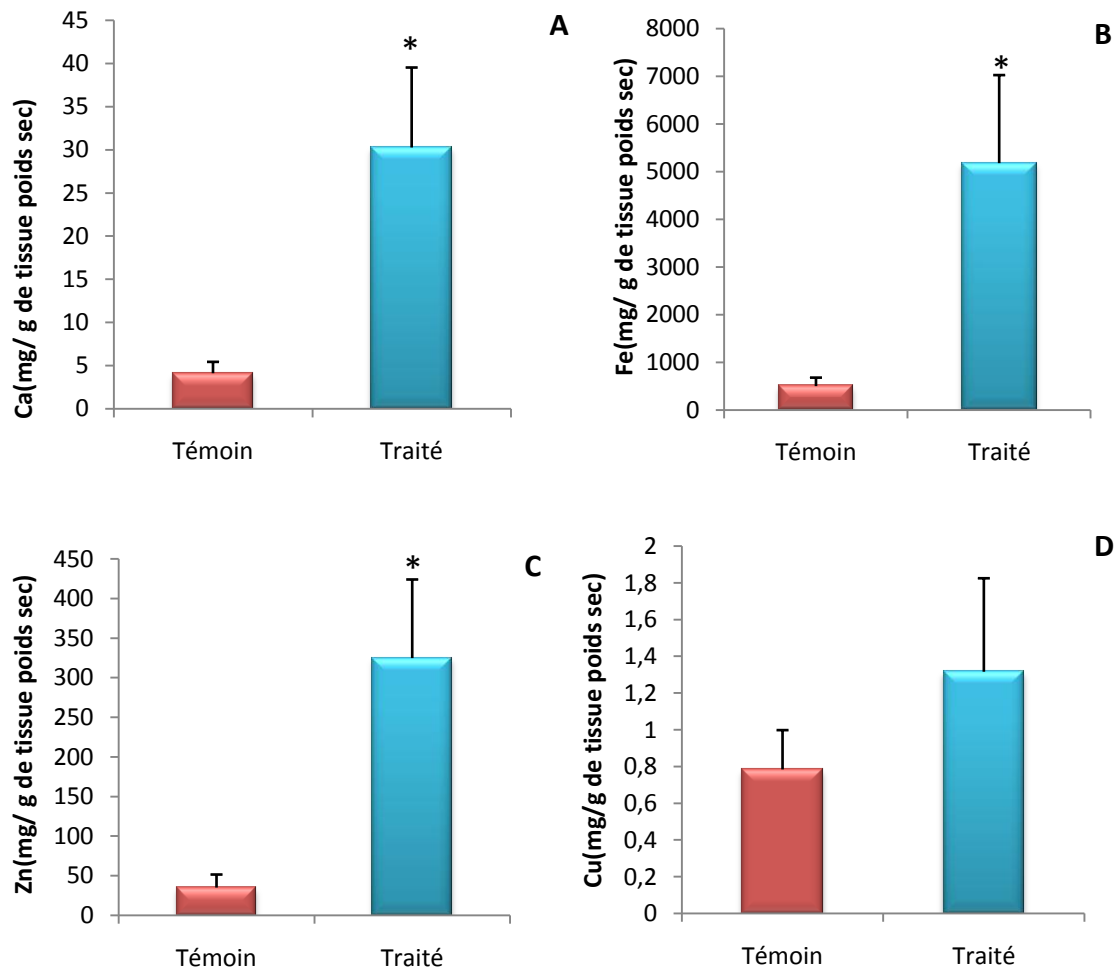


Figure 67: Effet de mercure sur la concentration des minéraux au niveau du foie de (A) Ca, (B) Fe, (C) Zn, (D) Cu. Les valeurs sont présentés sous forme de moyenne \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, (student *t-test*).

3. Dosage des minéraux au niveau rénal

Les résultats de la détermination des taux du Ca, du Fe, du Zn et du Cu au niveau rénal des souris adultes F1 intoxiqués ont montré que la présence du HgCl₂ au niveau rénal a induit une accumulation significative du Zn ($p= 0,046$; $t = -2,644$) comparés aux témoins alors que les concentrations des autres minéraux n'ont pas montré pas de différences significatives (**Figure 68 A-D**).

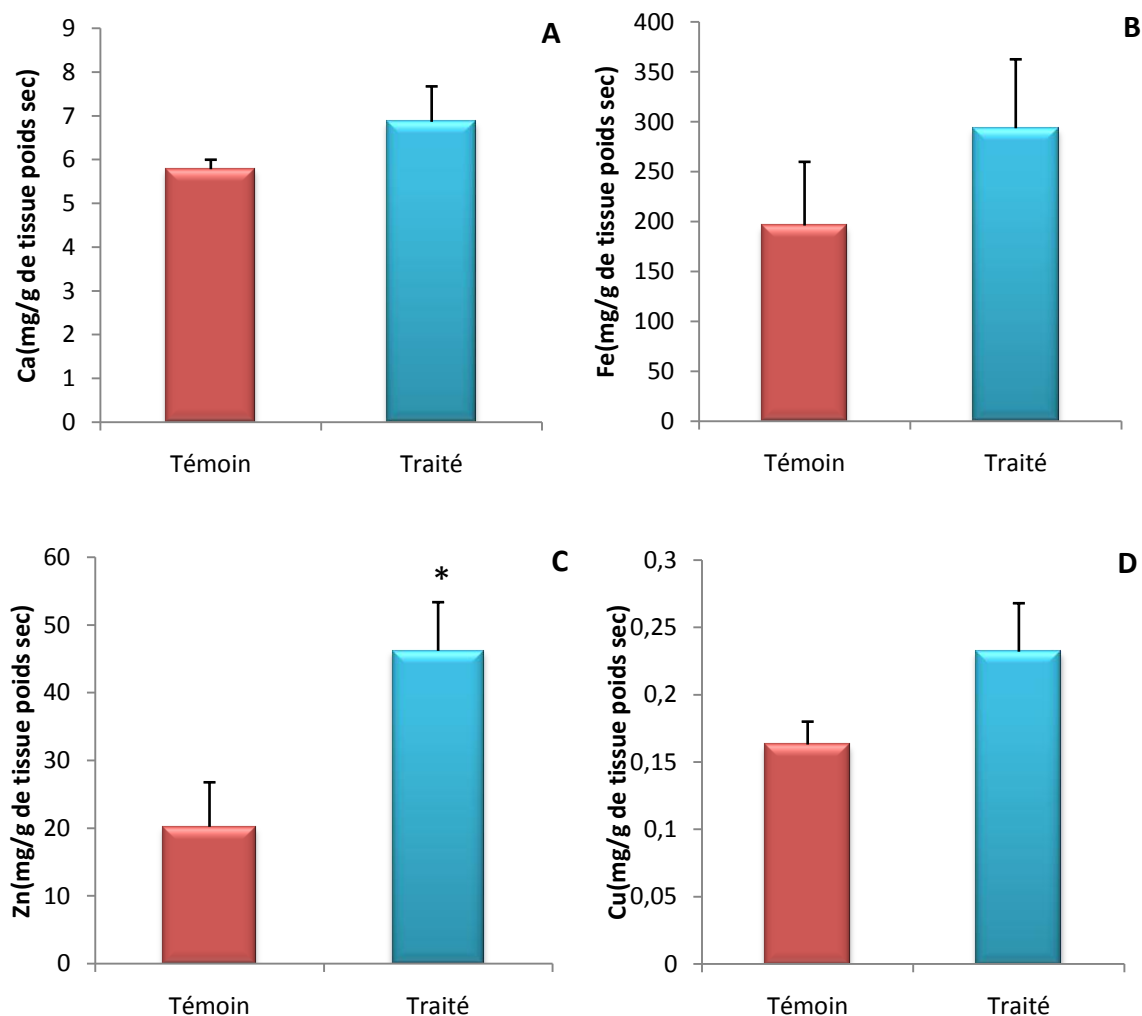


Figure 68: Effet de mercure sur la concentration des minéraux au niveau des reins de (A) Ca, (B) Fe, (C) Zn, (D) Cu. Les valeurs sont présentés sous forme de moyenne \pm SEM; * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, (student *t-test*).

IX-RESULTATS DE L'ETUDE HISTOLOGIQUE

1. L'étude histologique au niveau de l'intestin des souris F1 adultes

Les coupes histologiques de l'intestin grêle des souris traitées par le chlorure de mercure ont montré une diminution du nombre des cellules à mucus et des inflammations intestinale par rapport aux témoins qui ont montré une dispersion normale des cellules à mucus au niveau des villosités, (Figure 69A-C).

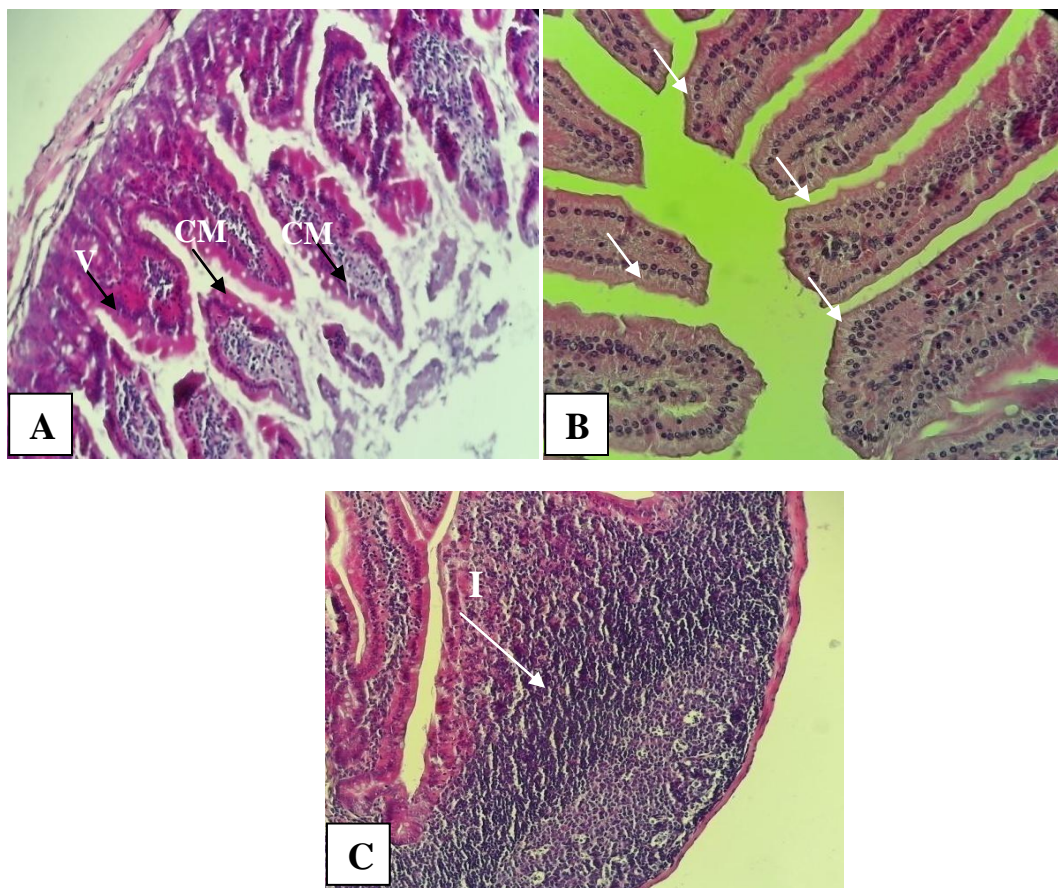


Figure 69: Evaluation microscopique du tissu de l'intestin grêle des souris témoins et traitées F1 adultes (H&E). (A) : le tissu de l'intestin grêle témoin : V : villosités.CM: cellules à mucus (H&E X150). (B) : Le tissu de l'intestin grêle traité par le chlorure de mercure avec une rareté des cellules à mucus (H&E X150) et (C) I : inflammation au niveau de l'intestin des souris traitées HgCl₂ (H&E X200).

2. L'étude histologique du foie des souris F1 adultes

Chez les souris témoins le foie présente une structure normale avec un cytoplasme granulaire, des noyaux centraux et des espaces sinusoidaux ouverts (**Figure 70 A-B**) alors que les souris traitées par le HgCl₂ présentent un foie avec plusieurs anomalies telles que la dégénérescence du cytoplasme (Figure 70 - C), la dilatation des espaces sinusoidaux (Figure 70 - D), la présence de vacuoles (Figure 70 - E) et la présence des noyaux pycnotiques (**Figure 70-F**).

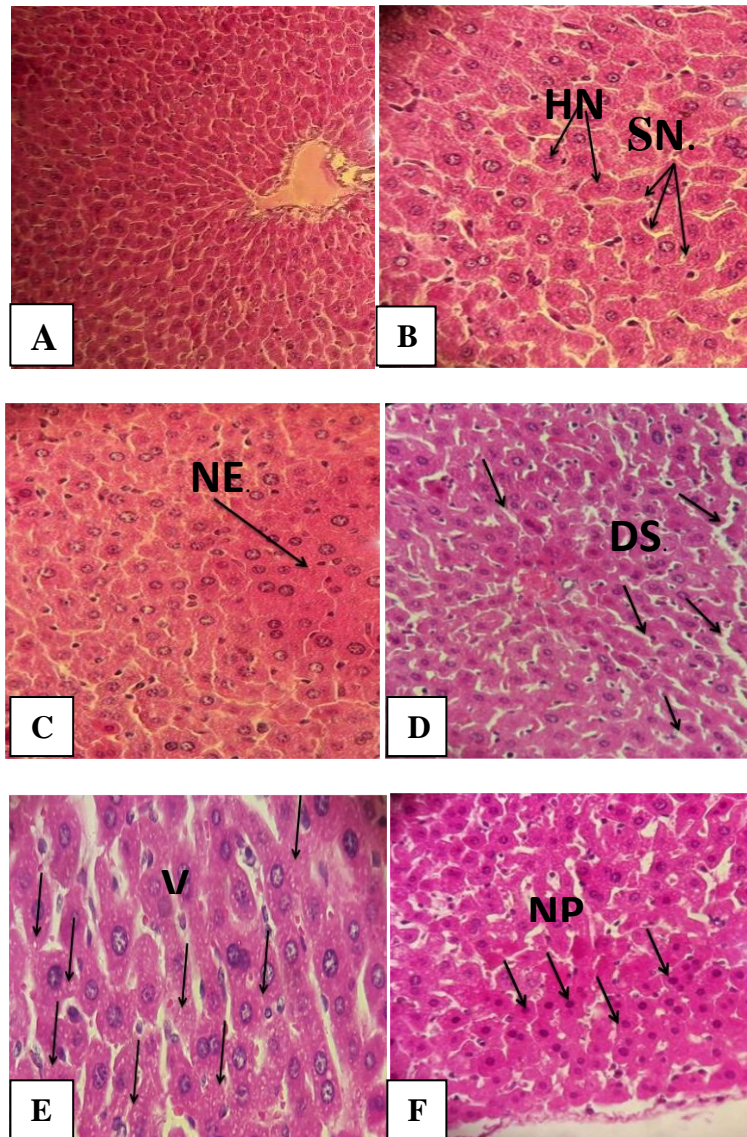


Figure 70: Évaluation microscopique du foie des souris mâles traitées avec du chlorure de mercure. (A) (H&E X 150) et (B) (H&E X 200) l'état du foie des souris témoins montrant la structure normale des hépatocytes (HN) avec un cytoplasme granulaire, des noyaux placés au

centre et des espaces sinusoidaux normaux (SN). (C, D, E et F) l'état du foie des souris traitées au mercure (H&E X 200), montrant la dégénérescence du cytoplasme (NE) (C), la dilatation des espaces sinusoidaux (DS) (D), la présence des vacuoles (V) (E) et la présence de noyaux pycnotiques (NP) (F).

3. L'étude histologique des reins des souris F1 adultes

Les coupes histologiques des reins des animaux témoins présentent des glomérules bien développés avec des cellules tubulaires normales (**Figure 71-A**), tandis que chez le groupe exposé au $HgCl_2$, les reins présentent une atrophie glomérulaire, une dilatation de la capsule de Bowman et une dégénérescence des cellules tubulaires (**Figure 71-B**) avec la présence de vacuoles et de noyaux pycnotiques au niveau cellulaire (**Figure 71C-D**).

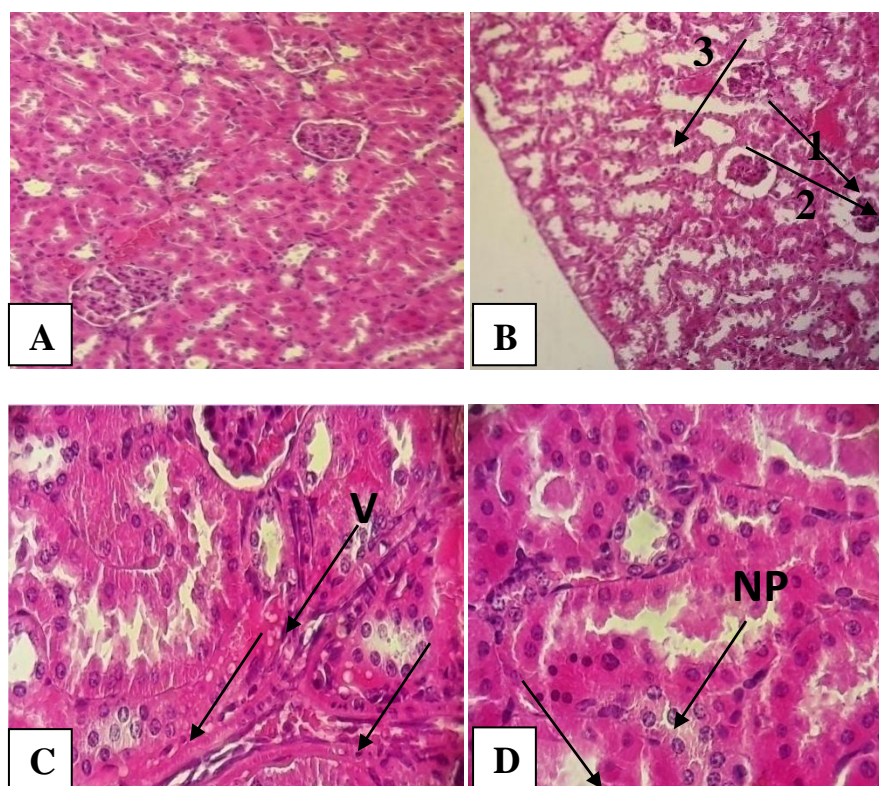


Figure 71: Évaluation microscopique des reins des souris mâles traitées avec du chlorure de mercure (Hg) et leurs témoins (H&E). (A) (H&E X150) montrant un tissu rénal normal des souris témoins avec des glomérules bien développés, un espace de Bowman normal et des cellules tubulaires normales. (B) (H&E X150) un tissu rénal chez les souris traitées au mercure avec une atrophie glomérulaire (1), dilatation de la capsule de Bowman (2) et une dégénérescence des

cellules tubulaires (3) (H&E X150). (C) (H&E X200) présence de vacuoles (V) et (D) des noyaux pycnotiques (NP).

X-EFFET DU MERCURE SUR LA REPRODUCTION CHEZ LES SOURIS TRAITÉES F1

1. L'étude de l'effet du HgCl_2 sur la reproduction chez les mâles

a. le poids des testicules

L'intoxication des souris F1 adultes par le HgCl_2 a entraîné une augmentation significative du poids des testicules par rapport au lot témoins ($p=0,008$; $t = -3,529$), (**Figure 72**).

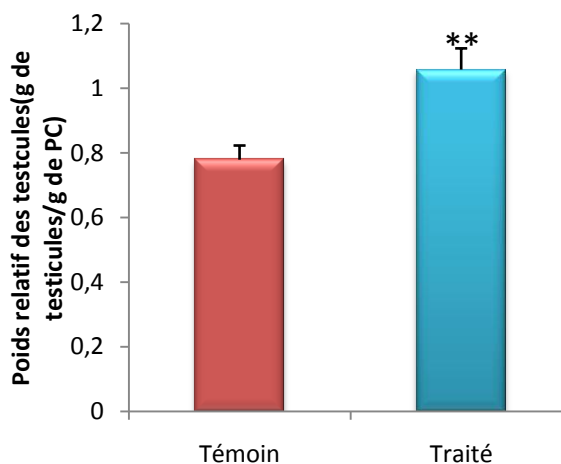


Figure 72 : Le poids relatif des testicules des souris F1 traitées HgCl_2 . Les valeurs sont présentées comme moyenne \pm SEM; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, (student *t-test*).

b. Evaluation du stress oxydant au niveau des testicules chez les souris adultes

-Le malondialdéhyde (MDA)

Les résultats de ce dosage ont montré que le mercure a augmenté significativement le taux de la peroxydation lipidique testiculaire chez les souris traitées par rapport aux contrôles ($p=0,019$; $t = -2,918$), (**Figure 73**).

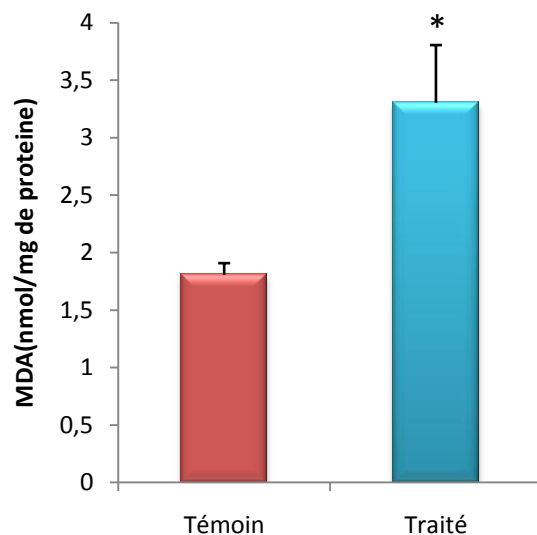


Figure 73: Effet du chlorure de mercure sur le taux de MDA testiculaire chez la souris adulte traitée F1 et témoin. Les valeurs sont présentés comme moyenne \pm SEM; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, (student *t-test*).

-Dosage de la GPx, de la GST, de la SOD, de la Catalase et de la TRxR testiculaire.

Nous avons montré que le chlorure de mercure a diminué significativement l'activité de la GPx ($p = 0,044$; $t = 2,458$) et de la SOD ($p = 0,006$; $t = 4,213$) chez les souris traitées F1 adulte au niveau des testicules. En parallèle à la GPx, l'activité TRxR a montré une diminution mais qui n'est pas significative. Finalement les activités GST et Catalase n'ont montré pas de différence significative entre les deux lots de souris, (**Figure 74**).

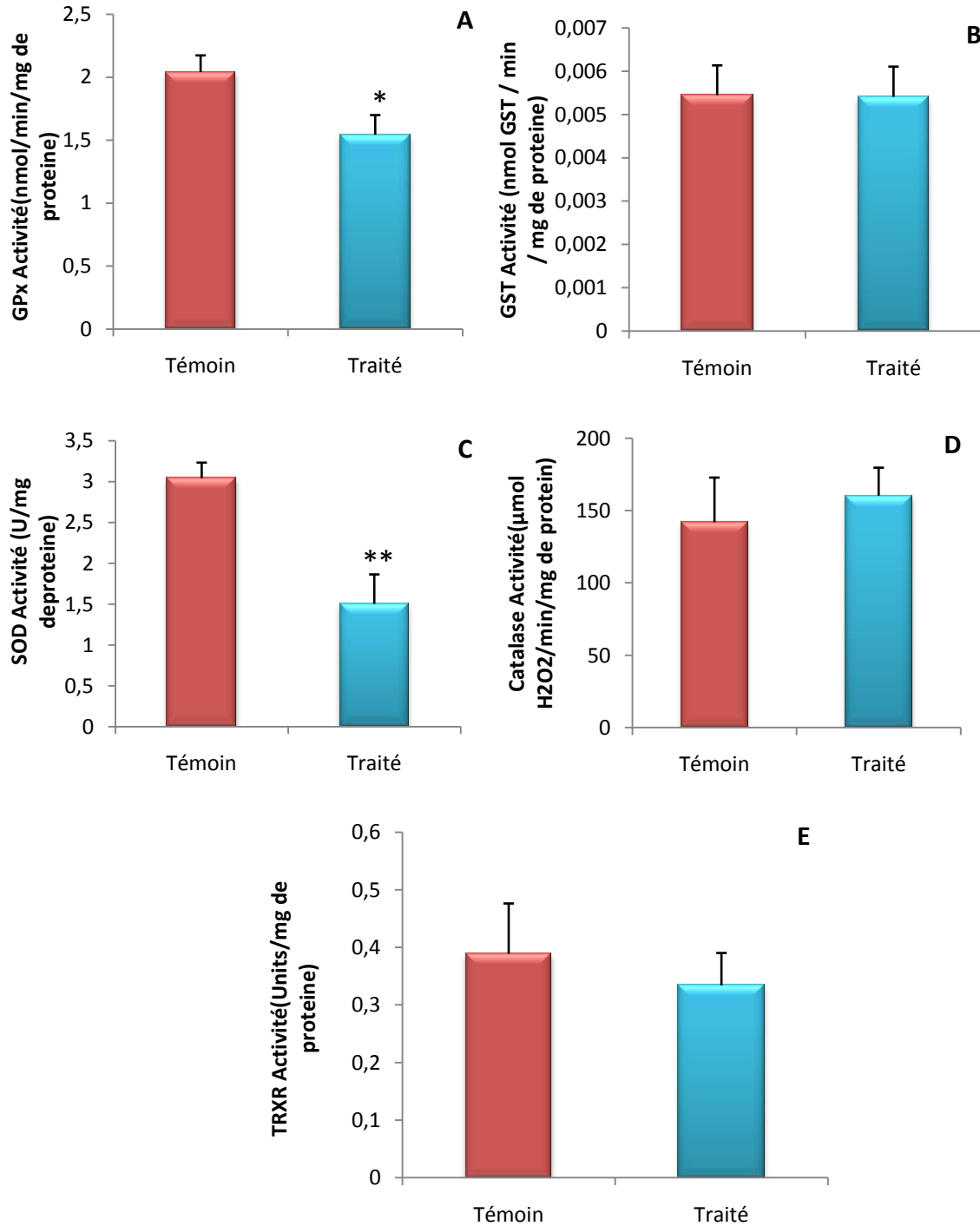


Figure 74: Effet du traitement HgCl₂ sur l'activité des enzymes antioxydantes de la GPx(A), de la GST(B), de la SOD(C), de la Catalase(D) et de la TRxR (E) au niveau des testicules. Les valeurs sont présentés comme moyenne ± SEM; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, (student *t-test*).

c. L'étude de l'effet du mercure inorganique sur le tissu testiculaire

Au niveau des gonades mâles témoins les coupes histologiques (**Figure 75-A**) présentent un tissu normal avec des tubes séminifères normaux et des espaces interstitiels étroits, alors que les coupes histologiques des animaux traités (**Figure 75-B**) montrent des tubes séminifères avec des (H) hémorragies interne et un détachement du tissu intérieur au niveau des autres tubes.

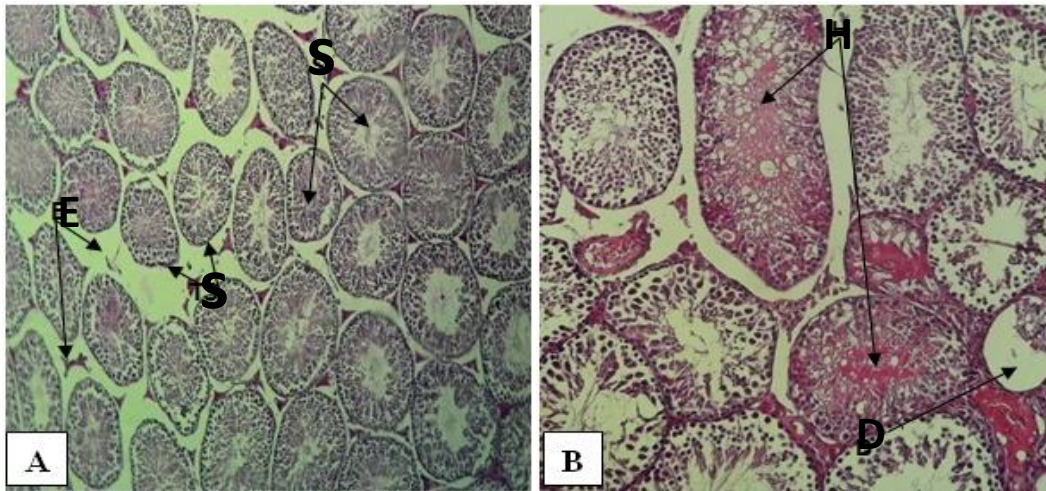


Figure 75 : Évaluation microscopique de l'histologie des testicules des souris mâles F1 traitées HgCl_2 et leur témoins. (A) (H&EX150) Témoin montrant la structure normale des testicules avec (TS) des tubes séminifères, (E) Espaces interstitiels, (S) spermatozoïdes. (B) Le tissu des testicules des souris traitées avec des (H) Hémorragies au niveau des tubes séminifères et un (D) détachement du tissu au niveau de quelques tubes séminifère (H&EX200).

d. Dosage des minéraux traces au niveau des Testicules

Au niveau testiculaire le HgCl_2 a entraîné une augmentation significative des concentrations de minéraux traces tels que le fer ($p = 0,038$; $t = -2,647$) et le Zinc ($p = 0,007$; $t = -4,068$) chez les souris traitées adultes par rapport aux témoins. De même une augmentation importante du taux calcique est également observé ($p = 0,048$; $t = -2,388$), (**Figure 76**).

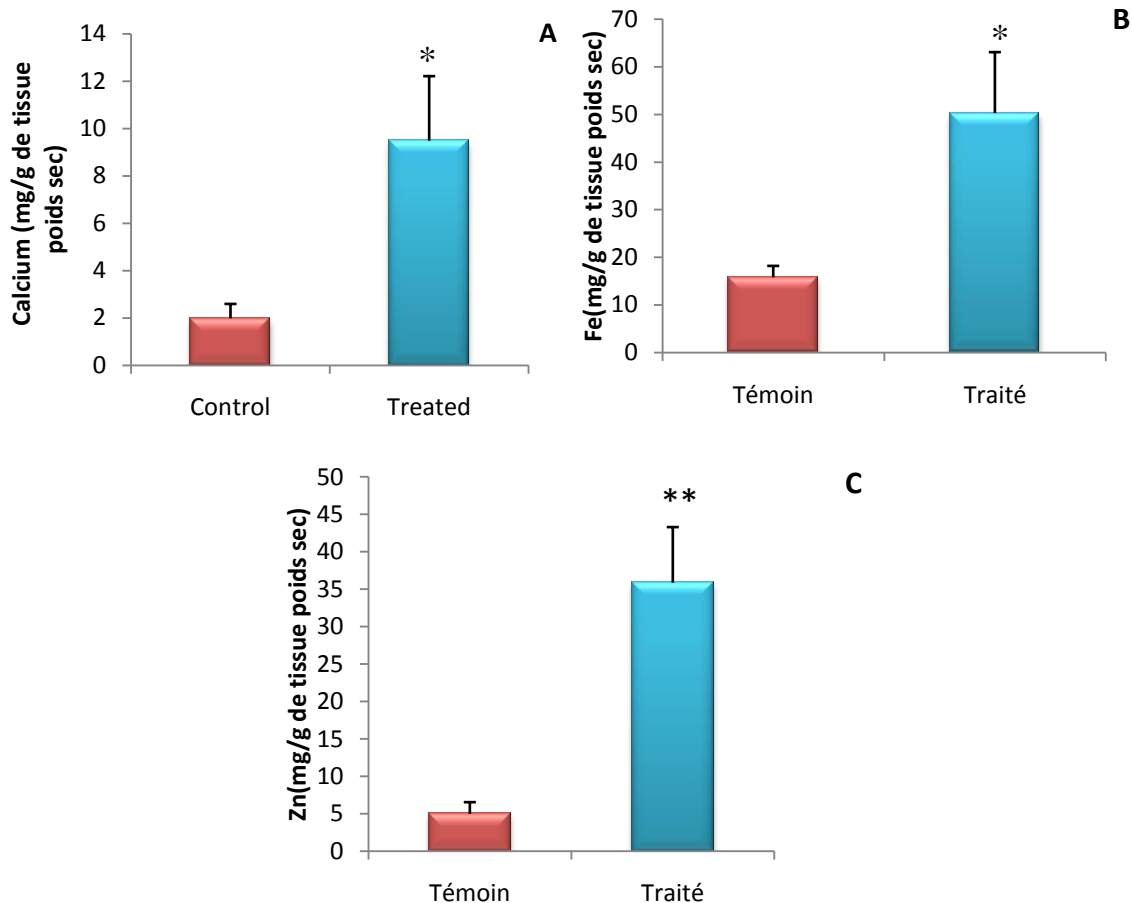


Figure 76 : Le taux des minéraux au niveau testiculaire des souris F1 males traités HgCl₂. Les valeurs sont présentés sous forme de moyenne ± SEM; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001. (student *t-test*)

2. Effet du mercure chez les femelles F1 adultes

a. L'effet de mercure sur le poids des ovaires, de l'utérus et de la graisse abdominale chez des femelles traitées F1 traité pendant 8 mois.

Les organes génitaux des femelles F1 traitées pendant 8 mois avec le HgCl₂ ont montré un poids relativement faible des ovaires ($p = 0,023$; $t = 2,815$) alors que le poids de l'utérus et les graisses abdominales n'ont montré aucune différence significative par rapport à leurs témoins, (**Figure 77**).

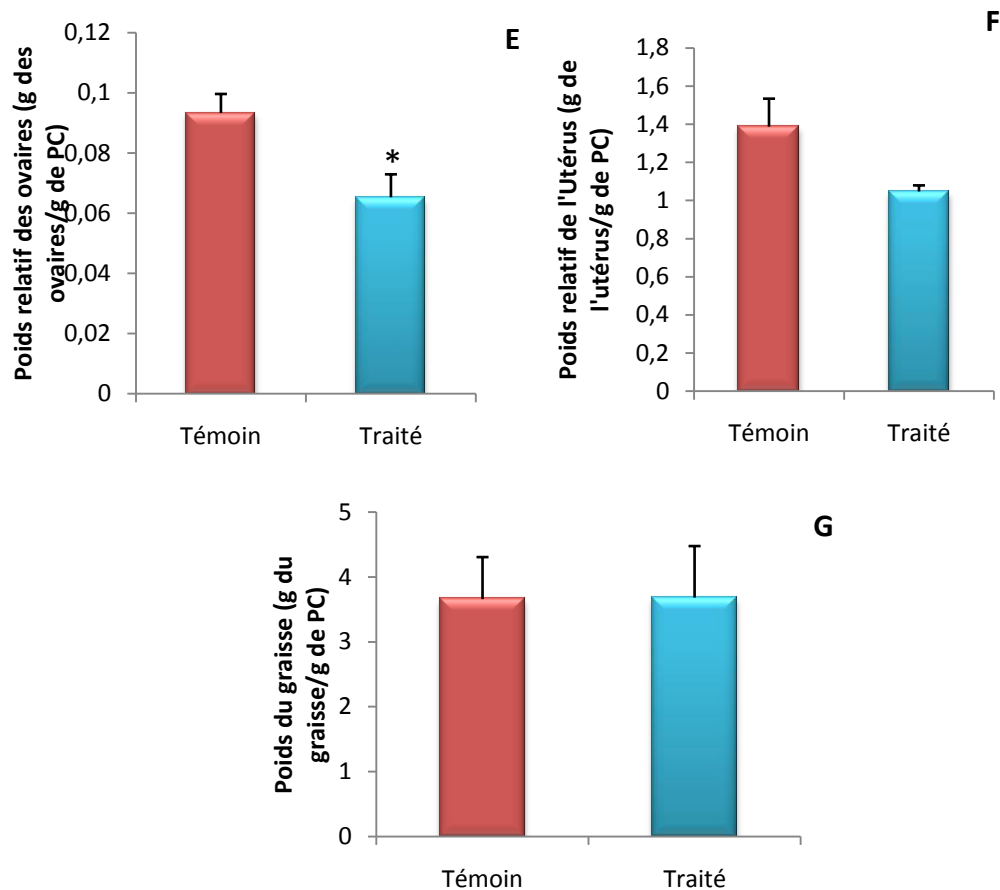


Figure 77: Poids relatif des organes des souris femelles F1 traitées par le mercure et des femelles témoins : Ovaires(E), Utérus(F) Graisses abdominales (G). Les valeurs sont présentés sous forme de moyenne \pm SEM; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. (student *t-test*)

b. Effet de mercure sur le taux des triglycérides et le taux du cholestérol chez les femelles adultes F1

Les taux des triglycérides et du cholestérol plasmatique sont significativement élevés chez les femelles F1 intoxiqués pendant huit mois dès la vie fœtale comparant à leurs témoins ($p = 0,040$; $t = -2,401$, $p = 0,023$; $t = -2,725$ respectivement), (Figure 78A-B).

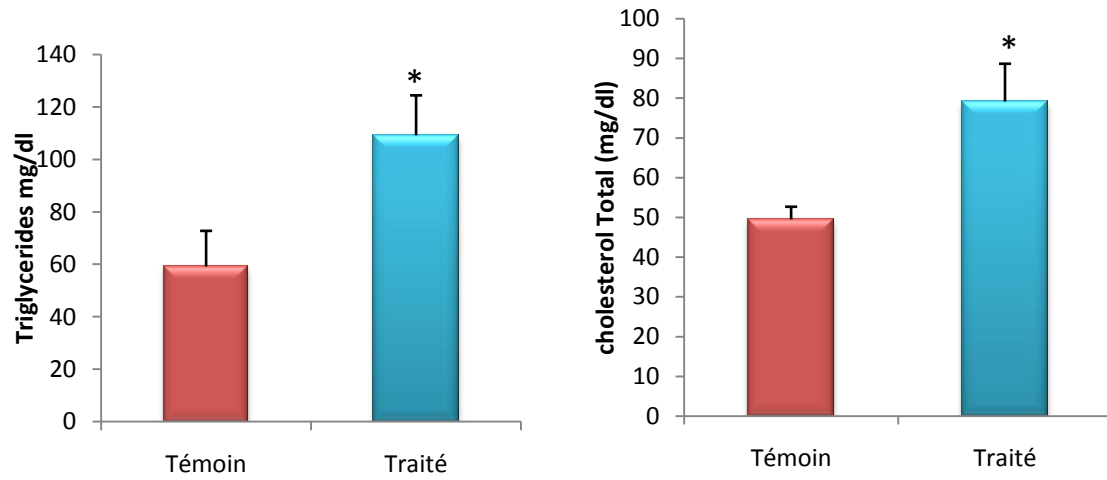


Figure 78: Le taux des triglycérides (A) et de cholestérol (B) des femelles traitées HgCl₂ F1 et leurs témoins. Les valeurs sont présentées comme moyenne ± SEM; *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, (student *t*-test).

DISCUSSION

Les travaux de la présente thèse rapportent une investigation détaillée de différents profils toxicologiques du mercure inorganique administré à de faibles doses dans un organisme vivant. Outre l'aspect homéostasique qui est approché dans sa globalité, l'aspect développemental a aussi retenu une grande attention eu égard des problèmes engendrés durant la période très sensible du développement.

Dans ce sens, notre étude a tenté de combler une lacune dans la littérature et d'étendre plus les données antérieures concernant les conséquences neurotoxicologique et toxique causées par une exposition continue à de faibles doses de mercure inorganique au cours du développement. Le protocole que nous avons utilisé lors de l'administration continue de faibles concentrations de la forme inorganique du mercure via l'alimentation pendant une longue période de la vie chez la souris débute de la gestation et continué jusqu'au l'âge adulte reflète les conditions environnementales humaines courantes. Très peu d'études se sont intéressées à la période de gestation malgré sa grande sensibilité car elle représente une période dynamique d'organogénèse et de maturation neuronale. La dose que nous avons utilisée dans cette étude n'est pas élevée et se situe en dessous de la dose avec le plus faible effet observé (LOEL) (**Institóris et al., 2001**). Pour s'assurer du passage physique de la dose expérimentée à l'organisme des souris expérimentées, nous avons mené des mesures au niveau des quantités d'eau, contenant la dose de mercure consommée quotidiennement. La comparaison de la consommation journalière moyenne d'eau, à la fois chez les souris témoins et traitées au cours de la période expérimentale n'ont montré aucune différence significative, contrairement aux études précédentes chez le rat (**Chehimi et al., 2012; Mello-Carpes et al., 2013; Peixoto et al., 2007; Oliveira et al., 2012**). Ceci suggère fortement l'absence de goût métallique associé au mercure inorganique à la dose que nous avons utilisée, ce qui aurait pu affecter l'appétibilité de la solution de HgCl_2 . Ces données confortent notre approche quant à la dose appropriée de HgCl_2 qui est ingurgitée aux souris. De plus, il a été rapporté que lorsque le mercure inorganique est administré, jusqu'à 40% peut pénétrer dans le corps par l'estomac et les intestins. Immédiatement après son entrée dans l'organisme, il atteint la circulation sanguine et ensuite de nombreux tissus, y compris le foie, le rein et le SNC malgré sa difficulté de franchir la barrière hémato-encéphalique, contrairement au MeHg et aux vapeurs de mercure métallique. Il est intéressant de noter que des études antérieures

ont montré qu'une exposition orale à long terme aux sels de mercure inorganiques provoque des lésions au niveau du système nerveux (**Peixoto et al., 2007; Chehimi et al., 2012**), ce qui conforte son passage du compartiment sanguin au compartiment cérébral.

I-EFFET DU HgCl₂ SUR LE CERVEAU ET SUR LE COMPORTEMENT DES SOURIS

Les résultats issus du dosage du mercure au niveau des différentes régions cérébrales ont montré clairement que dans nos conditions, au moins une partie de la forme inorganique du mercure a pu être transférée au compartiment cérébral. Ainsi, la bioaccumulation résultante d'un flux continue du HgCl₂ a permis de détecter de fortes concentrations du métal dans plusieurs structures cérébrales. Ceci plaide fortement en la capacité du HgCl₂ à franchir la barrière hématoencéphalique (BHE), bien que les mécanismes exacts sous-tendant ce passage ne soient pas encore élucidés, il n'est pas exclu que pour une fraction au moins du métal, une méthylation ait été réalisée par les bactéries intestinales, pour rejoindre après le cerveau.

Les études de neurotoxicité portant sur la forme inorganique du mercure ont eu recours différents modèles d'exposition pour ce qui est de la dose administrée et de la période de traitement (**Chehimi et al., 2012; Oliveira et al., 2012**). Bien que très intéressantes, ces études se sont focalisées uniquement sur une période d'exposition limitée et ne représentent pas les conditions réelles de l'exposition humaine. Dans nos investigations, nous nous sommes intéressés à analyser les éventuels effets de cette bioaccumulation sur le fonctionnement cérébral notamment en relation avec les altérations du développement sensorimoteur chez les souriceaux durant la période d'allaitement et les troubles comportementaux après sevrage au jour postnatal 25 et au stade adulte. Nous avons mené en parallèle une étude du comportement maternel chez les femelles F0 et son implication dans le développement sensorimoteur des souriceaux.

1. Effet du mercure sur le comportement maternel

Le comportement maternel comprend l'ensemble des interactions entre les femelles et leurs descendants jouant un rôle important dans le développement sensorimoteur normal de la progéniture. La faible dose du HgCl₂, bien qu'administrée en continue n'a provoqué aucune toxicité notable chez les femelles gestantes puisque le processus gestationnel a atteint son terme. En outre, aucun signe de décès maternel, d'avortement ou de saignement vaginal n'est observé après l'exposition des femelles à cette dose de HgCl₂. Il n'en demeure pas moins qu'un effet clair et net sur le comportement maternel est relevé chez les femelles gestantes traitées. Il s'agit d'une

augmentation du temps de l'allaitement passif, de la diminution du temps passé aux activités maternelles (contact et léchage des souriceaux) avec l'augmentation du temps passé dans les activités non maternelle (se nourrir et renifler autour de la cage). De même, nous avons montré que les temps des trois paramètres du test de récupération (premier contact avec les souriceaux, récupération du premier souriceau et le temps pour récupérer tous les souriceaux) sont plus importants chez les femelles traitées comparées aux témoins. Des allégations similaires ont rapporté un effet du HgCl₂ au niveau central et plus précisément au niveau de l'hypothalamus chez les mères gestantes et ce même à cette faible dose (Sheehan et Numan., 2002) et modulant par conséquent la sécrétion des neurotransmetteurs impliqués dans le comportement maternel tels que l'ocytocine, la vasopressine et la dopamine (Mann et Babb., 2004 ; Bosch et Neumann, 2012). Des mêmes résultats sont rapportés par Chehimi et al (2012) chez le rat et qui ont montré que le temps alloué à l'allaitement et le léchage des ratons est réduit alors que celui passé par les mères à se nourrir en dehors de la zone de nidification est plus important. Des auteurs ont suggéré que ce comportement est régulé par une stimulation multi sensorielle et par des stimuli distaux provenant de la femelle ou des souriceaux, ce qui induit une proximité par l'orientation, l'attention et l'excitation (Stern et al., 1990). Ces stimuli incluent des informations auditives sous forme de vocalisations ultrasonores des souriceaux, ainsi que des signaux thermiques, visuels et olfactifs (Anniko et al., 1983 ; Noirotet et al., 1964 ; Smotherman et al., 1974), d'autres auteurs ont signalé que la diminution ou l'absence du contact entre la mère et son petit peut influencer le comportement du développement de ces derniers, en particulier pour faire face au stress et aux maladies (Caldji et al., 1998 ; Lovic et al., 2001). Ces résultats peuvent d'un côté expliquer le retard sensorimoteur, l'augmentation de l'anxiété et la diminution du poids observés chez les souriceaux traités dans la présente étude. Des mêmes résultats ont été prouvés dans le travail de Gasem (Gasem, 2019).

2. Effet du HgCl₂ sur le stress oxydatif et l'AChE dans le cerveau en relation avec le développement sensorimoteur et comportemental des souriceaux

a-Stress oxydatif et développement sensorimoteur

Pour mettre en évidence des éventuelles altérations physiologiques au niveau cérébral chez les souris F1, nous avons étudié le statut de stress oxydatif qui est proposé pour représenter un mécanisme important impliqué dans la neurotoxicité induite par le mercure. Nous avons

constaté que le HgCl₂ perturbe l'homéostasie rédox intracellulaire avec une augmentation ultérieure du stress oxydatif intracellulaire et une dérégulation des enzymes antioxydantes vitales. En effet, pendant la période postnatale, jusqu'au sevrage, nous avons montré pour une faible dose expérimentée de HgCl₂ la présence de taux élevé et important de peroxydation lipidique, confirmé par les concentrations élevées de MDA chez les souriceaux traités par rapport aux témoins dans les deux premières semaines postnatales (PN5 et PN10) et a commencé à se diminué durant la troisième semaine (PN15 et PN21). Il intéressant de noter que le mercure était capable d'augmenter les biomarqueurs de la peroxydation lipidique, altérant la perméabilité mitochondriale et l'homéostasie du calcium (Ca²⁺) (**Yin et al., 2007**) par exagération de la production de radicaux libres au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale (**Barja 1999; Gassner et al., 1997**). Cette augmentation transitoire de la peroxydation lipidique pourrait être due à la concentration cérébrale élevée du HgCl₂ chez le fœtus et qui persiste jusqu'aux premières semaines après la naissance, puis commence à se diminuer au cours du temps ce qui explique la diminution du taux de MDA aux PN15 et PN21 comme il a été montré pour le méthylmercure par **Goulet (2002)**, mesurant une concentration cérébrale et hépatique très élevée du méthylmercure chez le fœtus et qui devient de plus en plus faible durant les 42 jours après la naissance. Des études antérieures ont suggéré que le mercure inorganique peut être méthylé dans la lumière intestinale avant absorption (**Rudd et al., 1980**) et franchir la barrière placentaire (**Yang et al., 1996; Chehimi et al., 2012**) et pouvait par conséquent agir sur le CNS des fœtus et augmenter par ricochet la peroxydation lipidique au cours de la gestation. Cependant l'analyse de l'activité des enzymes antioxydantes a montré une dérégulation des concentrations de ces enzymes surtout dans le cas de la GST, de la Catalase et de la TRxR. **Stringari** a montré que l'exposition prénatale au mercure provoque un déséquilibre enzymatique et un stress oxydatif dans la région antérieur du cerveau chez les rongeurs (**Stringari et al., 2008**). **Freitas** a précédemment suggéré que les tissus cérébraux étaient vulnérables au stress oxydatif (**Freitas, 2009**) et qui est en plus lié à une déficience cognitive chez le rat (**Reeta et al., 2011**). Cette relation entre l'augmentation de la peroxydation lipidique et le dysfonctionnement cognitif chez les souriceaux est confirmé pendant cette étude par l'altération du développement sensorimoteur dans les tests «negative geotaxis», «cliff avoidance» et «surface righting reflex» au PN5 et par le paramètre angle de la nage dans le test «Swimming development» au jour PN10 chez les souriceaux traités. Ces résultats pourraient être liés aux dommages ou au développement

inapproprié du cerveau en général (**Yoshida et al., 2011**), comme ceci a suggéré pour l'exposition au Pb pendant la gestation (**Mello et al., 1998**). Ceci est peut être lié aux dommages observés au niveau du cervelet car les cellules cérébelleuses sont ciblées sélectivement par des composés du mercure *in vivo* (**Sanfeliu et al., 2003**). De même, une relation entre le déficit moteur induit par le mercure et les lésions cérébelleuses est un phénomène qui est bien caractérisé (**Sakamoto et al., 1993**). D'autre part l'altération du comportement maternel et la diminution des interactions entre mères-souriceaux peut contribuer à l'altération du développement corporel et comportementale chez la descendance en général, influençant au passage leur habitude dans un nouvel environnement (**Chehimi et al., 2012**).

b-Acetylcholinesterase et développement sensorimoteur

L'étude de la variation de l'activité de l'AChE cérébrale chez les souriceaux durant la période d'allaitement (PN5, PN10, PN15 et PN21) n'a montré aucune différence entre les témoins et traités excepté une activation significative mais transitoire au PN10 chez les souriceaux traités par rapport aux témoins. Ces résultats peuvent être dus à l'immaturation du cerveau ou bien encore à la faible dose de mercure passé à travers le lait maternel. Chez les écrevisses l'étude de **Ayumi et al., (2016)** a montré qu'une faible dose de mercure stimule l'activité de l'AChE, mais des concentrations plus élevées (traitements moyen et élevé) ont tendance à inhiber cette enzyme comme nous avons montré chez l'adulte. Nos résultats montrent clairement que cette faible dose de mercure n'a pas inhibé l'activité AChE chez les souriceaux traités ce qui explique que l'activité locomotrice au niveau du paramètre utilisation de membres du test «Swimming développement», n'est pas altéré dans tous les âges postnataux étudiés (PN10, PN12 et PN21). Contrairement à notre étude, **Gasem (2019)** a montré une inhibition significative de l'activité AChE durant toute la période d'allaitement. Ces différences entre les deux études pourraient être dues à la différence de sensibilité des espèces.

c-Le comportement après sevrage

Nos résultats concernant le dysfonctionnement cognitif au jour PN25 montre une altération très significative chez le lot traité. En effet nous avons montré un effet anxiogène du mercure chez les souriceaux traités à cet âge précoce en analysant les résultats du test EMP et qui a relevé un indice d'anxiété et un pourcentage des passages dans les bras fermés qui sont significativement élevés. L'anxiété induite par HgCl₂ dans le test EPM est confirmée au niveau du test «Open Field»

par un temps un nombre des carreaux périphériques élevés. Cette anxiété s'apparente également à une diminution de la sociabilité des souriceaux avec augmentation du temps de toilettage dans le test d'interaction sociale. Bien que les mécanismes biochimiques et physiologiques sous tendant ces phénomènes restent à cet âge inconnus, il est possible que l'augmentation de l'anxiété chez les sujets traités serait la résultante des modifications dans la concentration de la sérotonine dans les régions du cerveau sous l'action de mercure (Eddins *et al.*, 2008 ; Gasem *et al.*, 2019). Oliveira *et al.*, (2012) ont signalé que l'exposition au HgCl₂ est à l'origine de déficits de développement postnatal et de modifications du comportement chez la descendance des rongeurs.

Cependant nous avons montré une diminution de la mémoire dans le test « RO » et au niveau du « Y-maze » chez les souriceaux traités par rapport aux témoins. Il a été montré que l'exposition prénatale au mercure a des effets durables sur les capacités d'apprentissage et les capacités émotionnelles (Chehimi *et al.*, 2012). D'autres études ont montré que le mercure principalement accumulé dans l'hippocampe et le cervelet des rats, alors que chez la rate femelle mère, le mercure est stocké presque en moyenne dans toutes les régions du cerveau. L'hippocampe étant étroitement lié aux fonctions d'apprentissage et de la mémoire dans les régions du cerveau et donc une exposition prénatale et postnatal au mercure inorganique risquerait de perturber le développement cognitif des nouveau-nés (Weiyue Feng *et al.*, 2004).

3. Effet du HgCl₂ sur le stress oxydatif et l'AChE cérébral et sur comportement chez la souris F1 adulte

D'après les résultats précédents l'exposition prénatale et postnatale au mercure des souris a entraîné des changements de comportement et des altérations cognitive chez les souriceaux traités. Ces altérations vont persister jusqu'à l'âge adulte avec la continuité de l'intoxication par HgCl₂.

Les troubles comportementaux qui sont évalués chez les souriceaux indiquent clairement que HgCl₂ est capable de franchir la barrière hémato-encéphalique malgré sa faible capacité lipophile et se concentre au cours du temps au niveau cérébrale. Chez l'adulte l'évaluation des concentrations de ce métal montre sa présence par des quantités considérables dans les différentes structures cérébrales étudiées. De plus, la présence d'altérations marquées dans les activités enzymatiques ainsi que dans les tests comportementaux favorise la présence de HgCl₂ en grande quantité dans le cerveau.

a- L'effet de HgCl₂ sur Acétylcholinestérase et sur l'activité locomotrice chez la souris adulte

Nos résultats ont indiqué que l'exposition à une faible dose de HgCl₂ diminuait l'activité de l'AChE impliquée dans la dégradation de l'ACh au niveau des synapses muscariniques et nicotiniques. Ceci pourrait être expliqué par le taux élevé de peroxydation lipidique dans les structures cérébrales, comme le confirment les concentrations élevées de MDA chez les souris traitées par rapport aux témoins. La peroxydation des lipides est connue pour affecter les organites membranaires, en particulier les mitochondries (**Gstraunthaler et al., 1983**). Étant donné que nous avons trouvé un effet clair du traitement par HgCl₂ sur la peroxydation des lipides cérébraux et l'inhibition de l'activité de l'AChE, nous supposons que les faibles quantités de Ca²⁺ observées, bien que la différence ne soit pas statistiquement significative entre les souris traitées et les souris témoins, moduleraient négativement l'effet de faible dose de HgCl₂ lors de la libération d'ACh. Ces données sont conformes aux études précédentes documentant la modulation négative de l'activité de l'AChE cérébrale par des composants, tels que les pesticides, et les métaux lourds non essentiels (**Goel et al., 2007; Liapi et al., 2008; Franciscato et al., 2009; Santos et al., 2012; Basha et Reddy 2015**). Cette réduction de l'activité de l'AChE pourrait être liée à une activité locomotrice anormale mesurée chez les animaux traités. En effet, des résultats antérieurs ont également révélé une activité locomotrice accrue chez les adultes exposés à de faibles doses de HgCl₂ aux stades péri- et post-nataux (**Huang et al., 2011**). Nos résultats issus du test Open Field (OF) n'ont pas montré d'activité locomotrice anormale, alors que l'activité AChE était significativement inhibée dans le cervelet qui est la structure cérébrale impliquée dans les ajustements réflexes et le contrôle moteur (**Glickstein et al., 2009**). Ces résultats suggèrent qu'une exposition chronique à de faibles doses de HgCl₂ entraîne une bioaccumulation importante du métal dans le cerveau, notamment dans le cervelet, à une concentration capable de modifier l'activité enzymatique de l'AChE, mais non suffisante pour altérer la fonction motrice. Nos résultats ont également révélé que cette activité pourrait être augmentée dans d'autres structures cérébrales après le traitement par HgCl₂. Cette dualité de réponse au HgCl₂ est rapportée dans le cerveau du poisson zèbre après l'administration d'éthanol (**Rico et al., 2007**). Les auteurs ont indiqué que l'augmentation de l'activité de l'AChE n'est pas directement liée à une expression plus élevée du gène de l'AChE et qu'elle pourrait être due à un

effet de la substance toxique sur la modulation post-traductionnelle de l'AChE (modifications possibles de l'état de phosphorylation). Nos résultats suggèrent que l'activité de l'AChE au niveau des structures cérébrales de souris traitées adultes est modifiée de manière différentielle après une exposition chronique à un traitement à faible concentration de HgCl₂, ce qui pourrait révéler différents mécanismes moléculaires liés à la signalisation cholinergique due à la toxicité du mercure.

b- L'implication du HgCl₂ dans la régénération du Stress oxydatif et sur les troubles d'anxiété

En plus de l'activité locomotrice, le test OF montrent également que le mercure induit un état d'anxiété chez les souris traitées, car nous avons montré une augmentation du nombre de carreaux traversés avec du temps passé à la périphérie par rapport à l'activité et au temps au centre. En effet, un temps plus long passé à la périphérie du dispositif OF est associé à un niveau d'anxiété plus élevé. Ainsi, les souris traitées avec HgCl₂ sont plus anxieuses que les animaux témoins à l'Open Field. En plus du test OF, nous avons examiné l'effet anxiogène de HgCl₂ par le test EPM, un des modèles les plus largement utilisés dans la recherche préclinique contemporaine sur l'anxiété (**Rodgers et Cole 1994; Hogg 1996**). Il en ressort que, les souris traitées présentaient un comportement anxieux significativement plus élevé, car les pourcentages d'entrées et le temps passé dans les bras ouverts du labyrinthe anxiogène sont significativement faible que ceux du groupe témoin alors que le pourcentage d'entrées dans les bras fermés n'étant pas différent entre les souris témoins et les souris traitées. Des effets équivalents sont rapportés pour le MeHg et l'éthanol (**Maia et al., 2010**). Enfin, le fait que le niveau de toilettage (grooming), considéré comme un comportement lié à l'anxiété, soit significativement plus élevé chez les souris traitées confirme également le rôle joué par HgCl₂ dans la genèse de l'anxiété et confirme donc l'augmentation du niveau d'anxiété chez les animaux exposés au mercure. Il est intéressant de noter que le degré d'inhibition de l'interaction sociale peut servir d'indice indirect de défense ou d'anxiété (**Blanchard et al., 1998; Bramley et Wass 2001; Mastripieri et al., 1992**). D'autre part nos résultats ont montré que l'exposition au mercure diminuait le comportement social, car les souris traitées passaient beaucoup moins de temps à explorer la deuxième souris étrange par rapport à la première souris étrange dans la deuxième session du test. Outre ces anomalies neuro-comportementales, il a été démontré que l'exposition chronique au HgCl₂ modifiait les biomarqueurs du stress oxydatif dans de nombreux organes et chez de

nombreuses espèces (**Agarwal et Behari 2007; Branco et al., 2012**). En effet, le stress oxydatif est fortement lié aux effets neuro-comportementaux induits par HgCl₂ (**Mello-Carpes et al., 2013; Teixeira et al. 2014**). Cela présente un grand intérêt dans le cas d'anxiété observée chez les souris traitées, car des données antérieures démontraient la présence d'un lien entre le stress oxydatif et un comportement lié à un degré élevé d'anxiété (**Bouayed et al., 2009**). De plus, certaines de ces études fournissent des preuves directes et indirectes sur un lien de causalité entre le stress oxydatif et le comportement lié à l'anxiété (**Desrumaux et al., 2005; Hovatta et al. 2005; Souza et al., 2007; Berry et al., 2007**). Nous rapportons également ici l'inhibition de toutes les activités des enzymes évaluées (SOD, CAT, GPx, ThR et GST) et parmi les régions cérébrales analysées, l'hypothalamus et dans une moindre mesure les structures du tronc cérébral sont les plus touchés. L'inhibition observée est généralement due à la liaison du mercure au site actif de chaque enzyme ou à la concentration élevée de radicaux libres occasionnée par l'action du métal. Ces observations ont clairement indiqué que le HgCl₂, administré à de faibles doses mais de manière continue pouvait modifier l'équilibre entre le système oxydant et antioxydant. En ce qui concerne la SOD, il est intéressant de noter que cette enzyme catalyse la conversion des radicaux superoxydes en peroxyde d'hydrogène, qui se décompose en eau et en oxygène moléculaire, empêchant ainsi la formation de radicaux hydroxyles par la CAT et la GPx. L'activité de la SOD, dans cette étude, est généralement régulée négativement dans les structures cérébrales analysées, ce qui indique que le premier système de défense enzymatique antioxydant est sérieusement affecté ce qui peut par conséquent initier une peroxydation lipidique, comme en témoigne l'élévation du taux de MDA dans le cerveau. Ce mécanisme pourrait entraîner une élévation de l'oxyde nitrique, qui endommage les structures du système nerveux central (**Songur et al., 2004**). D'autre part, l'exposition au mercure est associée à des modifications significatives des systèmes de la thiorédoxine (ThR) et du glutathion-péroxydase (GPx). En effet, il a été rapporté que le Hg perturbe l'homéostasie redox intracellulaire avec une augmentation subséquente du stress oxydatif intracellulaire et une dérégulation des enzymes antioxydantes essentielles, y compris les sélénoprotéines, telles que TrxR et GPx. En effet, via sa liaison au site sélénium (Se) le Hg inhibe la fonction de ces enzymes (voir **Spiller 2018**). Nous montrons ici pour la première fois que la dégradation de l'activité de l'enzyme antioxydante évaluée par le Hg au niveau cérébral est spécifique à une région, ce qui est probablement dû au fait que ces régions présentent des caractéristiques biochimiques différentes (**Das et al., 1982**). En complément de ces

enquêtes, nous avons également évalué le statut des métaux essentiels, tels que le Fe, le Cu, le Mg et le Zn. Ces oligo-éléments sont capables de se lier à des ions mercuriques ou à des enzymes antioxydantes, jouant ainsi un rôle protecteur contre la toxicité du mercure (**Feng et al., 2004**). Dans cette étude, nous avons constaté une augmentation des concentrations de tous les métaux essentiels que nous avons analysés, bien qu'à des degrés moindres. Le Fe, le Cu et le Mg ont montré des niveaux significativement élevés, en particulier dans l'hypothalamus, alors que des niveaux encore plus élevés de Zn sont présents principalement dans le bulbe olfactif. La présence de telles distributions hétérogènes et spécifiques pourrait refléter l'action différentielle du mercure sur l'homéostasie de ces métaux essentiels. En outre, ces résultats présentent un grand intérêt, du moins de certains d'entre eux, comme le Cu et le Zn, faisant partie de la métallothionéine (MT) antagoniste de la toxicité des métaux lourds (**Girardi et Elías, 1995**), et la SOD qui joue un rôle essentiel dans l'inhibition de la peroxydation lipidique provoquée par HgCl₂. Pris dans leur ensemble, les altérations des activités enzymatiques et des niveaux d'oligo-éléments, montrent que le Hg semble induire une inhibition drastique de ces activités régulant au passage la hausse des niveaux d'oligo-éléments essentiels au niveau de l'hypothalamus. Cette diminution frappante dans l'hypothalamus pourrait être liée au fait que le mercure s'est accumulé dans cette partie après une supplémentation exogène et qu'il n'est pas rapidement éliminé par rapport aux autres régions du cerveau. Une supplémentation en Se, antagoniste de la toxicité du mercure avec des effets antioxydants, n'a pas réussi à réduire l'accumulation de mercure inorganique, alors qu'elle a diminué l'accumulation de la forme organique, MeHg (**Branco et al., 2012**). Cette découverte révèle que l'hypothalamus est plus sensible au mercure par rapport aux autres régions du cerveau, ce qui correspond à une éventuelle altération ultérieure de l'homéostasie et des fonctions neuroendocrines / endocriniennes en relation avec les troubles liés à l'anxiété (**Zeng et al., 2007**). Ainsi, des études antérieures chez l'homme ont montré que l'exposition au mercure provoque une hypertrophie de la thyroïde accompagnée d'une élévation de la triiodothyronine et de la thyroxine et d'un faible taux d'hormones stimulant la thyroïde (**Karpathios et al., 1991; Barregård et al., 1994**). De plus, **Simon et al., (2002)** ont signalé une prévalence accrue de troubles de la thyroïde chez les patients présentant un trouble d'anxiété générale et un trouble de panique. Il est intéressant de noter qu'une production exagérée de radicaux libres et des niveaux de stress oxydant ont été rapportés chez des patients présentant des troubles de la thyroïde (**Komosinska-Vassev et al., 2000; Bhimte et al., 2012**) ce qui pourrait

expliquer le désordre lié à l'anxiété observé en raison d'une altération de l'axe l'hypothalamo-glande pituitaire.

c- L'implication du HgCl₂ dans la régénération du Stress oxydatif et les troubles de mémoire

Nos résultats ont montré une altération significative de la mémoire à court terme dans les deux tests utilisés ; une diminution de l'indice de reconnaissance au niveau du test reconnaissance des objets et par la diminution du pourcentage d'alternance dans le test de Y-maze). Étant donné que l'hippocampe est l'une des structures cérébrale impliqué dans le processus de la mémorisation, nous avons montré une augmentation significative de la peroxydation lipidique par action de mercure au niveau de cette structure, ce qui pourrait expliqué cette altération de la mémoire. Les résultats obtenus concordaient avec ceux obtenus chez le rat adulte dans l'étude de Mello-Carpes (**Mello-Carpes et al., 2013**). Des études ont suggéré que le mercure perturbe indirectement la fonction endocrinienne en modifiant l'axe HPT, ce qui peut être le médiateur des altérations cognitives causées par le mercure (**Schantz et Widholm, 2001**). D'autre études ont montré que l'exposition au mercure métallique, pendant la période prénatale, peut perturber le système dopaminergique et glutamatergique, entraînant des perturbations permanentes dans les processus d'apprentissage et de la mémoire (**Cagiano et al., 1990**).

4. Effet du mercure sur le développement physique des souriceaux

L'étude des paramètres morphologiques des souriceaux tels que la prise du poids corporel qui est généralement utilisée comme un indice de toxicité a montré qu'au cours de la période postnatale une diminution significative du poids de PN5 à PN17 dans le groupe traité par rapport au groupe témoin alors qu'à PN21, le gain a atteint les valeurs des témoins, reflétant une régulation retardée du poids corporel au cours des 3 semaines suivantes la mise bas. Le mercure inorganique ne provoque donc qu'une réduction transitoire du poids corporel. D'une manière surprenante, nos résultats contrastent avec ceux rapportés pour les ratons dont les mères sont exposées à une dose de HgCl₂ de 50 ppm, ce qui est relativement plus élevé que la dose que nous avons utilisée et le gain du poids corporel ne devient significatif qu'au PN16 et PN17 (**Chehimi et al., 2012**), alors que les différences significatives du poids au cours de la période postnatale sont obtenues avec une dose élevée de HgCl₂ (100 ppm). Les différences entre les deux études

pourraient refléter des différences de sensibilité des espèces vis-à-vis de l'effet du HgCl₂. Le gain retardé que nous avons observé pourrait refléter une diminution de la consommation de lait maternel (**Chehimi et al., 2012**) ou une réduction probable de l'absorption intestinale d'éléments nutritifs essentiels (**Rodriguez-Yoldi et al., 1989**). Oliveira et al ont rapporté que la réduction du gain de poids corporel chez les animaux exposés au Hg pourrait être due à une altération des métaux essentiels tels que le Cu, le Zn, le Fe et le Cu, (**Oliveira et al., 2016**).

Comme nous l'avons indiqué ci-dessus, l'exposition au HgCl₂ pendant la période de gestation et de lactation entraîne des effets indésirables sur la prise du poids, alors qu'au niveau des autres paramètres morphologique, nous rapportons, à notre connaissance, pour la première fois, un effet significatif de l'exposition au HgCl₂ sur les paramètres physiques. Ainsi, une diminution de la longueur du corps et de la queue au PN5 et PN15 respectivement. Ce retard chez les souriceaux traités pourrait être dû à des troubles métaboliques survenus pendant la gestation. Une récupération progressive de la fonction pourrait alors se produire pendant la période postnatale, car après le PN15, les différences morphologiques sont ensuite estompées. D'autres repères morphologiques tels que l'apparition du sexe, l'éruption des incisives et l'apparition des poils montrent également un retard dans le groupe exposé au HgCl₂ au cours de la période postnatale. Le retard accusé au niveau de ces paramètres physiques dans le groupe traité peut être lié à la diminution du poids des souriceaux traités. En effet, le poids corporel peut être le meilleur indicateur du développement physique et tout changements au niveau des repères de développement avant le sevrage, tels que le détachement des oreilles, l'éruption des incisive, etc., sont fortement corrélés au poids corporel (**ICH, 1993; Lochry E.A et al., 1987**). Ces résultats sont en accord avec ceux du **Karagas et al (2012)** chez l'homme et qui ont montré les effets négatifs d'une faible exposition au mercure sur la croissance fœtale et sur la croissance du nourrisson au cours des deux premières années de vie.

Bien que l'exposition au HgCl₂ n'affecte pas la moyenne des petits par portée comparée aux témoins, nous devrions noter une réduction significative du pourcentage des mâles par portée traitées (20% moins que chez les témoins). Cette différence de ratio sexuel pourrait être due à une possible interaction du mercure inorganique avec des hormones sexuelles féminines au cours des périodes critiques du développement (**Silva et al., 2005**). Dans ce sens, il a été rapporté que HgCl₂ agit comme un stimulus semblable à l'œstrogène (**Martin et al., 2003**). Il n'est pas exclu

non plus que le mercure inorganique puisse agir en tant qu'agent anti-androgène, comme cela a été rapporté pour de nombreux produits chimiques (**Gaudriault et al., 2017**).

II-EFFET DU MERCURE SUR LES PARAMETRES BIOCHIMIQUES ET HISTOLOGIQUE AU NIVEAU DU FOIE

Au niveau du foie les principaux effets toxiques du mercure impliquent une interaction avec un grand nombre de processus cellulaires, y compris la formation de complexes avec des thiols libres et des groupes protéine-thiol, susceptibles de conduire à un stress oxydatif (**Stacey et al., 1982**). En raison de sa capacité de liaison au groupe sulfhydryle, le HgCl_2 peut également inhiber les activités de nombreuses enzymes, en particulier celles impliquées dans l'absorption du glucose par les cellules, la gluconéogenèse et les acides gras. Nos résultats chez les souriceaux traités n'ont montré qu'une seule augmentation significative de la peroxydation lipidique au jour PN10 alors que la réponse des enzymes antioxydants a montré une activation transitoire mais significative de la GST, de la SOD, de la CAT et de la TRxR au même jour postnatal (PN10) avec une inhibition de GPx au PN15 et au PN21 pour la CAT. Cette instabilité et dérégulation de ces enzymes au cours des 21 jours après naissance peut être due à l'augmentation de la concentration du mercure au niveau du foie des souriceaux provenant de la vie fœtale (**Goulet et al., 2002**) et qui s'ajoute à la faible dose provenant du lait maternel pour atteindre un maximum au PN10 et qui pourrait être responsable de la production excessive des ROS, induisant une peroxydation lipidique très significative déclenchant une réponse anti-oxydante importante vis-à-vis du niveau élevé des ROS. Cette réponse diminuerait le taux de peroxydation à un taux plus faible ce qui est bien marqué dans les autres jours postnataux PN15 et PN21. Cependant à l'âge adulte et après une longue durée d'intoxication mercurielle nous avons montré une inhibition de tous les enzymes antioxydants étudiés durant cette étude ; cette inhibition qui est déjà montrée pour la catalase au PN21 chez les souriceaux traités. Ces données indiquent également que les radicaux libres générés par HgCl_2 altèrent l'activité antioxydante endogène chez l'adulte. Les travaux de **Brando et al., (2005)** et de **Jadhav et al., (2007)** ont mis en évidence une diminution des enzymes anti-oxydantes après une intoxication au mercure. En raison de la faible activité des enzymes antioxydantes dans le foie des souris traitées adultes, nous pouvons supposer que le foie est très susceptible au stress oxydatif, ce qui va dans la même lignée que le rôle principal du foie

dans le cadre de la toxicité, qui est celui de la détoxification faisant intervenir l'ensemble des enzymes analysées. Le stress oxydatif induit par le mercure devient sévère et les mécanismes cités ci-dessus, ne parviennent pas à atténuer les dégâts. Il a été démontré que le mercure atténue les systèmes antioxydants et provoque des dommages oxydatifs via la génération de H₂O₂, entraînant ainsi une peroxydation des lipides (**Cheng et al., 2006; Jadhav et al., 2007**). Par conséquent, il y a une augmentation de la formation de ROS par le chlorure de mercure qui peut induire des altérations biochimiques et fonctionnelles de la membrane et donc des dommages aux cellules hépatiques. En outre, nous avons montré que l'intoxication au mercure induit également une élévation significative de l'activité sérique AST et du taux du cholestérol. Cette augmentation indique une lésion hépatique et s'explique par la fuite des enzymes du tissu vers le plasma qui est dû à l'altération de la perméabilité membranaire causée par le mercure. Ces résultats sont en accord avec les travaux de **Deepmala et al (2013)**. Ceci confirme nos résultats sur les altérations histopathologiques du foie induites par l'intoxication au mercure ce qui est rapportée également par **Carmichael et Fowler (1979)** et **Al-Saleh et al., (2005)**. Ainsi, l'observation des coupes histologiques que nous avons réalisées révèle que la toxicité du mercure s'est manifestée par des atteintes tissulaires sans équivoque, au niveau du foie. Ces altérations sont induites, au cours d'un stress oxydatif, par l'augmentation de la peroxydation des lipides. Il en résulte l'activation des inflammations cellulaires et une dégradation des produits lipidiques (**Milton P et al., 2011**). De nombreuses recherches ont montré que les radicaux oxygénés libres sont à l'origine de ces altérations (**Thevenod et al.,2000**). En effet, ces radicaux peuvent diffuser dans le cytoplasme et à travers les membranes, pour aller attaquer des composants cellulaires éloignés de leur site de production ou encore pour atteindre d'autres cellules. L'attaque des composants organiques des cellules (lipides, protéines ou glucides) permet la transmission du caractère radicalaire et déclenche ainsi des pathologies sévères allant jusqu'à la mort des animaux. Il a été signalé que l'exposition subchronique par voie orale du mercure entraîne de multiples nécroses au niveau du foie associé à des changements de l'ultra-structure et des altérations hépatiques (**Necib et al., 2013a**). En plus de ces anomalies, nous avons constaté une augmentation des niveaux de Zn, du Fe et du Cu. Plusieurs études ont montré que certains oligo-éléments, tels que Se, Cu et Zn, etc., en se liant à des ions mercuriques ou en induisant des enzymes antioxydantes, jouent un rôle protecteur contre la toxicité du mercure (**Glynn et Lind, 1995; Orisakwe et al., 2001 ; Girardi et Elias, 1995**). L'accumulation anormale d'ions

métalliques est souvent liée à la toxicité du mercure et provoque des maladies fonctionnelles. Le cuivre et le zinc agissent en tant que Cu-, Zn-métallothionéine (MT), peuvent également s'opposer à la toxicité des métaux lourds en formant un complexe moins toxique Hg – thionéine chez les organismes (**Girardi et Elias, 1995**).

III-EFFET DU MERCURE SUR LES PARAMETRES BIOCHIMIQUES ET HISTOLOGIQUE DES REINS

Au niveau rénal des études antérieures ont déjà montré que le mercure inorganique s'accumule préférentiellement dans les reins et peut provoquer une insuffisance rénale aiguë (**Tanaka-Kagawa et al., 1998**). L'absorption, l'accumulation et la toxicité du mercure inorganique dans les reins sont liées à sa liaison à des molécules endogènes contenant les thiols (**Zalups, 2000**). Les enzymes contenant du thiol sont identifiées comme cibles du mercure inorganique (**Emanuelli et al., 1996; Nogueira et al., 2003**). En conséquence, un stress oxydatif induit par HgCl₂ au niveau rénal est déjà signalé (**Lund et al., 1993; Sener et al., 2007**). Dans la présente étude la toxicité induite par cette dose de HgCl₂ est prouvée durant toute la période de développement et à l'âge adulte. Ceci est traduit par une altération du système anti-oxydant menant par conséquent à une augmentation du taux de la peroxydation lipidique (MDA) durant la période d'allaitement et à l'âge adulte. En effet nous avons montré l'inhibition du premier système enzymatique anti-oxydant SOD et Catalase dans les deux jours postnataux PN15 et PN21 étudié et au jour PN15 pour la TRxR, par contre une activation transitoire des activités GPx et GST au PN15. Comme il est déjà cité que la SOD est une enzyme qui catalyse la conversion des radicaux superoxydes en peroxyde d'hydrogène, qui se décompose en eau et en oxygène moléculaire, empêchant ainsi la formation de radicaux hydroxyles par CAT et GPx. Les activités SOD et Catalase dans cette étude, généralement sont régulée négativement dans le rein, ce qui va déclencher par la suite une peroxydation lipidique au niveau rénal, révélée par l'augmentation du taux de MDA durant la période d'allaitement. En général l'induction des enzymes antioxydantes indique un début adaptatif du système de défense redox, alors que l'inhibition contribuerait au stress oxydant suite à une intoxication au mercure (**Yee et Choi, 1994; Hussain et al., 1991**). Ces résultats indiquent clairement que le mercure absorbé par la mère est transféré vers la descendance durant la période de gestation et aussi après naissance à travers le lait maternelle ce qui altère le système antioxydant chez les nouveau nés. **Clarkson, 1997** a montré que la plus forte teneur en mercure dans les reins des rats exposés est détecté chez la mère et chez le nouveau-né. Dans le rein

maternel, la teneur en mercure est environ 10 à 20 fois et chez le nourrisson environ 1,5 à 6 fois plus élevée que dans les autres tissus. Compte tenu du pourcentage de stockage total de mercure, environ 52,7%, 38,7% et 1,66% de mercure sont décelés dans les reins, le foie et le cerveau des rates, respectivement. En ce qui concerne les rats nouveau-nés, environ 48,9% du mercure sont trouvés dans le foie, puis environ 23,7% dans les reins et 15,6% du mercure dans le cerveau alors que **Daston et al. (1986)** ont indiqué que la néphrotoxicité causée par le chlorure de mercure augmenterait avec la maturation postnatale. A l'âge adulte de ces souris nous avons montré une inhibition des enzymes GPx et Catalase, alors que les autres activités enzymatiques sont stables et atteignent des valeurs équivalentes à celles des témoins mais toujours avec une augmentation du taux de la peroxydation lipidique. En général le stress oxydatif se développe lorsque les perturbations entre les formes réactives de l'oxygène sont produites en excès et que les facteurs empêchant leur effet nocif sont inhibés. Diverses études ont montré que les administrations de chlorure de mercure sont associées à une formation accrue de radicaux libres et à un stress oxydatif important. Cela entraînera des dommages oxydatifs aux composants cellulaires, par exemple les protéines, les lipides et les acides nucléiques (**Boya et al., 1999**). L'étude de Song a montré que le HgCl₂ inhibe les activités des enzymes antioxydantes (GSH-Px, GST et catalase) avec un épuisement des thiols cellulaires (**Song et al., 1998**) dans les reins, ce qui suggère que la toxicité de HgCl₂ résulte la génération d'espèces réactives de l'oxygène. Divers études ont montré que la néphrotoxicité induite par le chlorure de mercure est associée à une augmentation du taux de MDA. Le MDA et le 4-HNE (4-hydroxy-2-nonéanal) sont les produits finaux de la décomposition des acides gras polyinsaturés W3 et W6 (**Seppanen et al., 2004; Valko et al., 2005**) en raison de l'administration du HgCl₂. Ces complexes avec les groupements sulfhydryle sont absorbés par les cellules rénales et stabilisés par le GSH intracellulaire pendant plusieurs heures. En cas d'appauvrissement intracellulaire en GSH, les complexes subissent une transformation rapide pour recevoir des métabolites. Cet appauvrissement semble être le facteur principal qui permet la peroxydation lipidique et altère les enzymes antioxydants (**Stohs et Bagchi, 1995**). Compte tenu des résultats de cette étude on peut conclure que l'administration de HgCl₂ a entraîné une néphrotoxicité sévère chez la souris dès la période d'allaitement par inhibition des enzymes anti oxydantes accompagné par une augmentation de la peroxydation lipidique qui persiste jusqu'à un âge bien avancée.

Nos résultats du dosage biochimique plasmatique ont montré une altération de la filtration rénale par augmentation du taux de la créatinine plasmatique chez les souris traitées par le HgCl₂. Necib a mis en évidence une augmentation des taux plasmatiques d'urée, de créatinine et d'acide urique chez les rats traités par le chlorure de mercure comme marqueurs rénaux des lésions (Necib *et al.*, 2012). Autres études chez l'animal ont montré que les lésions tubulaires jouent un rôle central dans la réduction du débit de filtration glomérulaire dans les cas de nécrose tubulaire aiguë. Deux anomalies tubulaires majeures pourraient être impliquées dans la diminution de la fonction glomérulaire chez les rats traités au chlorure de mercure: obstruction et reflux du filtrat glomérulaire (Girardi et Elias, 1995). Les altérations de la fonction glomérulaire chez les souris traitées au chlorure de mercure peuvent également être secondaires aux ROS qui induisent la contraction des cellules mésangiales, modifient la surface de filtration et modifient les facteurs de coefficient d'ultrafiltration diminuant la filtration glomérulaire de l'animal (Stohs et Bagchi, 1999; Zalups, 2000). En outre de ces résultats, nous avons montré l'augmentation du taux de Zn au niveau rénal chez les souris traitées au mercure alors qu'il est déjà montré que le zinc est un excellent inducteur de la synthèse de la métallothionine (MT), outre son rôle de cofacteur enzymatique et de composant structural dans d'autres métalloprotéines (Eaton *et al.*, 1980; Cosson, 1989). Peixoto et ses collaborateurs suggèrent que la synthèse de la MT est un mécanisme important responsable, au moins en partie, de la réduction de la toxicité du mercure en raison de l'efficacité du Zn à induire une augmentation de la synthèse de la MT dans le foie et le rein et à modifier la distribution du mercure dans ces tissus (Peixoto *et al.*, 2007). Enfin nous avons montré des altérations histopathologiques qui confirment les résultats biochimiques dans le tissu rénal associés à la toxicité du mercure. Rumbelha *et al.* (2000), Al-Saleh *et al.* (2005), Alam *et coll.* (2007) et Augusti *et al.* (2007) ont également signalé des changements similaires en raison de la néphrotoxicité induite par le mercure.

IV-EFFET DU MERCURE SUR LES PARAMETRES BIOCHIMIQUES ET HISTOLOGIQUE AU NIVEAU DES GONADES

L'étude de l'effet du HgCl₂ au niveau des testicules est basée sur l'évaluation des paramètres du stress oxydant et sur les dommages histopathologiques induite par ce métal ainsi que les taux des minéraux essentiels. En effet, nous avons montré une inhibition significative des

enzymes GPx et SOD testiculaire associé à un taux de peroxydation lipidique élevé. Le rôle biologique de la SOD est de catalysé la conversion des radicaux superoxydes en peroxyde d'hydrogène alors la CAT convertit le peroxyde d'hydrogène en eau (**Mansour et Mossa, 2009**). Par conséquent, le système SOD – CAT constitue le premier système de défense contre le stress oxydatif et ces enzymes agissent ensemble pour éliminer les espèces à oxygène actif (**Boujbiha et al., 2009; El-Demerdash, 2011; Wafa et al., 2011**). Les glutathions peroxydases sont des sélénoenzymes antioxydantes présentes dans le cytosol des cellules et la fonction principale de ces enzymes, qui utilisent le glutathion (GSH) comme substrat, est de réduire le peroxyde d'hydrogène soluble et les alkyl-peroxydases (**Bebe et Panemangalore, 2003; Demir et al., 2011**). La GPx convertit le peroxyde d'hydrogène en eau en présence de glutathion oxydé (**Kanbur et al., 2009**). Ces activités enzymatiques sont connue d'être inhibé par les métaux lourds dans divers tissus chez le rat, (**Amara et al., 2006; Jadhav et al., 2007; Rao et Chunccha, 2010**), ce qui peut expliquer ces résultats de ces activités dans les testicules. D'autre part cette diminution observée des activités enzymatiques SOD et GPx est peut être due à la consommation lors de la décomposition des radicaux libres produitent par action de mercure ou à l'inhibition de ces enzymes par ces radicaux. Ces enzymes constituent également un indicateur important de l'état de l'équilibre entre la première et la deuxième étape de la voie antioxydante enzymatique (**Jihen et al., 2009**), sachant que les testicules, l'épididyme, le sperme et le plasma séminal contiennent de fortes activités d'enzymes antioxydantes (**Arulldhas et al., 2005**). En outre, des études antérieures ont montré que le mercure interfère avec la structure de la membrane cellulaire et immobilise également les spermatozoïdes en inhibant l'assemblage des microtubules (**Mohamed et al., 1986; Rao et Sharma, 2001**). Ces modifications du système de défense contre l'oxydation et l'augmentation du taux d'oxydants dans les tissus du testicule associés à l'exposition au chlorure de mercure entraînent une augmentation de la peroxydation des lipides. La peroxydation lipidique est l'un des processus principaux des dommages oxydatifs, qui joue un rôle essentiel dans la toxicité de nombreux xénobiotiques (**Ognjanovic' et al., 2010**). Ce stress oxydatif induit par ce métal joue un rôle important dans l'étiologie de la formation, de la fonction, du profil de numération des spermatozoïdes et de l'infertilité masculine (**Acharya et al., 2008**). Nos résultats durant cette étude révèlent un niveau élevé de la peroxydation lipidique dans les gonades des souris mâles traitées, ceci est peut être expliquer le passage du mercure à travers la barrière hémato-testiculaire pour provoquer des lésions testiculaires (**Sharma et al.,**

1996; Rao et Sharma, 2001). Ce métal qui est capable de former des complexes avec les groupes sulfhydryl cystéine des protéines, il provoque des altérations de la fonction enzymatique (**Bando *et al.*, 2005**).

En outre le chlorure mercurique durant cette étude a provoqué plusieurs modifications histologiques telles que la dégénérescence et des hémorragies au niveau des tubes séminifères, cela est peut être lié aux effets oxydatifs de ce métal sur les membranes cellulaires des testicules. Ces alterations enzymatiques et histologique sont accompagnées par l'augmentation du taux du Zn à rôle protecteur à la réponse de la présence de mercure au niveau testiculaire. D'après ces résultats on déduit que le mercure contribue à la diminution de la fertilité chez le mâle alors que chez la femelle c'est un autre travail qu'il faudra compléter pour avoir des données complètes sur l'effet du mercure sur la reproduction.

CONCLUSION GENERAL

En conclusion, nos résultats fournissent de nouvelles preuves qu'une exposition continue à de faible dose (40ppm) de mercure inorganique tout au long de la vie induit des altérations à plusieurs niveaux sanitaire en augmentant le taux de peroxydation lipidique avec des changements significatifs des activités enzymatiques du stress oxydatif et qui pourraient perturber la physiologie des cellules conduisant à d'éventuelles anomalies fonctionnelles.

L'étude chez les souriceaux a montré que :

- ✓ au niveau cérébral tout d'abord, le mercure inorganique a engendré une augmentation de la peroxydation lipidique et une dérégulation des enzymes antioxydantes et qui peuvent être à l'origine des altérations des paramètres physiques et du retard neuro-développemental observé chez la progéniture traitée outre du dysfonctionnement comportemental après sevrage. En plus, il a affecté également le comportement maternel des femelles traitées en favorisant plus les activités non maternelles au détriment des activités maternelles
- ✓ Le mercure a induit un stress oxydatif au niveau hépatique et rénal chez les souriceaux traités par un taux élevé de peroxydation lipidique et une instabilité de réponse de la défense antioxydante, témoignant d'un effet toxique notable au niveau de ces deux organes de détoxification et expliquant au moins en partie qu'une dose du mercure résiduelle peut échapper à la détoxification et atteindre le compartiment cérébral.

L'étude chez l'adulte a montré que :

- ✓ au niveau cérébral, le taux élevé de la peroxydation lipidique au niveau de la majorité des structures cérébrales étudiées chez les souris traitées a été accompagné par l'inhibition des activités enzymatiques antioxydantes et l'inhibition de l'AChE qui est peut être à l'origine des anomalies comportementales liées à l'anxiété et à la mémoire.
- ✓ Aux niveaux hépatique et rénal, les altérations histologiques observées chez les souris traités peuvent être les résultats de l'inhibition des enzymes antioxydantes et l'augmentation du taux de la peroxydation lipidique perturbant par ricochet les paramètres hématologique capables d'engendrer un dysfonctionnement hépatique et rénal chez la souris traités.

- ✓ L'analyse au niveau testiculaire a montré une augmentation du taux de la peroxydation lipidique, une inhibition du GPx et SOD accompagnée par une élévation des métaux essentiels (Fe, Zn, Ca) engendrant une altération histologique importante. Ceci est également un indice de compétition importante, bien documentée auparavant, avec le cerveau au niveau de l'utilisation du glutathion comme outil de défense.

PERSPECTIVE

Il serait judicieux de compléter cette recherche par des études approfondies, notamment :

- 1-étudier les mécanismes de défense radicalaire par le dosage d'autres marqueurs du stress oxydatif (rapport GSH/GSSG, GR, vitamine E...etc) au niveau des organes déjà étudiés ;
- 2-déterminer la concentration de mercure au niveau des organes de détoxification, foie et reins et même au niveau des organes génitaux (testicules et ovaires);
- 3-compléter l'étude de l'effet du mercure sur la reproduction par dosage de l'hormone testostérone chez la souris mâles en plus de l'étude histologique et enzymatique au niveau des ovaires ;
- 4-explorer l'état du transporteur de glutamate (par immunohistochimie/western blot), au niveau cérébral pour la compréhension de l'utilisation du glutamate après exposition au mercure et la libération du glutamate lui-même au niveau glial notamment;
- 5-mener des essais avec des antioxydants contre l'intoxication par le mercure pour prévoir les effets de ce métal au niveau des organes déjà étudiés.
- 6-doser du mercure dans le cerveau, foie et rein chez fœtus au cours de gestation.

REFERENCES

A

Abuja P.M, Albertini R. (2001). Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. *Clinica Chimica Acta*. 306, 1-17.

Acharya U.R, Mishra M, Patro J.K M.P. (2008). Effect of vitamins C and E on spermatogenesis in mice exposed to cadmium. *Reproductive Toxicology*, 84–88

Adinolfi M. (1985). The development of the human blood-CSF-brain barrier. *Dev Med Child Neurol*, 532-537.

Aebi H. (1974). Catalase. Methods of Enzymatic Analysis. *Academic Press NY*. 673-684.

Afssaps, 2005 Bilan du réseau amalgames dentaires mis en place par l’Afssaps.

Agarwal R. Behari J.R. (2007). Effect of Selenium Pretreatment in Chronic Mercury Intoxication in Rats Bull. *Environ Contam Toxicol*, 306–310

Al-Attar. (2011b). Vitamin E attenuates liver injury induced by exposure to lead, mercury, cadmium and copper in albino mice. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 395–401.

Alfano D.P, and Petit T.L. (1982). Neonatal lead exposure alters the dendritic development of hippocampal dentate granule cells. *Exp Neurol*, 275-288.

AL-Saleh ES, Obuekwe C. (2005). Inhibition of hydrocarbon bioremediation by lead in a crude oil-contaminated soil. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 1–7.

Altman J, Sudarshan k. (1975). Postnatal development of locomotion in the laboratory rat. *Animal behaviour*, 896-920.

Amara S, Abdelmelek H, Garrel C, Guiraud P, Douki T, Ravanat J.L., Favier A, Sakly M, Rhouma K.B. (2006). Influence of static magnetic field on cadmium toxicity: study of oxidative stress and DNA damage in rat tissues. *J. Trace Elem. Med. Biol*, 263–269.

Andersen, H. R., Nielsen, J. B., and Grandjean, P. (2000). Toxicologic evidence of developmental neurotoxicity of environmental chemicals. *Toxicology* 144, 121-127.

Anniko Matti. (1983). Embryonic development of vestibular sens organ and their innervations. *books.google.com*, 375-376.

Arnold A.P, Gorski R.A. (1984). Gonadal steroid induction of structural sex differences in the central nervous system. *Annual review of neuroscience*, 413-42

Aruldas M, Subramanian S, Sekar P, Vengatesh G, Chandrahasan G, Govindarajulu P, Akbarsha M.A. (2005). Chronic chromium exposure-induced changes in testicular histoarchitecture are associated with oxidative stress: study in a non-human primate (*Macaca radiata* Geoffroy). 2801–2813.

Asada K, Takahashi M, Nagate M. (1974). Assay and inhibitors of spinach superoxide dismutase. *Agric Biol Chem*, 471–3.

Ask K, Akesson A, Berglund M, Vahter M. (2002). Inorganic mercury and methylmercury in placentas of Swedish women. *Environ Health Perspect*, 523-526.

Atkinson A, Thompson S.J, Khan AT, Graham T.C, Ali S, Shannon C, Clarke O, Upchurch L. (2001). Assessment of a two-generation reproductive and fertility study of mercuric chloride in rats. *Food Chem. Toxicol.* 73–84.

Audesirk, T., and Cabell, L. (1999). Nanomolar concentrations of nicotine and cotinine alter the development of cultured hippocampal neurons via non-acetylcholine receptor-mediated mechanisms. *Neurotoxicology*, 639-646.

Ayumi C ,Yokota H, Amanda J, Reichelt-B, Lei L, Paul B. (2006). Behavioural and biochemical alterations in *Penaeus monodon* postlarvae diet-exposed to inorganic mercury. *Chemosphere* , 241-247.

B

Baillie J.K, Matthew G. D, Roger T, Stephen W, Roland W. Partridge BA, Simpson A, Simon R. (2007). Endogenous Urate Production Augments Plasma Antioxidant Capacity in Healthy Lowland Subjects Exposed to High Altitude. *HYPOXIA-RELATED ISSUES*, 1473-1478.

Bakir F, Damluji SF., Amin-zaki L, Murtadha M, Khalidi A, Al-rawi NY., Tikriti S, Dhahir H I, Clarkson TW, Smith JC et Doherty R A. (1973): Methylmercury poisoning in Iraq. *Science* , 230-241.

Bando I, Rens M.I, Andres D, Cascales M. (2005). Endogenous antioxidant defence system in rat liver following mercuric chloride oral intoxication. *J of Biochem Mol and Toxicol*, 154-161.

Banic C, Blanchard P, Dastoor A, Hung H, Steffena, Tordon R, Poissant Let Wiens B. (2005): Atmospheric distribution and long-range transport of mercury. *In Mercury: Sources, Measurements, Cycles, and Effects* (M.B. Parsons & J.B. Percival, eds.). *Mineral. Assoc. Canada, Short Course*, 157-177.

BENNETT, E. (1948). Almadén – world's greatest mercury mine. *Mining Metallur.* **29**, 6.

Bapu T.C, Purohit R.C, Sood P.P. (1994). Fluctuation of trace elements during methylmercury toxication, and chelation therapy. *Hum. Exp. Toxicol*, 815–823.

Barja.G. (1999).

Endogenous oxidative stress: relationship to aging, longevity and caloric restriction. *Ageing Research Reviews*, 397–411.

Barnett SA, Burn J. (1970). Reproduction and breeding technique of laboratory animals. *Maternal and Infant Behavior.* IN *E.S.E HAFEZ*, 177-191.

Barone S.Jr, Haykal C.N, Parran D.K , and Tilson H.A. (1998). Gestational exposure to methylmercury alters the developmental pattern of trk-like immunoreactivity in the rat brain and results in cortical dysmorphology. *Brain Res Dev Brain Res*, 13-31.

Barouki R. (2006). Stress oxydant et vieillissement. *Medecine/sciences*, 266-72.

Barregård L, Lindstedt G, Schütz A, Sällsten G. (1994). Endocrine function in mercury exposed chloralkali workers. *Occupational and Environmental Medicine*, 536-540.

Basha CD, Reddy RG. (2015). Long-term changes in brain cholinergic system and behavior in rats following gestational exposure to lead: protective effect of calcium supplement. *Interdiscip Toxicol*, 159– 168.

Baskin SI, Salem H. (1994). Oxidant, Antioxidant and Free Radicals. Academic press Inc, 25-62.

Bayer S. A, Altman, J, Russo, R. J, Dai X. F, and Simmons J. A. (1991). Cell migration in the rat embryonic neocortex. *J Comp Neurol*, 499-516.

Beaudeau JL, Delattre J, Peynet J. (2003). Lipoprotéines et athérosclérose : mécanismes moléculaires et cellulaires. In : Delattre J, Durand G, Jardillier JC. Biochimie pathologique : aspects moléculaires et cellulaires. *Médecine-Sciences Flammarion*, 91-107.

Bebe F.N, Panemangalore M. (2003). Exposure to low doses of endosulfan and chlorpyrifos modifies endogenous in tissues of rats. *J. Environ. Sci. Health B*, 349–363.

Bensefat-Colas L, Andujan P, Descathar A. (2011). Intoxication au mercure. *Rev Med Inter.* 416-42.

Berry A, Capone F, Giorgio M, Pelicci PG, de Kloet ER, Alleva E, Minghetti L, Cirulli F. (2007). Deletion of the life span determinant prevents age-dependent increases in emotionality and pain sensitivity in mice. *Exp Gerontol*, 37–45.

Bhimte B, Agrawal BK, Sharma VK, Chauhan SS. (2012). Oxidative stress status in hypothyroid patients. *Biomed Res*, 286–288.

Bigbee J.W, Sharma K.V, Gupta J.J, and Dupree J.L. (1999). Morphogenic role for acetylcholinesterase in axonal outgrowth during neural development. *Environ Health Perspect*, 81-87.

Bismuth C, Baud F, Conso F, Dally S, Fréjaville JP, Garnier R, Jaeger A. (2000). *Médecine-Sciences Flammarion*, (Guide pratique de toxicologie).

Bjorling-Poulse M, Andersen H.R, and Grandjean P. (2008). Potential developmental neurotoxicity of pesticides used in Europe. *Environ Health*, 7, 50.

Blanchard RJ, Hebert MA, Ferrari PF, Palanza P, Figueira R, Blanchard DC, Parmigiani S. (1998). Defensive behaviors in wild and laboratory (Swiss) mice: the mouse defense test battery. *Physiol Behav*, 201–209

Bonnefont-Rousselot D, Théron P, Beaudeau JL, Peynet J, Legrand A, Delattre J. (2001). Vieillesse et stress oxydant. Quels marqueurs potentiels ?. *Ann Biol Clin*, 453-459.

Bosch, Oliver J. Inga D. Neumann. (2012). Both oxytocin and vasopressin are mediators of maternal care and aggression in rodents: From central release to sites of action. *Hormones and Behavior*, 293–303.

Bouayed J, Rammal H, Soulimani R. (2009). Oxidative stress and anxiety. *Oxidative Med Cell Longev*, 63–67.

Boujbiha MA, Hamden K, Guermazi F, Bouslama A, Omezzine A, Kammoun A. (2009). Testicular toxicity in mercuric chloride treated rats: association with oxidative stress. *Reprod Toxicol*, 81-89.

Boya P.P, Beloqui O, Larrea E, Conchillo M, Castelruiz Y, Civeira .M-P and Prieto J. (1999). Antioxidant status and glutathione metabolism in peripheral blood mononuclear cells from patients with chronic hepatitis C. *Journal of Hepatology*, 808-814.

Bramley GN, Wass JR. (2001). Laboratory and field evaluation of predator odors as repellents for kiore (*Rattus exulans*) and ship rats (*R. rattus*). *J Chem Ecol*, 1029–1047

Branco V, Canário J, Lu J, Holmgren A, Carvalho C. (2012). Mercury and selenium interaction in vivo: effects on thioredoxin reductase and glutathione peroxidase. *Free Radic Biol Med*, 781–793.

Brent J. (2001). Toxicologists and the Assessment of Risk: The Problem with Mercury. *Clinical Toxicology* , 707–710.

Brigelius-Flohe R, Banning A, Schnurr K. (2003). Selenium-dependent enzymes in endothelial cell function. *Antioxid Redox Signal*, 205–215.

Barillet S, Adam C, Palluel O, Devaux A. (2007). Bioaccumulation, oxidative stress, and neurotoxicity in *Danio rerio* exposed to different isotopic compositions of uranium. *Environ Toxicol Chem*. 497-505.

Brimijoin S and Koenigsberger C. (1999). Cholinesterases in neural development: new findings and toxicologic implications. *Environ Health Perspect*, 59-64.

Brimijoin S and Hammond P. (1996). Transient expression of acetylcholinesterase messenger RNA and enzyme activity in developing rat thalamus studied by quantitative histochemistry and in situ hybridization. *Neuroscience*, 555-565.

Burbacher TM, Monnett C, Grant KS, Mottet NK. (1984). Methylmercury exposure and reproductive dysfunction in the non human primate. *Toxicol Appl Pharmacol*, 18-24.

C

Caldji C, Tannenbaum B, Sharma S, Francis D, Plotsky PM, Meaney MJ. (1998). Maternal care during infancy regulates the development of neural systems mediating the expression of fearfulness in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 35-40

Campbell C.G, Seidler F.J and Slotkin T.A. (1997). Chlorpyrifos interferes with cell development in rat brain regions. *Brain Res Bull*, 179-189.

Carmichael NG, Fowler BA. (1979). Effects of separate and combined chronic mercuric chloride and sodium selenate administration in rats: histological, ultrastructural, and x-ray microanalytical studies of liver and kidney. *Journal of Environmental Pathology and Toxicology*, 399-412.

Castagne V, Lefevre K, Natero R. (1999). An optimal redox status for the survival of axotomized ganglion cells in the developing retina. *Neuroscience*, 313–320.

Castoldi A.F, Johansson C, Onishchenko N, Coccini T, Roda E, Vahter M. (2008). Human developmental neurotoxicity of methylmercury: impact of variables and risk modifiers. *Regul Toxicol Pharmacol*, 201-214.

Castoldi AF, Coccini T, Ceccatelli S, Manzo L. (2001). Neurotoxicity and molecular effects of methylmercury. *Brain Res Bull*, 197-203.

Chehimi L, Roy V, Jeljeli M, Sakly M. (2012). Chronic exposure to mercuric chloride during gestation affects sensorimotor development and later behaviour in rats. *Behav Brain Res*, 43–50.

Chen YW, Huang CF, Tsai KS, Yang RS, Yen CC, Yang CY. (2006). Methylmercury induces pancreatic beta-cell apoptosis and dysfunction. *Chem Res Toxicol*, 1080-1085.

Chen EY, Fujinaga M, Giaccia AJ. (1999). Hypoxic microenvironment within an embryo induces apoptosis and is essential for proper morphological development. *Teratology*, 215–225.

Cheng J.P, Hu W.X, Lin X.J.M, Shi w, Wang W.H. (2006). Expression of C-fos and oxidative stress on brain of rats reared on food from mercury-selenium coexisting mining area. *J of Environ Scie (china)*, 788-792.

Cherian MG, Hursh JB, Clarkson TW, Allen J. (1978). Radioactive mercury distribution in biological fluids and excretion in human subjects after inhalation of mercury vapor. *Arch Environ Health*, 109–14.

Choi, B.H. (1989). The effects of methylmercury on the developing brain. *Prog Neurobiol* , 447-470.

Choi B.H, Lapham L.W, Amin-Zaki L, Saleem T. (1978). Abnormal neuronal migration, deranged cerebral cortical organization, and diffuse white matter astrocytosis of human fetal brain: a major effect of methylmercury poisoning in utero. *J Neuropathol Exp Neurol*; 719-733.

Clarkson T, Cox C, Davidson PW, Myers GJ. (1998). Mercury in fish. *Science*, 459–461.

Clarkson TW. (1997). The Toxicology of Mercury. *Critical Reviews in Clinical Toxicology*, 369-403.

Clarkson, T. W. (1993). Mercury: major issues in environmental health. [Review]. *Environ Health Perspect*, 31-38.

Colquitt PJ. (1995). The effect of occupational exposure to mercury vapour on the fertility of female dental assistants. *Occup Environ Med*, 214.

Cosson R.P. (1989). Relationships between heavy metal and metallothionein-like protein levels in the liver and kidney of two birds: the greater flamingo and the little egret. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 243–248.

Costa, L. G., Aschner, M., Vitalone, A., Syversen, T., and Soldin, O. P. (2004). Developmental neuropathology of environmental agents. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 44.

Counter S.A, Buchanan L.H. (2004). Mercury exposure in children: a review. *Toxicol. Appl. Pharmacol*, 209–230.

Crawley JN. (2004). Designing mouse behavioral tasks relevant to autisticlike behaviors. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*, 248–258.

Crumpton T.L, Seidler F.J, Slotkin T.A. (2000) .Developmental neurotoxicity of chlorpyrifos in vivo and in vitro: effects on nuclear transcription factors involved in cell replication and differentiation, *Brain Res*, 87-98.

Curtin J F, Donovan M, Cotter TG. (2002). Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. *J of Imm Methods*, 49-72.

Cutler A.R, Wilkerson A.E, Gingras J.L, and Levin E.D. (1996). Prenatal cocaine and/or nicotine exposure in rats: preliminary findings on long-term cognitive outcome and genital development at birth. *Neurotoxicol Teratol*, 635-643.

D

Das M, Mukhtar H, Seth PK. (1982). Aryl hydrocarbon hydroxylase and glutathione-S-transferase activities in discrete regions of rat brain. *Toxicol Lett*, 125–128.

Daston G.P, rehnberg B.F, Hall L.L and Kavlock R.J.(1986). Toxicity of Mercuric Chloride to the Developing Rat Kidney III. Distribution and Elimination of Mercury during Postnatal Maturation. *toxicologie and applied pharmacology*, 39-48.

Davis B.J, Price H.C, O'Connor R.W, Fernando R, Rowland A.S, Morgan D.L. (2001). Mercury vapor and female reproductive toxicity. *Toxicol Sci*, 291-296.

Deepmala J, Deepaka M, Srivastava S, Sangeeta S, Kumar A S, Kumar S S.(2013). Protective effect of combined therapy with dithiothreitol, zinc and selenium protects acute mercury induced oxidative injury in rats. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 249–256.

Delattre J. (2005). Radicaux libres et stress oxydant: *TECDOC. Londres-paris – new york*. 620.

Demir, F, Uzun F.G, Durak D, Kalender Y. (2011). Subacute chlorpyrifos-induced oxidative stress in rat erythrocytes and the protective effects of catechin and quercetin. *Pestic. Biochem. Phys*, 77–81.

Desrumaux C, Risold P-Y, Schroeder H, Deckert V, Masson D, Athias A, Laplanche H, Guern NL, Blache D, Jiang X-C, Tall A, Desor D and Lagrost L. (2005). Phospholipid transfer protein (PLTP) deficiency reduces brain vitamin E content and increases anxiety in mice. *The FASEB Journal*, 1-6.

Dessesio JM. (1996). Contributor of Handbook of developmentale toxicology.

Diana XD. (1988). Evaluation of tissue disposition, myelopoietic, and immunologic response in mice after long-term exposure to nickel sulfate in the drinking water. *Toxicol Environ Health*. 357-72.

Dickman MD, Leung CK, Leong MK. (1998) Hong Kong male subfertility links to mercury in human hair and fish. *Sci Total Environ*, 165-174.

D'itri PA et D'itri F M. (1977). Mercury Contamination: A Human Tragedy. John Wiley et Sons, *Toronto, Ontario. Enviromental science and technology series. Livre*. 311 pages.

D'itri, F.M. (1972): The Environmental Mercury, Problem. CRC Press, Cleveland, Ohio. Livre. 124 page.

Drasch G, Aigner S, Roider G, Staiger F, Lipowskyn G.(1998). Mercury in human colostrum and early breast milk. Its dependence on dental amalgam and other factors. *J Trace Elem Med Biol*, 23-27.

Drasch G, Schupp I, Hofl H, Reinke R, Roider G.(1994). Mercury burden of human fetal and infant tissues. *Eur J Ped*, 607-610.

Drews, U. (1975). Cholinesterase in embryonic development. *Prog Histochem Cytochem*, 1-52.

Duarte T.L, Jones G.D.D. (2007). Vitamin C modulation of H₂O₂-induced damage and iron homeostasis in human cells. *Free Radical Biology & Medicine*, 1165–1175.

E

Eaton D.L, Stacey N.H, Wong K.L, Klaassen C.D. (1980). Dose-response effects of various metal ions on rat liver metallothionein, glutathione, heme oxygenase, and cytochrome P-450. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 393–402.

Eddins D, Petro A, Pollard N, Freedman J.H, Levin E.D. (2008). Mercury-induced cognitive impairment in metallothionein-1/2 null mice. *Neurotoxicology and Teratology*, 88–95.

El-Demerdash F.M. (2011). Lipid peroxidation, oxidative stress and acetylcholinesterase in rat brain exposed to organophosphate and pyrethroid insecticides. *Food and Chemical Toxicology*, 1346-1352.

Ellman G.L, Courtney K.D, ANDRES V, Featherstone R.M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*. 88-95.

Ennaceur, A., Meliani, K. (1988). A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats III. Spatial vs. non-spatial working memory. *Behav. Brain Res*, 83-92.

Ernanuelli T, Rocha J.B.T, Pereira M. E, Porciuncula L, Morsch K.M, Martins A.E and Souza D.G. (1996). Effect of Mercuric Chloride Intoxication and Dimercaprol Treatment on 6-Aminolevulinatase from Brain, Liver and Kidney of Adult Mice. *Pharmacology & Toxicology*, 136-143.

Essig DA and Nosek TM. (1997). Muscle fatigue and induction of stress protein genes: a dual function of reactive oxygen species. *Can J Appl Physiol*, 409-428.

Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jurgens G. (1992). The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Rad Biol Med*, 341 - 349.

F

Farrar W V. & Williams AR. (1977): A history of mercury. In *The Chemistry of Mercury* (C.A. McAuliffe, ed.). *MacMillan of Canada*, 1-45.

Favier A. (2003). Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'act Chim*, 108 - 115.

Favier A. (1997). Le stress oxydant: intérêt de sa mise en évidence en biologie médicale et problèmes posés par le choix d'un marqueur. *Ann Biol Clin*, 9 - 16.

Feng W, Wang M, Li B, Liu J, Chai Z, Zhao J, Deng G.(2004). Mercury and trace element distribution in organic tissues and regional brain of fetal rat after in utero and weaning exposure to low dose of inorganic mercury. *Toxicology Letters*, 223–34.

Fleming AS, O'Day DH, Kraemer GW.(1999). Neurobiology of mother-infant interactions: experience and central nervous system plasticity across development and generations. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 673-85.

Flohe L, Gunzler WA. (1984). Analysis of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol*, 114–121.

Francis D, Diorio J, Liu D, Meaney MJ.(1999). Nongenomic transmission across generations of maternal behavior and stress responses in the rat. *Science*, 1155-8.

Franciscato C, Goulart FR, Lovatto NM, Duarte FA, Flores EM, Dressler VL, Peixoto NC, Pereira ME. (2009). ZnCl₂ exposure protects against behavioral and acetylcholinesterase changes induced by HgCl₂. *Int J Dev Neurosci*, 459–468.

Freitas. (2009). Tractus Immuno-Logicus: A Brief History of the Immune System.livre

Friberg, L., and Vostal, J. General discussion and conclusions need for further research. In: Mercury in the Environment (L. Friberg and J. Vostal, Eds.), Chemical Rubber Company Press, Cleveland, 1972, pp. 183-186.

Frischer R.E, King J.A, Rose K.J and Strand F.L. (1988). Maturational changes in neonatal rat motor system with early postnatal administration of nicotine. *Int J Dev Neurosci*, 149-154.

G

Garnier R. Mercure. In: Bismuth C. (2000). Toxicologie Clinique. *Paris Flammarion Médecine Science*, 14-23.

Garrel C, Ceballos-Picot I, Germain G, Al-Gubory K H. (2007). Oxidative stressinducible antioxidant adaptive response during prostaglandin F₂ alpha-induced luteal cell death in vivo. *Free Rad Res*, 251-9.

Gasem M.A-T. (2019). Neurobehavioral protective properties of curcumin against the mercury chloride treated mice offspring. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 736–74.

Gassner B.A. Wüthrich J. Lis G. Scholtysik and M. Solioz. (1997). Opical application of synthetic pyrethroids to cattle as a source of persistent environmental contamination. *J. Environ. Sci. Health*, 729-739.

Gaudriault P, Mazaud-Guittot S, Lavoué V, Coiffec I, Lesné L, Dejuq-Rainsford N, Scholze M, Kortenkamp A, and Jégou B. (2017). Endocrine Disruption in Human Fetal Testis

Explants by Individual and Combined Exposures to Selected Pharmaceuticals, Pesticides, and Environmental Pollutants. *Environmental Health Perspectives*.

Geelen J.A, Dormans J.(1990). The early effects of methylmercury on developing rat brain. *Acta Neuropathol.* 432–438.

Ginsberg G, Hattis D and Sonawane B. (2004). Incorporating pharmacokinetic differences between children and adults in assessing children's risks to environmental toxicants. *Toxicol Appl Pharmacol*, 164-183.

Girardi G, Elías MM. (1995). Mercuric chloride effects on rat renal redox enzymes activities: SOD protection. *Free Radic Biol Med*, 61–66.

Givica-Perez A, Santana-Montesdeoca J.M, Diaz-Sanchez M, Martinez-Lagares F.J, Castaneda W.R. European radiology. (2001). Deliberate, repeated self-administration of metallic mercury injection: *case report and review of the literature*, 1351-1354.

Glickstein M, Strata P, and J. Voog. (2009).Cerebellum: history. *Neuroscience*, 549 – 559.

Glynn A.W and Lmd Y. (1995). Effect of Long-Term Sodium Selenite Supplementation on Levels and Distribution of Mercury in Blood, Brain and Kidneys of Methyl Mercury-Exposed Female Mice. *Pharmacology & Toxicology*, 41-47.

Goel A, Dani V, Dhawan DK. (2007). Zinc mediates normalization of hepatic drug metabolizing enzymes in chlorpyrifos-induced toxicity. *Toxicol Lett*, 26–33.

Goldwater L.J. (1972): Mercury – A History of Quicksilver. York Press, Baltimore, Maryland, 318.

Götze A. (1924-1932). In Reallexikon der Vorgeschichte. *M. Ebert, ed.*. De Gruyter and Co., Berlin.

Goudable J, Favier A. (1997). Radicaux libres oxygène et antioxydants. *Nutr Clin Mdtabol*, 115-20.

Goulet S, Dore FY, Mirault ME. (2003). Neurobehavioral changes in mice chronically exposed to methylmercury during fetal and early postnatal development. *Neurotoxicol Teratol.* 335–347.

Grandjean P, and Landrigan P.J. (2006). Developmental neurotoxicity of industrial chemicals. *Lancet*, 2167-2178.

Grandjean P. Weihe R.F. White F. Debes S. Araki K. Yokoyama K. Murata N. Sorensen R. Dahl P.J. Jorgensen. (1997).Cognitive deficit in 7-yearold children with prenatal exposure to methylmercury. *Neurotoxicol. Teratol*, 417–428.

Grandjean P, Weihe P, White RF, Debes F. (1998).Cognitive performance of children prenatally exposed to “safe” levels of methylmercury. *Environ Res*, 165–72.

Grandjean P, Weihe P, White RF. (1995). Milestone development in infants exposed to methylmercury from human milk. *Neurotoxicology*, 27–33.

Greene J. G, Noorian A. R, and Srinivasan S. (2009). Delayed gastric emptying and enteric nervous system dysfunction in the rotenone model of Parkinson’s disease. *Exp. Neurol.* 154–161.

Grifman M, Galyam N, Seidman, S., and Soreq, H. (1998). Functional redundancy of acetylcholinesterase and neurtigin in mammalian neuritogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 13935-13940.

GRAY, J.E., HINES, M.E., HIGUERAS, P.L., ADATTO, I. & LASORSA, B.K. (2004): Mercury speciation and microbial transformations in mine wastes, stream sediments, and surface waters at the Almadén mining district, Spain. *Environ. Sci. Tech.* 4285-4292.

Grisaru D, Sternfeld M, Eldor A, Glick D, and Soreq H. (1999). Structural roles of acetylcholinesterase variants in biology and pathology. *Eur J Biochem*, 672-686.

Grosman M, Melet J.J. (2000). Le mercure des amalgames dentaires : Quels risques pour la santé et l’environnement ? Quels enjeux financiers ?. *Mémoire en Médecine. Montpellier.*

Gstraunthaler G, Pfaller W, Kotanko P. (1983). Glutathione depletion and in vitro lipid peroxidation in mercury or maleate induced acute renal failure. *Biochem Pharmacol*, 2969–2972.

Guerri C. (1998). Neuroanatomical and neurophysiological mechanisms involved in central nervous system dysfunctions induced by prenatal alcohol exposure. *Alcohol Clin Exp*, 304-312.

Gupta S , Barlow M et Donaldson S. (2005): Exposure and human health effects. *In Mercury: Sources, Measurements, Cycles, and Effects* (M.B. Parsons & J.B. Percival, eds.). *Mineral. Assoc. Canada, Short Course.* 259-286

Gutteridge J. (1992). Invited review free radicals in disease processes: a compilation of cause and consequence. *Free Rad Res Comm*, 598-620.

H

Habig WH, Pabst Jakoby WB. (1974). Glutathione-S-transferase the first step in mercapturic acid formation. *J Biol chem.* 7130-9.

Harada M, Nakachi S, Cheu T, Hamada H, Ono Y, Tsuda T.(1999). Monitoring of mercury pollution in Tanzania: relation between head hair mercury and health. *Sci Total Environ*, 249-256.

Havarinasab S, and Hultman P. (2005). Organic mercury compounds and autoimmunity. *Autoimmun. Rev.*270–275.

Havelková M, Dušek L, Némethov D, Poleszczuk G, and Svobodová Z. (2008). Comparison of Mercury Distribution Between Liver and Muscle – A Biomonitoring of Fish from Lightly and Heavily Contaminated Localities. *Sensors.* 4095-4109.

Hayakawa M, Sugiyama S, Tanaka M, Ozawa T. (1991). Age-associated accumulation of 8-hydroxydeoxyguanosine in mitochondrial DNA of human diaphragm.

Helden V, Yvonne G.J, Sandra G.H, Frederik J. Schooten van, Evelien K, Susanne H , Jaume A , Joan R, Katja T, Adrian W, Georg L. M. Luisa B, Johannes L, Roger W. L. G, Jaap K. (2010). Knockout of the Bcmo1 gene results in an inflammatory response in female lung, which is suppressed by dietary beta-carotene. *Cell. Mol. Life Sci,* 2039–2056.

Henry GA, Jarnot BM, Steinhoff MM and Bigazzi PE. (1988). Mercury-induced renal autoimmunity in the MAXX rat. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 187–203.

HILL, J. (trans) (1946): Theophrastus, History of Stones, English version and notes by John Hill, London. In E.L. Egenhoff (ed), 1953, *Calif. J. Mines. Geol,* 12.

Hogg S . (1996). A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav,* 21–30.

Holmes P, James K. A, and Levy L. S. (2009). Is low-level environmental mercury exposure of concern to human health? *Sci Total Enviro,*171-182.

Holzenberger M, Dupont J, Ducos B, Leneuve P, Geloan A, Even PC, Cervera P, Le bouc Y. (2003). IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice. *Nat.* 182-187.

Horvat, M., Jereb, V., Fajon, V., Logar, M., Kotnik, J., Faganeli, J., Hines, M.E. et Bonzongo, J.-C. (2002): Mercury distribution in water, sediment and soil in the Idrijca and Soca river systems. *Geochem. Explor. Environ. Anal.* 287-296.

Hovatta I, Tennant RS, Helton R, Marr RA, Singer O, Redwine JM, Ellison JA, Schadt EE, Verma IM, Lockhart DJ, Barlow C. (2005). Glyoxalase 1 and glutathione reductase 1 regulate anxiety in mice. *Nature,* 662–666.

Howland G, Bender T et Hayes L. (2005): Mercury management in Canada: domestic and global dimensions. In Mercury: Sources, Measurements, Cycles, and Effects. (M.B. Parsons & J.B. Percival, eds.). *Mineral. Assoc. Canada, Short Course* 34, 287-298.

Hua J, Pelletier L, Berlin M, Druet P. (1993). Autoimmune glomerulonephritis induced by mercury vapour exposure in the Brown Norway rat. *Toxicol,* 119–29.

Huang CF, Liu SH, Hsu CJ, Lin-Shiau SY. (2011). Neurotoxicological effects of low-dose methylmercury and mercuric chloride in developing offspring mice. *Toxicol Lett*, 196–204.

Hultman, P., Bell, L. J., Eneström, S., and Pollard, K. M. (1993). Murine susceptibility to mercury. II. autoantibody profiles and renal immune deposits in hybrid, backcross, and H-2d congenic mice. *Clin. Immunol. Immunopathol.*

68, 9–20. **Hultman P, and Eneström S.** (1988). Mercury induced antinuclear antibodies in mice: Characterization and correlation with renal immune complex deposits. *Clin. Exp. Immunol.* 269–274.

Hylander L.D et Meili, M. (2005). The rise and fall of mercury: converting a resource to refuse after 500 years of mining and pollution. *Crit. Rev. Environ. Sci. Tech.*, 1-36.

I

ICH. (1993). ICH Harmonised Tripartite Guideline: Detection of Toxicity to Reproduction for Medical Products. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceutical for Human Use.

Imai H, Nakagawa Y. (2003). Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. *Free Radic Biol Med*, 145–169.

INERIS (Institut National d'Environnement industriel et de risques). (2010). Données toxicologiques et environnementales des substances chimiques : Mercure et ses dérivés, France.

Institóris L, Siroki O, Undeger U, Basaran N, Dési I. (2001). Immunotoxicological investigations on rats treated subacutely with dimethoate, As³⁺ and Hg²⁺ in combination. *Hum Exp Toxicol*, 329–336.

J

Jadhav S.H, Sarkar S.N, Aggarwal M, Tripathi H.C. (2007). Induction of oxidative stress in erythrocytes of male rats subchronically exposed to a mixture of eight metals found as ground water contaminants in different parts of india. *Arc Environ Contam and Toxicol*, 145-151

Jarup.I . Marika Bergland, Carl Gustaf Elindec, Gunnar Nrdberg, Marie Vahte. (1998). Health effects of cadmium exposure - a review of the literature and a risk estimate. *Scand J Work Environ Health*; 1:52 p.

Jean M. HUSS. (2011). **Les risques sanitaires des métaux lourds.** Luxembourg, Groupe socialiste, assemblée parlementaire. Rapport1 : Commission des questions sociales, de la santé et de la famille.

Jean-pierre Carmouse, Marc Lucotte, Alain Boudou.(2013).le mercure en amazonie rôle de l'homme et de l'environnement, risques sanitaires. Livre. IRD Éditions, 494.

Jenkins AJ, Hill MA, Rowley KG. (2007). Diabetes and Oxidant Stress. Atherosclerosis and Oxidant Stress. A New Perspective. *Holtzman J.L*, 123-160.

Jeong DW, Kim EH, Kim TS. (2004). Different distributions of selenoprotein W and thioredoxin during postnatal brain development and embryogenesis. *Mol Cells*, 156– 159.

Ji LL, Fu R, Mitchell EW. (1992). Glutathione and antioxidant enzymes in skeletal muscle: effects of fiber type and exercise intensity. *J Appl Physiol*, 1854-1859.

Jiang H and Zhang X. J. (2008). Acetylcholinesterase and apoptosis. A novel perspective for an old enzyme. *FEBS J*, 612-617.

Jihen EH, Imed M, Fatima H, Abdelhamid K. (2009) .Protective effects of selenium (Se) and zinc (Zn) on cadmium (Cd) toxicity in the liver of the rat: effects on the oxidative stress. *Ecotoxicol Environ Saf*, 1559–1564.

Johnson, C.L. (2004). In the environment: sources, toxicities, and prevention of exposure. *Pediatr. Ann*, 437–442.

K

Kagi J.H.R. (1993). Evolution, structure and chemical activity of class 1 metallothioneins: an overview, in: **Suzuki, KT, Imura, N, Kimura, M.** (Eds), Metallothionein III: Biological roles and medical implications, *Birkhauser verlag, Berlin*, 29-56.

Kanbur M, Eraslan G, Silici S. (2009). Antioxidant effect of propolis against exposure to propentamphos in rats. *Ecotoxicol. Environ. Saf*, 909–915.

Karagas M.R, Choi A.L, Oken E, Horvat M, Schoeny R, Kamai E, Cowell W, Grandjean P, and Korrick S. (2012). Evidence on the Human Health Effects of Low-Level Methylmercury Exposure. *Environmental Health Perspective*

Karpathios T, Zervoudakis A, Theodoridis C, Vlachos P, Apostolopoulou E, Fretzayas A. (1991). Mercury vapor poisoning associated with hyperthyroidism in a child. *Acta Paediatrica Scand*, 551–552.

Karpel R, Sternfeld, M, Ginzberg D, Guhl, E, Graessmann A, and Soreq H. (1996). Overexpression of alternative human acetylcholinesterase forms modulates process extensions in cultured glioma cells. *J Neurochem*, 114-123.

Karpel R, Ben Aziz-Aloya R, Sternfeld M, Ehrlich,G, Ginzberg D, Tarroni P, Clementi F, Zakut H, and Soreq H. (1994). Expression of three alternative acetylcholinesterase messenger RNAs in human tumor cell lines of different tissue origins. *Exp Cell Res*, 268-277.

Kaufers D, Friedman A, Seidman S, and Soreq H. (1998). Acute stress facilitates longlasting changes in cholinergic gene expression. *Nature*, 373-377.

Kehrer JP. (1993). Free radcals as mediators of tissue injury and disease. *Crit Review in Toxicol.* 21-48.

Kihara T, Matsuo L.T, Sakamoto M, Yasuda Y, Yamamoto Y, Tanimura T.(2000). Effects of prenatal aflatoxin B1 exposure on behaviors of rat offspring. *Toxicol Sci*, 392–9.

Kihara T. (1991). Effects of the prenatal ochratoxin-a exposure on behaviors of rat offspring. *Acta Med*, 1-22.

Kobayashi-Miura M, Nakamura H, Yodoi J, Shiota K. (2002). Thioredoxin, an anti-oxidant protein, protects mouse embryos from oxidative stress-induced developmental anomalies. *Free Radic Res*, 949–956.

Koenigsberger, C., Hammond, P., and Brimijoin, S. (1998). Developmental expression of acetyl- and butyrylcholinesterase in the rat: enzyme and mRNA levels in embryonic dorsal root ganglia. *Brain Res*, 248-258.

Komosinska-Vassev K, Olczyk K, Kucharz EJ, Marcisz C, WinszSzcotka K, Kotulska A. (2000). Free radical activity and antioxidant defense mechanisms in patients with hyperthyroidism due to Graves' disease during therapy. *Clin Chim Acta*, 107–117.

Kostovic I, and Goldman-Rakic P.S. (1983). Transient cholinesterase staining in the mediodorsal nucleus of the thalamus and its connections in the developing human and monkey brain. *J Comp Neurol*, 431-447.

Kousba A.A, Poet T. S, and Timchalk C. (2007). Age-related brain cholinesterase inhibition kinetics following in vitro incubation with chlorpyrifos-oxon and diazinonoxon. *Toxicol Sci*, 147-155.

Kousba A.A, Sultatos L.G, Poet T.S, and Timchalk C. (2004). Comparison of chlorpyrifos-oxon and paraoxon acetylcholinesterase inhibition dynamics: potential role of a peripheral binding site. *Toxicol Sci*, 239-248.

L

Laamech J, Bernard A, Dumont X, Benazzouz. B, Lyoussi B. (2014). Blood lead, cadmium and mercury among children from urban, industrial and rural areas of fez boulemane region (morocco): relevant factors and early renal effects. *International J of Occupational Med and Envir Health* . 641 – 659.

Lalonde R. (2002). The neurobiological basis of spontaneous . activity of fourteen wild edible fruits from Burkina Faso. *Mol*, 581-594.

Langkammer C, Krebs N, Goessler W, Scheurer E, Ebner F, Yen K, Fazekas F, Ropele S, (2010). **Quantitative MR imaging of brain iron: a postmortem validation study.** *Radiology*, 455–462.

Lauder J.M., and Schambra U.B. (1999). Morphogenetic roles of acetylcholine. *Environ Health Perspect*, 65-69.

Lauwerys R.R, Haufroid V, Hoet P, Lison D. (2007). Mercure. In: Toxicologie industrielle et intoxication professionnelle. *Paris: Elsevier Masson*, 309–63.

Layer P G, and Willbold E. (1995). Novel functions of cholinesterases in development, physiology and disease. *Prog Histochem Cytochem*, 1-94.

Layer P.G. (1990a). Cholinesterases preceding major tracts in vertebrate neurogenesis. *Bioessays*, 415-420.

Layer P.G, and Willbold E. (1994). Cholinesterases in avian neurogenesis. *Int Rev Cytol*, 139-181.

Layer P.G, and Sporns O. (1987). Spatiotemporal relationship of embryonic cholinesterases with cell proliferation in chicken brain and eye. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 284-288.

Lazo J.S, Pitt B.R. (1995). Mettalothoninein and cell, death by anticancer drug. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*, 655-677.

Lee KJ and Dabrowski K. (2003). Interaction of vitamin C and E in yellow perch (*Perca flavescens*) nutrition and reproduction. *Br J Nutr.* Vol. 89, 589-596

Laev H., Karpiak S. E, Gokhale V. S, and Hungund B.L. (1995). In utero ethanol exposure retards growth and alters morphology of cortical cultures: GM1 reverses effects. *Alcohol Clin Exp Res*, 1226-1233.

Lehucher-Michel MP, Lesgards JF, Delubac O, Stocker P, Durand P, Prost M. (2001) Stress oxydant et pathologies humaines. *La Presse méd*, 1076-1081.

Levine RL. (2002). Carbonyl modified proteins in cellular regulation; aging and disease. *Free Radic Biol Med*, 790-796.

Levitt, P. (1998). Prenatal effects of drugs of abuse on brain development. *Drug Alcohol Depend*, 109-125.

Lévy F, Nowak R, Schaal B. (2001). La mère et le jeune : échange comportementaux et régulations physiologiques. *In La reproduction chez les mammifères et l'Homme.*

Levay E.A, Paolini A.G, Govic A, Hazi A, Penman J, Kent S.(2008). Anxiety-like behaviour in adult rats perinatally exposed to maternal calorie restriction. *Behav. Brain Res*, 164–172.

Li Z. S, Schmauss C, Cuenca A, Ratcliffe E, and Gershon M.D. (2006). Physiological modulation of intestinal motility by enteric dopaminergic neurons and the D2 receptor: analysis of dopamine receptor expression, location, development, and function in wild-type and knock-out mice. *J. Neurosci*, 2798–2807.

Li S.J, Zhang S.H, Chen H.P, Zeng C.H, Zheng C.X, Li L.S. (2010). Mercury-induced membranous nephropathy: clinical and pathological features. *Clin J Am Soc Nephrol*, 439-444.

Liapi C, Zarros A, Galanopoulou P, Theocharis S, Skandali N, AlHumadi H, Anifantaki F, Gkrouzman E, Mellios Z, Tsakiris S.(2008). Effects of short-term exposure to manganese on the adult rat brain antioxidant status and the activities of acetylcholinesterase, (Na,K)-ATPase and Mg-ATPase: modulation by L-cysteine. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 171–175.

Lochry E.A. (1987) Concurrent use of behavioral/functional testing in existing reproductive and developmental toxicity screens: Practical considerations. *J. Amer. Coll. Toxicol*, 433-439.

Lockitch G. (1993). Perspectives on Lead Toxicity. *Clin Biochem.* 371-381.

Loflin J, Lopez N, Whanger PD, Kioussi C. (2006). Selenoprotein W during development and oxidative stress. *J Inorg Biochem*, 1679–1684.

Lovic Vedran ,Andrea Gonzalez Alison S. Fleming. (2001). Maternally Separated Rats Show Deficits in Maternal Care in Adulthood. Maternally Separated Rats Show Deficits in Maternal Care in Adulthood. *Inc. Dev Psychobiol*, 19-33.

Lowry O, Rosebrough N, Farr A, Randall R . (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 265–275

Luglie PF, Campus G, Chessa G, Spano G, Capobianco G, Fadda GM, Dessole S.(2005). Effect of amalgam fillings on the mercury concentration in human amniotic fluid. *Arch Gynecol Obstet*, 138-142.

Lund BO, Miler DM, Woods JS. (1993). Studies on Hg(II)- induced H₂O₂ formation and oxidative stress in vivo and in vitro in rat kidney mitochondria. *Biochem. Pharmacol*, 2017–2024.

M

Madsen K.M and Maunsbach A.B.(1981). Effects of Chronic Mercury Exposure on the Rat Kidney Cortex as Studied Morphometrically by Light and Electron Microscopy. *Virchows Arch [Cell Pathol]*, 137-152.

Maia C, Ferreira V.M, Diniz J.S, Carneiro F.P, Sousa J.B, da Costa E.T, Tomaz C. (2010). Inhibitory avoidance acquisition in adult rats exposed to a combination of ethanol and methylmercury during central nervous system development. *Behav Brain Res*, 191–197.

Mann P.E, Jessica A.B. (2004). Disinhibition of maternal behavior following neurotoxic lesions of the hypothalamus in primigravid rats. *Brain Research*, 51 – 58.

Mansour S.A, Mossa A-TH. (2009). Lipid peroxidation and oxidative stress in rat erythrocytes induced by chlorpyrifos and the protective effect of zinc. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 34–39.

Markovich D, James K.M.(1999). Heavy metals mercury, cadmium, and chromium inhibit the activity of the mammalian liver and kidney sulfate transporter sat-1. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 181–187.

Marnett L.J. (1999). Lipid peroxidation-DNA damage by Malondialdehyde. *Mutat Res.* 83-95.

Martin J.L, Barbanoj M.J, Schlaepfer T.E, Thompson E, Perez V, Kulisevsky J.(2003): Repetitive transcranial magnetic stimulation for the treatment of depression. Systematic review and meta-analysis. *Br J Psychiatry*, 480 –491.

Martín-G J, Martín-G, F J, Delibes-decastro, G., Zapatero magdaleno, P. et Sarabia-herrero, F.J. (1995): The first known use of vermillion. *Experientia*, 759-761.

Martínez-Cayuela, M. (1995) Oxygen free radicals and human disease. *Bioch*, 147-161.

Massoulie J, Pezzementi L, Bon S, Krejci E, and Vallette F.M. (1993). Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Prog Neurobiol*, 31-91.

Mastripieri D. (1992). Functional aspects of maternal aggression in mammals. *Can. J. Zool*, 1069- 1077.

Mathieson P.W.(1995). Mercury: god of TH2 cells. *Clin. Exp. Immunol*, 229–230.

Matsui M, Oshima M, Oshima H. (1996). Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse thioredoxin gene. *Dev Biol*, 179–185.

Mello-Carpes P.B, Barros W, Borges S, Alves N, Rizzetti D, Peçanha F.M, Vassallo D.V, Wiggers G.A, Izquierdo I. (2013). Chronic exposure to low mercury chloride concentration induces object recognition and aversive memories deficits in rats. *Int J Dev Neurosci*, 468–472.

Meacham CA, Freudenrich TM, Anderson WL, Sui L, Lyons-Darden T, Barone S Jr.(2005). Accumulation of methylmercury or polychlorinated biphenyls in in vitro models of rat neuronal tissue. *Toxicol Appl Pharmacol*, 177-187

Mello C.F, Kraemer C.K, Filippin A, Morsch V.M, Rodrigues A.L, Martins A.F, and Rubin M.A. (1998).Effect of lead acetate on neurobehavioral development of rats. *Braz J Med Biol Res*, 943-950.

Milbury P E. et Richer A C. (2008). Understanding the Antioxidant Controversy; Ed: *PRAEGER*, 81-100.

Miller S, Pallan S, Gangji AS, Lukic D, Clase CM. (2013).Mercury-associated nephrotic syndrome: a case report and systematic review of the literature. *Am J Kidney Dis*, 135-138.

Miller M.W. (1996). Limited ethanol exposure selectively alters the proliferation of precursor cells in the cerebral cortex. *Alcohol Clin Exp Res*, 139-143.

Milton- Prabua S, Shagirthab K, Renugadevia J. (2011). Quercetin in combination with vitamins (C and E) improve oxidative stress and hepatic injury in cadmium intoxicated rats. *Biomed and Prev Nut*, 1–7.

Mohamed M.K., Lee W.I, Mottet N.K, Burbacher T.M. (1986). Laser light scattering study of the toxic effects of methyl mercury on sperm motility. *J. Androl*,11–15.

Montagnier L, Olivier R, Pasquier C. (1998). Oxidative stress in cancer. AIDS, and neurodegenerative diseases. *Free Radic Biol Med*, 359-378.

Morriss G. 1979. Growing embryos in vitro. *Nature* 278-402.

Mottet N.K, Shaw C.M, Burbacher T.M. (1985) Health risks from increases in methylmercury exposure. *Environ Health Perspect*, 133-140.

Murata K.M. Sakamoto K, Nakai P, Weihe M, Dakeishi T, Iwata X.J, Li T, Kurosawa T, Kamiy K. (2004). Effects of methylmercury on neurodevelopment in Japanese children in relation to the Madeiran study, *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 571–579.

N

Nair J, Barbin A, Velic I, Bartsch H. (1999). Etheno DNA-base adducts from endogenous reactive species. *Mutat*, 59-69.

Necib Y, Bahi A, Zerizer S. (2013a). Argan oil (*Argania Spinosa* .L) provides protection against mercuric chloride induced oxidative stress in rat albinos wistar. *Int J of basic and App sci*, 73-80.

New DA, Coppola PT. (1970). Effects of different oxygen concentrations on the development of rat embryos in culture. *J Reprod Fertil*, 109–118.

Nguyen, T., and Sudhof, T. C. (1997). Binding properties of neuroligin 1 and neurexin 1beta reveal function as heterophilic cell adhesion molecules. *J Biol Chem*, 26032-26039.

Nogueira CW, Soares FA, Nascimento PC, Muller DA, Rocha JBT. (2003). 2,3-Dimercaptopropane-1-sulfonic acid and meso-2,3- dimercaptosuccinic acid increase mercury and cadmium-induced inhibition of d-aminolevulinic acid dehydratase. *Toxicology*, 85–95.

Noirot C, Noirot-Timothe C. (1967). Un nouveau type de jonction intercellulaire (zonula continua) dans l'intestin moyen des Insectes. *C.R. Acad. Sci. (Paris) I*) 2796-2798

Nriagu J.O. (1979a): The Biogeochemistry of Mercury in the Environment. *Envir Health 3, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, New York*, Liver. 696 pages

O

Ognjanovic B.I, Markovi S.D, Natasa Z. Đord E, Trbojevic I.S, Stajn A.S, Saici Z.S. (2010). Cadmium-induced lipid peroxidation and changes in antioxidant defense system in the rat testes: Protective role of coenzyme Q10 and Vitamin E. *Reproductive Toxicology*, 191–197.

Oliveira C.S, Oliveira V.A, Ineu R.P, Moraes-Silva L, Pereira M.E. (2012). Biochemical parameters of pregnant rats and their offspring exposed to different doses of inorganic mercury in drinking water. *Food Chem Toxicol*, 2382–2387.

Oliveira D.B, Foster G, Savill J, Syme P.D, Taylor A. (1987). Membranous nephropathy caused by mercury-containing skin lightening cream. *Postgrad Med J*, 303-304.

Olivieri G, Novakovic M, Savaskan E, Meier F, Baysang G, Brockhaus M, Muller-Spahn F.(2002). The effects of estradiol on SHSY5Y neuroblastoma cells during heavy metal induced oxidative stress, neurotoxicity and beta-amyloid secretion. *Neuroscience*, 849–855.

Orisakwe O.E, Afonne O.J, Nwobodo E, Asomungha L, Dioka C.E.(2001). Low dose mercury induces testicular damage protected by zinc in mice. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol*, 92–96.

Orish E. Orisakwea, Onyenmechi J, Afonneb E.N, Lasbrey A , Chudi E.D. (2001). Low-dose mercury induces testicular damage protected by zinc in mice. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 92-96.

Ozyurt H, Sogut S, Yildirim Z, Kart L, Iraz M, Armutcu F, Ismail T, Ozen S, Uzun A, Akyol O. (2004). Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester on bleomycine-induced lung fibrosis in rats. *Clin. Chim. Acta*, 65–75.

P

Packer T, Ritschler H.J, Wessel K. (1997). Neuroprotection by the metabolic antioxidant alpha-lipoic acid. *Free Radic Biol Med*, 359-378.

Pacyna JM et Pacyna EG. (2005): Anthropogenic sources and global inventory of mercury emissions. In *Mercury: Sources, Measurements, Cycles, and Effects* (M.B. Parsons & J.B. Percival) . *Mineral. Assoc. Canada, Short Course* .43-56.

Peixoto N.C, Roza T, Morsch V.M, Pereira M.E. (2007). Behavioral alterations induced by HgCl₂ depend on the postnatal period of exposure. *Int J Dev Neurosci*, 39–46.

Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. (1985). Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods*;14:149–67.

Petit T.L, Alfano D.P, and LeBoutillier J.C. (1983). Early lead exposure and the hippocampus: *a review and recent advances*. *Neurotoxicology*, 79-94.

Petit T.L, and LeBoutillier, J. C. (1979). Effects of lead exposure during development on neocortical dendritic and synaptic structure. *Exp Neurol*, 482-492.

Pincemail J, Meurisse M, Limet R, Defraigne JO. (1999). L'évaluation du stress oxydatif d'un individu : une réalité pour le médecin. *Vaiss Coeur Poumons*. 4(5), 359-370.

Piquet M A. et Hébuterne X. (2007). Nutrition en pathologie digestive. *DOIN*, 16-20.

Pokorny J, Smith V.C, and Margaret Lutze. (1987). Aging of the human lens. *APPLIED OPTICS*, 1437-1440.

Ponce R.A, Kavanagh T.J, Mottet N.K., Whittaker S.G, and Faustman E.M. (1994). Effects of methyl mercury on the cell cycle of primary rat CNS cells in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol*, 83-90.

Powers SK , Lennon SL. (1999) Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. *Proc Nutr Soc*, 1025-1033.

PUTMAN, J.J. (1972). Quicksilver and slow death. *Natl. Geogr.* **142**, 506-527.

R

Ran Q, Van R.H, Gu M. (2003). Embryonic fibroblasts from Gpx41⁻ mice: a novel model for studying the role of membrane peroxidation in biological processes. *Free Radic Biol Med*, 1101–1109.

Rao, M.V., Chhunchha, B.(2010). Protective role of melatonin against the mercury induced oxidative stress in rat thyroid. *Food Chem. Toxicol*, 7–10.

Rao M.V, Sharma P.S.N.(2001).Protective effect of vitamin E against mercuric chloride reproductive toxicity in male mice. *Reproductive Toxicology*, 705–712

Reeta K.H, Mehla J, Pahuja M, Gupta Y. (2011). Pharmacokinetic, and pharmacodynamic interactions of valproate, phenytoin, phenobarbitone and carbamazepine with curcumin in experimental models of epilepsy in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav*, 399–407

Reichl F-X, Benecke M, Benecke J, Eckert K-G.(2004). Traduction de la 2^{ème} édition par Perraud R .et Krahe E. *Bruxelles, Edition De Boeck*,.

Rice D and Barone S Jr. (2000). Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. *Environ Health Perspect*, 511-533.

Robertson R.T. (1987). A morphogenic role for transiently expressed acetylcholinesterase in developing thalamocortical systems?. *Neurosci Lett*, 259-264.

Robin A. Bernhoft. (2012).Mercury Toxicity and Treatment: A Review of the Literature. *J of Environ and Public Health*, 10p.

Rodier P.M. (1995). Developing brain as a target of toxicity. *Environ Health Perspect* 73-76.

Rodier P.M. (1980). Chronology of neuron development: animal studies and their clinical implications. *Dev Med Child Neurol*, 525-545.

Rodgers R.J, Cole J.C. (1994) The elevated plus-maze: pharmacology, methodology and ethology. In: Cooper **SJ, Hendrie CA.** Ethology and psychopharmacology. *Wiley, Chichester*, 9–44.

Rosenblum L, Moltz H. (1983). Symbiosis in parent-offspring interactions, **Gubernick D.J, Alberts J.R.** . *New York: Plenum pressed*, 7-44.

Rowland A.S, Baird D.D, Weinberg C.R, Shore D.L, Shy C.M, Wilcox A.J. (1994). The effect of occupational exposure to mercury vapour on the fertility of female dental assistants. *Occup Environ*, 28-34.

Roy T.S, Andrews J. E, Seidler F.J, and Slotkin T.A. (1998a). Chlorpyrifos elicits mitotic abnormalities and apoptosis in neuroepithelium of cultured rat embryos. *Teratology*, 62-68.

Rudd JW, Furutani A, Turner MA (1980) Mercury methylation by fish intestinal contents. *Appl Environ Microbiol*, 777-782

RYTUBA J J. (2005). Geogenic and mining sources of mercury to the environment. In *Mercury: Sources, Measurements, Cycles, and Effects* (M.B. Parsons & J.B. Percival, eds.). *Mineral. Assoc. Canada, Short Course*. 21-41.

S

Sakamoto M, Nakano A, Kajiwara Y, Naruse I, Fujisaki T. (1993). Effects of methyl mercury in postnatal developing rats, *Environ. Res.* 43-50

Sanfeliu C.J , Sebastia R, Cristofol E. (2003). Rodriguez-Farre, Neurotoxicity of organomercurial compounds, *Neurotox. Res*, 283-305

Santos D, Milatovic D, Andrade V, Batoreu MC, Aschner M, Marreilha dos Santos AP. (2012). The inhibitory effect of manganese on acetylcholinesterase activity enhances oxidative stress and neuroinflammation in the rat brain. *Toxicology*, 90-98.

Schafer FQ, Buettner GR. (2001). Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radical Biology & Medicine*, 1191-1212.

Schantz SL, Widholm JJ. (2001). Cognitive effects of endocrine-disrupting chemicals in animals. *Environ Health Perspect*, 1197-1206.

Schrag SD, Dixon RL. (1985). Occupational exposures associated with male reproductive dysfunction. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 567-592.

Schwarz M, Loewenstein-Lichtenstein Y, Glick D, Liao J, Norgaard-Pedersen B, and Soreq H. (1995). Successive organophosphate inhibition and oxime reactivation reveals distinct responses of recombinant human cholinesterase variants. *Brain Res Mol Brain Res*, 101-110.

Sen CK. (2001). Antioxidant and redox regulation of cellular signaling: Introduction. *Med Sci Sports Exer.* 368-370.

Şener D.E, Melih A.G , Torun A.M.(2007).Lipid peroxidation and total antioxidant status in patients with breast cancer Lipid peroxidation and total antioxidant status in patients with breast cancer. *cell biochemistry and function Cell Biochem Funct*, 377–382.

Sener G, Sehirli A.O, Ayanoglu D.G .(2003). Melatonin protects against mercury (II)-induced oxidative tissue damage in rats. *Pharmacol. Toxicol*, 290–296.

Seppanen K, Soininen P, Salonen J.T, Lotjonen S, Laatikainen R. (2004) Does mercury promote lipid peroxidation? An in vitro study concerning mercury, copper, and iron in peroxidation of low-densitylipoprotein. *Biol.*

Sergent O, Griffon B, Cillard P, Cillard J. (2000). Alcool et stress oxydatif. *Pathol. Biol.* 689-695.

Sharma R K and AGARWAL A. (1996). Role of reactive oxygen species in male infertility. *urology* 48-61.

Sharma K V and Bigbee J W. (1998). Acetylcholinesterase antibody treatment results in neurite detachment and reduced outgrowth from cultured neurons: further evidence for a cell adhesive role for neuronal acetylcholinesterase. *J Neurosci Res.* 454-464.

Sheehan T, Numan M. (2002).Estrogen, Progesterone, and Pregnancy Termination Alter Neural Activity in Brain Regions That Control Maternal Behavior in Rats. *Regulation of Reproductive Functions. Neuroendocrinology* 12–23.

Sies H. (1993). Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Amer J of Med*, 31-38.

Silva I.A, Graber J, Nyland J.F, and Silbergeld E.K. (2005).In vitro HgCl₂ exposure of immune cells at different stages of maturation: effects on phenotype and function. *Environ Res.* 341-348.

Simon NM, Blacker D, Korbly NB, Sharma SG, Worthington JJ, Otto MW, Pollack MH .(2002).Hypothyroidism and hyperthyroidism in anxiety disorders revisited: new data and literature review. *J Affect Disord*, 209–217

Simonian N.A, Coyle J.T. (1996). Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Ann review of Pharmacol and Toxicol*, 83-106.

Singh U, Devaraj S and Jialal I. (2005). Vitamine E, Oxidative stress, and inflammation. *Ann Rev of Nut*, 151-175

Slamberova R, Szilagyi B, Vathy I. (2001). Repeated morphine administration during pregnancy attenuates maternal behavior. *Psychoneuroendocrinology*, 565-76.

Slotkin T, and Seidler F. (2008a). Transcriptional profiles reveal similarities and differences in the effects of developmental neurotoxicants on differentiation into neurotransmitter phenotypes in PC12 cells. *Brain Res Bull*.

Slotkin, T. A. (2004). Cholinergic systems in brain development and disruption by neurotoxicants: nicotine, environmental tobacco smoke, organophosphates. *Toxicol Appl Pharmacol*, 132-151.

Slotkin, T. A. (1999). Developmental cholinotoxicants: nicotine and chlorpyrifos. *Environ Health Perspect*, 71-80.

Slotkin T.A, Lappi S.E, and Seidler F.J. (1993). Impact of fetal nicotine exposure on development of rat brain regions: critical sensitive periods or effects of withdrawal? *Brain Res Bull*, 319-328.

Smith J.C, Allen P.V, Turner M.D, Hall L.L.(1994).The kinetics of intravenously administered methylmercury in man. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 251-256.

Smith WE et SMITH AM. (1975): *Minimata*. Holt, Rinehart and Winston, New York, New York. 192p.

Smotherman W.P., Robert W. B, James S, Jeffrey E. (1974). Maternal Responses to Infant Vocalizations and Olfactory Cues in Rats and Mice I. *behavioral biology*, 55-66

Sohal RS, Mockett RJ, Orr WC. (2002). Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis. *Free Rad Biol Med*, 575-586.

Song H-j, Guo-li M, Zhigang H, Maxime L, Lisa M, Marc T-L, Mu-ming P. (1998). Conversion of Neuronal Growth Cone Responses from Repulsion to Attraction by Cyclic Nucleotides. *Science*, 281.

Songur A, Sarsilmaz M, Sogut S, Ozyurt B, Ozyurt H, Zararsiz I, Turkoglu AO.(2004). Hypothalamic superoxide dismutase, xanthine oxidase, nitric oxide, and malondialdehyde in rats fed with fish omega-3 fatty acids. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry*, 693–698.

Sorg O. (2004). Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality. *Comptes Rendus Acad Sci Paris, Ser B*, 649-662.

Souza C.G, Moreira J.D, Siqueira I.R, Pereira A.G, Rieger D.K, Souza D.O, Souza T.M, Portela L.V, Perry M.L. (2007). Highly palatable diet consumption increases protein oxidation in rat frontal cortex and anxiety-like behavior. *Life Sci* 198–203.

Spiller H.A (2018) Rethinking mercury: the role of selenium in the pathophysiology of mercury toxicity. *Clin Toxicol (Phila)*, 313–326.

Stacey N.H, and Kappus H. (1982). Cellular Toxicity and Lipid Peroxidation in Response to Mercury. *toxicology and applied pharmacology*, 29-35

Stern JM. (1990). Multisensory regulation of maternal behaviour and masculine sexual behaviour: a revised view. *Neuroscience and Biobehavioral Review*, 183–200

Stevnsner T, Tharslund T, De souza-pinto NC, Bohr VA. (2002). Mitochondrial repair of 8-oxoguanine and changes with aging. *Exp Gerontol*, 1189-1196.

Stringari J, Nunes AK, Franco JL, Bohrer D, Garcia SC, Dafre AL, Milatovic D, Souza DO, Rocha JB, Aschner M, Farina M .(2008) .Prenatal methylmercury exposure hampers glutathione antioxidant system ontogenesis and causes long-lasting oxidative stress in the mouse brain. *Toxicol Appl Pharmacol*, 147–154.

Stohs S.J, Bagchi D. (1995). Oxidative mechanisms in the toxicity of metal-ions. *Free Radic. Biol; Med*, 321-336.

Summers AO, Wireman J, Vimy MJ, Lorscheider FL, Marshall B, Levy SB.(1993) Mercury released from dental “silver” fillings provokes an increase in mercury- and antibiotic-resistant bacteria in oral and intestinal floras of primates. *Antimicrob Agents Chemother*, 825-834

T

Takahashi S, Zeydel M. (1982). gamma-Glutamyl transpeptidase and glutathione in aging IMR-90 fibroblasts and in differentiating 3T3 L1 preadipocytes. *Arch Biochem Biophys*, 260–267.

Tchounwou PB, Ayensu WK, Ninashvili N, Sutton D. (2003). Environmental exposure to mercury and its toxicopathologic implications for public health. *Environ Toxicol*, 149-175

Teixeira FB, Fernandes RM, Farias-Junior PM, Costa NM, Fernandes LM, Santana LN, Silva-Junior AF, Silva MC, Maia CS, Lima RR .(2014). Evaluation of the effects of chronic intoxication with inorganic mercury on memory and motor control in rats. *Int J Environ Res Public Health*, 9171–9185.

Testud F. (2005). Mercure. In: Pathologie toxique professionnelle et environnementale. *Paris: Eska*, 239–51.

Thevenod F. (2003). Nephrotoxicity and the proximal tubule. Insights from cadmium. *Nephron Physiol*, 87-93.

Toshiko T-K, Mieko S, Akira N, Nobuaki Y and Nobumasa I. (1998). Strain Difference in Sensitivity of Mice to Renal Toxicity of Inorganic Mercury1. *the journal of pharmacology and experimental therapeutics*. *JPET* 335–341.

U

United Nation Environment Programme (UNEP) – Chemicals. (2002). Global Mercury Assessment. *Geneva*, 266.

Uversky V.N, Li J, Fink A.L. (2001). Metal-triggered structural transformations, aggregation, and fibrillation of human α -synuclein. A possible molecular link between Parkinson's disease and heavy metal exposure. *J. Biol. Chem*, 44284– 44296.

V

Valko M, Morris H, and Cronin M.T.D. (2005). Metals, Toxicity and Oxidative Stress. *Current Medicinal Chemistry*, 1161-1208.

Valles S, Pitarch J, Renau-Piqueras J, and Guerri, C. (1997). Ethanol exposure affects glial fibrillary acidic protein gene expression and transcription during rat brain development. *J Neurochem*, 2484-2493.

Valles, S., Sancho-Tello, M., Minana, R., Climent, E., Renau-Piqueras, J., and Guerri, C.(1996). Glial fibrillary acidic protein expression in rat brain and in radial glia culture is delayed by prenatal ethanol exposure. *J Neurochem*, 2425-2433.

Vimy MJ, Hooper DE, King WW, Lorscheider FL. (1997). Mercury from maternal "silver" tooth fillings in sheep and human breast milk. A source of neonatal exposure. *Biol Trace Element Res*, 143-152.

Vojdani A, Pangborn JB, Vojdani E, Cooper EL. (2003) Infections, toxic chemicals and dietary peptides binding to lymphocyte receptors and tissue enzymes are major instigators of autoimmunity in autism. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 189-199.

W

Wafa T, Amel N, Issam, C, Imed C, Abdelhedi M, Mohamed H. (2011). Subacute effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic herbicide on antioxidant defense system and lipid peroxidation in rat erythrocytes. *Pestic. Biochem. Phys*, 256–264.

Watts J. (2001). The Lancet Mercury poisoning victims could increase by 20 000, 358.

Weiyue Feng, Meng Wang, Bai Li, Jing Liu, Zhifang Chai, Jiujiang Zhao, Guilong Deng. (2004). Mercury and trace element distribution in organic tissues and regional brain of fetal rat after in utero and weaning exposure to low dose of inorganic mercury.

Welch WJ.(1992). Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. *Physiol Rev*, 1063-1081.

Whitney K. D, Seidler F. J, and Slotkin T.A. (1995). Developmental neurotoxicity of chlorpyrifos: cellular mechanisms. *Toxicol Appl Pharmacol*, 53-62.

Y

Yang JM, Jiang XZ, Chen QY, Li PJ, Zhou YF, Wang YL. (1996). The distribution of HgCl₂ in rat body and its effects on fetus. *Biomed Environ Sci*, 437-442.

Yant LJ, Ran Q, Rao L. (2003). The selenoprotein GPX4 is essential for mouse development and protects from radiation and oxidative damage insults. *Free Radic Biol Med*, 496-502.

Yee S, Choi BH. (1996). Oxidative stress in neurotoxic effects of methylmercury poisoning. *Neurotoxicology*, 17-26.

Yin Z, Milatovic D, Aschner JL, Syversen T, Rocha JB, Souza DO, Sidoryk M, Albrecht J, Aschner M (2007) Methylmercury induces oxidative injury, alterations in permeability and glutamine transport in cultured astrocytes. *Brain Res*, 1-10.

Yoshida M, Honda M, Watanabe C, Satoh M, Yasutake A. (2011). Neurobehavioral changes and alteration of gene expression in the brains of metallothionein-I/II null mice exposed to low levels of mercury vapor during postnatal development. *J Toxicol Sci*, 539-547.

Yoshida M, Watanabe C, Satoh M, Yasutake A, Sawada M, Ohtsuka Y, Akama Y, Tohyama C. (2004). Susceptibility of Metallothionein-Null Mice to the Behavioural Alterations Caused by Exposure to Mercury Vapour at Human Relevant Concentration. *Toxicol Sci*, 69-73.

Yoshida M. (2002). Placental to fetal transfer of mercury and fetotoxicity. *Tohoku J Exp Med*, 79-88.

Z

Zalups, P.K. (2000). Molecular interactions with mercury in the kidney. *Pharmacol. Rev*, 113-143.

Zelko IN, Marian TJ, Folz RJ. (2002). Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Rad Biol & Med*, 337-349.

Zeng H, Schimpf BA, Rohde AD, Pavlova MN, Gragerov A, Bergmann JE. (2007). Thyrotropin-releasing hormone receptor 1-deficient mice display increased depression and anxiety-like behavior. *Mol Endocrinol*, 2795-2804.

