

Effets du méthylmercure sur la santé

- effets sur la santé
- valeurs toxicologiques de référence
- conséquences de la diminution des valeurs toxicologiques de référence

**Rapport établi à la demande de l'AFSSE
25 mars 2004**

Philippe Saviuc et Nathalie Fouilhé Sam-Lai

Groupement d'Études en Toxicologie
Président : Pr Vincent Danel
Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble
38043 Grenoble cedex 9

Le 21 Juillet 2003, l'Agence française de sécurité sanitaire environnementale (AFSSE) a été saisie par le Ministère de la Santé, de la Famille et des Personnes Handicapées et le Ministère de l'Ecologie et du Développement Durable "d'organiser en étroite collaboration avec l'InVS, une journée scientifique avec l'ensemble des organismes de recherche intéressés, d'effectuer une synthèse de leurs travaux et de nous proposer des recommandations pour nous aider à gérer avec efficacité les risques sanitaires liés au mercure en Guyane" selon les termes de la saisine.

En janvier 2004, l'Agence française de sécurité sanitaire environnementale (AFSSE) a demandé au Groupement d'Études en Toxicologie de Grenoble d' :

- analyser l'ensemble des informations et données toxicologiques provenant des monographies publiées en particulier par l'OMS et l'US EPA sur le méthylmercure,
- analyser l'impact de la recommandation du JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives), datant de juin 2003, d'abaisser la dose provisoire hebdomadaire tolérable de 3.3 µg/kg de masse corporelle à 1.6 µg/kg sur les valeurs biologiques de référence dans différents milieux biologiques (sang, urine, cheveux, placenta) en particulier en ce qui concerne la valeur de référence pour les cheveux (puisque'il s'agit de l'indicateur utilisé dans les études menées en Guyane),
- indiquer si les méthodes d'échantillonnage et d'analyse du mercure (et/ou de ses composés) pour les milieux biologiques sont comparables d'une étude à l'autre,
- indiquer dans quelle mesure les tests psychométriques utilisés dans les différents articles et études sont différents.

Ce travail s'inscrit dans le cadre de la préparation de cette journée scientifique.

SOMMAIRE

1. CONTEXTE.....	3
2. EFFETS SUR LA SANTÉ DES FAIBLES DOSES DE METHYLMERCURE.....	3
2.1. Mécanismes	3
2.2. Effets chez l'homme	3
2.2.1 Effets sur le développement neurocomportemental	3
2.2.2 Effets cardiovasculaires	4
2.2.3 Immunotoxicité	4
3. ÉTUDES ANCIENNES : JAPON, IRAQ (et CANADA).....	4
4. COHORTES RÉCENTES : ÎLES FÉROÉ, ÎLES SEYCHELLES ET N.-ZÉLANDE	6
4.1. Design et date	6
4.2. Population	6
4.3. Consommation	7
4.4. Mesure de l'exposition.....	7
4.4.1 Méthodes d'estimation de l'exposition des 3 études	7
4.4.2 Propriétés d'un biomarqueur d'exposition	8
4.4.3 Sang maternel et sang foetal.....	9
4.4.4 Cheveu	10
4.5. Tests neuropsychométriques	11
4.6. Confusion : appariement / ajustement.....	12
4.7. Analyse statistique	12
4.8. Résultats	12
4.9. Analyses complémentaires	13
5. COMMENTAIRES.....	13
5.1. Féroé.....	13
5.1.1 Effets cardiovasculaires	14
5.1.2 Effets neurophysiologiques	14
5.2. Seychelles	14
5.3. Nouvelle-Zélande	16
6. CONSTRUCTION DES VALEURS TOXICOLOGIQUES DE RÉFÉRENCE.....	17
6.1. DHTP DE L'OMS, 1972.....	17
6.2. DHTP DE L'OMS, 2003.....	18
6.3. RfD DE L'EPA, 1995	20
6.4. RfD DE L'EPA, 2001	21
6.5. RfD DE L'ATSDR, 1999	22
6.6. RfD DU RIVM	22
7. COMPARAISON DES VALEURS TOXICOLOGIQUES DE RÉFÉRENCE	23
8. IMPACT DE LA DIMINUTION DES VTR.....	24
8.1. PROPOSITION DE VALEUR DE RÉFÉRENCE DANS LE CHEVEU.....	24
8.2. CONSÉQUENCE (IMPACT) SUR LES POPULATIONS EXPOSÉES.....	25
9. LIMITATIONS DE CONSOMMATION DE POISSONS	28
9.1. FDA	28
9.2. AFSSA.....	28
10. EN CONCLUSION	28
11. RÉFÉRENCES.....	29

1. CONTEXTE

Le poisson représente la principale source d'exposition au mercure pour l'homme. Les poissons vivant dans des eaux non polluées contiennent moins de 0,4 µg/g de méthylmercure (MeHg). Les grands prédateurs marins voient leur concentration atteindre plusieurs µg/g¹.

Pour prévenir les risques liés à la consommation du mercure organique, en particulier à travers le poisson plus ou moins contaminé, des valeurs toxicologiques de référence (VTR) ont été établies par différentes agences internationales. A partir de ces VTR peuvent être dérivées des valeurs de qualité de milieu, et peut être estimé l'impact sur les populations exposées.

La dose hebdomadaire tolérable provisoire (DHTP) de l'OMS a été évaluée une première fois en 1972 (JECFA 1972) à partir d'études japonaises et scandinaves, et révisée en 2003 (JECFA 2003) à partir des études conduites aux îles Seychelles et Féroé.

L'US EPA a révisé la RfD du méthylmercure en 1995 à partir d'études réalisées en Iraq (Rice 2000), puis une nouvelle fois en 2001 à partir de l'étude réalisée dans les îles Féroé (Rice 2003).

Pour comprendre les modifications dans le temps de ces VTR et leur différence (ratio de 3,5 entre la VTR la plus élevée et la moins élevée), il convient dans un premier temps de revoir ces études épidémiologiques, et dans un deuxième temps d'analyser les procédures de production des VTR.

2. EFFETS SUR LA SANTÉ DES FAIBLES DOSES DE METHYLMERCURE

2.1. Mécanismes (WHO/EHC 101, 1990)

Plusieurs mécanismes ont été identifiés, rendant compte des effets diffus chez l'enfant (alors qu'ils sont focalisés chez l'adulte avec une atteinte de la sensibilité et une atteinte cérébelleuse) :

- diminution de la synthèse protéique, surtout des petits neurones possédant des capacités de réparation réduites ;
- perturbation de la division cellulaire avec atteinte des microtubules ;
- perturbation de la migration des cellules nerveuses dans les cortex cérébraux et cérébelleux ; la période critique s'étale du 3^e au 4^e mois de gestation.

2.2. Effets chez l'homme

2.2.1 Effets sur le développement neurocomportemental

C'est l'exposition prénatale (in utero) et du jeune enfant qui est responsable de l'atteinte de l'organe cible principal, le système nerveux central en développement. La période critique semble être durant la 2^e partie de la grossesse. Cinq types d'effets neuropsychométriques peuvent être recherchés / mesurés :

- neurologiques : réflexes ostéo-tendineux, tonus musculaire...
- âge pour atteindre les étapes du développement : marche, premier mot...
- développement pré scolaire : tests...
- développement durant l'enfance : tests...
- neurophysiologiques : potentiel évoqué auditif.

¹ 1 µg/g = 1 ppm = 1 mg/kg ; 1 ppb (dans le sang) = 1 µg/L

Les 2 derniers types d'effets sont les plus pertinents pour un objectif d'établissement de VTR.

2.2.2 Effets cardiovasculaires

De nombreuses études ont montré des effets protecteurs sur le système cardiovasculaire de la consommation de poisson, rapportés à la présence d'acide gras oméga-3 ou de sélénium voire à la faible consommation de viande rouge.

Les premiers rapports montrant un effet cardiovasculaire lié au mercure organique remontent à l'intoxication iraquienne.

Plus récemment plusieurs études épidémiologiques ont investigué cette relation :

- Salonen a montré la relation entre prévalence de l'infarctus aigu du myocarde (IAM) et décès d'origine cardiaque sur une cohorte de 1833 sujets suivis durant 7 ans consommant 46,5 g/j de poisson (0 – 612 µg/g), soit 7,6 µg/j de MeHg (1,1 – 65 µg/g), correspondant à 1,92 µg/g dans le cheveu (0 – 16 µg/g) ; le risque relatif d'IAM était 2 chez les hommes qui avaient plus de 2 versus moins de 2 µg/g de Hg dans les cheveux (Salonen 1995) ;

- Guellar et al (Guellar, 2002) ont montré une association entre la concentration de Hg dans les ongles et le risque d'infarctus du myocarde, même après ajustement sur la consommation d'acide gras polyinsaturé (oméga-3) pour des niveaux de Hg de 0,11 à 0,66 µg/g. Malheureusement, il n'y avait pas d'information sur la consommation de poissons (quantité et espèces consommées). Dans le même numéro du New England Journal of Medicine, une autre étude (étude cas-témoin nichée dans une cohorte de professionnels comprenant 60% de dentistes) n'a pas mis en évidence d'association entre la concentration de Hg dans les ongles et le risque de coronaropathie, après ajustement sur les concentrations en cadmium et sélénium, sur les habituels facteurs de risque et une estimation de la consommation d'oméga-3 (RR = 0,97). Une analyse de sous groupes excluant les dentistes, soit environ 60% des effectifs, montre pour un effectif de 220 sujets répartis en 5 quintiles une association non significative (RR = 1,27 ; IC95% : 0,62 – 2,59), qui est majorée après ajustement sur les oméga-3 (RR = 1,70 ; IC95% : 0,78 – 3,73) ; un défaut de puissance peut être avancé.

2.2.3 Immunotoxicité

Les effets du MeHg sur le système immunitaire n'ont pas été étudiés chez l'homme.

3. ÉTUDES ANCIENNES : JAPON, IRAQ (et CANADA)

Les études japonaises (Minamata, Niigata), historiques, ont montré les risques de l'exposition prolongée au Hg, en rapport avec sa transformation en MeHg et sa concentration dans la chaîne alimentaire (consommation de poisson). Des effets neurologiques, tératogènes et fœtotoxiques ont été démasqués pour des niveaux d'exposition importants.

L'intoxication en Iraq est en relation avec l'utilisation de céréales contaminées par du MeHg, utilisées durant plusieurs mois pour la confection de pain artisanal.

Ces études sont résumées dans le tableau suivant.

Etudes conduites au Japon, en Iraq et au Canada (d'après WHO/EHC 101, 1990).

Minamata

auteurs/an	effectif	âge	effet	mesure	résultats	facteurs de confusion : appariement/ajustement	commentaires
Takeuchi 1973	23		paralysie cérébrale retard mental important		pas de mesure		
Harada 1977			retard mental		sang du cordon		

Iraq

auteurs/an	effectif	âge	effet	mesure	résultats	facteurs appariement/confusion	commentaires
Marsh 1977, 1980	29	4,5-5 a	retard marche (>18 mois) retard langage (1er mot > 24 mois)	cheveu segment 1 cm max des segments	retard marche et langage quand [cheveu] < 180 ppm	biais social	pas de relation pour retard mental, convulsions, signes neurologiques, périmètre crânien, taille
Marsh 1981	84		retard marche, moteur et mental, convulsions	cheveu (SAA) segment 1 cm max des segments 0,4-640 ppm	symptômes augmentent avec l'exposition	alcool, tabac maladie, médicament socio-éco, nutrition	84 (dont les 29) contrôle Hg et MeHg par SAA
	5		déficit sévère		[] min 404 ppm		
	?		syndrome modéré : retard marche troubles tonus et réflexes		relation statistique pas de seuil		méconnaissance du bruit de fond
Marsh 1987			troubles tonus et réflexes (souvent ataxie, retard développ.)		risque > 30% qd > 70 ppm risque 5% qd 10-20 ppm		recommandation d'études épidémiologiques pour des expositions correspondant à moins de 20 ppm

Canada

auteurs/an	effectif	âge	effet	mesure	résultats	facteurs appariement/confusion	commentaires
McKeown 1983	234	12-30 m		cheveu segment 1 cm max (mois-1 à mois+1) moy 6 ppm, max 24 ppm 6% > 20 ppm		alcool (2/3 mère), tabac (2/3), caféine condition grossesse et accouchement, durée lactation, sexe, âge mère (13% < 20 ans) et enfant	poids, taille, périmètre crânien, dysmorphie, malformation, maladie acquise, sens, <u>paire crânienne</u> , sensibilité, <u>tonus</u> , <u>réflexes</u> , <u>coordination</u> , réflexe cutané plantaire Denver Developmental Scale (% du test, selon trouble moteur <u>fin</u> , <u>grossier</u> , aptitude <u>personnelle</u> et <u>sociale</u>)
	97 garçon	12-30 m	anomalies tonus et réflexe, retard marche (> 24 mois), 1 ^e mot, sauf papa et maman (> 18 mois)		corrélation avec [cheveu] pas de relation dose effet pas de seuil	id	résultats dépendant du modèle régression <u>variables</u> / [cheveu] ; puis cas (effet le plus associé) témoin (les autres), Odd ratio ajusté sur facteurs de confusion

SAA : Spectrométrie d'absorption atomique ; 1 ppm = 1 µg/g

L'étude iraquienne a servi de base à la VTR de l'EPA en 1995. Les données de l'étude initiale (Marsh 1987) ont été re-analysées (Cox 1989) avec pour objectif l'identification de la forme de la relation dose réponse et l'identification d'un seuil. L'exposition a été re-estimée à partir du cheveu par fluorométrie au rayon X. En utilisant plusieurs modélisations statistiques (paramétriques et non paramétriques) un seuil de 10 µg/g a été établi, très largement dépendant du bruit de fond (prévalence de base de l'effet).

Par la suite, 2 nouvelles re-analyses ont montré que les résultats étaient très sensibles à la détermination du niveau du bruit de fond, au choix du modèle, à l'influence de quelques individus (Crump 1995, Cox 1995). Un biais de mémorisation lors de l'interrogatoire des mamans (dates des premiers pas et des premiers mots) et un probable biais de sélection ont été discutés.

4. COHORTES RÉCENTES : ÎLES FÉROÉ, ÎLES SEYCHELLES ET NOUVELLE-ZÉLANDE

De nombreuses études ont été réalisées en d'autres lieux et ne seront pas reprises ici (Madère, Amazonie, Guyane française...) : elles sont résumées dans le document du NRC (NRC 2000).

L'OMS, l'US EPA, le NRC ont largement revu et commenté les résultats des 3 principales études épidémiologiques qui ont produit avec un recul de 5,5 à 9 ans des résultats contradictoires (WHO Food Additives series 44, 2000 ; NRC 2000).

Elles sont détaillées point par point (en gras sont soulignés les principaux points / les principales critiques qui ont été discutés comme pouvant interférer dans l'interprétation des résultats).

4.1. Design et date

Seychelles Davidson 1998	cohorte exposé / non exposé débutée en 1989-1990 réalisation d'une étude pilote analyse à 66 mois (5,5 ans) (au moins 1 an d'école)
Féroé Grandjean 1997 Grandjean 1998	1) cohorte, débutée en 1986-1987 2) étude exposé / non exposé nichée analyse à 7 ans (non scolarisé)
N-Zélande Kjellstrom 1989	cohorte exposé / non exposé, débutée en 1977-1978 analyse à 4 ans (n=31), à 6-7 ans (n=61) la 1 ^e étude (n=31) n'est pas interprétable (erreur d'appariement)

4.2. Population

Seychelles Davidson 1998	hétérogène (îles pacifiques, africains, peu d'asiatiques) 711 couples mère-enfant, tabac et alcool < 15%
Féroé Grandjean 1997 Grandjean 1998	homogène (grande majorité d'insulaires, quelques danois) 1) 1022 couples mère-enfant, tabac, alcool (~ 26%) , 917 à 7 ans 2) sélection de 120 mères avec Hg capillaire 10-20 µg/g (groupe) et de 312 mères avec Hg capillaire 1-3 µg/g (moyenne 1,8 µg/g) sélection de contrôle par appariement sur sexe, âge, année examen, RPM Au total 122 groupe (éviction antécédent neuro), 122 contrôle
N-Zélande Kjellstrom 1989	hétérogène (62% îles pacifiques, 27% maoris, 11% européens) 10970 couples mère-enfant sélection des consommatrices de poisson > 3/sem : - exposé : taux Hg capillaire > 6 µg/g (n=61) - contrôles : 1) 3-6 µg/g; 2) <3 µg/g et consommation poisson faible ; 3) <3 µg/g et consommation forte, appariés selon ethnie, âge maternel, tabac, lieu de résidence durée de vie en N-Zélande avant la grossesse

4.3. Consommation

Des enquêtes spécifiques permettent d'estimer la consommation individuelle en associant quantification (souvent imprécise ou qualitative), connaissance des espèces consommées et leur niveau de contamination (très grande variabilité régionale).

Seychelles Davidson 1998	consommation importante (moy. 12 repas/semaine ; de 10 à 14) de poisson peu contaminé
Féroé Grandjean 1997 Grandjean 1998	groupe : médiane de 3 repas baleine / mois, de 3 repas poisson / semaine contrôle : médiane de 1 repas baleine / mois, de 2 repas poisson / semaine consommation peu importante de poisson et mammifère moyennement contaminés
N-Zélande Kjellstrom 1989	questionnaire diététique

- aux îles Seychelles, l'enquête se limite à évaluer, 6 mois après la naissance, le nombre moyen de repas de poisson par semaine. Le niveau de contamination des différentes espèces est connu, mais pas la quantification de leur consommation ;
- aux îles Féroé, la consommation est estimée avec le nombre de repas de poisson par semaine et le nombre de repas mensuel de baleine (contenant 1-3 ppm de MeHg) ; la consommation de baleine est bien moins fréquente (mais plusieurs jours de suite : phénomène de pics). La quantification des portions n'a pas été réalisée. Il a été calculé, en tenant compte des différences de fréquence de consommation et de teneurs entre baleine et poisson, une contribution 15 fois supérieure pour les baleines (TERA 2000) ;
- en Nouvelle-Zélande, l'enquête précise la fréquence et les quantités consommées, mais ne mentionne pas les teneurs en Hg des espèces consommées.

4.4. Mesure de l'exposition

4.4.1 Méthodes d'estimation de l'exposition des 3 études

Seychelles Davidson 1998	Hg total tout le cheveu de la mère (Hg organique et inorganique par SAA) : 6,8 µg/g (0,5-26,7 µg/g, médiane 5,5 µg/g) Hg total 1 cm de cheveu de l'enfant à 66 mois : 6,5 µg/g (0,9-25,8 µg/g) ; r (mère, enfant 0,15) Hg dans 350 poissons (25 espèces), médiane/espèce : 0,004-0,75 ppm, la plupart : 0,05-0,25 ppm ; 90% = MeHg Pb < 100 µg/L ; PCB (18 congénères) chez 49 enfants < LD
Féroé Grandjean 1997 Grandjean 1998	1) Hg cordon 22,9 µg/L, cheveu mère 4,3 µg/g, enfant 1 an 1,1 µg/g, 7 ans 3 µg/g 2) mesure du Hg capillaire (groupe 12,5 µg/g versus témoin 1,8 µg/g), du Hg sur le sang du cordon (groupe 59,0 µg/L versus témoin 11,9 µg/L) mesure de PCB (3 congénères) sur le cordon (GC-ECD : electron capture detector) : (groupe 2,73 µg/g versus témoin 1,48 µg/g, p<0,0001) ; rho (Hg cordon, PCB) = 0,49
N-Zélande Kjellstrom 1989	cheveu : segment 1 cm sur durée grossesse moyenne Hg capillaire : 6-86 ppm (2 ^e plus haute valeur : 20 µg/g)

- Seychelles : mesures que sur le cheveu du Hg total par SAA vapeur froide (CVAA). Comparaison avec une méthode de référence (Cernichiari 1995a), mais pas de résultats résumés.

- Féroé : mesure sur le sang du cordon et sur le cheveu, mais pour une longueur de cheveu prélevé à la naissance variant de 3 à 9 cm. Les données du contrôle qualité sont confuses du fait de multiples méthodes utilisées sur le cheveu et le sang, dans différents laboratoires. Mesures sur le cheveu dans le même laboratoire que Seychelles (CVAA) avec une erreur de

mesure comparable. Mesures sur le sang par SA dans l'UV. Contrôle avec 4 échantillons de référence de 9,9 µg/L 98 µg/L 103 µg/L et 103 µg/L avec une précision de 0% 13,0% 11,2% et 10,0%, et des coefficients de variation de 7 à 14%.

Grandjean (1999) a montré une différence de prédictibilité des biomarqueurs : la teneur de Hg dans le cheveu a été reliée à des déficits moteurs fins, et celle dans le sang du cordon a été reliée à des déficits cognitifs (langage, attention, troubles de la mémoire). Cette différence a été attribuée à la différence de signification temporelle des 2 biomarqueurs notamment au regard de la « fenêtre de vulnérabilité » de l'effet mesuré. Cette interprétation a semblé discutable du fait de l'absence d'uniformité de la longueur des cheveux (NRC 2000).

- Nouvelle Zélande : mesure uniquement sur le cheveu par CVAA (9 cm mesurés cm par cm). Pas de contrôle entre les 2 stades (1986 et 1989). Re analyse de 16 prélèvements : pour 13 d'entre eux différence moyenne de 23% ; 3 prélèvements donnent des résultats très éloignés liés à une probable erreur de mesure.

4.4.2 Propriétés d'un biomarqueur d'exposition

Au sens strict, les biomarqueurs d'exposition permettent à travers la mesure du Hg dans certains milieux d'estimer l'exposition :

- à partir de là, il est possible d'établir une relation dose-réponse entre concentration de Hg dans le milieu d'intérêt et effet ;
- une fois une concentration critique retenue dans le milieu d'intérêt (correspondant à la concentration critique inconnue dans le tissu cible), une dose peut être dérivée.

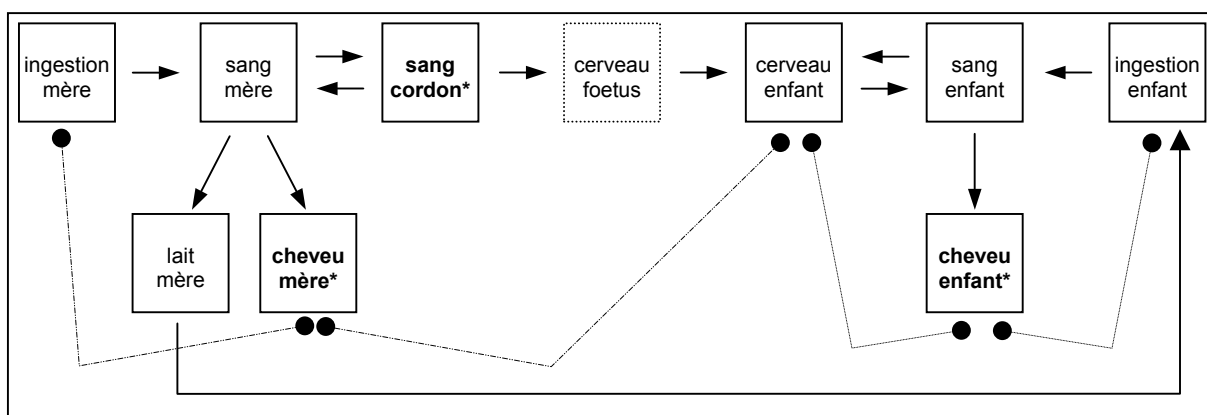
Un biomarqueur pertinent doit donc répondre à 3 conditions :

- il est relié à la dose ingérée ;
- il est relié à la concentration à l'organe cible ;
- les variations temporelles de concentration du biomarqueur sont corrélées aux variations temporelles de concentration à l'organe cible.

La « position » du milieu dans lequel le Hg est mesuré intervient.

D'un point de vue de proximité cinétique, le sang du cordon est mieux relié à la concentration dans le tissu cible, moins bien relié à la dose ingérée ; le sang maternel est mieux relié à la dose ingérée ; le cheveu, apparaît moins bien relié et à la dose ingérée et à la concentration à l'organe cible.

Biomarqueurs d'exposition au mercure (adapté de NRC 2000).



- * milieu utilisé lors des études épidémiologiques récentes
- trait plein : distribution du polluant
- trait pointillé : propriété du biomarqueur

La variabilité des méthodes utilisées peut être grande. Elle tient au choix :

- du milieu et du sujet (cheveu de la mère, cheveu de l'enfant, sang de la mère, sang du cordon).
- de la méthode de dosage, de la spéciation du métal. La spectrométrie d'absorption atomique peut mesurer le Hg total et inorganique ; le Hg organique est obtenu par différence. Le dosage du MeHg peut être réalisé directement : dans le cheveu 80% du Hg total est du MeHg (WHO, Food Additives series 44, 2000). D'autres méthodes peuvent ou ont été utilisées (spectrométrie par fluorescence X, ICP-MS = torche à plasma) ;
- du moment de la mesure, son intégration dans le temps ;
- du choix de l'indicateur statistique (moyenne, maximum).

4.4.3 Sang maternel et sang fœtal

La limite de détection de la plupart des méthodes est de 0,1-0,3 µg/L de sang. Les concentrations mesurées dans le sang dans la population générale varient de 1-5 µg/L. C'est le Hg total qui est le plus souvent mesuré. La signification du résultat dépend des circonstances :

- chez les non consommateurs de poisson, le Hg sanguin correspond au Hg inorganique ; la concentration est de 2 µg/L (sd = 1,8) ;
- chez les grands consommateurs de poisson, le taux (dans le sang du cordon) est de 24 µg/L (Féroé) ; le Hg sanguin total correspond pour la plus grande partie au Hg organique. Pour l'OMS, dans ces circonstances, le Hg organique contribue pour 84% du Hg total (de 69 à 99%) (EHC 101, 1990) ;
- chez les faibles consommateurs de poisson, la mesure dans le sang du cordon n'est pas pertinente.

Le Hg sanguin est à l'état d'équilibre un bon marqueur d'exposition chronique, un piètre marqueur pour estimer les variations à court terme, sous forme de répétition de pics, trop dépendant du moment du prélèvement par rapport à ces pics (la demi vie d'élimination sanguine est de l'ordre de 51 – 56 j (Smith 1996)). Un questionnaire parallèle de consommation de poissons est souhaitable. La mesure de Hg dans le sang fœtal est le reflet de l'exposition des 150 derniers jours, avec une contribution croissante de la 2^e moitié du second trimestre à la naissance. Relier ce biomarqueur aux effets neurocomportementaux suppose une sensibilité accrue au Hg durant la fin de la grossesse, alors que la sensibilité au Hg durant le développement cérébral n'est peut être pas identique, et que l'effet éventuel de « pic » durant une « fenêtre de vulnérabilité » n'est pas connu.

La demi vie d'élimination du sang maternel n'est pas forcément la même que celle du sang du cordon (un peu plus élevée dans le sang fœtal).

Utiliser la concentration de Hg dans le sang fœtal pour estimer une dose ingérée nécessite une conversion de la concentration de Hg dans le sang maternel. La variabilité de cette conversion est celle qui contribue le plus lors du calcul d'une dose ingérée (NRC 2000, Stern 1997). Le ratio entre sang fœtal et sang maternel varie selon les études de 1 à 1,2-1,3. Le ratio moyen a été ré évalué à partir de 18 études à 1,55 (min 1,04 - max 2,63 ; NRC 2000). Stern en 2003 a revu 10 études permettant une méta-analyse et une simulation de Monte-Carlo : il propose de retenir un ratio de 1,7 (95^{ème} percentile : 3,4) et d'utiliser un facteur d'incertitude pour tenir compte de la variabilité (Stern 2003).

Grandjean a évalué la pertinence de l'utilisation de 5 biomarqueurs (Hg dans le sang du cordon, le cheveu maternel, le cheveu de l'enfant à 1 an et à 7 ans et le sang de l'enfant à 7 ans). Sous l'hypothèse de l'existence d'une association entre biomarqueurs et tests psychométriques, le sang du cordon s'avère être le meilleur prédicteur de cette association (coefficients les plus élevés) (Grandjean 1999).

4.4.4 Cheveu

Cette méthode non invasive est souvent utilisée. La limite de détection (SAA vapeur froide) pour le Hg total sur le cheveu humain est de 0,01 à 0,04 µg/g. La concentration moyenne en population générale aux USA varie de 0,3 à 1 µg/g :

- chez les non ou faibles consommateurs de poisson, le Hg représente le Hg inorganique, et les concentrations varient de 0,2 à 0,8 µg/g.
- chez les consommateurs de poissons, les concentrations moyennes variaient de 4,8 µg/g (Féroé) à 6,8 µg/g (Seychelles) en Hg total. Ces excès de concentrations sont attribuables au Hg organique.

Cette mesure intègre dans le temps le moment et l'importance d'une consommation. La pertinence de cette mesure présuppose :

- une croissance constante du cheveu : 1,1 cm en moyenne (0,6 à 1,5 cm) pouvant varier avec l'âge, la race, le sexe et la saison ; 9 cm de cheveu représente 8 mois de grossesse en moyenne, de 6 à 15 mois (NRC 2000);
- une incorporation dans le cheveu directement dépendante de la concentration dans le sang, ce dernier milieu agissant comme un compartiment cinétique intermédiaire.

Le ratio entre la concentration de Hg dans le cheveu et dans le sang maternel dans différentes études peut varier d'un facteur de 2 (dans la majorité des études, cette variation est de 20% autour de la moyenne).

Les mesures dans le sang (plus proche du tissu cible) et dans le cheveu (intégration de l'exposition dans le temps) ont chacune leur avantage et leur défaut. Les 2 mesures, associées à un questionnaire permettent d'améliorer significativement la précision de l'estimation.

Peu d'informations sont disponibles quant aux concentrations de Hg à l'organe cible et leur corrélation avec un biomarqueurs. Une étude réalisée aux Seychelles a permis de recueillir en 5 ans 32 cerveaux d'enfant (20 décédés à la naissance, 3 mort-nés, les autres âgés de 1 à 24 jours (moyenne 6 j, médiane 3 j). Les concentrations de Hg mesurées dans 6 régions cérébrales différentes s'évaluaient de 26 à 295 µg/kg (5^e - 95^e percentile : 44 - 226 µg/kg ; moyennes géométriques des 6 régions : 80 µg/kg à 123 µg/kg) (Lapham 1995).

Pour 27 cerveaux, au moment du décès, les concentrations en mercure total sur le cheveu maternel (1 cm près du scalp), le sang maternel et de l'enfant ont été obtenues (Cernichiari 1995b). Les corrélations étaient : cheveu mère - cerveau 0,6 à 0,8 (selon les régions cérébrales) ; cheveu maternel - sang maternel 0,82 ; sang maternel - sang enfant 0,65 ; sang enfant - cerveau 0,4 à 0,8 (Cernichiari 1995b).

Les ratios entre les différents milieux étaient conformes à ceux de la littérature (Cernichiari 1995b). Pour apprécier leur variabilité, à partir des données fournies par les auteurs, les coefficients de variation moyens des 6 régions cérébrales ont pu être calculés : cerveau - cheveu mère 7,1% ; cerveau - sang maternel 10,5% ; cerveau - sang enfant 13,3%.

Ces résultats ont justifié pour les auteurs le bien fondé de l'utilisation de la mesure du Hg sur le cheveu de la mère pour estimer l'exposition fœtale (Cernichiari 1995b).

Selon les études, les approches pour estimer la consommation de poissons sont différentes, avec des limitations respectives, des incertitudes, des défauts de contrôle qualité. La comparaison des mesures des 3 études est donc rendue difficile, et pour les experts aucune de ces approches ne semble meilleure que l'autre (NRC 2000). Ainsi, de possibles erreurs de classification de l'exposition ont pu réduire la puissance de l'étude, donc diminuer la force de l'association (Féroé) et let réduire la probabilité de mettre en évidence une association vraie (notamment aux Seychelles) (NRC 2000).

4.5. Tests neuropsychométriques

Les tests représentent une grande source de variabilité de la mesure de l'effet. Cette variabilité dépend :

- du choix de tests plus ou moins sensibles pour la période d'âge considérée
- du choix de tests culturellement adaptés
- de l'âge réel au moment de l'administration du test
- de la façon de scorer les résultats
- du choix du référentiel de normalité

Seychelles Davidson 1998	PLS t MSCA (étude pilote) MC-GCI, PLS, LWR, W-J, BG, CBCL, DDST-R, audition, QI mère (RPM) contrôle qualité administration tests
Féroé Grandjean 1997 Grandjean 1998	NES2-FTP, NES2-HEC, NES2-CTP, WISC-R digit span, WISC-R similarities, WISC-R block designs, Bender Visual Motor Gestalt Test, CVLT, BNT, FACT, TPT, NAPMS contrôle qualité administration tests
N-Zélande Kjellstrom 1986 Kjellstrom 1989 Crump 1998	à 4 ans : DDST à 6 ans, 5 tests : TOLD-SL, WISC-RP, WISC-RF, MC-RP, MC-MOT 26 tests au total : CDS, Burt Word Recognition Test (age equivalent, score), TOLD (grammar completion, grammar understanding, oral vocabulary, sentence imitation, TOLD-SL), PPVT, McCarthy scales (MC-MOT, verbal, MC-PP, quantitative, memory, general cognitive, MC-GCI), MSCA, WISC-R (verbal IQ, WISC-RF, WISC-RP), Everts Behavior Rating Scale, Child Behavior Checklist, Key Math Diagnostic Arithmetic Test administration par personnel entraîné

- Bender Visual Motor Gestalt Test (BG) (mémoire immédiate)
- BNT : Boston Naming Test
- BSID (Bayley Scale of Infant Development) : MDI (Mental Development Index) et PDI (Psychomotor Development Index)
- Clay Diagnostic Survey (Concepts, Lettertest, Word tests, Reading accuracy)
- CVLT (children) : California Verbal Learning Test (mémoire court et long terme)
- DDST (Denver Developmental Screening Test) : gross motor, fine motor, language, personal and social subscale
- DDST-R : DDST révisé
- FACT : Functional Activity Contrast Test
- IBR (Infant Behavior Record) : activity level, attention span, responsiveness to examiner, response to caregiver, cooperation, general emotional tone FTII (Fagan Test Infant Intelligence) : visual recognition memory or novelty preference MCC-PP : McCarthy scales Perceptual
- MC-GCI : McCarthy General Recognition Index
- MC-MOT : McCarthy scales Motoric
- MSCS : McCarthy Scales of Children's Abilities NAPMS : Nonverbal Analysis Profile of Mood States
- NES2-CTP : Neurobehavioral Evaluation System-Continuous Performance Test
- NES2-FTT : NES2-Finger Tapping Test
- NES2-HEC : NES2-Hand-Eye Coordination test
- PLS : Preschool Language Scale (total language and auditory comprehension)
- PPVT : Peabody Picture Vocabulary Test (percentile rank, standard score)
- RPM : Raven's Progressive Matrices (fonction cognitive maternelle)
- TOLD : Test of Language Development
- TOLD-SL : Test of Language Development Spoken Language quotient
- TPT : Tactual Performance Test
- WISC-R : Wechsler Intelligence Scale for Children-Revised
- WISC-R block designs
- WISC-R digit span
- WISC-R similarities
- WISC-RF : WISC-R fullscale IQ

- WISC-RP : WISC-R Performance IQ
- W-J : Woodcock-Johnson Test of Achievement

Les NES2 sont des tests assistés par ordinateur capables de mettre en évidence des différences neurocomportementales subtiles ;
 Parmi les constats faits par les auteurs, des tests sont trop difficiles (NES2-HEC, WISC-R similarities) ; les WISC-R varient trop peu pour détecter des différences.

4.6. Confusion : appariement / ajustement

Une grande partie des variables a pour but de contrôler les biais inhérents à l'utilisation des tests.

Seychelles Davidson 1998	ajustement - variables les plus influentes : sexe, poids de naissance, antécédents, âge mère, HOME, QI (RPM) de la personne qui s'occupe de l'enfant (caregiver), statut économique/social (SES), audition - autres variables : place dans fratrie, allaitement, antécédents enfant, tabac, alcool, langue parlée
Féroé Grandjean 1997 Grandjean 1998	- appariement : sexe, âge, année examen, RPM - ajustement : habitude de l'ordinateur
N-Zélande Kjellstrom 1989	- appariement : âge maternel (+/- 6 ans), ethnologie, tabac (o/n), lieu de résidence (urbain, rural), durée séjour en N-Zélande (+/- 10 ans), langue parlée au domicile - ajustement : âge mère, tabac, alcool, ethnologie, durée en N-Zélande, classe sociale, niveau d'éducation ; poids de naissance, âge gestationnel, Apgar, allaitement, sexe, place dans fratrie et âge, âge au moment du test

HOME : Home Observation for Measurement of the Environment, inventory for family of preschool age children

4.7. Analyse statistique

Seychelles Davidson 1998	régression linéaire multiple des 6 tests avec Hg pré et post natal + toutes les variables d'ajustement, les variables les plus influentes et test de l'interaction Hg-sexe. contrôle a posteriori de la linéarité (transformation logarithmique, régression par quintile)
Féroé Grandjean 1997 Grandjean 1998	analyse univariée tests non paramétriques, régressions avec variable indicatrice pour les 2 groupes
N-Zélande Kjellstrom 1989	régression linéaire pondérée et non pondérée, avec variable indicatrice pour les 2 groupes

La plupart des études ont fait appel à des méthodes de régression paramétrique. Seules les études les plus récentes, complémentaires à ces 3 études princeps (cf. infra) ont pu utiliser des modèles semi-paramétriques ou non paramétriques.

4.8. Résultats

Seychelles Davidson 1998	analyse univariée : amélioration paradoxale des performances 4 tests / 6 modèles ajustés : pas de relation avec l'exposition (Hg mère ou enfant) effet paradoxal de certains tests, avec Hg mère ou enfant, surtout garçon principale contribution : sexe féminin, SES, HOME, QI
Féroé Grandjean 1997 Grandjean 1998	1) moins bonne performance aux tests pour les 2 sexes : atteintes surtout du langage, de l'attention et de la mémoire ; atteintes moindre des fonctions visio-spatiales et motrices, qui persistent en ôtant les 15% de valeurs + élevés et après ajustement 2) 6 tests / 18 significatifs à 5% (unilatéral), surtout chez le garçon 1) + 2) meilleur prédiction avec le sang du cordon vs cheveu mère ou enfant

N-Zélande Kjellstrom 1986 Kjellstrom 1989	à 4 ans : fréquence DDS anormal : 17% contrôle versus 50% groupe (>6 ppm) ; relation dose réponse (erreur d'appariement détectée plus tard) régression robuste : 4 tests associés avec Hg capillaire ; baisse performance des tests à 13-15 µg/g ; régression non robuste : résultats dans le même sens ; un seul test significatif Hg capillaire contribue peu à la variance (2%)
---	---

Aux îles Féroé, les effets les plus importants concernent l'association entre le Hg mesuré sur le sang du cordon et l'attention, l'apprentissage, la mémoire, et de façon moindre l'activité visio spatiale et motrice.

Aux îles Seychelles, dans l'étude principale, aucune association adverse n'est observée entre le Hg mesuré dans le cheveu maternel et les tests. L'effet bénéfique montré est rapporté à la consommation importante de poisson. Les associations adverses observées dans l'étude pilote prenant en compte moins de variables d'ajustement n'ont pas été retenues.

4.9. Analyses complémentaires

Elles ont pour la plupart été réalisées pour répondre aux critiques générées à la publication de l'étude princeps.

Seychelles	
Myers 2000b Palumbo 2000	analyse de sous classes / recombinaison des résultats des sous classes de tests
Huang 2003 Axtell 1998	modélisation des erreurs de mesure de l'exposition re-analyse avec modèles semi paramétriques confirmant l'absence d'effet du Hg et le développement précoce des enfants aux Seychelles
Axtell 2000 Davidson 2000 Myers 2003	re-analyse avec modèles non paramétriques analyse à 108 mois (9 ans)
Féroé	
Budtz-Jorgensen 1999 Steuerwald 2000	re-analyse ajustant les PCB diminution d'un score neurologique (NOS) évalué à l'âge de 2 semaines associé au Hg après ajustement sur PCB et nutrition (sélénium et acides gras)
N-Zélande	
Crump 1998	- re-analyse des 5 tests avec Hg paramétrique, scolarité des parents (niveau d'éducation), âge enfant au moment du test + transformation logarithmique de variables, et tests sans outliers : 1 seul test reste significativement associé au Hg - analyse avec 26 nouveaux tests : aucun significatif avec la valeur de 86 µg/g, 6 tests significatifs sans cette valeur

5. COMMENTAIRES

5.1. Féroé

L'étude réalisée aux îles Féroé (Atlantique) a fait l'objet d'un nombre important de publications (Medline : « Methylmercury » AND « Faeroe » = 24). Les publications de 1997 et 1998 rapportent une association entre de faibles expositions au MeHg et le développement neurocomportemental d'enfants investigués à l'âge de 7 ans (Grandjean 1997, Grandjean 1998).

Il s'agit d'une population homogène (insulaire et Danois) exposée au Hg par la consommation de poisson (3 fois par semaine pour le groupe exposé) et de baleine (3 fois par mois pour le groupe exposé) contaminés, avec une prévalence de consommation de

tabac et d'alcool élevée chez ces femmes enceintes (26%, ce qui n'est pas le cas des îles Seychelles). Cette étude est remarquable par la qualité des tests psychométriques utilisés, notamment des tests informatiques capables de démasquer de subtiles différences neurocomportementales, et par l'utilisation de dosage de Hg sur le sang du cordon. Au total, 18 tests ont été administrés.

Des critiques ont été apportées à cette étude :

- présence de PCB (mesure sur 4 congénères) sur le sang du cordon, bien corrélée à celle du Hg ($r=0,49$), dont l'effet est difficile à contrôler (sur 4 tests associés avec le Hg, un seul reste associé au Hg quand la mesure des PCB est introduite dans le modèle) ;
- répartition socio-démographique inhérente à la consommation de poisson (plus de non exposés vivent en ville), avec un contrôle là aussi difficile ; l'un des tests est relié à l'habitat ville/côte.

Pour répondre à ces critiques, une re-analyse a été entreprise (Budtz-Jorgensen 1999) montrant un effet indépendant du Hg, et l'absence d'interaction lors d'une régression par tertile de la distribution des PCB.

De nouvelles études ont été réalisées à partir de cette même cohorte à l'âge de 7 ans et de 14 ans, montrant des effets neurophysiologiques et cardiovasculaires.

5.1.1 Effets cardiovasculaires

Sorensen a montré à partir de l'étude Féroé des effets sur la pression artérielle à l'âge de 7 ans (pression artérielle diastolique et systolique augmentées respectivement de 13,9 et 14,6 mm de Hg) quand la concentration de MeHg dans le sang du cordon passe de 1 à 10 µg/L (Sorensen, 1999). Cet effet n'était plus présent à l'âge de 14 ans (Grandjean, 2004). Une variabilité de la fréquence cardiaque a été mise en évidence durant l'évaluation réalisée à l'âge de 7 ans (Sorensen, 1999), et persiste à l'âge de 14 ans (Grandjean, 2004). Si ces études montrent des effets cardiovasculaires aux faibles doses d'exposition au MeHg, la signification même de ces effets peut être l'objet de discussions (importance clinique, effet adaptatif...). Cependant, ces effets justifient le recours à un facteur d'incertitude quant au choix de l'effet critique.

5.1.2 Effets neurophysiologiques

A ces 2 même temps d'évaluation (7 et 14 ans), les potentiels évoqués auditifs ont été mesurés. Cet examen neurophysiologique permet de s'affranchir des facteurs socio-économiques, d'éducation et de langage susceptibles d'interférer avec l'administration de tests (Murata 1999). Le délai de latence de certains pics est significativement associé à l'importance de la concentration de mercure dans le cheveu de la mère à la naissance, que ce soit à l'âge de 7 ans (Murata 1999) et de 14 ans (Murata 2004). Ces résultats suggèrent pour les auteurs de ces études un effet tardif lié à l'exposition in utero, sans influence de l'exposition postnatale.

Enfin, une étude a montré l'effet du Hg sur un score neurologique (Neurologic Optimality Score, correspondant à l'étude des fonctions néonatales) établi à la 2^e semaine de vie, effet non modifié après ajustement sur les PCB et certaines variables nutritionnelles (sélénium, acides gras poly insaturés) (Steuerwald 2000).

5.2. Seychelles

L'étude réalisée aux îles Seychelles (Pacifique) a fait l'objet d'un grand nombre de publications (Medline : « Methylmercury » AND « Seychelles » = 50). Il s'agit d'une population hétérogène (60% îles pacifiques, 30% maoris, 10% européens) peu exposée à des polluants industriels (en particulier PCB et Hg), consommant beaucoup de poissons. Publiée en 1998 dans le JAMA (Davidson 1998), elle ne rapporte aucun effet de faibles

expositions au MeHg sur le développement neurocomportemental (DNC) d'enfants investigués à l'âge de 66 mois.

De nombreuses critiques ont été portées à cette étude (Mahaffray 1998, Grandjean 1999, Stern 1999, NRC 2000), notamment pour expliquer l'apparente contradiction entre ces résultats et ceux réalisés ailleurs (Féroé, Nouvelle-Zélande, pour les plus importantes). Elles sont résumées ici :

- la population pourrait présenter une robustesse particulière : les enfants marchent à 10 mois en moyenne ; les paramètres de base (poids, taille) sont plus élevés ; les taux d'échec aux tests chez les enfants peu exposés sont particulièrement bas... Ce résultat négatif, s'il était vrai, ne serait pas ou peu transposable. Par ailleurs, les variables populationnelles ne seraient pas assez prises en compte (niveau d'éducation...). La possibilité d'un biais de sélection a été soulevée, puisque 55% des couples mère-enfant ont été inclus durant la période de recrutement ; ce biais pourrait avoir sélectionné une population mieux éduquée (meilleure acceptation et compréhension des tests) qui pourrait expliquer le faible taux des DDS anormaux (cf. supra), et correspondre à une meilleure nutrition (cf. infra) (WHO Food Additives series 44, 2000) ;
- la consommation de poissons est déterminée par le nombre de repas par semaine (en moyenne 12) de poissons qui apparaissent peu contaminés. Aucune enquête diététique précise n'a été réalisée. Au delà de ces critiques, si les résultats étaient vrais, leur transposabilité a été là aussi discutée. Les populations occidentales (y compris dans les îles Féroé) consomment beaucoup moins de poissons, plus contaminés et ne pourraient pas bénéficier d'un éventuel effet d'une alimentation riche en poisson, au travers des omega-3, mis en avant pour expliquer d'une part l'absence d'effet (existence d'une interaction Hg-quantité de poisson consommée) ;
- ces différences de consommation (beaucoup de poisson peu contaminé versus peu de poisson contaminé) rejoignent les incertitudes quant aux mécanismes d'action, notamment l'influence de "bolus" durant une période critique (la mesure de l'exposition intégrée sur une longue période de grossesse présuppose une relation linéaire entre la dose et l'effet). Parmi les autres contaminants, les PCB n'ont été mesurés que sur 49 enfants (mais sur 28 congénères, avec les taux les plus bas du monde) ;
- la mesure de l'exposition (cheveu) a été critiquée, les concentrations de Hg mesurées sur le sang du cordon étant mieux reliées aux effets dans l'étude des îles Féroé (meilleure prédiction avec le sang du cordon : plus de tests significatifs, avec des coefficients plus importants). Les concentrations de Hg ont été mesurées sur le cheveu correspondant à la période de toute la grossesse, et dans l'hypothèse d'un effet du Hg prépondérant durant le 3^e trimestre, cette mesure serait moins sensible ; une mesure sur le sang du cordon est bien reliée à l'exposition des 3 derniers mois de grossesse. Cependant, il est très peu probable que la mesure capillaire explique à elle seule l'absence d'effet observée à Seychelles (NRC 2000) ;
- la principale critique à cette étude réside dans les tests utilisés. Ils sont réputés "globaux", "omnibus", moins sensibles que ceux utilisés dans les îles Féroé pour discerner de subtiles altérations des performances cognitives et motrices. De plus, provenant des pays occidentaux, ils ont été traduits en Créole, et les valeurs de normalité sont celles des Etats-Unis, avec un ajustement sur l'âge par tranches de 3 mois. Cette standardisation a pu niveler les éventuels effets (NRC 2000). L'absence d'information sur le contrôle de la qualité de l'administration a aussi été critiquée. Enfin la période d'administration des tests a aussi fait l'objet de débat (âge moyen de 5,5 ans), la possibilité de démasquer de subtiles différences étant plus difficile au moment des périodes de grand changement du développement (l'âge de 7 ans retenu dans l'étude des îles Féroé correspondant à une période plus stable dans le développement ; l'âge était de 6 ans en Nouvelle-Zélande). A Féroé, les résultats de test étaient ajustés, lors de l'analyse, sur l'âge (en jour) au moment de sa réalisation ;
- un défaut de puissance a été évoqué. Le NRC a calculé une puissance de 0,50 à cette étude pour pouvoir mettre en évidence des effets aussi faibles que ceux observés à Féroé (NRC 2000).

Pour répondre à ces critiques, plusieurs re-analyses et analyses complémentaires ont été conduites sans modifier les conclusions de l'étude initiale :

- analyse de sous classes (Myers 2000b) ou recombinaison des résultats des sous classes de tests, pour mieux recouvrir les domaines des tests utilisés à Féroé (Palumbo 2000) ;
- modélisation des erreurs de mesure de l'exposition par un modèle MEM (Huang, 2003) ;
- re-analyse avec des modèles non paramétriques (Axtell 2000), avec une difficulté liée à la faiblesse des effectifs au dessus de 10 µg/g de Hg dans les cheveux ;
- évaluation des dates de marche, de premiers mots par des modèles semi paramétriques confirmant le développement précoce des enfants aux Seychelles (Axtell 1998) ;
- enfin, évaluation à 108 mois (9 ans) avec des tests plus proches voire identiques à ceux utilisés à Féroé (là c'est l'âge tardif qui a été critiqué du fait de l'effet "plafond" : trop d'enfants répondent bien) (Davidson 2000).

Prenant en compte les commentaires et les critiques, l'évaluation à 9 ans a été à nouveau publiée, dans le *Lancet* (Myers 2003). Les tests reprennent en partie ceux utilisés aux îles Féroé :

Wechsler intelligence scale for children III (WISC- III full-scale IQ) ; Woodcock-johnson test of achievement, letter-word recognition, and applied problems subtests ; California verbal learning test ; visual memory subtest of the wide-range assessment of memory and learning ; finger tapping, trailmaking, grooved pegboard, most of the Bruininks-Oseretsky test of motor proficiency (motor fonctions) ; Boston naming test (language) ; Beery-Buktenica developmental test of visual motor intégration and a test of haptic matching (visual-motor integration) ; Connor's continuous performance test (sustained attention) ; Connor's teacher rating scale and parent-child behaviour checklist (behaviour).

Les résultats montrent une relation entre MeHg et 2 de ces tests : un effet adverse et un effet « bénéfique ». La sensibilité des tests a été vérifiée en montrant l'effet des variables influentes habituelles. Le défaut de puissance précédemment pointé (NRC 2000) a été rediscuté : le calcul montre une puissance à peine inférieure à celle de l'étude des îles Féroé. Les auteurs attribuent l'association adverse à la multiplicité des tests réalisés. La principale explication avancée pour expliquer les différences de résultats entre les cohortes des îles Féroé et celles des îles Seychelles tient dans les modalités de consommation des poissons / mammifères marins (Myers 2003). L'hypothèse serait que pour une même dose, les effets d'une consommation alimentaire régulière à faible concentration de MeHg (Seychelles) différeraient des effets de consommations ponctuelles à plus forte concentration (Féroé), du fait par exemple du débordement des mécanismes de détoxication (Myers 1998, 2000a, Lyketsos 2003).

Il faut rappeler que du fait d'une problématique de distribution de résultats d'études, la possibilité qu'une étude puisse conclure à un résultat "négatif" est concevable même si l'effet est vrai (risque α / puissance) ; c'est le cas avec le plomb, et c'est la réalisation de méta-analyses qui a pu parfaire la relation dose réponse et l'établissement de seuil). La puissance est généralement calculée sur la totalité de l'étude, non pas sur les sous groupes.

Il est peu probable qu'une seule de ces critiques puisse expliquer ces résultats ; par contre il est difficile de se prononcer sur la réunion de l'ensemble des critiques. Le point le plus contributif est probablement la qualité de la mesure de l'effet (NRC 2000).

5.3. Nouvelle-Zélande

L'étude réalisée en Nouvelle-Zélande apporte un autre éclairage. Elle a montré une relation entre la perturbation de certains tests et l'exposition au mercure (Kjellstrom 1989, Crump 1998). La principale critique faite à cette étude est l'instabilité des résultats selon que l'on prenne en compte ou non un seul individu dont la concentration de Hg dans le cheveu (86

µg/g) est 4 fois supérieure à la valeur immédiatement contiguë (20 µg/g). Elle a montré l'importance de l'ethnie dans la réponse aux tests.

Cette étude intéresse une population proche de celle des Seychelles en terme d'hétérogénéité ethnique, de consommation de poissons, de mesure de l'exposition et de tests administrés ; elle a conclu à une association entre la perturbation de certains tests et le niveau de Hg dans les cheveux. En filigrane, elle apporte quelques arguments montrant indirectement que l'étude des Seychelles avait les possibilités méthodologiques de conclure (à la puissance près) (NRC 2000).

En résumé, des différences de design entre les études des îles Seychelles et Féroé pourraient expliquer les différences de résultats, malgré des niveaux d'exposition comparables : biomarqueurs (cheveu/sang), type de tests (globaux/spécifiques), âge d'évaluation (5,5/7 ans), mode de consommation (continue/pic), défaut de puissance. En considérant l'étude néo-zélandaise, ces différences apparaissent moins être explicatives. Le rôle de la présence de facteurs confondants (PCBs) n'a pas été jugé déterminant.

6. CONSTRUCTION DES VALEURS TOXICOLOGIQUES DE RÉFÉRENCE

6.1. DHTP DE L'OMS, 1972

La dose hebdomadaire tolérable provisoire (DHTP) a été évaluée une première fois (JECFA, 1972) et a été fixée à 300 µg de mercure total par personne (soit 5 µg/kg) dont 200 µg maximum sous forme de MeHg (soit 3,3 µg/kg). Cette évaluation a été confirmée en 1978, 1989 et 1999. En réaffirmant la pertinence de la DHTP, il était précisé que l'enfant et le fœtus pouvaient être plus à risque. Finalement cette DHTP est restée à l'identique durant 30 ans.

La méthode avec laquelle elle a été établie apparaît dans les documents sources (WHO Food additives series 4, 1972). A partir des études de Niigata, et de mesures réalisées au Japon, en Suède et en Finlande, il a été montré que :

- les concentrations de Hg dans les cheveux des intoxiqués de Niigata dépassaient les 200 µg de Hg par g de cheveu (µg/g), sauf dans quelques cas où cette concentration était de 50 µg/g (soit 200 µg/L de sang) ; ces intoxiqués étaient dans la queue de distribution du Hg dans les cheveux et ont été considérés comme les plus sensibles ;
- à l'inverse toutes les personnes (Suède, Finlande, Japon) dont la concentration de Hg dans les cheveux pouvait atteindre 50 µg/g n'avaient pas de symptômes.

Les concentrations de 50 µg/g dans les cheveux / 200 µg/L dans le sang ont été considérées comme une LOEL pour l'effet critique retenu, la survenue d'anomalies neurologiques (paresthésies) chez l'adulte.

A partir de cette concentration, une consommation de 300 µg par jour pour un adulte a été établie à partir d'équations mettant en relation les apports soit à partir de la concentration sanguine (2 études) soit à partir de la concentration dans les cheveux (1 étude).

Relation consommation journalière, concentration sanguine et capillaire (adapté de WHO Food Additives series 4, 1972)

No. of subjects	Hg intake mg/day (x)	Hg in blood Cells µg/g (y ₁)	Hg in hair µg/g (y ₂)	Reference	Daily dose pour 200 µg/l µg
6 + 26*	0-0.8	$Y_1 = 1.4X + 0.003$	-	Birke et al., 1967	140
139 + 26*	0-0.4	$Y_1 = 0.6x + 0.011$	-	Tejning, 1967; 1969a, b, c	315
735	0-0.8	-	$Y_2 = 150X + 1.66$	Kojima & Araki, 1972	322

NB : le calcul de la moyenne pondérée par les effectifs des résultats de la dernière colonne permet d'obtenir une dose journalière de 314 µg ; aucune précision n'est donnée dans le rapport quant aux méthodes analytiques utilisées.

NB : En utilisant (comme l'OMS l'a fait en 2003) l'équation (2) (cf. infra), avec comme paramètre un volume sanguin de 7% (soit 5 litres ; le volume de 9% soit 5,85 litres correspond à la femme enceinte), on obtient une dose journalière de 295 µg.

Dans le même document (WHO Food Additives series 4, 1972), la dose journalière de 300 µg est déclarée correspondre à une PTWI (DHTP)² de 300 µg, dont les 2 tiers pour le MeHg (200 µg), ce qui correspond, rapporté à un poids de 60 kg, à respectivement 5 µg/kg/sem et 3,3 µg/kg/sem, en rappelant que le fœtus est plus sensible que la mère, et les incertitudes qui existent entre une consommation de poisson et un taux mesuré dans un milieu biologique.

NB : cette approche revient à appliquer un facteur de sécurité de 7.

En 2003, le JECFA (61^e meeting) a pris en compte les résultats des récentes études épidémiologiques pourtant contradictoires et a porté la DHTP pour le MeHg à 1,6 µg/kg de poids corporel. Entre temps, différentes agences (RIVM, ATSDR, EPA, Santé Canada) avaient adopté leur propre VTR à partir de méthodes et d'études épidémiologiques parfois différentes.

6.2. DHTP DE L'OMS, 2003

L'OMS a retenu comme études critiques les études réalisées dans les îles Féroé et les îles Seychelles. L'étude réalisée en Nouvelle-Zélande n'a pas été retenue du fait de l'instabilité des résultats en tenant compte ou non de la présence de l'enfant dont la mère présentait une concentration capillaire de 86 µg/g. L'effet critique retenu est la survenue de perturbation neurodéveloppementale chez l'enfant exposé in utero. La dose critique retenue est une BMD composite des 2 BMD, soit 14 µg/g.

Estimation de la concentration capillaire associée avec la BMD pour une atteinte du développement après une exposition in utero (JECFA 2003)

Etudes	Effectifs	BMD (Hg capillaire mère)
Féroé	917	12 µg/g
Seychelles	711	15,3 µg/g
Composite		14 µg/g

² DHTP : Dose Hebdomadaire Tolérable Provisoire ; PTWI : Provisoire Tolerable Weekly Intake

Calcul alternatif de la dose critique (Benchmark dose)

L'établissement d'une valeur toxicologique de référence à partir d'une NOEL est une méthode traditionnelle qui a fait ses preuves. La benchmark dose (BMD) est un moyen alternatif de calculer une dose critique obtenue à partir de la modélisation de l'ensemble des données (courbe dose réponse) extrapolée vers les plus faibles doses, et qui ne se contente pas de la détermination d'un point critique unique à partir de ces données comme le fait la NOEL (Crump 1984). Un autre avantage est le déplacement de la dose critique vers les doses élevées quand la puissance de l'étude augmente (et l'incertitude diminue) alors que par construction la détermination de la NOEL aboutit dans ces circonstances à un résultat inverse.

Parmi les inconvénients, la méthode demande de connaître le bruit de fond de l'effet, et de fixer a priori le niveau de la réponse (conventionnellement de 1% à 10%). Les résultats peuvent être très sensibles au choix du modèle statistique. Cette méthode est utilisée par d'autres agences.

Pour convertir cette concentration capillaire en dose orale, une première modélisation a permis de relier la concentration capillaire à la concentration sanguine. A partir d'une dizaine d'études chez l'homme, des ratios de concentration capillaire / concentration sanguine humaine ont été calculés : les ratios des différentes études s'échelonnaient de 140 à 370 (EHC 101, 1990) :

Relation entre concentration de mercure sanguin et capillaire chez des exposés à long terme au méthylmercure par la consommation de poisson (EHC 101, 1990)

Country	Number of subjects	Whole blood (x) (µg/litre)	Hair (y) (mg/kg)	Linear regression	Reference
Canada	339	1 - 60	1 - 150	$y = 0.30x + 0.5$	Phelps et al. (1980)
Japan	45	2 - 800	20 - 325	$y = 0.25x + 0$	WHO (1976b)
Netherlands	47	1 - 40	0 - 13	$y = 0.26x + 0$	Den Tonkelaar et al. (1974)
Sweden	12	4 - 650	1 - 180	$y = 0.28x - 1.3$	WHO (1976b)
	51	4 - 110	1 - 30	$y = 0.23x + 0.6$	WHO (1976b)
	50	5 - 270	1 - 56	$y = 0.14x + 1.5$	WHO (1976b)
	60	44 - 550	1 - 142	$y = 0.23x - 3.6$	WHO (1976b)
United Kingdom	173	0.4 - 26	0.1 - 11	$y = 0.25x + 0.6$	Haxton et al. (1979)
	98	1.1 - 42	0.2 - 21	$y = 0.37x + 0.7$	Sherlock et al. (1982)
Yugoslavia	38	1.2 - 9.6	0.4 - 3.0	$y = 0.34x - 22$	Horvat et al. (1986b)

Le ratio cheveu/sang apparaît en gras dans la 5^e colonne et doit être multiplié par 1000 pour assurer une concordance d'unités.

Le ratio moyen a été estimé à 250 (moyenne arithmétique) : c'est cette valeur centrale qui a été retenue. Les ratios individuels s'échelonnaient de 137 à 585.

L'équation (1) s'écrit :

$$C_s = \frac{C_c}{250}$$

où :

C_s = concentration de mercure dans le sang (µg/L)
 C_c = concentration de mercure dans le cheveu (µg/g)

NB : la concentration sanguine correspondant à une concentration capillaire de 14 µg/g est 56 µg/L.

Une seconde modélisation a permis de relier la concentration sanguine à la dose orale. Cette équation de pharmacocinétique suppose un modèle de pharmacocinétique à un seul compartiment, et permet de relier à l'état d'équilibre dose journalière et concentration sanguine. L'équation (2) s'écrit :

$$D = \frac{C_s * B * V}{A * F * PC}$$

où :

D = dose ($\mu\text{g}/\text{kg pc}/\text{j}$)
 Cs = concentration de mercure dans le sang ($\mu\text{g}/\text{L}$)
 B = Constante d'élimination (0.014 j^{-1})
 V = Volume sanguin (9% du poids corporel (PC) chez la femme enceinte, soit 5,85)
 A = fraction absorbée de la dose (0,95)
 F = fraction distribuée dans le sang (0,05)
 PC = Poids Corporel (65 kg chez la femme enceinte)

NB : la dose journalière calculée est : $56 * 0,014 * 0,09 * 65 / (0,95 * 0,05 * 65) = 1,48547368 = 1,5 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{j}$.

Cette dose est estimée directement à partir de la BMD. Pour construire la DHT, des facteurs d'incertitude ont été appliqués. Comme cette BMD est établie chez l'homme, aucun facteur d'incertitude n'est nécessaire pour tenir compte de la variabilité interspécifique.

Pour tenir compte de la variabilité intra spécifique (inter-individuelle), et notamment des données limitées concernant la toxicocinétique, un facteur d'incertitude de 3,2 a été appliqué (il est issu de la décomposition en 2 parties, toxicodynamique ($10^{0.5}$) et toxicocinétique ($10^{0.5}$)) du facteur d'incertitude de 10 habituellement pris en compte pour la variabilité interindividuelle) (WHO/EHC 210, 1990).

Pour tenir compte de l'incertitude prise en retenant un ratio central de 250 entre la concentration capillaire et sanguine (les ratios individuels s'échelonnant de 137 à 585), un facteur de sécurité supplémentaire de 2 a été appliqué.

NB : au total, la DJT peut être estimée à $1,5 / (3,2 * 2)$ soit $0,23 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{j}$ et la DHT à $1,64 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{j}$.

NB : cette dernière évaluation de l'OMS n'apparaît pas forcément comme très conservatrice :

- 3 agences proposent des VTR inférieures
- l'étude néo-zélandaise proposant une BMD de l'ordre de $7 \mu\text{g}/\text{g}$ n'a pas été prise en compte
- la valeur « composite » de la BMD entre 12 et $15,3 \mu\text{g}/\text{g}$ a été fixée à $14 \mu\text{g}/\text{g}$.

NB : Les mêmes modélisations permettent d'établir à l'état d'équilibre que la consommation de $1 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{sem}$ de MeHg correspond à une concentration sanguine de $10 \mu\text{g}/\text{L}$ et une concentration capillaire de $2,5 \mu\text{g}/\text{g}$ (WHO Food Additives series 44, 2000).

6.3. RfD DE L'EPA, 1995

En 1995, à partir d'études réalisées en Iraq (Marsh 1987) et re-analysées, l'US EPA a révisé la RfD du méthylmercure pour l'établir à $0,1 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{j}$. Auparavant, en 1985, la RfD avait été établie à $0,3 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{j}$ pour des paresthésies chez l'adulte (Rice 2000). La dose critique de 1995 a été obtenue par le calcul de la Benchmark dose (Rice 2000). La BMD retenue est la BMD correspondant à la borne inférieure de l'intervalle de confiance à 95% de la BMD.

En 1995, la BMD, pour une augmentation de 10% des effets neurologiques, établie à partir d'une re-analyse de l'étude de 81 couples en Iraq, était de $11 \mu\text{g}/\text{g}$ (modèle Weibull). Cette valeur a été transformée en concentration sanguine en supposant un ratio de 250 entre les 2

milieux, traduite en dose journalière pour la voie orale selon l'équation (2), avec pour seul paramètre modifié :

$$| \text{PC} = \text{Poids Corporel (60 kg)}$$

puis pondérée par 2 facteurs d'incertitude de 3 (arrondi à 10) pour tenir compte de la variabilité interspécifique (inter-individuelle) toxicocinétique et de l'incertitude quant à l'effet retenu (absence d'étude de 2^e génération, et d'études explorant les éventuelles séquelles à long terme liées à une exposition chronique). La BMD retenue était de 0,1 µg/kg/j.

Parmi les sources d'incertitude ont été pointés un vraisemblable biais de sélection et un scénario d'exposition peu compatible avec l'objectif de l'établissement d'une RfD.

6.4. RfD DE L'EPA, 2001 (EPA, 2001)

L'US EPA a révisé une nouvelle fois la RfD en 2001 ; à l'issue de la révision la RfD a été confirmée à 0,1 µg/kg/j. L'étude critique retenue est celle des îles Féroé. L'US EPA n'a pas souhaité utiliser, pour construire une BMD une étude - celle des Seychelles - ne montrant pas d'association entre consommation de MeHg et effet sanitaire. Parmi les 2 études « positives » :

- l'étude néo-zélandaise n'a pas été retenue : elle envisageait cependant des effets d'une plus grande valeur prédictive (performances scolaires versus de subtiles perturbations aux tests neuropsychodéveloppementaux) et elle montrait l'absence de groupe ethnique vulnérable ;
- celle des îles Féroé a été retenue du fait de son effectif (4 fois celui de l'étude Néo-Zélandaise), de l'utilisation de 2 marqueurs d'exposition (sang du cordon et cheveu), et de la réalisation de multiples re-analyses.

L'effet critique retenu était le développement neurocomportemental de l'enfant exposé in utero, en notant cependant l'émergence d'effets critiques potentiels cardiovasculaires ou immunotoxiques. Le test critique retenu était le Boston Naming Test (BNT).

Plutôt que d'utiliser les BMD produites dans la littérature en rapport avec le Hg capillaire, l'US EPA a procédé différemment (Rice 2003).

BMD construites par différents auteurs

Etude	Effet	% de l'effet	BMD _{low} (cheveu, µg/g)	Auteurs
Iraq	retard marche, parole	10	11	Marsh 1987 (Rice 2000)
Féroé	neurocomportemental	5	1 ¹	Budtz-Jorgensen 2000
Nouvelle-Zélande	neurocomportemental	10	13 – 21 7,4 – 10 ²	Crump 1998
Seychelles	neurocomportemental	10	25 (11 – 30)	Crump 2000
Féroé/Madère	PEA	5	9,5	Murata 2002

¹ extrême sensibilité des résultats aux conditions de modélisation de la BMD

² en ôtant un individu extrême

L'US EPA a calculé une BMD pour une augmentation de 5% du bruit de fond (BMR 5%) de la réponse au BNT en relation avec la concentration de Hg dans le sang (Rice 2003).

Cette BMD a été transformée en dose journalière selon la même équation (2), mais en modifiant quelques paramètres jugés plus adaptés à la population américaine :

V = Volume sanguin de 5 litres (au lieu de 9% du poids corporel d'une femme enceinte pesant 65 Kg, soit 5,85)
F = fraction distribuée dans le sang de 0,059 (au lieu de 0,05)
PC = Poids Corporel de 67 kg chez la femme enceinte (au lieu de 65 kg)

Cette transformation présuppose un rapport de 1 entre la concentration maternelle et la concentration sur le sang du cordon, ce qui s'avère inexact (cf supra). La même pondération qu'en 1995 a été appliquée pour tenir compte de l'incertitude liée à l'extrapolation : un facteur d'incertitude de 2-3 est réputé tenir compte de la variabilité biologique de l'estimation de la dose de 95-99% de la population (facteur de 2-3 à partir de cheveu ; facteur de 2 à partir du sang du cordon ; NRC 2000) ; un facteur d'incertitude de 3 tient compte de l'incertitude liée au manque de données sur d'éventuels effets cardiovasculaires notamment sur la pression diastolique ou immunotoxiques...). La dose journalière obtenue est de 0,1 µg/kg/j.

Une analyse de "sensibilité" calculant une moyenne géométrique des BMD établies pour chacun des 4 tests significativement associés à la concentration de Hg dans le sang du cordon à Féroé, et une autre intégrant les résultats des 3 études (Féroé, Seychelles et Nouvelle-Zélande) dans le calcul de la BMD a montré des résultats identiques (Rice 2003). Ces études exploratoires ont été présentées comme les premiers pas d'une approche intégrant les résultats de plusieurs études pour l'établissement d'une BMD (NRC 2000).

NB : on peut s'interroger sur l'importance de la valeur de 10 prise comme facteur d'incertitude, la même valeur que celle prise en 1995 à partir des résultats d'études iraqiennes, alors que des effets de plus en plus fins sont pris en compte, mis en évidence à partir d'effectifs plus importants incorporant très vraisemblablement les individus les plus sensibles, pour une exposition de mieux en mieux mesurée, notamment par un marqueur sanguin relié aux concentrations/à la charge cérébrales, et que de plus la BMD a été calculée pour un excès de réponse de 5% au lieu de 10% en 1995. Il est paradoxal que tous les progrès méthodologiques n'aient pas affecté entre 1995 et 2003 ce facteur d'incertitude, le plus élevé de toutes les récentes évaluations.

6.5. RfD DE L'ATSDR, 1999

L'ATSDR a établi une VTR (MRL = Minimal Risk Level) à partir de l'étude des Seychelles, en retenant la BMD de 15,3 µg/g, et comme facteurs d'incertitude une *sommation* de 3 facteurs, chacun de 1,5, pour retenir 4,5. Ces facteurs prennent en compte la variabilité toxicocinétique (1,5), la variabilité toxicodynamique (1,5) et un effet modificateur pour intégrer le fait qu'une autre étude (Féroé) a montré des effets non pris en compte dans l'étude des Seychelles (1,5) (NRC 2000).

6.6. RfD DU RIVM

Pour intégrer le fait que la VTR OMS 1972 prenait en compte un effet critique non pertinent (paresthésies chez l'adulte) au lieu de l'atteinte neurodéveloppementale lors de l'exposition in utero, le RIVM a produit une VTR en 1995 consistant à pondérer la VTR en cours d'un facteur de sécurité de 5. Cette VTR a été révisée en 2001 pour s'aligner sur celle de l'EPA.

7. COMPARAISON DES VALEURS TOXICOLOGIQUES DE RÉFÉRENCE

Valeurs toxicologiques de référence du méthylmercure (adapté de EPA 2001, INERIS 2003, AFSSA 2002, JECFA 2003, Bars 2001). Partie supérieure : anciennes VTR ; partie inférieure : VTR actuelles

Organisme année	NOEL/BMD source	NOEL cheveu µg/g	BMD	dose journalière extrapolée ¹ µg/kg/j	Facteurs incertitude	VTR jour ²	VTR semaine ²
OMS 1972, 1989	7.1.1.1	LOEL	50	-	10	DJT: 0,4 µg/kg	DHTP: 3,3 µg/kg
RIVM 1995	?	?	-	-	DJT OMS/ 5	DJT: 0,08 µg/kg	0,56 µg/kg
US EPA 1995	BMD/Iraq ³	-	11 ³ µg/g cheveu	1,1	3*3 -> 10	RfD: 0,1 µg/kg ⁴	0,7 µg/kg
Canada 1998	?	10	-	-	5	0,2 µg/kg	DHTP: 1,4 µg/kg
ATSDR 1999	étude Seychelles	15,3	-	1,3	4,5	MRL: 0,3 µg/kg	2,1 µg/kg
US EPA 2001	BMD/Féroé ⁵	-	46-79 µg/L sang cordon (soit 12 µg/g cheveu)	0,86-1,47	3*3 -> 10	RfD: 0,1 µg/kg ⁴	0,7 µg/kg
RIVM 2001	?	?	?	?	?	TDI: 0,1 µg/kg	0,7 µg/kg
OMS 2003	valeur composite Seychelle/Féroé	14 (12-15,3)	-	1,5	3,2*2 -> 6,4	0,23 µg/kg	DHTP: 1,6 µg/kg

OMS : organisation mondiale de la santé ; RIVM : RijkInstituut voor Volkgezondheid en Milieu ; US EPA : United States Environmental Protection Agency ; ATSDR : Agency for Toxic Substances and Disease Registry ; NOEL : No Observed Effect Level ; LOEL : Low Observed Effect Level ; BMD : Benchmark Dose ; VTR : Valeur Toxicologique de Référence ; DJT : Dose Journalière Tolérable ; DHTP : Dose Hebdomadaire Tolérable Provisoire ; RfD : Reference Dose ; MRL : Minimal Risk Level ; TDI : Tolerable Daily Intake.

¹ après conversion en taux sanguin (division par 250) et extrapolation à une dose journalière selon l'équation (2)

² en italique : dose calculée pour permettre les comparaisons

³ pour une réponse de 10% des effets neurologiques, établie à partir d'une re-analyse de l'étude de 81 couples en Iraq

⁴ RfD : 0,3 µg/kg/j avant cette date

⁵ pour une réponse de 5% des effets neuro-développementaux, établie à partir d'une re-analyse de l'étude des îles Féroé

Les VTR dépendent des NOEL/BMD prises en compte (quand elles sont connues), variant de 10 à 15,3 ppm et des facteurs d'incertitude variant de 4,5 à 10. Les VTR les plus récentes, c'est à dire construites entre 1995 et 2003, ramenées à une période commune, la semaine, varient selon les agences de 0,6 à 2,1, soit un facteur de 3,5 entre ces valeurs extrêmes.

8. IMPACT DE LA DIMINUTION DES VTR SUR LA VALEUR DES MARQUEURS D'EXPOSITION (SANG, CHEVEU)

8.1. PROPOSITION DE VALEUR DE RÉFÉRENCE DANS LE CHEVEU

La précédente DHTP de l'OMS fixée à 3,3 µg/kg poids corporel pour le méthylmercure a été appliquée de 1972 à 2002. Durant cette période, l'OMS a recommandé une teneur capillaire à ne pas dépasser de 10 µg/g (EHC 101, 1990) probablement sur le mercure total, bien que cela ne soit pas spécifié.

La révision de la DHTP de 2003 à 1,6 µg/kg, et les conditions d'obtention ont été parfaitement explicitées (cf. supra). La DHTP a été établie pour prévenir les effets sur le système nerveux central en développement lors de l'exposition in utero, et par extension dans la petite enfance. A partir d'une BMD de 14 µg/g de cheveu (correspondant à une NOEL) ont été appliqués successivement :

- une conversion en mercure sanguin maternel (par l'utilisation d'un facteur 250),
- une transformation en dose journalière équivalente (par l'utilisation d'une équation de pharmacocinétique),
- 2 facteurs de sécurité (2 et 3,2 soit 6,4) pour prendre en compte d'une part l'incertitude liée à l'utilisation de la conversion cheveu-sang (facteur de sécurité de 2) et d'autre part l'incertitude lié à la variabilité toxicocinétique interindividuelle liée aux possibles différences interindividuelles d'un ratio Hg cheveu / Hg cible (SNC), ET aux possibles différences interindividuelles lors de l'utilisation de l'équation de pharmacocinétique (JECFA 2003).

Il est à noter que les experts de l'OMS n'ont pas jugé bon d'utiliser des facteurs de sécurité pour la composante toxicodynamique inter individuelle (ni d'ailleurs de proposer une valeur de référence dans le cheveu).

En partant de cette nouvelle DHTP, et connaissant les hypothèses faites lors de sa construction, 3 approches sont possibles pour évaluer l'impact d'une (sur)exposition au MeHg lié à la consommation de poisson :

- Une enquête alimentaire précise a été réalisée qui permet de connaître notamment pour la population cible de la VTR (femme en âge de procréer, femme enceinte, jeune enfant) la quantité de poisson consommée et les espèces les plus consommées. Ces données peuvent être couplées aux concentrations de MeHg pour chacune des espèces, et une quantité de MeHg consommée peut être estimée sur un pas de temps hebdomadaire. Cette valeur pourrait être comparée à la DHTP, et la fraction de la population dépassant la DHTP pourrait être calculée.
- Une enquête alimentaire n'est pas disponible, et sous l'hypothèse d'une consommation régulière, la teneur de Hg total dans les cheveux pourrait être utilisée :
- Les concentrations capillaires mesurées peuvent être mises en correspondance avec la NOEL (BMD) retenue pour la construction de la DHTP sous la forme d'un rapport (teneur mesurée / DHTP). La valeur obtenue sans dimension permettrait d'estimer une MOE, margin of exposure, marge de sécurité, et la comparer aux facteurs d'incertitude.
- A la NOEL (BMD) retenue par l'OMS, il pourrait être appliqué un facteur de sécurité pour la transformer en valeur de référence à ne pas dépasser, qui transposée, correspondrait la dose journalière à ne pas dépasser. En effet, dans le processus de construction de la DHTP rappelé ci-dessus, 2 facteurs de sécurité sont utilisés. Le facteur 2 est là uniquement pour gérer l'incertitude de la transformation cheveu-sang, facteur qui n'a plus lieu d'être puisque la concentration sanguine n'a pas besoin d'être extrapolée dans cette approche. Le facteur 3,2 est pris en compte pour gérer une double incertitude toxicocinétique (cf. supra).

Il est proposé, en respectant les conditions d'établissement de la norme, d'appliquer à la BMD (NOEL) établie sur le cheveu un facteur de sécurité de 3,2. Il est à noter que cette

approche reste quelque peu conservatrice (une partie de l'incertitude liée à l'utilisation d'une équation cinétique n'existe plus mais le facteur 3,2 demeure entier).

La teneur en Hg capillaire deviendrait $14/3,2 = 4,4 \mu\text{g/g}$ de cheveu.

Ainsi à une diminution de la DHTP d'un facteur 2 entre 1972 et 2003, correspondrait une diminution de $10 \mu\text{g/g}$ (la valeur auparavant recommandée par l'OMS, EHC 101, 1990) à $4,4 \mu\text{g/g}$.

Dans le but d'évaluer l'impact sur la population, le NRC a calculé la marge d'exposition (margin of exposure, MOE), un autre outil utile à la décision.

A partir des BMD développées par le NRC, et de l'exposition moyenne estimée à partir de 3 populations d'intérêt, le NRC a proposé, pour établir une valeur limite sur le cheveu, de diviser la BMD de $11 \mu\text{g/g}$ pour un facteur d'incertitude de 10 (soit une valeur limite $1 \mu\text{g/g}$). Les experts ont estimé une MOE comprise en 7,5 et 77. En prenant le 95^e percentile de la distribution de l'exposition, la MOE est comprise entre 2 et 22. Les experts ont estimé le nombre annuel de nouveau-nés à risque d'effets neuro-comportementaux du fait de l'importante consommation de poisson par leur mère à 60 000 pour les USA. Cette approche a été critiquée (TERA 2000) ; elle semblait excessive dans la mesure où dans ce facteur d'incertitude de 10 est aussi incluse l'incertitude liée à la transformation « concentration sanguine / dose par voie orale ».

8.2. CONSÉQUENCE (EN TERME D'IMPACT) SUR LES POPULATIONS EXPOSÉES

Différentes études ont été menées sur le terrain en Guyane pour connaître l'imprégnation par le mercure de la population, en cibler les causes et les conséquences. Les principaux résultats de ces études figurent dans le tableau suivant.

Principaux résultats des études réalisées auprès de la population Guyanaise

type d'étude	imprégnation	alimentation	risques neuro	imprégnation
auteur	Cordier 1994, 1998	Fréry 1999, 2001	Cordier 1999, 2002	Boudan 2003
date	1994	1997	1997-1998	2001
type mercure dosé	total	total	total	total
indicateur	cheveu	cheveu	cheveu	cheveu
méthode analyse	SAA	SAA	SAA	?
Nombre total inclusions	500	235	648	285
Hommes	124	121	-	68
Femmes	131		270	123
Enfants	136	114	378	94
Femmes enceintes	109	-	-	-
Taux Hg moyen Hommes ($\mu\text{g/g}$)	3,9	11,3	-	2,1
Taux Hg moyen Femmes ($\mu\text{g/g}$)	2,4	11,5	6,1	
Taux Hg moyen Enfants ($\mu\text{g/g}$)	2,5	10,1	4,3	1,3
Taux Hg moyen Femmes enceintes ($\mu\text{g/g}$)	1,6	-	-	-
minimum-maximum Adultes	0,2-22,3	4,5-27,2	-	?-22,4
minimum-maximum Enfants	0,2-30,8	1,9-22,5	0,1-31	?-16,8
minimum-maximum Femmes	-	-	0,4-25,7	?-10
minimum-maximum Femmes enceintes	0,2-13,3	-	-	-

Des études d'impact liées à la construction d'un barrage sur le fleuve Sinnamary en Guyane ont mis en évidence des teneurs en mercure dans les poissons prédateurs qui dépassent les normes réglementaires (0,5 mg/kg pour les non carnivores et 1 mg/kg pour les carnivores). Les poissons constituent la base alimentaire de certaines populations autochtones.

Une première étude d'imprégnation de la population et des sources individuelles de cette imprégnation a donc été réalisée en 1994 (Cordier 1994, Cordier 1998). Les lieux de recrutement ont été choisis de façon à couvrir la majorité des zones peuplées de Guyane et à représenter les différentes populations, en particulier celles pour lesquelles la consommation de poisson est une part importante de l'alimentation. L'imprégnation a été mesurée par le dosage du mercure total dans les cheveux. Cette première étude a montré que trois villages étaient plus contaminés que les autres, villages dans lesquels la consommation de poissons d'eau douce est quasi quotidienne. La concentration de mercure dans les cheveux est plus élevée dans la communauté amérindienne et est corrélée avec la fréquence hebdomadaire de consommation de poissons. Les résultats de cette étude ont conduit à la réalisation de deux études épidémiologiques au sein de la population amérindienne : une enquête alimentaire et une étude des effets neurotoxiques du mercure.

L'enquête alimentaire réalisée en 1997 (Fréry 1999, Fréry 2001) a eu pour but de quantifier l'apport alimentaire de mercure et d'identifier les espèces contribuant le plus à la contamination. Les résultats ont confirmé que l'exposition au mercure des amérindiens est bien liée à une alimentation riche en poissons dont certaines espèces sont fortement contaminées.

L'étude des risques neurotoxiques chez l'enfant liés à l'exposition au méthylmercure réalisée entre 1997 et 1998 (Cordier 1999, Cordier 2002) a eu pour but d'évaluer les conséquences environnementales et sanitaires de la pollution par le mercure liée aux activités d'orpaillage, dans les villages amérindiens les plus contaminés dans la première étude d'imprégnation en les comparant avec deux autres communautés moyennement ou faiblement exposées. L'examen neurologique et neuropsychologique des enfants n'a pas montré de déficiences majeures en relation avec l'exposition au mercure mais a montré une relation entre l'exposition au mercure et la présence de réflexes ostéotendineux accrus, une moins bonne coordination des jambes et un déficit de performance des capacités d'organisation visuospatiale surtout chez les garçons.

Enfin, une autre étude d'imprégnation a été réalisée en 2001 (Boudan 2003) sur une population déjà testée en 1994 (population de Sinnamary) car la situation environnementale a évolué. Un barrage a été mis en service entre temps et, dans les eaux de la retenue, la teneur en mercure du poisson était élevée. L'objectif de cette étude était d'évaluer l'imprégnation mercurielle des personnes résidant en aval du barrage et de préciser les estimations de l'étude réalisée en 1994. Les résultats montrent une relation entre la consommation de poissons et la concentration capillaire de mercure. Cette relation est plus importante avec la consommation de poissons du fleuve. Les résultats obtenus sont similaires à ceux de 1994.

Pour quantifier le niveau d'exposition des populations étudiées, c'est la teneur en mercure total dans les cheveux qui a été retenue, sous l'hypothèse que 90% du Hg est du MeHg quand la consommation de poisson est importante. La valeur moyenne de mercure dans les cheveux des deux études d'imprégnation est du même ordre de grandeur que celle observée dans des pays industrialisés (Airey 1983).

Pour chaque étude, le pourcentage de personnes qui ont eu un taux supérieur à l'ancienne valeur guide du mercure capillaire (10 µg/g) a été calculé.

Pourcentage de la population dépassant la valeur guide de 10 µg/g dans le cheveu

type d'étude auteur	imprégnation Cordier 1994, 1998	alimentation Fréry 1999, 2001	risques neuro Cordier 1999, 2002	imprégnation Boudan 2003
Taux>10 µg/g toute population	-	57%	-	5%
Taux>10 µg/g Adultes	12%	64%	-	6%
Taux>10 µg/g Enfants	12%	50%	27%	2%
Taux>10 µg/g Femmes	-	-	34,50%	0%
Taux>10 µg/g Femmes enceintes	5%	-	-	-

Ce pourcentage est très variable d'une étude à une autre puisque les populations ciblées étaient différentes (sauf pour l'enquête alimentaire (Fréry 1999) et l'étude sur les risques neurologiques (Cordier 1999) qui ont concerné la même communauté). C'est d'ailleurs dans ces deux études que ce pourcentage est le plus élevé, puisque la communauté amérindienne est la plus contaminée.

En prenant en compte la nouvelle valeur calculée (4,4 µg/g dans le cheveu) qui découle de la nouvelle DHT, il a été possible de calculer le pourcentage de population dépassant cette nouvelle valeur seulement pour deux études pour lesquelles la distribution de la teneur en mercure dans les cheveux était connue.

Pourcentage de la population dépassant la valeur proposée de 4,4 µg/g dans le cheveu

type d'étude auteur	imprégnation Cordier 1994, 1998	alimentation Fréry 1999, 2001	risques neuro Cordier 1999, 2002	imprégnation Boudan 2003
Taux>4,4 µg/g toute population	*	99,60%	*	21 à 22%
Taux>4,4 µg/g Adultes	*	*	*	28 à 30%
Taux>4,4 µg/g Enfants	*	*	*	6%
Taux>4,4 µg/g Femmes	*	*	*	12 à 13%

* les données disponibles ne permettent pas d'effectuer le calcul

Pour la population testée lors de l'enquête alimentaire (Fréry 1999), le pourcentage de la population totale dépassant 4,4 µg/g est de 99,6%. Pour l'étude d'imprégnation de 2001 (Boudan 2003), **le pourcentage de la population au-dessus de la nouvelle valeur guide est multiplié par 5 pour les adultes et par 3 pour les enfants** (cf. Tableau). Il serait intéressant de connaître le pourcentage de la population dépassant 4,4 µg/g dans l'étude d'imprégnation (Cordier 1994), ainsi que dans l'étude des risques neurotoxiques (Cordier 1999), et donc de retourner aux données sources.

L'enquête alimentaire (Fréry 1999) a mis en évidence que l'apport alimentaire de mercure dans la population amérindienne dépasse l'ancienne DHT de 3,3 µg/kg/sem pour toutes les classes d'âge (sauf les enfants de moins de 1 an). A fortiori, il en va de même pour la nouvelle DHT de 1,6µg/kg/sem.

Pour que l'apport alimentaire de mercure soit en deçà de 1,6 µg/kg/sem, il faudrait que l'apport hebdomadaire de mercure via l'alimentation soit diminué de 3 à 5 fois chez les enfants et de 4 à 5 fois chez les femmes en âge de procréer.

9. LIMITATIONS DE CONSOMMATION DE POISSONS

9.1. FDA

La Food and Drug Administration a émis un avis recommandant la limitation de la consommation de poisson par la femme enceinte ou désireuse de l'être :

- les 4 espèces de poisson dont les concentrations en MeHg atteignent ou dépassent 1 µg/g (requin, maquereau, espadon et « tilefish ») ne doivent pas être consommées ;
- à titre de précaution, cette recommandation est étendue aux femmes qui allaitent et aux jeunes enfants ;
- pour les autres espèces (concentration en MeHg < 0,4 µg/g) l'ingestion hebdomadaire chez la femme enceinte de 340 g (2 repas moyens) peut être considérée comme sans danger, tout en préservant les bénéfices liés aux effets cardioprotecteurs de la consommation de poissons (Bolger 2002).

Des informations complémentaires (Advisory on Mercury in Seafood) sont disponibles à : <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/admeHg3.html> (accédé le 25 03 2004).

9.2. AFSSA

Après un certain nombre d'attendus, les recommandations établies le 21 octobre 2002 restent les suivantes (AFSSA 2002) :

«... Il est estimé que, sur le fondement des données disponibles (toxicologiques et de contamination) et en tenant compte des habitudes alimentaires de la population française, aucun élément scientifiquement fondé justifie une remise en cause des recommandations de consommation de poisson préconisées dans le cadre du Programme national nutrition-santé : au moins deux fois par semaine sans oublier les poissons gras (maquereau, hareng, saumon,...).

Toutefois, compte tenu de la sensibilité particulière du système nerveux central à l'action toxique du méthylmercure durant le développement du fœtus, mise en évidence par des données expérimentales ou accidentelles lors d'expositions très élevées, il peut être recommandé aux femmes enceintes ou qui allaitent et aux jeunes enfants de favoriser une consommation diversifiée des différentes espèces de poisson sans privilégier, à titre de précaution, la consommation de poissons susceptibles de présenter des niveaux plus élevés de méthylmercure tels que daurade, espadon, marlin, requin, thon. »

Cet avis n'a pas été remis en cause du fait de la modification de la DHTP de l'OMS (AFSSA 2003).

10. EN CONCLUSION

Il convient de ne pas perdre de vue que la quantification d'une population surexposée est réalisée au regard de la VTR établie pour des femmes enceintes : par construction, des mesures de restriction de consommation à toute la population ne sont donc pas justifiées, et doivent être évaluées, notamment au regard des bénéfices apportés à la population non sensible de la consommation de poisson.

Le but à long terme n'est pas de réduire la consommation de poisson, mais de diminuer les apports en MeHg à travers cette consommation, par diminution de la contamination des milieux quand elle n'est pas d'origine naturelle.

A moyen terme l'objectif serait de limiter la consommation des espèces de poisson les plus contaminées, en particulier pour les populations sensibles (femmes enceintes, et par extension jeunes enfants).

11. RÉFÉRENCES

- AFFSA. Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à l'évaluation des risques sanitaires liés à l'exposition au mercure des femmes enceintes et allaitantes et des jeunes enfants. AFSSA, saisine n° 2002-SA-0014, Maisons-alfort, 21 octobre **2002**.
- AFSSA. Méthylmercure : recommandations de consommation de poisson. Communiqué, 11 septembre 2003.
- Airey D. Total mercury concentrations in human hair from 13 countries in relation to fish consumption and location. *Sci Total Environ*, **1983**, 31 (2), 157-180.
- Axtell CD, Myers GJ, Davidson PW, Choi AL, Cernichiari E, Sloane-Reeves J, Shamlaye C, Cox C, Clarkson TW. Semiparametric modeling of age at achieving developmental milestones after prenatal exposure to methylmercury in the Seychelles Child Development Study. *Environ Health Perspect*, **1998**, 106, 559-564.
- Axtell CD, Cox C, Myers GJ, Davidson PW, Choi AL, Cernichiari E, Sloane-Reeves J, Shamlaye CF, Clarkson TW. Association between methylmercury exposure from fish consumption and child development at five and a half years of age in the Seychelles Child Development Study: an evaluation of nonlinear relationships. *Environ Res*, **2000**, 84 (2), 71-80.
- Baars AJ, Theelen RMC, Janssen PJCM, Hesse JM, van Apeldoorn ME, Meijerink MCM, Verdam L, Zeilmaker MJ. Re-evaluation of human-toxicological maximum permissible risk levels. RIVM report 711701 025, 2001.
- Bolger PM, Schwetz BA. Mercury and health. *N Engl J Med*, **2002**, 347 (22), 1735-1736.
- Boudan V, Chaud P, Quenel P, Blateau A, Cardoso T. Etude de l'imprégnation par le mercure de la population de Sinnamary. Institut de Veille Sanitaire / direction Générale de la Santé, mai **2003**.
- Budtz-Jorgensen E, Keiding N, Grandjean P, White RF, Weihe P. Methylmercury neurotoxicity independent of PCB exposure. *Environ Health Perspect*, **1999**, 107 (5), A236-237.
- Budtz-Jorgensen E, Grandjean P, Keiding N, White RF, Weihe P. Benchmark dose calculations of methylmercury-associated neurobehavioral deficits. *Toxicol Lett*, **2000**, 112-113, 193-199.
- Cernichiari E, Toribara TY, Liang L, Marsh DO, Berlin MW, Myers GJ, Cox C, Shamlaye CF, Choisy O, Davidson P, Clarkson TW. The biological monitoring of mercury in the Seychelles study. *Neurotoxicology*, **1995**, 16 (4), 613-628. (a)
- Cernichiari E, Brewer R, Myers GJ, Marsh DO, Lapham LW, Cox C, Shamlaye CF, Berlin M, Davidson PW, Clarkson TW. Monitoring methylmercury during pregnancy: maternal hair predicts fetal brain exposure. *Neurotoxicology*, **1995**, 16 (4), 705-710. (b)
- Cordier S, Grasmick C. Etude de l'imprégnation par le mercure dans la population guyanaise. Réseau National de Santé Publique / Direction Générale de la Santé. Rapport, déc. 1994, 29 p.
- Cordier S, Grasmick C, Paquier-Paasselaigue M, Mandereau L, Weber J-P, Jouan M. Mercury Exposure in French Guiana: Levels and Determinants. *Arch Environ Health*, **1998**, 53 (4), 299-303.
- Cordier S, Garel M. Risques neurotoxiques chez l'enfant liés à l'exposition au méthylmercure en Guyane française. Institut de Veille Sanitaire / INSERM, avril **1999**.
- Cordier S, Garel M, Mandereau L, Morcel H, Doineau P, Gosme-Seguret S, Josse D, White R, Amiel-Tison C. Neurodevelopmental investigations among methylmercury-exposed children in French Guiana. *Environ Res*, **2002**, 89 (1), 1-11.
- Cox C, Clarkson TW, Marsh DO, Amin-Zaki L, Tikriti S, Myers GG. Dose-response analysis of infants prenatally exposed to methyl mercury: an application of a single compartment model to single-strand hair analysis. *Environ Res*, **1989**, 49 (2) ; 318-332.
- Crump KS. A new method for determining allowable daily intakes. *Fundam Appl Toxicol*, **1984**, 4(5), 854-871.
- Crump K, Viren J, Silvers A, Clewell H 3rd, Gearhart J, Shipp A. Reanalysis of dose-response data from the Iraqi methylmercury poisoning episode. *Risk Anal*, **1995**, 15(4), 523-532.
- Crump K, Kjellstrom T, Shipp A, Silvers A, Stewart A. Influence of prenatal mercury exposure upon scholastic and psychological test performance: statistical analysis of a New Zealand cohort. *Risk Anal*, **1998**, 18, 701-713.

- Crump K, Landingham C, Shamlaye C, Cox C, Davidson P, Myers G, Clarkson T. Benchmark concentrations for methylmercury obtained from the Seychelles child development study. *Environ Health Perspect*, **2000**, 108, 257-263.
- Davidson PW, Myers GJ, Cox C, Axtell C, Shamlaye C, Sloane-Reeves J, Cernichiari E, Needham L, Choi A, Yang Y, Berlin M, Clarkson TW. Effects of prenatal and postnatal methylmercury exposure from fish consumption on neurodevelopment: Outcomes at 66 months of age in the Seychelles child development study. *JAMA*, **1998**, 280, 701-707.
- Davidson PW, Palumbo D, Myers GJ, Cox C, Shamlaye CF, Sloane-Reeves J, Cernichiari E, Wilding GE, Clarkson TW. Neurodevelopmental outcomes of Seychellois children from the pilot cohort at 108 months following prenatal exposure to methylmercury from a maternal fish diet. *Environ Res*, **2000**, 84 (1), 1-11.
- EPA. Water quality criterion for the protection of human health: methylmercury. Office of Science and Technology, Office of Water, US Environmental Protection Agency, Washington, DC 20460, **2001**.
- Fréry N, Maillot E, Deheeger M, Boudou A, Maury-Brachet R. Exposition au mercure de la population amérindienne Wayana de Guyane. enquête alimentaire. Institut de Veille Sanitaire / INSERM, mai **1999**.
- Fréry N, Maury-Brachet R, Maillot E, Deheeger M, de Merona B, Boudou A. Gold-mining activities and mercury contamination of native amerindian communities in French Guiana: key role of fish in dietary uptake. *Environ Health Perspect*, **2001**, 109(5), 449-456.
- Grandjean P, Weihe P, White RF, Debes F, Araki S, Yokoyama K, Murata K, Sorensen N, Dahl R, Jorgensen PJ. Cognitive deficit in 7-year-old children with prenatal exposure to mercury. *Neurotoxicol Teratol*, **1997**, 19, 417-428.
- Grandjean P, Weihe P, White RF, Debes F. Cognitive performance of children prenatally exposed to 'safe' levels of methylmercury. *Environ Res*, **1998**, 77, 165-172.
- Grandjean P, Budtz-Jorgensen E, White RF, Jorgensen PJ, Weihe P, Debes F, Keiding N. Methylmercury exposure biomarkers as indicators of neurotoxicity in children aged 7 years. *Am J Epidemiol*, **1999**, 150 (3), 301-305.
- Grandjean P, White RF. Effects of methylmercury exposure on neurodevelopment. *JAMA*, **1999**, 10, 281 (10), 896. (b)
- Grandjean P, Murata K, Budtz-Jorgensen E, Weihe P. Cardiac autonomic activity in methylmercury neurotoxicity: 14-year follow-up of a Faroese birth cohort. *J Pediatr*, **2004**, 144, 169-176.
- Guallar E, Sanz-Gallardo MI, van't Veer P, Bode P, Aro A, Gomez-Aracena J, Kark JD, Riemersma RA, Martin-Moreno JM, Kok FJ and the Heavy metals and Myocardial Infarction Study Group. Mercury, fish oils, and the risk of myocardial infarction. *N Engl J Med*, **2002**, 347 (22), 1747-1754.
- Huang LS, Cox C, Wilding GE, Myers GJ, Davidson PW, Shamlaye CF, Cernichiari E, Sloane-Reeves J, Clarkson TW. Using measurement error models to assess effects of prenatal and postnatal methylmercury exposure in the Seychelles Child Development Study. *Environ Res*, **2003**, 93 (2), 115-122.
- INERIS. Mercure et dérivés du mercure. Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances dangereuses. Version 2-1, décembre **2003**.
- JECFA 2003. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 61st meeting, Rome, 10-19 June **2003**.
- Kjellstrom T, Kennedy P, Wallis S, Stewart A, Friberg L, Lind B, Wutherspoon P, Mantell C. Physical and mental development of children with prenatal exposure to mercury from fish. Stage 2. Interviews and psychological tests at age 6, Solna, National Swedish Environmental Board, 112 pp (Report no.3642), **1989**.
- Lapham LW, Cernichiari E, Cox C, Myers GJ, Baggs RB, Brewer R, Shamlaye CF, Davidson PW, Clarkson TW. An analysis of autopsy brain tissue from infants prenatally exposed to methylmercury. *Neurotoxicology*, **1995**, 16 (4), 689-704.
- Lyketsos CG. Should pregnant women avoid eating fish? Lessons from the Seychelles. *Lancet*, **2003**, 361 (9370), 1667-1668.
- Mahaffey KR. Methylmercury exposure and neurotoxicity. *JAMA*, **1998**, 280, 737-738.
- Marsh D, Clarkson T, Cox C, Myers G, Amin-Zaki L, Al-Tikriti S. Fetal methylmercury poisoning. Relationship between concentration in single strands of maternal hair and child effects. *Arch Neurol*, **1987**, 44, 1017-1022.
- Murata K, Budtz-Jorgensen E, Grandjean P. Benchmark dose calculations for methylmercury associated delays on evoked potential latencies in two cohorts of children. *Risk Anal*, **2002**, 22 (3), 465-474.
- Murata K, Weihe P, Budtz-Jorgensen E, Jorgensen PJ, Grandjean P. Delayed brainstem auditory evoked potential latencies in 14-year-old children exposed to methylmercury. *J Pediatr*, **2004**, 144 (2), 177-183.

- Myers GJ, Davidson PW. Prenatal methylmercury exposure and children: neurologic, developmental, and behavioral research. *Environ Health Perspect*, **1998**, 106 (suppl 3), 841-847.
- Myers GJ, Davidson PW. Does methylmercury have a role in causing developmental disabilities in children? *Environ Health Perspect*, **2000**, 108 (suppl 3), 413-420. (a)
- Myers GJ, Davidson PW, Palumbo D, Shamlaye C, Cox C, Cernichiari E, Clarkson TW. Secondary analysis from the Seychelles Child Development Study: the child behavior checklist. *Environ Res*, **2000**, 84 (1), 12-19. (b)
- Myers GJ, Davidson PW, Cox C, Shamlaye CF, Palumbo D, Cernichiari E, Sloane-Reeves J, Wilding GE, Kost J, Huang LS, Clarkson TW. Prenatal methylmercury exposure from ocean fish consumption in the Seychelles Child Development Study. *Lancet*, **2003**, 361 (9370), 1686-1692.
- NRC. Toxicological Effects of Methylmercury. Committee on the Toxicological Effects of Mercury, Board on Environmental Studies and Toxicology, Committee on Life Sciences, National Research Council. The National Academy of Sciences, Washington DC, **2000**.
- Palumbo DR, Cox C, Davidson PW, Myers GJ, Choi A, Shamlaye C, Sloane-Reeves J, Cernichiari E, Clarkson TW. Association between prenatal exposure to methylmercury and cognitive functioning in Seychellois children: a reanalysis of the McCarthy Scales of Children's Ability from the main cohort study. *Environ Res*, **2000**, 84 (2), 81-88.
- Rice DC, Schoeny R, Mahaffey K. Methods and rationale for derivation of a reference dose for methylmercury by the U.S. EPA. *Risk Anal*, **2003**, 23 (1), 107-115.
- Rice G, Swartout J, Mahaffey K, Schoeny R. Derivation of US EPA's oral reference dose (RfD) for methylmercury. *Drug Chem Toxicol*, **2000**, 23 (1), 41-54.
- Salonen JT, Seppanen K, Nyyssonen K, Korpela H, Kauhanen J, Kantola M, Tuomilehto J, Esterbauer H, Tatzber F, Salonen R. Intake of mercury from fish, lipid peroxidation, and the risk of myocardial infarction and coronary, cardiovascular, and any death in eastern Finnish men. *Circulation*, **1995**, 92 (8), 2355-2356.
- Smith JC, Farris FF. Methylmercury pharmacokinetics in man: a reevaluation. *Toxicol Appl Pharmacol*, **1996**, 137 (2), 245-252.
- Sorensen N, Murata K, Budtz-Jorgensen E, Weihe P, Grandjean P. Prenatal methylmercury exposure as a cardiovascular risk factor at seven years of age. *Epidemiology*, **1999**, 10 (4), 370-375.
- Stern AH. Estimation of the interindividual variability in the one-compartment pharmacokinetic model for methylmercury: implications for the derivation of a reference dose. *Regul Toxicol Pharmacol*, **1997**, 25 (3), 277-288.
- Stern AH, Gochfeld M. Effects of methylmercury exposure on neurodevelopment. *JAMA*, **1999**, 281, (10), 896-897.
- Stern AH, Smith AE. An assessment of the cord blood:maternal blood methylmercury ratio: implications for risk assessment. *Environ Health Perspect*, **2003**, 111 (12), 1465-1470.
- Steuerwald U, Weihe P, Jorgensen PJ, Bjerve K, Brock J, Heinzow B, Budtz-Jorgensen E, Grandjean P. Maternal seafood diet, methylmercury exposure, and neonatal neurologic function. *J Pediatr*, **2000**, 136 (5), 599-605.
- TERA. Determining the Reference Dose for methylmercury: how can we further reduce uncertainties ? *Toxicology Excellence for Risk Assessment (TERA)*, 3 novembre **2000**.
- WHO/EHC. Environmental Health Criteria 101. Methylmercury. Geneve, Switzerland, World Health Organization, **1990**.
- WHO/EHC. Environmental Health Criteria 210 . Principles for the assessment of risk to human health from exposure to chemicals. Geneve, Switzerland, World Health Organization / International Programme on Chemical Safety, **1999**.
- WHO/JEFCA. Food Additives series 4. Evaluation of mercury, lead, cadmium and the food additives amaranth, diethylpyrocarbonate, and octyl gallate. Prepared by the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives which met in Geneva, 4-12 April **1972**.
- WHO/JEFCA. Food Additives series 44. Safety evaluation of certain food additives and contaminants. Prepared by the Fifty-third meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), World Health Organization/ International Programme on Chemical Safety, Geneva, **2000**.
- Yoshizawa K, Rimm EB, Morris JS, Spate VL, Hsieh CC, Spiegelman D, Stampfer MJ, Willett WC. Mercury and the risk of coronary heart disease in men. *N Engl J Med*, **2002**, 347 (22), 1755-1760.