HAL
open science

Transfert de Polluants Organiques Persistants (POP) vers l'oeuf de poule : influence des caracteristiques des polluants et du statut physiologique de l'animal

Agnès Fournier

To cite this version:

Agnès Fournier. Transfert de Polluants Organiques Persistants (POP) vers l'oeuf de poule : influence des caracteristiques des polluants et du statut physiologique de l'animal. Sciences agricoles. Institut National Polytechnique de Lorraine, 2011. Français. NNT : 2011INPL031N . tel-01749493

HAL Id: tel-01749493

https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01749493

Submitted on 29 Mar 2018

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

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

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

Unité de recherche Animal et Fonctionnalités des Produits Animaux

Institut Technique de l'Aviculture

Institut National Polytechnique de Lorraine

Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires

THESE

En vue d'obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Ecole Doctorale : Ressources Procédés Produits Environnement

Discipline : Sciences Agronomiques

TRANSFERT DE POLLUANTS ORGANIQUES PERSISTANTS (POP)
VERS L'ŒUF DE POULE :
INFLUENCE DES CARACTERISTIQUES DES POLLUANTS ET DU STATUT PHYSIOLOGIQUE DE L'ANIMAL

---

présentée et soutenue publiquement par :

Agnès FOURNIER

Le 31 Mai 2011

Devant le jury composé de :

Yves NYS	Directeur de Recherche, INRA, Nouzilly	**Rapporteur** *Président du jury*
Pascal SANDERS	Directeur de Recherche, ANSES, Fougères	**Rapporteur**
Jean-Philippe ANTIGNAC	Ingénieur de Recherche, ONIRIS, Nantes	**Examinateur**
Cyril FEIDT	Professeur, Nancy Université, Nancy	**Examinateur** *Directeur*
Catherine JONDREVILLE	Ingénieur de Recherche, INRA, Nancy	**Examinatrice** *Co-directrice*
Angélique TRAVEL	Ingénieur, ITAVI, Nouzilly	**Invitée**

Remerciements

Ce projet a bénéficié du soutien financier du ministère de l'agriculture, de l'alimentation, de la pêche, de la ruralité et de l'aménagement du territoire, dans le cadre du Compte d'Affectation Spéciale Développement Agricole et Rural (projet CASDAR n°7106), de l'Association Nationale de la Recherche et de la Technologie (ANRT) et de l'Institut Technique de l'Aviculture (ITAVI). Ce soutien a été à la base de mon entrée en thèse qui s'est effectuée en collaboration entre l'ITAVI et l'Unité de Recherche Animal et Fonctionnalités des Produits Animaux (UR AFPA) dont je remercie les directeurs respectifs : Philippe Le Loup, pour avoir accepté le projet de cette thèse CIFRE et Guido Rychen, pour son accueil au sein de l'UR AFPA.

Ce travail de thèse étant aujourd'hui achevé, je suis très reconnaissante à Yves Nys et Pascal Sanders d'avoir accepté d'en être les rapporteurs. Je remercie également Jean-Philippe Antignac et Angélique Travel d'avoir accepté de participer au jury.

J'ai eu la chance d'effectuer ma thèse en collaboration avec des personnes de plusieurs structures de recherche, situées dans différentes régions de France. Cela m'a permis de m'ouvrir à des savoir-faire variés, à diverses façons de travailler et d'aborder les problèmes. En bref, cela m'a permis de travailler avec différentes équipes,… et par chance, le plus souvent dans la bonne humeur.

Tout d'abord, un grand MERCI à Cyril Feidt et Catherine Jondreville pour avoir débuté avec moi cette nouvelle thématique, que représentent le transfert de POP chez les poules pondeuses et sa modélisation. Merci de m'avoir proposé cette thèse après quelques mois passés au laboratoire. Je vous suis très reconnaissante de m'avoir fait confiance depuis le tout début, de m'avoir aidée, guidée et soutenue jusqu'à la fin. Merci pour votre disponibilité et les nombreuses discussions (bien souvent salvatrices !) malgré vos journées bien remplies. Enfin, merci pour votre encadrement complémentaire d'où il ressort méthode, structure, rigueur, enthousiasme, créativité, humour… et sans lequel ce travail n'aurait pas été ce qu'il est.

Je tiens à remercier Angélique Travel pour avoir tenu le rôle de « référente ITAVI » dans le cadre de ma thèse CIFRE. Plus spécialement merci pour ta confiance, ton aide, ton soutien et ton implication notamment lors de l'expérimentation « HBCD ». Merci pour ton accueil dans le bureau, ta bonne humeur, ton optimisme imperturbable et ta disponibilité, mais aussi pour tes réponses rapides lors de mes interrogations (souvent dans l'urgence !) malgré la distance Nancy-Tours. Enfin, merci de m'avoir toujours encouragée.

Je remercie Olivier Martin de l'UMR MoSAR (AgroParisTech) d'avoir accepté de nous accompagner sur le volet « modèle ». Merci de m'avoir montré une autre façon d'aborder mon sujet et de m'avoir guidée avec patience dans le monde de la modélisation. Je te remercie pour les plages de travail dans la bonne humeur et pour t'être penché avec intérêt sur le cas des volailles et la lipophilicité des molécules !

Ma thèse faisant partie d'un projet CASDAR, je tiens à remercier l'ensemble des partenaires du projet pour leur collaboration et pour avoir toujours montré de l'intérêt pour mon travail. Plus particulièrement, au LABERCA, je tiens à remercier Bruno Le Bizec, Philippe Marchand et Anaïs Venisseau, pour leur implication dans le volet analytique. A l'INERIS : merci à

Karine Tack et Sébastien Denys, pour nous avoir fourni le sol indispensable à ma dernière expérimentation.

Mes travaux de thèse ont nécessité la mise en œuvre d'expérimentations in vivo et le développement d'un modèle. Cela m'a amenée à rencontrer d'autres équipes :

J'ai eu l'occasion de séjourner à Nouzilly, au sein de l'Unité de Recherches Avicoles (URA) et au Pôle d'Expérimentations Avicoles de Tours (PEAT) pour y mener une des expérimentations de ma thèse. Je tiens donc à adresser tous mes remerciements à l'ensemble des personnes travaillant à l'URA et au PEAT qui m'ont facilité la vie et me l'ont rendue agréable durant ce « long séjour », mais aussi lors de mes visites plus courtes.

En particulier, au PEAT : merci à Nadine Sellier, Frédérique Mercerand, Jean-Marc Meslier, Dominique Boulay, Nicolas Besnes, Michel Gibelin, Kléber Gérard, Dimitri Mailler, Bernard Guillerm et Florence Favreau pour l'aide apportée lors de l'expérimentation « HBCD ». A l'URA, merci à Michel Duclos de m'avoir accueillie au sein de l'unité et à Yves Nys, pour les informations et conseils concernant la physiologie de la poule. Merci aussi aux personnes de l'étage « Dynamiques Nutritionnelles » pour la convivialité des pauses cafés et les repas à la cantine. Une pensée particulière à Agnès, Nathalie M., Florence, Anne-Marie, Maryse et Christine, ainsi qu'aux thésards de l'URA, Marie-Pierre, Murtala, Nathalie, Sarah, Stéphanie et Hugues : pour avoir su accueillir la thésarde de Nancy.

Au sein de l'ITAVI, merci à Laure Bignon, Isabelle Bouvarel et Vérane Gigaud pour votre accueil à Nouzilly. Merci aussi à Gisèle Bernard, du siège à Paris, pour votre disponibilité à chacun de mes appels téléphoniques.

A l'INRA de Clermont-Ferrand, de l'équipe T2A (QuaPA), merci à Erwan Engel et Jérémy Ratel pour votre intérêt pour mon sujet et votre sympathie, qui ont été les bases d'une collaboration. Merci aussi à Patrick Blinet pour la gestion des échantillons.

Au sein de l'équipe MoSAR et en complément de l'aide d'Olivier, je ne peux que remercier Laurence Puillet pour son accompagnement indispensable sur MM3 et son intérêt pour la modélisation de la grappe. Laurence, un grand merci pour ta disponibilité et tous tes trucs et astuces de thésarde modélisatrice qui m'ont évité bien des écueils. Enfin, je suis reconnaissante à l'ensemble des personnes de l'UMR MoSAR que j'ai pu croiser lors de mes visites et qui m'ont toujours accueillie avec gentillesse.

Pour finir avec les équipes qui m'ont, tour à tour, accueillie ou aidée, je termine par adresser mes remerciements à l'ensemble de personnes travaillant dans mon laboratoire d'accueil l'UR AFPA et particulièrement aux personnes du site ENSAIA pour la bonne humeur qui y règne. Plus spécialement, merci à Catherine Larrière d'avoir comblée mes lacunes administratives avec patience. Christine Grandclaudon, Marie-Antoinette Dziurla, Yann Guiavarc'h et Diane Julien-David, merci de m'avoir, à un moment donné et chacun votre tour, apporté votre soutien à tout ce qui « touche l'analytique » ! (Mention spéciale à Christine en souvenir des heures passées face au blanc d'œuf en gélification !). Claire Soligot, merci pour ton aide, l'hygiène et sécurité…et les dimanches matins. Pamela Hartmeyer : pour ton implication dans l'expérimentation PCB, mais aussi pour ton soutien et les micro-pauses ! Hervé Toussaint, merci pour les pdf et la surveillance de la bonne santé des poules. Yves Le Roux, merci pour les coups de pouce informatiques et statistiques. Stefan Jurjanz et Damien Banas, merci à vous pour les nombreuses discussions de tout ordre, ainsi que pour vos conseils et encouragements. Enfin, merci à Katy Poiret de m'avoir accueillie dans son bureau pour mon dernier mois de rédaction!

En parallèle de mes travaux de thèse, j'ai eu l'occasion de faire mes premiers pas dans l'enseignement et l'encadrement d'étudiants. Un grand merci à Cyril Feidt, Guido Rychen et Yves Le Roux de m'avoir donné l'opportunité de les effectuer dans les meilleures conditions possibles… à vous et aux autres enseignants-chercheurs de l'équipe, merci pour les conversations sur le métier…

J'en arrive aux nouveaux docteurs, thésards et stagiaires …

MERCI aux fondateurs du « bureau A14 », en particulier durant l'attente de mon contrat puis durant les premiers mois de cette thèse : pour les pauses « sciences » au tableau, le travail en équipe et les échanges sur la façon d'aborder la thèse (et la vie). Merci à vous 4 pour votre aide et votre soutien de façon générale. Plus particulièrement, Anaël Weissenburger : je n'oublie pas nos débuts avec les poules, ni ton aide et les discussions que nous avons eu en début de thèse sur ma thématique. Angélique Lazartigues : pour les conseils sur les manips et l'analytique, mais aussi pour tes encouragements notamment lors de la dernière ligne droite. Fayçal Ounnas : pour avoir co-préparé nos dernières manips de thèse. Julien Caboche : pour tes conseils de « thésard chevronné », ta confiance et tes encouragements quand j'en avais besoin.

Abdou, Abir, Adrian, Aude, Aurélie, Balbine, David, Fred, Nadia, Nicolas V et Rodrigue : mes prédécesseurs, pour leurs conseils avisés à mon arrivée dans le laboratoire et pour leurs encouragements du début à la fin. Vous n'êtes pas thésards, mais merci aussi à vous : Florence P, et Nicolas B, parce que tu as une belle montre, mais surtout pour ton soutien… Je n'oublie pas non plus les thésards des autres sites UR AFPA : je pense en particulier aux thésardes des petits rats, Julie et Guillemette, mais aussi Marie-Do des poissons, Stéphanie, Zelda et Xavier : bon courage à vous pour la suite ! Merci aussi aux (anciens) thésards d'autres labos, en particulier Camille et Benjamin pour le soutien et les conseils, ainsi qu'à Max : pour les pdf des Pays-Bas et les encouragements, à toi de jouer maintenant ! Enfin aux derniers colocataires en date du bureau A14 : Cécile et Bilal, je souhaite bon courage et bonne continuation pour la suite !

Merci également aux nombreux stagiaires, en particulier : Cynthia, pour les pauses teintées de joie de vivre, Olivier H et Elodie L : pour votre soutien et pour avoir mis de la bonne humeur dans le début de ma 2ème année de thèse. Un merci supplémentaire à Olivier pour le sauvetage de ficus qui grâce à toi a survécu à nos thèses…

Aux personnes de l'ENSAIA, notamment celles des bureaux voisins (Laboratoire Sols et Environnement, Laboratoire Agronomie et Environnement et les professeurs de langues) qui, par un sourire ou un petit mot savent rendre accueillants les couloirs !

Merci à mes amis et ma famille d'avoir témoigné de l'intérêt à mon sujet de thèse et surtout de m'avoir toujours soutenue.

Aux amis qui d'une façon ou d'une autre ont éclairé d'un sourire ou d'un mot à un moment donné ces années de travail, c'est une chance et j'en suis consciente.

Plus particulièrement, pour avoir suivi toute la thèse malgré la distance géographique, merci à : Amélie, pour son soutien et sa prose même de l'autre bout du monde et à Mel pour les échanges concernant la thèse et la vie…

Ainsi qu'à Alexandra, Axel, Claire, Doris, Pierre-Emmanuel, Anne et Matthieu…

Enfin, un grand merci à tous ceux qui m'ont régulièrement aidée à trouver un équilibre entre travail et détente : pour votre compréhension et votre persévérance !... Un merci tout particulier à Camille (et ses kits de survie) et Sophie (moteur d'un bon nombre de petites pauses essentielles avant de mieux repartir). Merci à vous deux pour les bons moments passés ensemble et n'avoir jamais manqué, chacune à votre façon, de me soutenir !

Merci aussi à toute ma famille, avec un clin d'œil spécial à Claire G pour les transits Nancy-Tours, avoir supporté des réveils aux heures improbables et m'avoir accueillie lors de mes journées « modélisation » sur Paris !

Enfin, je tiens avant tout à remercier mes parents pour votre présence, votre compréhension et votre confiance… pour tout ce que vous m'avez donné qui m'a permis d'arriver jusque là. Merci à vous, ainsi qu'à Fanny et Gilles, pour m'avoir toujours encouragée… sans oublier Hugues et Charles…

Résumé

Les poules pondeuses sont susceptibles d'être exposées à une grande diversité de polluants organiques persistants (POP) potentiellement présents dans leur environnement. La principale voie d'exposition est la voie orale, avec l'ingestion soit d'aliment soit de matrices environnementales (sol, végétaux…) contaminés. Dans un contexte de sécurisation des systèmes d'élevage avicole vis-à-vis des POP, nos travaux de recherche ont porté sur l'identification et la hiérarchisation des facteurs influençant le transfert des POP ingérés vers l'œuf. Ces facteurs sont liés à la nature de la matrice ingérée (sol ou aliment), aux caractéristiques de l'animal (taux de ponte, état d'engraissement) et aux caractéristiques de la molécule (lipophilicité, susceptibilité à la métabolisation). Pour cette étude, différentes approches scientifiques ont été mobilisées : l'expérimentation *in vivo* et la modélisation mathématique. Les expérimentations *in vivo* ont permis d'étudier la biodisponibilité relative des PCB d'un sol naturellement contaminé, et de renseigner les paramètres de la cinétique de transfert vers l'œuf de molécules non encore étudiées chez la poule pondeuse telles que des molécules émergentes (exemple d'un retardateur de flammes bromé, HBCD) ou les HAP. Nos résultats montrent en particulier l'importance de l'impact du degré de métabolisation de la molécule sur l'allure de la cinétique et le niveau du transfert.

L'élaboration d'un modèle mathématique pouvant faire varier de façon dynamique la taille des compartiments lipidiques de l'animal, ainsi que la fréquence de ponte, a permis d'explorer l'influence des caractéristiques de l'animal sur le transfert de POP vers l'œuf. Le niveau de ponte influence directement, et de façon proportionnelle, le niveau de contamination des tissus de la poule à l'état d'équilibre. Le niveau d'engraissement a un rôle de dilution en cas de période de non ponte et influence de façon marquée la vitesse de décontamination des tissus lors d'une période d'épuration suivant une exposition. Pour une molécule caractérisée par un degré de biotransformation et un mode de distribution donné, les variations de concentration dans les œufs à un temps donné, sont donc dépendantes de la quantité de molécule absorbée (pilotée par la quantité ingérée et par la biodisponibilité relative liée à la matrice ingérée) et des caractéristiques physiologiques.

L'application de ce modèle à des cas concrets met en évidence l'intérêt d'un tel outil dans le cadre de l'évaluation et de la gestion des risques en système d'élevage.

Mots clés : POP, ADME, transfert, œuf, poule pondeuse, modèle

Abstract

Laying hens are likely to be exposed to a wide range of persistent organic pollutants (POPs) potentially present in their environment. The major route of exposure is oral, with ingestion of contaminated feed or environmental matrices (soil, plants ...). In the context of securing poultry farming systems regarding POPs, our research has focused on identifying and grading factors likely to influence the transfer of ingested POPs to eggs. These factors are related to the nature of the ingested matrix (soil or feed), to the characteristics of the animal (laying rate, fatness) and to the properties of the molecule (lipophilicity, sensitivity to metabolism). Different scientific approaches have been implemented: *in vivo* experimentation and mathematical modeling. In the frame of *in vivo* experiments we have assessed the relative bioavailability of PCBs from one naturally contaminated soil. In addition, we have calculated parameters of the kinetics of transfer to eggs of molecules that had never been studied in laying hens, such as emerging molecules (for example a brominated flame retardant, HBCD), or PAHs. Our results point out the dominant impact of the molecule metabolism on the shape of its kinetics and on its rate of transfer to eggs.

The developed dynamic mathematical model makes it possible to pilot variations with time of the size of the lipid compartments in the animal and of the frequency of laying. It was used to assess the influence of these animal characteristics on the transfer of POPs to eggs. Laying rate proportionally influences the contamination level of eggs and of animal tissues at steady state. Body fat dilutes absorbed POPs in absence of laying and significantly influences the rate of decontamination of tissues during depuration subsequent to an exposure period. For a given molecule, characterized by proper sensitivity to biotransformation and mode of transport, concentration in eggs and its variation with time depend of the amount absorbed (driven by the amount ingested and the bioavailability related to the ingested matrix) and of the physiological status of the animal. The implementation of this model in actual cases highlights its performance as a tool for risk assessment and management in farming systems.

Key words: POP, ADME, transfer, egg, laying hen, modeling

Valorisation scientifique des travaux de thèse

PUBLICATIONS :

-internationales :

Fournier A., Feidt C., Dziurla M.-A., Grandclaudon C., Jondreville C., 2010. Transfer kinetics to egg yolk and modeling residue recovered in yolk of readily metabolized molecules: Polycyclic aromatic hydrocarbons orally administered to laying hens. Chemosphere, 78, 1004-1010.

Fournier A., Feidt C., Marchand P., Le Bizec B., Venisseau A., Sellier N., Engel E., Ratel J., Travel A., Jondreville C., 2011. Kinetic study of hexabromocyclododecane in laying hens (Gallus domesticus) given a contaminated diet, Environmental Science and Pollution Research, *en cours de revision*

Fournier A., Feidt C., Travel A., Le Bizec B., Marchand P., Jondreville C., 2011. Relative bioavailability to laying hens of indicator polychlorobiphenyls present in soil, Chemosphere, *soumis*

-nationale

Jondreville C., **Fournier A.**, Travel A., Feidt C., Roudaut B., 2010. Modalités et risques de transfert des contaminants chimiques organiques vers l'œuf de poule pondeuse. INRA Productions Animales, 23, 205-214

CHAPITRE d'OUVRAGE :

Jondreville C., **Fournier A.**, Travel A., Feidt C., Roudaut B., 2011. Chemical resdues and egg safety. In : Improving egg and egg product safety and quality. Volume 2. Nys Y., Bain M. and Van Immerseel F. (Eds), in press

COMMUNICATIONS ORALES:

-internationale

Fournier A., Feidt C., Travel A., Marchand P., Jondreville C., 2010. Transfer kinetic of an emergent pollutant into egg yolk of hens: Brominated flame retardant hexabromocyclododecane. XIIIth European Poultry Conference, M. Duclos and Y. Nys, Eds, Tours, 23-27 August 2010, World's Poultry Science Journal, 66 Supp, 4 pp.

-nationales

Fournier A., Feidt C., Martin O., Travel A., Jondreville C., 2009. Elaboration d'un modèle de transfert des polluants organiques persistants du sol vers l'œuf de poule : Un outil pour sécuriser les systèmes de production avicole. 2èmes Rencontres Nationales de la Recherche sur les Sites et Sols Pollués, 20-21 Octobre, Paris, France, 5 pp.

Travel A., Jondreville C., **Fournier A**., Marchand P., Feidt C., 2009. Sécuriser les systèmes d'élevage avicole sur parcours vis à vis des POP. Journée nationale des professionnels de la pondeuse et de l'œuf de consommation, 3 décembre, Ploufragan, France.

Fournier A., Feidt C., Travel A., Marchand P., Jondreville C., 2011. Biodisponibilité relative des PCB indicateurs présents dans un sol chez la poule pondeuse. Neuvièmes Journées de la Recherche Avicole, Tours, 29 et 30 mars 2011, 5 pp.

COMMUNICATIONS AFFICHEES :

-congrès internationaux

Fournier A., Dziurla M.-A., Rychen R., Feidt C., Jondreville C., 2007. Transfer of PAHs orally administered to hens into egg yolk. In: 21st International Symposium for Polycyclic Aromatic Compounds, ISPAC, 5-10 August 2007, Trondheim, Norway (Abstract).

Fournier A., Feidt C., Dziurla M.-A., Grandclaudon C., Jondreville C., 2009. Transfer and fate of three model PAHs into egg yolk of hen after a short oral exposition. XIII European Symposium on the Quality of Eggs and Egg Products, 21-25 Juin, Turku, Finlande.

Fournier A., Feidt C., Dziurla M.-A., Grandclaudon C., Jondreville C., 2009. Kinetic study of transfer of PAHs and metabolites into egg yolk in hens orally given a mixture of PAHs. SETAC Europe, 19th Annual Meeting, 31 Mai - 4 Juin, Göteborg, Suède.

Fournier A., Feidt C., Travel A., Marchand P., Jondreville C., 2010. Kinetic study of transfer of hexabromocyclododecane into egg yolk in hens. SETAC Europe, 20th Annual Meeting, 23-27 Mai, Seville, Espagne.

Fournier A., Feidt C., Travel A., Marchand P., Jondreville C., 2010. Relative bioavailability of soil-bound non-dioxin like polychlorobiphenyls in laying hens. SETAC Europe, 20th Annual Meeting, 23-27 Mai, Seville, Espagne.

Fournier A., Feidt C., Travel A., Marchand P., Jondreville C., 2010. Soil modulates bioavailability of non-dioxin like polychlorobiphenyls in laying hens. XIIIth European Poultry Conference, M. Duclos and Y. Nys, Eds, Tours, 23-27 August 2010, World's Poultry Science Journal, 66 Supp, 4 pp.

- Journées INRA

Fournier A., Feidt C., Rychen G., Dziurla M.A., Jondreville C., 2007. Evaluation du transfert d'Hydrocarbures Aromatiques polycycliques et du lindane vers l'œuf. 2èmes Journées d'Animation Scientifique du Département PHASE, 22 - 24 octobre, Tours, France.

Fournier A., Feidt C., Dziurla M.A, Grandclaudon C., Jondreville C., 2008. Evaluation du transfert d'hydrocarbures polycycliques vers l'œuf, 2èmes Journées « Crédits Incitatifs » du Département PHASE, 26 - 27 novembre, Tours, France.

- Séminaire RP2E

Fournier A., Feidt C., Dziurla M.A., Grandclaudon C., Jondreville C., 2009. Etude cinétique du transfert d'hydrocarbures aromatiques polycycliques et de quelques métabolites vers le jaune d'œuf, Séminaire de l'école doctorale RP2E, 15 janvier, Nancy, France. *(poster)*

Fournier A., Martin O., Feidt C., Puillet L., Travel A., Jondreville, C., 2010. Modélisation du dépôt de jaune lors de la formation de l'œuf : un outil pour simuler le dépôt de polluants lipophiles dans le jaune chez la poule, Séminaire de l'école doctorale RP2E, 28 janvier, Nancy, France. *(poster + article)*

Sommaire

Remerciements ... 3
Résumé ... 7
Abstract ... 8
Valorisation scientifique des travaux de thèse ... 9
Sommaire ... 11
Liste des abréviations (hors modèle du chapitre III) ... 15
Liste des abréviations et noms utilisés dans le modèle (Chapitre III) ... 17
Liste des figures ... 19
Liste des tableaux ... 23

Introduction ... 27

Chapitre I : Synthèse bibliographique ... 30
1. Introduction ... 30
2. Les Polluants Organiques Persistants : quel enjeu pour la filière avicole ? ... 31
2.1. Les POP ... 31
2.1.1. Nature, origines et propriétés ... 31
2.1.2. Diversité des POP ... 32
2.1.3. Présence dans l'environnement ... 33
2.1.4. Règlementation ... 35
2.2. Les poules potentiellement exposées : quel enjeu pour la filière ? ... 37
2.2.1. Présence de POP dans les produits avicoles ... 37
2.2.2. Place des élevages alternatifs dans la filière ... 39
2.2.3. Voies possibles d'exposition ... 41
2.3. Les pratiques d'élevage : potentiels facteurs de risque ... 44
3. Transfert des xénobiotiques chez la poule ... 47
3.1. Absorption ... 47
3.1.1. Bioaccessibilité ... 48
3.1.2. Transfert à travers la barrière intestinale : l'absorption ... 51
3.1.3. Mesures et valeurs de l'absorption des POP chez l'oiseau ... 52
3.1.4. Facteurs influençant l'absorption intestinale ... 53
3.2. Distribution ... 56
3.2.1. Prise en charge des POP par les différents constituants du sang ... 57
3.2.2. Distribution tissulaire ... 59
3.2.3. Stockage, bioaccumulation et remobilisation ... 61
3.3. Elimination ... 65
3.3.1. Taux d'élimination au niveau de l'organisme entier et demi-vie ... 65
3.3.2. Biotransformation ... 65
3.3.3. Production d'œuf : une voie d'élimination des POP ... 71
3.3.4. Excrétion fécale et urinaire ... 77
3.3.5. Autres voies d'élimination ... 78
4. Modélisation du transfert de xénobiotiques vers l'œuf ... 81
4.1. Contexte et objectif du développement des modèles toxicocinétiques ... 81
4.2. Différents modèles pour différents objectifs ... 82
4.2.1. Approche non compartimentale : les modèles empiriques ... 82
4.2.2. Modèles à compartiments ... 83
4.2.3. Modèles cinétiques à base physiologique ... 87
4.2.4. Modèles bioénergétiques ... 90

4.2.5. Intérêts et limites des grandes catégories de modèles toxicocinétiques 91
4.2.6. Les modèles mixtes 93
4.2.7. Modélisation du transfert de contaminant chez l'oiseau : Synthèse 94
4.3. Modélisation des étapes du transfert 95
4.4. Facteurs influençant le transfert et leur modélisation 99
4.4.1. Prise en compte des facteurs influençant le transfert dans les modèles existants 99
4.4.2. Expression des paramètres liés à l'animal et à la molécule dans les équations des modèles 101
4.5. Conclusion : Intérêts et limites des modèles existants chez l'oiseau 104
5. Références 105

Objectifs de thèse et démarche 119

Chapitre II : Impacts des caractéristiques de la molécule sur différentes étapes du transfert à l'échelle de l'animal : Expérimentations *in vivo* 121
1. Introduction 121
2. Biodisponibilité des PCB-I du sol 122
2.1. Introduction 124
2.2. Material and methods 125
2.2.1. Contaminated matrices and experimental diets 125
2.2.2. Birds and management 125
2.2.3. Indicator PCBs analysis 127
2.2.4. Calculations and statistical analysis 127
2.3. Results and discussion 128
2.4. Conclusion 135
2.5. Acknowledgements 135
2.6. References 135
3. Dépôt dans l'œuf de molécules ayant des degrés de métabolisation différents 137
4. Cinétique de contamination et de décontamination d'un polluant émergent (HBCD) à l'échelle de la poule 145
4.1. Introduction 147
4.2. Materials and methods 148
4.2.1. Feed 148
4.2.2. Animals and housing 149
4.2.3. Experimental procedure 149
4.2.4. Analyses 149
4.2.5. Calculations and statistical analysis 152
4.3. Results 152
4.4. Discussion 156
4.5. Acknowledgements 159
4.6. References 159

Chapitre III : Impacts des caractéristiques physiologiques de l'animal sur le transfert : la modélisation, un outil de recherche 163
1. Introduction 163
2. Description du modèle 163
2.1. Principe général du modèle 163
2.2. Facteurs physiologiques à représenter 164
2.2.1. Choix des facteurs physiologiques et leurs variations 164
2.2.2. Caractéristiques physiologiques et paramètres d'entrée 165

2.3. Représentation des étapes ADME lors du transfert de POP au sein de la poule 171
2.3.1. Absorption 171
2.3.2. Distribution 172
2.3.3. Voies d'élimination : métabolisme et ponte 172
2.4. Structure du modèle 172
2.4.1. Compartimentation 172
2.4.2. Flux d'échange 173
2.5. Développement du modèle 180
2.5.1. Calibration du modèle physiologique 180
2.5.2. Ajustement des paramètres de flux de POP 183
2.5.3. Analyse de sensibilité 185
2.5.4. Simulations : effet du taux d'engraissement et du taux de ponte sur les cinétiques de concentration de PCB-I dans le tissu adipeux et le jaune d'œuf 187
3. Résultats 191
3.1. Calibration 191
3.1.1. Modèle physiologique 192
3.1.2. Flux de POP 194
3.2. Analyse de sensibilité 196
3.2.1. Paramètres physiologiques 198
3.2.2. Paramètres des flux de POP 201
3.3. Simulations 202
3.3.1. Allure générale des cinétiques de concentration de PCB-I dans le tissu adipeux et dans l'œuf 202
3.3.2. Effet des niveaux d'engraissement sur les cinétiques des concentrations de PCB-I dans le tissu adipeux et dans l'œuf 203
3.3.3. Effet des caractéristiques de ponte sur les cinétiques des concentrations de PCB-I dans le tissu adipeux et dans l'œuf 206
3.3.4. Etude des « amplitudes » de contamination et de décontamination en fonction des caractéristiques physiologiques 209
3.3.5. Effet combiné des caractéristiques corporelles et de ponte sur les cinétiques des concentrations de PCB-I dans le tissu adipeux et dans l'œuf : illustration à l'échelle de la vie d'une poule 212
4. Discussion 215
5. Références 218

Chapitre IV : Discussion générale 221
1. Physiologie : un modèle de recherche 221
1.1. Le modèle : un outil d'exploration 221
1.2. Vers une validation 221
1.3. Vers une meilleure représentation des mécanismes 221
2. Intégration du comportement de la molécule dans le modèle 222
2.1. Intégration du comportement de la molécule et structure du modèle 222
2.2. Cas du métabolisme des PCB-I : Ajustement du paramètre relatif au métabolisme *(k_elimination_clearance)* 223
2.3. Autres types de molécules 224
2.4. Conclusion en lien avec l'étude de cinétique d'une molécule 225
3. Sécurisation sanitaire des systèmes d'élevage avicole 225
3.1. Hiérarchisation des facteurs de risques au cours de l'ingestion et des étapes de l'ADME 225
3.1.1. Quantité absorbée 225
3.1.2. Quantités distribuées, métabolisées, éliminées 226

3.1.3. Synthèse 226
3.2. Sensibilité de la filière volaille vis-à-vis des POP 228
4. Application à des situations de terrain : vers une meilleure gestion de crise 228
4.1. Le modèle : un outil pour la gestion de crise 228
4.2. Etudes de cas 229
4.2.1. Crise de Saint Cyprien : PCB-NDL dans l'œuf 229
4.2.2. Application à des données de décontamination de PCB-NDL 231
4.2.3. Cas de contamination en HBCD 233
4.2.4. Intérêts du modèle 234
5. Références 234

Conclusions – Perspectives 236

Liste des abréviations (hors modèle du chapitre III)

1-OH Pyr : 1-hydroxy-Pyrène
2-OH Phe : 2-hydroxy-Phenanthrène
3-OH B[a]P : 3-hydroxy-Benzo[a]Pyrène
3-OH Phe : 3-hydroxy-Phenanthrène
AbE : Efficience d'Absorption
ADEME : Agence De l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie
ADME : Absorption, Distribution, Métabolisme, Excrétion
AE : Efficience d'Assimilation
AFSSA : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments
AHH : Aryl Hydrocarbon Hydroxylase
AOC : Appellation d'Origine Contrôlée
ASE : Accelerated Solvent Extraction
AUC : Aire sous la courbe des concentrations
B[a]P : Benzo[a]Pyrène
BAF : Facteur de BioAccumulation
BCF : Facteur de BioConcentration
BMF : Facteur de Bioamplification
BW : Body Weight = Poids Vif = PV
CASDAR : Compte d'Affectation Spéciale Développement Agricole et Rural
CONTEGG : chemical CONTamination of home-produced chicken EGGs
CYP : Cytochrome P450
DDT : DichloroDiphénylTrichloroéthane
DGAL : Direction Générale de l'ALimentation
DL : Detection Limit (=LOD)
DMSO : DiMethylSulfOxide
EFSA : European Food Safety Authority
ER : Extraction Ratio
EROD : EthoxyResorufin-O-Deéthylase
ESB : Encéphalopathie Spongiforme Bovine
GC-HRMS : Gas Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry
HAP : Hydrocabure Aromatique Polycyclique
HBCD : HexaBromoCycloDodécane
HBB : HexaBromoBiphényle
HCB : HexaChloroBenzène
HCH : HexaChlorocycloHexane
HDL : High Density Lipoprotein
HPLC : High Pressure Liquid Chromatography
INERIS : Institut National de l'Environnement et des RISques
INRA : Institut National de Recherche Agronomique
IRM : Imagerie par Résonance Magnétique
ITAVI : Institut Technique de l'AVIculture
K_{ow} : Coefficient de partage octanol/eau
LDA : Laboratoire Départemental d'Analyses
LDL : Low Density Lipoprotein
LOD : Limit Of Detection (=DL)
LOQ : Limit Of Quantification (=QL)
MG : Matière Grasse
MS : Matière Sèche
OM : Organic Matter

OMS : Organisation Mondiale de la Santé
PAFC : Diffusion Permeation in Fat Constant
PBB : PolyBromoBiphényles
PBDE : PolyBromoDiphényl-Ethers
PBPK : Physiologically Based PharmacoKinetics
PCB : PolyChloroBiphényles
PCB-DL : PolyChloroBiphényles de type « Dioxin-Like
PCB-I : PolyChloroBiphényles Indicateurs
PCB-NDL : PolyChloroBiphényles de type « Non-Dioxin Like »
PCDD : PolyChloroDibenzo-*p*-Dioxines
PCDF : PolyChloroDibenzoFuranes
PEAT : Pôle d'Expérimentations Avicoles de Tours
pH : Potentiel hydrogène
Phe : Phénanthrène
POP : Polluant Organique Persistant
PV : Poids Vif = BW
Pyr : Pyrène
QL : Quantification Limit (= LOQ)
R^2 : Coefficient de détermination
RBA : Relative BioAvailability
RFB : Retardateur de Flammes Bromé
RSD : Residual Standard Deviation
SAR : Relations Structure-Activité
SCCP : Short-Chain Chlorinated Paraffin = paraffines chlorées à courtes chaines
SIM : Selected Ion-Monitoring
SPE : Solid Phase Extraction
$t_{1/2}$: temps de demi-vie
TA : Tissue Adipeux
TEF : Facteurs d'Equivalent Toxique
TEQ : Toxic Equivalent Quotient
UR AFPA : Unité de Recherche Animal et Fonctionnalités des Produits Animaux
US-EPA : United State Environment Protection Agency
VLDL : Very Low Density Lipoprotein
Y_max : taille maximale vers laquelle tend le jaune en fin de dernière phase de croissance
Y_min : taille du jaune à son entrée en dernière phase de croissance

Liste des abréviations et noms utilisés dans le modèle (Chapitre III)

(Liste contenue dans l'annexe mobile)

- ***A*** : scénario correspondant à une exposition accidentelle
- ***alpha*** : constante de proportionnalité intervenant dans l'expression de la vitesse minimale de dépôt de jaune (V_min)
- ***b_molting1*** : marque le début de la 1ère mue
- ***b_molting2*** : marque le début de la 2ème mue
- ***Box_POP_yolk*** : Cumul de POP éliminés *via* les jaunes d'œuf pondus par la poule (de t=0 à t)
- ***Box_yolk*** : dépôt cumulé de constituants du jaune pour l'ensemble des jaunes pondus par la poule (de t=0 à t)
- ***BW*** : poids vif de la poule au temps t
- ***BW_max*** : poids vif maximal
- ***BW_min*** : poids vif initial en début de croissance
- ***BW_min_molting*** : poids vif minimal atteint pendant la mue
- ***C*** : scénario correspondant à une exposition chronique
- ***concentration_POP_central*** : Concentration de POP dans le compartiment central
- ***concentration_POP_fat*** : Concentration de POP dans le compartiment gras
- ***concentration_POP_yolk[i]*** : Concentration de POP dans le jaune i en formation
- ***Contamination*** : indique s'il y a contamination ou non
- ***Cycle*** : détermine le numéro du cycle de ponte, ce qui indique quel jeu de paramètres caractérise la fréquence de ponte
- ***daily_concentration_POP_yolk*** : Concentration de POP dans le jaune pondu au jour t
- ***daily_POP_yolk_layed*** : Quantité de POP excrétés dans le jaune pondu au temps t
- ***daily_POP_yolk_ovulated*** : Quantité de POP excrétés dans le jaune ovulé au temps t
- ***daily_yolk_ovulated*** : quantité de jaune ovulé au temps t
- ***daily_yolk_layed*** : quantité de jaune pondu au temps t
- ***day_pause*** : absence de ponte ce jour
- ***d_contamine*** : durée de la période de contamination
- E^+ : niveau d'engraissement élevé
- E^- : niveau d'engraissement faible
- ***e_molting1*** : marque la fin de la 1ère mue
- ***e_molting2*** : marque la fin de la 2ème mue
- ***Exposition*** : détermine la période durant laquelle la poule ingère une dose quotidienne de POP
- ***F*** : concentration dans le tissu adipeux
- ***Growth_in_yolk[1..20]*** : dépôt cumulé de constituants du jaune pour un jaune i donné (=Y_growth[1..20])
- ***Initialization*** : déclenche l'entrée en croissance d'un jaune, au maximum, par jour
- $I_{p/e}$: indicateur représentatif de l'état des flux de lipides sortant par rapport à la masse lipidique stockée
- ***k_BW_lost*** : part maximale du poids vif perdue lors d'un événement de mue
- ***k_absorption*** : coefficient d'absorption
- ***k_central*** : part du poids vif représentant les lipides du compartiment central
- ***k_central_molting*** : part du poids vif représentant les lipides du compartiment central durant la mue
- ***k_cycle[NumCycle,1]*** : valeur maximale prise par la longueur maximale de la série
- ***k_cycle[NumCycle,2]*** : vitesse à laquelle les séries s'allongent
- ***k_cycle[NumCycle,3]*** : âge auquel les séries sont à 50% de la longueur de la série maximale
- ***k_cycle[NumCycle,4]*** : vitesse à laquelle la longueur de la série maximale diminue
- ***k_cycle[NumCycle,5]*** : âge auquel la longueur de la série a diminué de 50% par rapport à la longueur maximale
- ***k_elimination_clearance*** : coefficient d'élimination du compartiment central (métabolisme, retour biliaire…)
- ***k_elimination_yolk*** : coefficient d'élimination du compartiment central vers les jaunes d'œufs
- ***k_fat*** : part du poids vif représentant les lipides du compartiment tissu adipeux hors mue

- ***k_fat_molting*** : part du poids vif représentant les lipides du compartiment tissu adipeux durant la mue
- ***k_fat_var*** : part du poids vif représentant les lipides du compartiment tissu adipeux
- ***k_growth _yolk*** : taux fractionnaire de croissance du jaune
- ***k_growth_BW*** : vitesse de prise de poids vif durant la croissance de la poule
- ***k_matrix_amount_ingested*** : quantité de matrice ingérée
- ***k_matrix_bioavailability*** : fraction de POP biodisponible dans la matrice ingérée
- ***k_matrix_concentration*** : concentration de POP dans la matrice ingérée
- ***k_mobilization*** : coefficient de transfert du compartiment gras vers le compartiment central
- ***k_storage*** : coefficient de transfert du compartiment central vers le compartiment gras
- ***k_Y_max*** : taille vers laquelle tend le jaune d'œuf en fin de croissance
- ***k_Y_min*** : taille du jaune d'œuf en début de dernière phase de croissance
- ***k_Y_lip*** : part de lipides dans le jaune d'œuf
- ***MaxEgg*** : nombre maximal de jaunes entrant en croissance quotidiennement
- ***m_molting*** : durée de la chute de poids vif à partir du 1er jour de mue
- ***Molt*** : déclenche la mue
- ***Molting*** : indicateur de la mue
- ***NumCycle*** : indique le numéro de la saison de ponte
- ***Ovulation*** : stoppe la croissance du jaune lorsqu'il est considéré comme mûr
- ***P*** : correspond à la réponse du modèle suite à la variation d'un paramètre donné
- P^+: niveau de ponte élevé
- P^- : niveau de ponte faible
- ***POP_absorption*** : Quantité de POP absorbée
- ***POP_central*** : Quantité de POP présente dans le compartiment central
- ***POP_clearance*** : Quantité de POP éliminée du compartiment central (par métabolisme, retour biliaire…)
- ***POP_excretion*** : Quantité de POP non absorbée, directement excrétée *via* les fèces
- ***POP_fat*** : Quantité de POP présente dans le compartiment tissu adipeux
- ***POP_ingestion*** : Quantité de POP ingérée
- ***POP_Y_growth[i]*** : Quantité de POP présents dans le jaune d'œuf i en formation
- Q_p : quantité de lipides exportés *via* la ponte (en g sur 100 jours)
- Q_e : quantité de lipides stockés dans le tissu adipeux (en g)
- ***R*** *:* correspond à la réponse du modèle avec les valeurs de référence des paramètres
- ***sequence_length*** : longueur de la série
- ***Smax_length*** : longueur de la série maximale
- ***Smin*** : durée minimale d'une série
- ***t_half_BW*** : âge pour lequel la poule a atteint 50% de son poids vif maximal
- ***ti_contamine*** : premier jour de contamination
- ***V_central*** : taille lipidique du compartiment central (en période de ponte ou en mue)
- ***V_fat*** : taille lipidique du tissu adipeux (en période de ponte ou en mue)
- ***v_min*** : vitesse minimale de formation du jaune en-dessous de laquelle le jaune est considéré mûr pour être ovulé
- ***Y*** : concentration de POP dans le jaune d'œuf
- ***Y/F*** : ratio des concentrations de POP dans le jaune d'œuf et dans le tissu adipeux
- ***Y_growth [1..20]*** : dépôt cumulé de constituants du jaune pour un jaune i donné

Liste des figures

Liste des figures du chapitre I

Figure I- 1 : Structure chimique de quelques POP 33
Figure I- 2 : Evolution du log K_{ow} au sein de trois familles de POP 33
Figure I- 3 : Contribution (en %) de différents aliments à l'exposition de la population française aux PCDD/F et PCB-DL (AFSSA, 2005) 35
Figure I- 4 : Teneurs en PCDD/F, PCB-DL et PBDE des œufs collectés dans 34 élevages professionnels et 10 élevages familiaux (Travel *et al.,* 2008) 38
Figure I- 5 : Evolution de l'effectif de poules pondeuses des différents modes d'élevages alternatifs en France de 1993 à 2008 40
Figure I- 6 : Part des systèmes alternatifs dans certains Etats membres de l'Union Européenne en 2008 40
Figure I- 7 : Part des différents types d'œufs dans la consommation d'œufs en coquilles dans différents Etats membres de l'Union Européenne en 2007 40
Figure I- 8 : Evolution de la concentration de PCB-I dans les œufs de poules élevées en plein air en fonction de la concentration de PCB-I dans le sol prélevé sur les parcours 42
Figure I- 9 : Evolution de la concentration de PCDD/F dans les œufs de poules élevées en plein air en fonction de la concentration de PCDD/F dans le sol prélevé sur les parcours 43
Figure I- 10 : Schéma synthétisant les relations existantes entre les différentes composantes du système d'élevage sur parcours 46
Figure I- 11 : Diagramme schématique illustrant (A) les mécanismes de solubilisation et libération des POP liés aux particules de sol dans la lumière de l'intestin et (B) les mécanismes de transport des molécules de la lumière de l'intestin jusqu'à la circulation systémique (d'après Holman *et al.,* 2002) 49
Figure I- 12 : Relation entre le log Kow des molécules PCB et leur assimilation intestinale . 54
Figure I- 13 : Modèle conceptuel du processus de biodisponibilité orale 56
Figure I- 14 : Paramètres agissant sur les processus de bioaccumulation d'un xénobiotique.. 64
Figure I- 15 : Schéma général du métabolisme de phase I et de phase II 66
Figure I- 16 : Dénomination des sites de chloration des PCB 70
Figure I- 17 : Visualisation de la structure en anneaux du jaune, ... 73
Figure I- 18 : Grappe de follicules à différents stades de développement 73
Figure I- 19 : Structure de la paroi d'un follicule en phase d'accroissement rapide 74
Figure I- 20 : Représentation de l'oviducte de poule et de la séquence spatiale et temporelle de la formation de l'œuf 75
Figure I- 21 : Transport des lipides chez l'oiseau (Hermier, 1994) 76
Figure I- 22 : Devenir des xénobiotiques et facteurs influençant chaque processus à l'échelle de l'élevage et de la poule pondeuse 79
Figure I- 23 : Schéma récapitulatif des principaux facteurs liés au sol, à la molécule et à l'animal, intervenant dans les différentes étapes du transfert des POP au sein de l'animal 80
Figure I- 24 : Représentation d'un modèle toxicocinétique à un compartiment représentant l'animal 84
Figure I- 25 : Représentation d'un modèle à deux compartiments représentant l'animal 86
Figure I- 26 : A- structure du modèle à compartiments de Clark *et al.,* 1987 ; B- structure du modèle à compartiments de Van Eijkeren *et al*., 2006 87
Figure I- 27 : Structure du modèle PBPK développé par MacLachlan (2010) 89
Figure I- 28: Synthèse des modèles existants pour représenter le transfert de POP chez l'oiseau 95

Liste des figures du chapitre II

Figure II- 1 : Response of PCBs 28, 52, 101 and 118 concentration in egg yolk[1], in abdominal fat[2] and in liver[3] ($ng.g^{-1}$ fat) to the amount ingested originating from contaminated soil or from contaminated oil ($ng.d^{-1}$) 132
Figure II- 2 : Response PCBs 138, 153, 180 and indicator PCBs concentration in egg yolk[1], in abdominal fat[2] and in liver[3] ($ng.g^{-1}$ fat) to the amount ingested originating from contaminated soil or from contaminated oil ($ng.d^{-1}$) 133
Fig.1. Dates of collection of eggs after the 1- and 3-day exposure periods starting at day 0 and status of eggs at time of first dosing ……139
Fig.2. Concentration of PAHs and metabolites in yolks collected from hens orally exposed to 2 mg Phe, Pyr and B[a]P or 3 mg $lindane.kg^{-1}$ body weight daily during 1 or 3 days from day 0 …….....142
Figure II- 3 : Kinetics of α- and γ-HBCD in egg yolk during exposure (21 days) and depuration (18 days)..... 155
Figure II- 4 : Kinetics of α- and γ-HBCD in abdominal fat during exposure (21 days) and depuration (18 days)..... 155
Figure II- 5 : Kinetics of α- and γ-HBCD in liver during exposure (21 days) and depuration (18 days)..... 156

Liste des figures du chapitre III

Figure III- 1 : Représentation graphique du principe de modélisation de l'accroissement du jaune d'œuf (en g de poids frais) au cours de sa dernière phase de croissance..... 166
Figure III- 2 : Représentation de l'entrée successive des jaunes en croissance (avec un délai d'un jour)..... 167
Figure III- 3 : Représentation graphique du principe de modélisation de l'évolution de la longueur de la série (en jours) en fonction de l'âge de la poule..... 168
Figure III- 4 : Evolution qualitative schématique des caractéristiques physiologiques modifiées lors d'une période de mue (d'après Sauveur, 1988)..... 169
Figure III- 5 : Logigramme présentant les conditions physiologiques et la succession des évènements et processus liées à la croissance du jaune menant à la ponte d'un œuf 170
Figure III- 6 : Diagramme du modèle 174
Figure III- 7 : Récapitulatif des différentes catégories d'entrées et de sorties du modèle 185
Figure III- 8 : Détermination de la période de ponte régulière commune à chacun des niveaux de ponte étudiés..... 190
Figure III- 9 : Schéma récapitulatif de l'évolution des paramètres physiologiques simulés en fonction du temps 192
Figure III- 10 : Représentation des cycles de ponte *via* le suivi de la longueur des séries et de la ponte des jaunes d'œuf..... 193
Figure III- 11 : Représentation de l'entrée successive en dernière phase de croissance des jaunes d'œuf en début et fin de la première période de ponte..... 193
Figure III- 12 : Relation entre la croissance moyenne du poids vif mesuré (ISA Brown) et la croissance simulée par le modèle 194
Figure III- 13 : Relation entre le poids moyen mesuré des jaunes de la grappe (Fournier *et al.*, 2010) et leur poids simulée par le modèle..... 194
Figure III- 14 : Cinétique des concentrations de PCB-I dans l'œuf (A) et dans le tissu adipeux (B) ajustée pour une ingestion quotidienne de 121g d'aliment contenant 14,2 ng PCB-I $.g^{-1}$ (Traag *et al.*, 2004)..... 195
Figure III- 15 : Confrontation des données de concentrations de PCB-I dans les jaunes d'œuf prédites par le modèle et des concentrations observées dans l'étude de Traag *et al.* (2004). 196

Figure III- 16 : Evolution des concentrations dans le tissu adipeux et le jaune d'œuf pour une poule dont les caractéristiques sont définies par les paramètres de référence et qui subit une période de contamination (de t=0 à 300 jours) suivie d'une période de décontamination (à partir de t=300 jours). 196
Figure III- 17 : Evolution des flux de stockage et de mobilisation (en ng/j) intervenant entre les compartiments « central » et « tissu adipeux » en période de contamination suivie d'une période de décontamination, pour un taux d'engraissement de 17,5% du poids vif (k_fat = 0,175) 199
Figure III- 18 : Cinétiques des concentrations de PCB-I dans le jaune d'œuf et dans le tissu adipeux pour des poules pondeuses présentant une diminution du taux de ponte plus ou moins précoce, caractérisée par un k_cycle[1,5] variant de 280 à 380 jours 200
Figure III- 19 : Succession des phases des cinétiques des concentrations de PCB-I dans le tissu adipeux et dans le jaune, simulées au cours de la vie d'une poule (de la naissance à la fin de son deuxième cycle de ponte), présentant des niveaux d'engraissement (**E**$^+$) et de ponte (**P**$^+$) élevés et soumise à une exposition chronique (C) de PCB-I 203
Figure III- 20 : Cinétiques des concentrations de PCB-I dans le tissu adipeux (a) et dans le jaune d'œuf (b) selon différents niveaux d'engraissement chez des poules soumises à une contamination chronique 204
Figure III- 21 : Cinétiques de concentration de PCB-I dans le tissu adipeux (a) et dans le jaune d'œuf (b) selon les niveaux d'engraissement chez des poules soumises à une contamination accidentelle : zoom de t=200 à 450 jours 205
Figure III- 22 : Cinétiques des concentrations de PCB-I dans le tissu adipeux (a) et dans le jaune d'œuf (b) selon les niveaux d'engraissement chez des poules soumises à une contamination accidentelle de t=250 à 330 jours. 206
Figure III- 23 : Cinétiques des concentrations de PCB-I dans le tissu adipeux (a) et dans le jaune d'œuf (b) selon le niveau de ponte chez des poules soumises à une contamination chronique 207
Figure III- 24 : Cinétiques des concentrations de PCB-I dans le tissu adipeux (a) et dans le jaune d'œuf (b) selon le niveau de ponte chez des poules soumises à une contamination accidentelle 208
Figure III- 25 : Amplitude des concentrations entre t= 330 jours et t=400 jours en fonction de l'indice $I_{p/e}$ (en %)1 212
Figure III- 26 : Cinétiques des concentrations de PCB-I dans le tissu adipeux (a) et dans le jaune d'œuf (b) simulées au cours de la vie de poules présentant deux niveaux d'engraissement et de ponte différents, soumises à une exposition chronique (C) 213
Figure III- 27 : Cinétiques des concentrations de PCB-I dans le tissu adipeux (a) et dans le jaune (b), simulées au cours de la vie de poules présentant deux niveaux d'engraissement et de ponte différents, soumises à une exposition accidentelle de 80 jours (A) 214
Figure III- 28 : Comparaison des cinétiques des concentrations de PCB-I dans le tissu adipeux et dans le jaune, simulées au cours de la vie (de la naissance à la fin de son deuxième cycle de ponte) d'une poule exposée dès son premier jour de vie et d'une poule exposée à partir de 18 semaines 216

Liste des figures du chapitre IV

Figure IV- 1 : Simulations ajustées sur les cinétiques observées de contamination et de décontamination de deux congénères de PCB (a : PCB 52 ; b : PCB 153) 223
Figure IV- 2 : Confrontation des concentrations simulées aux observées (données issues de l'expérimentation décrite au chapitre II) 224
Figure IV- 3 : Cinétiques simulées des concentrations de POP dans l'œuf suivant la propension à être métabolisée de la molécule (caractérisée par un paramètre 0,001 ou1), la

consommation quotidienne de sol par la poule (2 ou 30 g) et la disponibilité relative des polluants du sol (0,4 ou 1) 227
Figure IV- 4 : Cinétiques des concentrations de PCB-NDL simulées dans le jaune d'œuf, suite à l'ingestion quotidienne de 0,5 ; 1,0 ; 1,5 et 2,0 g de sol contaminé à 652 ng PCB-NDL.g-1 MS 230
Figure IV- 5 : Confrontation des cinétiques de décontamination de PCB-NDL simulée vs observée 232
Figure IV- 6 : Concentrations de HBCD simulées dans le jaune d'œuf suite à une exposition de 1mg par jour et par poule 233

Liste des tableaux

Liste des tableaux du chapitre I

Tableau I- 1 : Polluants Organiques Persistants référencés dans la Convention de Stockholm et le Protocole d'Aarhus et leurs valeurs limites maximales règlementaires dans les aliments pour animaux et les œufs de consommation 36
Tableau I- 2 : Récapitulatif des voies d'exposition des oiseaux aux polluants et contribution 44
Tableau I- 3 : Facteurs relatifs aux pratiques d'élevages influant sur la quantité de sol ingéré par la poule pondeuse en élevage plein air 45
Tableau I- 4 : Facteurs relatifs aux pratiques d'élevage influant sur les paramètres physiologiques de la poule pondeuse 45
Tableau I- 5 : Facteurs influant sur la bioaccessibilité des POP présents dans la matrice contaminée ingérée 50
Tableau I- 6 : Synthèse des principaux facteurs influençant la distribution des POP au sein de l'animal 64
Tableau I- 7 : Classification des PCB reliant les caractéristiques structurelles et leur capacité à être métabolisés (d'après Borlakoglu *et al*., 1989 ; Braune et Norstrom, 1989 ; Rozemeijer *et al.*, 1995 ; Drouillard, 2001; Borga *et al.*, 2005) – Application aux PCB-I. 70
Tableau I- 8 : Composition du jaune d'œuf (Sauveur, 1988) 72
Tableau I- 9 : Facteurs influençant l'élimination des POP via la production d'œuf 77
Tableau I- 10 : Paramètres caractérisant la bioconcentration de l'animal 84
Tableau I- 11: Comparaison synthétique des intérêts (vert) et limites (rouges) de quelques caractéristiques des différents types de modèles toxicocinétiques 92
Tableau I- 12 : Intégration des paramètres liés à la physiologie de la poule et aux propriétés de la molécule, dans chacun des modèles de transfert existant chez l'oiseau 100
Tableau I- 13 : Paramètres principaux utilisés pour chaque étape du transfert et leurs variations en fonction des paramètres physiologiques de la poule (rouge) et des propriétés de la molécule (bleu) 103

Liste des tableaux du chapitre II

Table II- 1 : Composition and contamination level of the experimental diets 126
Table II- 2 : Parameters of the linear response of indicator PCBs concentration in egg yolk and in abdominal fat ($ng.g^{-1}$ fat) to the amount of ingested indicator PCBs ($\mu g.d^{-1}$) originating from contaminated soil or from contaminated oil 130
Table II- 3 : Parameters of the linear response of indicator PCBs concentration in liver ($ng.g^{-1}$ fat) to the amount of ingested indicator PCBs ($\mu g.d^{-1}$) originating from contaminated oil ... 131
Table 1: Statistical significance of the effects of exposure duration (1 *vs* 3 days) and of date of egg collection on B[a]P, Lindane, 2-OH Phe and 1-OH Pyr concentration in egg yolk and of exposure duration (1 *vs* 3 days) on Phe, Pyr and 3-OH Pyr concentration in egg yolk….143
Table 2: Parameters of the linear relationship between the flow of PAHs or metabolites and of yolk in eggs collected from hens orally exposed to 2 mg Phe, Pyr and $B[a]P.kg^{-1}$ body weight daily 3 days from day 0……..143
Table II- 4 : Concentration of target analytes and internal standards in calibration solutions (in $pg.L^{-1}$) 152
Table II- 5 : Concentration ($pg.g^{-1}$ lw) of α- and γ-HBCD in egg yolk, in abdominal fat and in liver 154

Liste des tableaux du chapitre III

Tableau III- 1 : Caractéristiques physiologiques identifiées[a] et représentées[b] dans le modèle 164

Tableau III- 2 : Paramètres impliqués dans la modélisation des caractéristiques physiologiques 165
Tableau III- 3 : Description des variables et compartiments relatifs à la physiologie de la poule 175
Tableau III- 4 : Description des variables et compartiments relatifs aux flux de polluants... 176
Tableau III- 5 : Description des événements pilotant l'exposition de la poule aux POP et les variations physiologiques de la poule 176
Tableau III- 6 : Equations des variables et compartiments impliqués dans la représentation de la physiologie de la poule 177
Tableau III- 7 : Expressions des quantités et concentrations de POP dans les différents compartiments 178
Tableau III- 8 : Description de l'ensemble des paramètres d'entrée du modèle 179
Tableau III- 9 : Descriptif du contenu du compartiment « central » 180
Tableau III- 10 : Valeurs des paramètres physiologiques issues de la calibration du modèle 182
Tableau III- 11 : Valeurs des paramètres de ponte au cours de trois cycles successifs 183
Tableau III- 12 : Valeurs ajustées des paramètres décrivant les flux de POP au sein de l'animal 184
Tableau III- 13 : Liste des intervalles de variations des paramètres testés lors de l'analyse de sensibilité 186
Tableau III- 14 : Valeurs des paramètres de contamination utilisés pour effectuer l'analyse de sensibilité des paramètres intervenant dans les mécanismes physiologiques (et dans les flux de POP chez la poule) 186
Tableau III- 15 : Valeurs des paramètres représentant une exposition chronique et une exposition accidentelle 188
Tableau III- 16 : Valeurs des paramètres représentant la gamme de niveaux d'engraissement 189
Tableau III- 17 : Valeurs des paramètres représentant la gamme de niveaux de ponte 189
Tableau III- 18 : Quatre scenarii résultant de la combinaison des niveaux de ponte et d'engraissement extrêmes 191
Tableau III- 19 : Récapitulatif des huit scenarii étudiés 191
Tableau III- 20 : Résultats de l'analyse de sensibilité : impact des paramètres physiologiques sur les concentrations de POP dans les tissus. 197
Tableau III- 21 : Résultats de l'analyse de sensibilité : impact des paramètres caractérisant les flux de POP sur les concentrations de POP dans les tissus. 198
Tableau III- 22 : Variations des concentrations de PCB-I (en %) dans le tissu adipeux et dans le jaune d'œuf lors d'une variation de 26% de lipides stockés (au niveau du tissu adipeux) ou de 26% de lipides exportés *via* la ponte, pour les différents temps d'étude de l'exposition chronique (t= 160, 250, 300, 350 et 400 jours) 209
Tableau III- 23 : Calcul des amplitudes des concentrations dans le tissu adipeux et le jaune d'œuf entre les jours J160 et J400 lors d'une exposition chronique 210
Tableau III- 24 : Variations des concentrations de PCB-I (en %) dans le tissu adipeux et dans le jaune d'œuf lors d'une variation de 26% de lipides stockés (au niveau du tissu adipeux) ou de 26% de lipides exportés *via* la ponte, pour les différents temps d'étude de l'exposition accidentelle (t= 290, 330, 360, 400 jours) 210
Tableau III- 25 : Calcul des amplitudes des concentrations dans le tissu adipeux et le jaune d'œuf entre les jours J330 et J400, suite à une exposition accidentelle 211

Liste des tableaux du chapitre IV

Tableau IV- 1 : Valeurs des paramètres de contamination de HBCD fixées par le protocole 225
Tableau IV- 2 : Valeurs des paramètres ajustées sur la cinétique des concentrations de HBCD 225

Tableau IV- 3 : Descriptif des combinaisons de paramètres utilisées pour les estimations des concentrations au cours du temps..... 227
Tableau IV- 4 : Valeurs des paramètres de contamination de PCB-NDL 232

Introduction

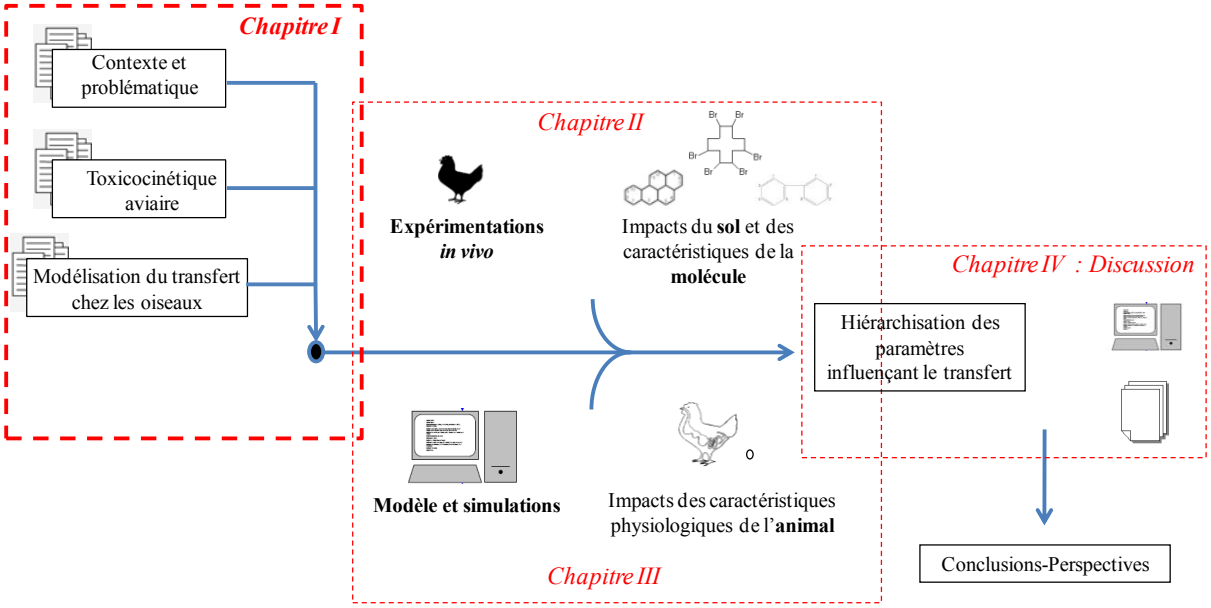
Les crises successives (ESB, dioxines, antibiotiques, …) ont sensibilisé les consommateurs à la sécurité sanitaire des aliments. Ces dernières années, divers scandales tels que la découverte de dioxines ou PCB (Poly-Chloro-Biphényles) dans des œufs en 1999 et l'Influenza aviaire en 2006 ont entaché l'image de la filière avicole dans l'esprit des consommateurs. Leur médiatisation auprès du public a eu des répercussions importantes sur les ventes des produits et sur l'équilibre économique des filières avicoles.

De façon générale, le consommateur manifeste plus de méfiance à l'égard de l'élevage industriel qu'à celui des élevages alternatifs (au sol ou en plein air). Pourtant, même si les grandes crises sanitaires sont susceptibles d'affecter les différents modes d'élevage (en batterie ou plein air), des études révèlent que l'élevage en plein air des poules pondeuses augmente le risque de contamination des œufs par des Polluants Organiques Persistants (POP), par rapport à l'élevage en claustration (Schoeters et Hoogenboom, 2006). En effet, le contrôle sanitaire, qu'il s'agisse de la santé des animaux ou la qualité sanitaire des produits, est moins aisé lorsque les animaux sont en contact avec l'environnement que lorsqu'ils sont élevés en claustration (EFSA, 2005). Parallèlement, les préoccupations du citoyen vis-à-vis du bien être animal, relayées par la réglementation (Directive 1999/74/CE), ont conduit à une modification substantielle des modes de production des œufs, aboutissant à une augmentation significative de la part des œufs issus des élevages en plein air.

L'enjeu est donc de taille pour la filière avicole qui est confrontée aux exigences du citoyen, soucieux de bien-être animal, et à celles du consommateur, exigeant des produits de qualité sanitaire irréprochable. Afin de pouvoir y répondre, il est indispensable de connaître et de comprendre les mécanismes mis en jeu lors de la contamination des produits, afin de la prévenir.

Dans ce contexte, nous nous intéressons pour ce travail de thèse, plus particulièrement aux POP. L'objectif est de progresser dans la compréhension des mécanismes mis en œuvre lors du transfert des POP chez la poule pondeuse, et d'en déterminer les facteurs de variation. Au final, dans le cadre de la gestion des risques, cette démarche représente une base pour aider à l'élaboration de stratégies à mettre en place pour prévenir les cas de contamination ou pour réagir suite à une crise sanitaire.

La première partie de notre travail consiste à effectuer une synthèse bibliographique nous permettant de faire le point sur les connaissances concernant le transfert des différentes familles de POP à l'échelle de la poule pondeuse, ainsi que sur ses facteurs de variation, notamment ceux liés à la molécule et à la physiologie de l'animal. Après avoir présenté notre démarche de travail, un deuxième chapitre aborde, *via* la conduite de trois expérimentations *in vivo,* la biodisponibilité des POP du sol et le transfert de molécules non étudiées chez la poule pondeuse en milieu contrôlé, avec pour objectif de préciser l'impact du métabolisme de la molécule sur le transfert. Ensuite un modèle mathématique est construit pour explorer l'impact des caractéristiques physiologiques de la poule sur le transfert des POP. La discussion de l'ensemble de ces résultats nous permet de comparer les facteurs de variation du transfert de POP vers l'œuf, d'appliquer le modèle à des cas concrets de gestion de crise et de conclure quant à la pertinence de compléter le modèle dans le cadre de l'évaluation et de la gestion des risques en système d'élevage.


Chapitre I
Contexte et problématique
Toxicocinétique aviaire
Modélisation du transfert chez les oiseaux
Chapitre II
Expérimentations in vivo
Impacts du sol et des caractéristiques de la molécule
Modèle et simulations
Impacts des caractéristiques physiologiques de l'animal
Chapitre III
Chapitre IV : Discussion
Hiérarchisation des paramètres influençant le transfert
Conclusions-Perspectives

Chapitre I : Synthèse bibliographique

1. Introduction

Les travaux de recherche sur l'évaluation du risque dans les élevages avicoles ont pour objectif d'améliorer notre compréhension du transfert de contaminants chez la poule pondeuse. Ils ont également pour ambition d'évaluer l'impact des différents facteurs (environnementaux, d'élevage) sur ce transfert, qui entraînent des concentrations différentes de contaminants dans les produits avicoles et notamment dans les œufs.

Le transfert de molécules au sein d'un individu est le résultat d'un ensemble de processus d'absorption (A), de distribution (D), de métabolisme (M) et d'excrétion (E), communément désigné par l'acronyme ADME. Les caractéristiques de l'exposition de l'animal à une molécule (dose, quantité et nature de la matrice vecteur du xénobiotique), ainsi que les caractéristiques de l'ADME pour cette même molécule chez cet individu, déterminent le niveau de concentration de contaminants dans l'œuf pondu par ce dernier.

Face aux origines variées des paramètres intervenant dans le processus ADME, la modélisation se présente alors comme un outil méthodologique pour nous aider à mieux comprendre les mécanismes mis en jeu lors du transfert de contaminants à l'échelle de l'individu. Les modèles de recherche élaborés peuvent aussi, par la suite, être des ressources pour évaluer l'impact des paramètres intervenant dans ces mécanismes (ADME) sur le transfert et également pour améliorer notre capacité à prédire ce transfert.

Depuis une trentaine d'années, plusieurs modèles de transfert, à différents niveaux de précision et de complexité, ont été développés chez les oiseaux, principalement dans un contexte d'étude du niveau de contamination environnementale.

Aussi l'objectif de cette synthèse bibliographique est-il de faire l'état de l'art sur le transfert de POP et ses facteurs de modulation chez la poule pondeuse, d'analyser comment les modèles existant prennent en compte ces facteurs dans la caractérisation des mécanismes ADME, et d'étudier dans quelle mesure ces mécanismes ADME sont représentés.

Cette synthèse débute avec un état des lieux de la contamination en Polluants Organiques Persistants (POP) de la filière avicole, en passant en revue la diversité des molécules et les voies d'exposition auxquelles sont potentiellement exposées les poules pondeuses. Dans une deuxième partie, les différents mécanismes du transfert des molécules au sein de l'animal influençant le niveau de contamination des produits avicoles sont décrits. Face au nombre de données restreint concernant le transfert de xénobiotiques ou le niveau de contamination des

produits avicoles, les études choisies pour illustrer les mécanismes ADME portent de façon plus générale sur les oiseaux et, en cas d'absence d'études chez les espèces aviaires, certaines données provenant d'études chez les mammifères (notamment chez le rat ou chez l'homme) pourront être rapportées.

Ensuite, les modèles de transfert de xénobiotiques chez l'oiseau sont étudiés afin de mettre en exergue les avantages et les limites de chacun d'eux pour étudier les cinétiques de transfert de POP vers l'œuf. Pour finir, cette partie bibliographique propose une démarche pour étudier et hiérarchiser l'impact des principaux facteurs liés à la physiologie de l'animal et aux caractéristiques de la molécule, sur le transfert de contaminants vers l'œuf de poule.

2. Les Polluants Organiques Persistants : quel enjeu pour la filière avicole ?

2.1. Les POP

Au cours de l'élevage, les animaux peuvent se trouver en contact avec des substances chimiques, dont les Polluants Organiques Persistants (POP), susceptibles d'être transférées vers les denrées alimentaires d'origine animale. Présentes dans les produits animaux, ces substances, ainsi que leurs produits de dégradation ou métabolites, représentent un danger potentiel pour la santé des consommateurs, d'où la mise en place de règlementations pour certaines d'entre elles.

2.1.1. Nature, origines et propriétés

Le terme générique POP a été attribué à certaines substances chimiques organiques jugées préoccupantes pour la santé[1] par la règlementation internationale, au travers de deux textes réglementaires internationaux majeurs : le protocole d'Aarhus (1998) et la Convention de Stockholm (2001), révisée en 2009. Une combinaison de propriétés physiques et chimiques confère à ces molécules plusieurs caractéristiques communes une fois qu'elles sont présentes dans l'environnement. Sont notamment répertoriées : une stabilité dans les milieux pendant plusieurs années, une propension à migrer vers des milieux éloignés (en particulier par voie atmosphérique), une accumulation dans les tissus gras des organismes vivants, une bioaccumulation le long de la chaîne trophique et une toxicité. Les textes du protocole d'Aarhus (1998) et de la Convention de Stockholm[2] (2001) recensent ces substances qui se

[1] Les POP sont des molécules potentiellement cancérigènes et mutagènes.
[2] Convention mise à jour en mai 2009.

répartissent en trois grandes catégories que sont les pesticides, les produits chimiques industriels et des substances produites non intentionnellement par diverses activités humaines. La liste des POP est régulièrement mise à jour et complétée par l'ajout de nouvelles molécules (Tableau I-1).

2.1.2. Diversité des POP

Au-delà de leurs propriétés communes qui les caractérisent comme tels, les POP se distinguent les uns des autres par un comportement et un devenir qui leur sont propres au sein des matrices environnementales[3]. Ces différences s'observent entre deux familles de POP mais également au sein d'une même famille de molécules, telles que les polychlorobiphényles (PCB), les polychlorodibenzo-*para*-dioxines et polychlorodibenzo-*para*-furanes (PCDD/F), les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) ou les polybromodiphényléthers (PBDE) (Figure I-1, Tableau I-1). Cela s'explique principalement par des différences de composition et de structure entre molécule, influençant leur caractère lipophile[4] (Figure I-2) et leur propension à être métabolisées.

Ces particularités structurelles sont de types divers selon les grandes familles de POP considérées. Les PCDD/F comptent 210 composés. Certains d'entre eux, au nombre de 17, plus couramment étudiés car bioaccumulés et considérés comme les plus toxiques, diffèrent les uns des autres par le nombre (au moins 4 en position 2,3,7,8) et la position des atomes de chlore (Cl) sur les deux noyaux benzéniques. Les PCB constituent une famille de 209 congénères qui diffèrent entre eux par la position et le nombre d'atomes de chlore (1 à 10) associés à deux groupes phényles liés entre eux par une liaison covalente. Deux groupes, l'un de 12 PCB dioxin-like (PCB-DL) et l'autre de 6 PCB non dioxin-like (PCB-NDL), sont identifiés par l'Union Européenne. Les HAP sont constitués exclusivement d'atomes de carbone (C) et d'hydrogène (H) organisés sous forme de cycles aromatiques fusionnés. A l'origine, seize congénères ont été classés comme prioritaires par l'agence de la protection de l'environnement des Etats-Unis (US-EPA) en raison de leur toxicité dans l'environnement, mais la somme de quatre d'entre eux[5], reconnue par l'EFSA (2008) comme indicateurs de la présence et de la toxicité des HAP, est considérée en priorité dans la nourriture. Les HAP se distinguent les uns des autres par le nombre (2 à 6) et l'arrangement spatial des cycles. La

[3] Les matrices environnementales comprennent l'ensemble des matrices abiotiques et biotiques.
[4] Classiquement, la lipophilicité d'un POP est caractérisée par le logarithme du coefficient de partage « octanol-eau » noté log K_{ow}. Une molécule est considérée comme lipophile lorsque cette valeur est supérieure à 3.
[5] La somme des quatre HAP utilisée comme indicateur de la présence et de la toxicité des HAP dans la nourriture est constituée du benzo[a]pyrène, du benz[a]anthracène, du benzo[b]fluoranthène et du chrysène.

famille des PBDE comprend 209 congénères bromés dont le nombre et la localisation des atomes de brome (Br) varient. Deux groupes sont distingués : les PBDE légers (comportant au maximum 7 atomes de brome) et les PBDE lourds (comportant un minimum de 8 atomes de brome).

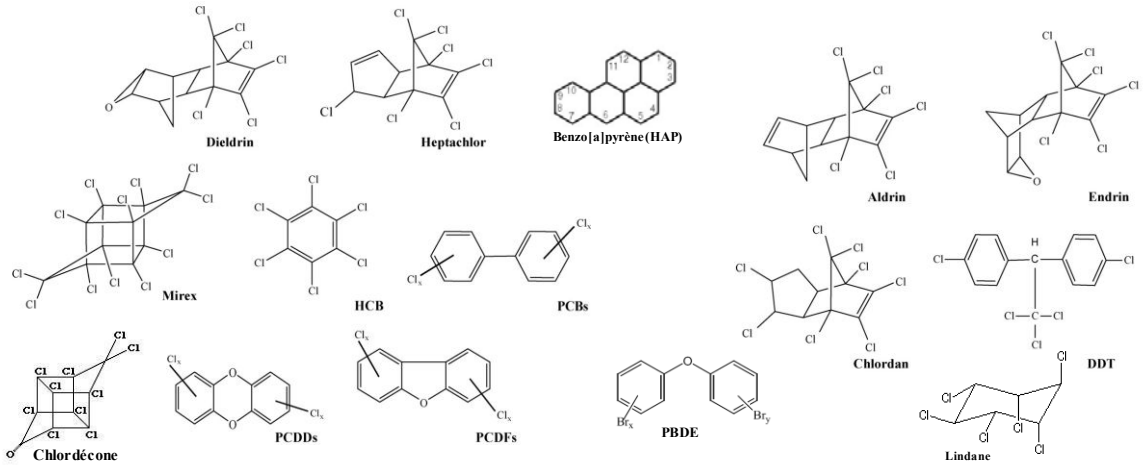


Figure I- 1 : Structure chimique de quelques POP

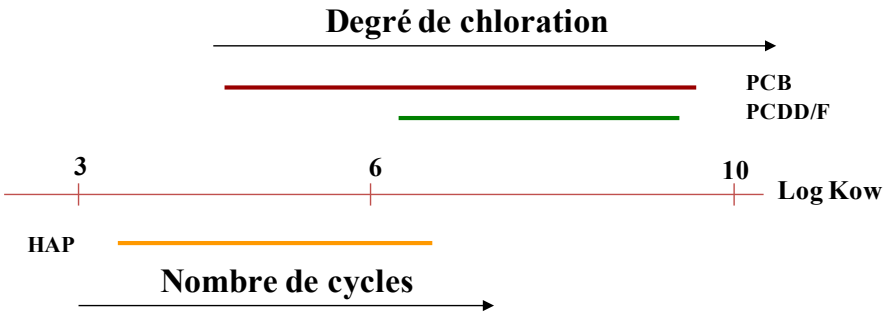


Figure I- 2 : Evolution du log K_{ow} au sein de trois familles de POP
(amplitude représentée pour les composés de ces familles habituellement étudiés)

2.1.3. Présence dans l'environnement

L'usage des pesticides[6] classés POP est, pour la plupart, interdit depuis plusieurs dizaines d'années en Europe. Cependant de par leur rémanence, ils sont encore présents dans certaines matrices environnementales (sol, végétaux), comme en témoignent certaines études, par exemple sur le lindane (Fabre, 2005) ou le chlordécone (Cabidoche *et al.*, 2009).

[6] Les pesticides concernés sont des molécules organo-halogénées et/ou hydrophobes.

En ce qui concerne les produits industriels, la situation est similaire avec des composés désormais interdits à la production, comme les PCB, mais qui ont été massivement utilisés des années 1930 aux années 1970 (adjuvant de certains pesticides, transformateurs électriques, condensateurs, fluides hydrauliques, additifs d'huile...). Garban *et al*. (2002, cités par Rychen *et al.*, 2005) rapportent par exemple que 30 % des PCB produits avant 1985[7] seraient encore présents dans l'environnement. De même, les retardateurs de flammes bromés (PBDE), malgré leur interdiction ces dernières années pour certains d'entre eux (Directive 2003/11/CE), sont encore présents dans de nombreux composés du quotidien. Ils sont retrouvés soit dans des produits datant d'avant l'interdiction ou bien suite à l'utilisation de décabromodiphenyléther (decaBDE) qui est la seule forme encore utilisée ces dernières années dans les plastiques et les textiles.

Quant à la dernière catégorie de POP, les substances involontairement produites lors de processus de combustion incomplète de matière organique (PCDD/F, HAP), leur émission tend à diminuer ces dernières années (CITEPA, 2007), mais les données disponibles sur ces molécules témoignent encore d'une contamination des milieux aquatiques, de l'air et du sol dans la plupart des régions françaises.

Les POP, de par leurs propriétés de transport et persistance, sont donc encore bien présents dans l'environnement de l'homme mais aussi des animaux d'élevage. Parmi toutes les voies d'exposition auxquelles le consommateur peut être soumis, il est reconnu que la principale voie est l'ingestion d'aliments contaminés, dont les œufs font partie. Ainsi, par exemple, il a été estimé que les œufs contribuaient pour 3 à 6 % de l'exposition de la population française aux PCDD/F et PCB-DL (Figure I-3). D'où la vigilance déployée par les autorités sanitaires et la réglementation établie.

[7] 1985 est la date de publication par l'Union Européenne d'une directive visant à limiter la mise sur le marché des PCB (Directive 85/467/CEE)

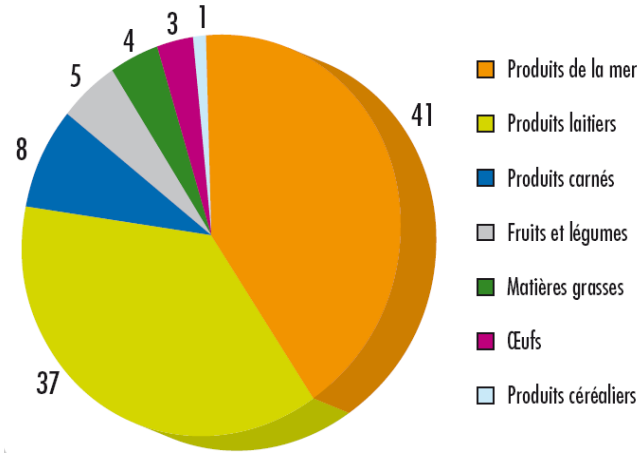


Figure I- 3 : Contribution (en %) de différents aliments à l'exposition de la population française aux PCDD/F et PCB-DL (AFSSA, 2005)

2.1.4. Règlementation

Certains POP sont interdits d'usage et de mise sur le marché (Protocole d'Aarhus, 1998 ; Convention de Stockholm, 2001) mais sont susceptibles d'être présents (ou à l'état de trace) non intentionnellement dans des substances, des préparations ou des articles. Aussi la législation européenne a-t-elle émis des valeurs seuils à ne pas dépasser concernant la présence involontaire de certains POP dans les matières premières et aliments destinés à l'alimentation des animaux (Directive 2002/32/CE modifiée par la Directive 2006/13/CE de la Commission du 3 février 2006 et Directive 2006/77/CE de la Commission du 29 septembre 2006) et dans les denrées alimentaires (Règlement CE 1881/2006). Les valeurs limites maximales règlementaires relatives aux POP, et existantes dans les produits sont reportées dans le tableau I-1.

Les molécules les moins bien documentées, notamment au niveau de leur toxicité, restent pour le moment non règlementées, c'est le cas des PBDE. D'autres molécules, comme les HAP, n'ont pas de concentrations maximales autorisées établies dans l'œuf, car la contribution de l'œuf à l'exposition humaine vis-à-vis de ces molécules n'est pas considérée comme significative.

Tableau I- 1 : Polluants Organiques Persistants référencés dans la Convention de Stockholm et le Protocole d'Aarhus et leurs valeurs limites maximales règlementaires dans les aliments pour animaux et les œufs de consommation

Catégories	**Molécules**	**Seuil règlementaire[a] dans les aliments pour animaux[f]**	**Seuil règlementaire[b,c,d,e] dans les œufs[g]**
Pesticides	aldrine + dieldrine	0,01	0,02
	chlordane	0,02	0,005
	dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT)	0,05	0,05
	endrine	0,01	0,005
	heptachlore	0,01	0,02
	hexachlorobenzène (HCB)	0,01	0,02
	mirex		
	toxaphène		0,02
	chlordecone		0,02
	alpha-hexachlorocyclohexane (α-HCH)	0,02	0,02
	beta-hexachlorocyclohexane (β-HCH)	0,01	0,01
	gamma-hexachlorocyclohexane (lindane)	0,2	0,01
	pentachlorobenzène		
Produits chimiques industriels	hexachlorobenzène (HCB)		0,02
	polychlorobiphényle (PCB)		*cf. co-produits*
	hexabromobiphényle (HBB)		
	polybromodiphényl-éther (PBDE)		
	pentachlorobenzène		
	acide perfluorooctane sulfonique et ses sels		
Co-produits	hexachlorobenzène (HCB)		0,02
	polychlorodibenzo-p-dioxines (PCDD)	} 0,75 } 0,5	} 3 | } 6
	polychlorodibenzofuranes (PCDF)		
	polychlorobiphényles dioxin-like (PCB-DL)		
	alpha-hexachlorocyclohexane (α-HCH)		
	beta-hexachlorocyclohexane (β-HCH)		
	hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)		
	pentachlorobenzène		
Proposés à la convention[8]	paraffines chlorées à courtes chaines (SCCP)		
	endosulfan		0,05
	hexabromocyclododécane (HBCD)		

[a] Directive 2002/32/CE modifiée par la Directive 2006/13/CE et la Directive 2006/77/CE
[b] Règlement CE 1881/2006
[c] Règlement CE 149/2008 modifiant le règlement CE 396/2005
[d] Règlement CE 839/2008 modifiant le règlement CE 396/2005
[e] Pour certaines molécules, la valeur règlementaire n'est pas spécifique à l'œuf et concerne l'ensemble des produits animaux (Règlement CE 149/2008 modifiant le règlement CE 396/2005)
[f] Valeurs exprimées en $\mu g.g^{-1}$ sauf les PCB-DL et PCDD/F exprimés en pg OMS TEQ[9].g^{-1} d'aliments pour animaux d'une teneur en humidité de 12%
[g] Valeurs exprimées en $\mu g.g^{-1}$ d'œuf sauf PCB-DL et PCDD/F exprimés en pg OMS TEQ.g^{-1} MG.

[8] Le 6ème Persistent Organic Pollutants Review Committee (POPRC) a rediscuté les 11-15 octobre 2010 de l'ajout de ces 3 substances proposés à la convention lors des comités précédents. Les conclusions sont :
- Recommandation de l'inscription de l'endosulfan à l'annexe A de la Convention,
- Adoption du profil de risques pour l'HBCD et poursuite de l'évaluation du risque,
- Aucune décision concernant les SCCP, poursuite de l'élaboration du descriptif des risques de l'Annexe E de la Convention.

[9] La toxicité d'un mélange est exprimée en équivalents toxiques (TEQ : Toxic Equivalent Quotient) de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), en utilisant les TEF-OMS (Facteurs d'Equivalent Toxique).
Le TEQ se calcule de la manière suivante : $TEQ = [\Sigma(PCDD_i) \times TEF_i] + [(PCDF_i) \times TEF_i]$, avec TEF qui est un coefficient de pondération indiquant le degré de toxicité par rapport au 2,3,7,8-TCDD, auquel une valeur de référence de 1 a été donné. Les valeurs de TEF-OMS sont établies pour l'évaluation des risques pour les êtres humains, fondées sur les conclusions de la réunion de l'OMS tenue à Stockholm (Suède), du 15 au 18 juin 1997 (Van den Berg *et al.,* 1998).

2.2. Les poules potentiellement exposées : quel enjeu pour la filière ?

2.2.1. Présence de POP dans les produits avicoles

Des dépassements importants des limites maximales réglementaires de PCB-DL et PCDD/F ont été relevés au moment de la crise belge en 1999 avec des teneurs dans les œufs atteignant 32 pg OMS-TEQ PCDD/F.g^{-1} MG. Bien qu'encore non règlementées, les teneurs en PCB-I dans les œufs avoisinaient quant à elles les 46 µg PCB-I.g^{-1} MG[10] (Bernard *et al.*, 2002 ; Esteve-Garcia et García-Regueiro, 2005 ; Schoeters et Hoogenboom, 2006). D'autres dépassements ont été constatés lors de l'utilisation d'argiles contaminées comme antimottant dans les aliments (Abad *et al*., 2002 ; Schmid *et al.,* 2002) ou encore lors de contamination environnementale. Ainsi, en France, des teneurs allant de 1,2 à 122 pg OMS-TEQ PCDD / F.g^{-1} MG ont été rapportées dans des œufs issus d'élevages de particuliers, dans des zones réputées contaminées par un incinérateur (Meunier, 2003 ; Pirard *et al.,* 2005 ; Apperry *et al.*, 2006). Par exemple, Meunier (2003) rapporte des concentrations de 6,4 à 54 pg OMS-TEQ. g^{-1} MG dans des œufs d'élevage de particuliers à Gilly sur Isère.

En dehors de ces situations accidentelles, les produits avicoles issus de poules d'élevage professionnel présentent généralement des teneurs en PCDD/F et PCB-DL très inférieures aux limites réglementaires. Des œufs issus de poules élevées en bâtiment, sans contact avec le milieu extérieur, contiennent 1 à 22 ng PCB-NDL.g^{-1} MG et moins de 1 pg OMS-TEQ PCDD/F.g^{-1} MG (EFSA, 2005 ; Thébault, 2005 ; Travel *et al.*, 2008).

Cependant, des enquêtes menées dans différents pays européens (Belgique, Suisse, Allemagne, Irlande, France, Suède, Royaume-Uni) révèlent une contamination d'œufs de poules ayant accès à l'extérieur par des PCDD/F plus importante que celle des œufs de poules en claustration (Schoeters et Hoogenboom, 2006). L'ingestion par les poules de matrices environnementales contaminées est alors avancée comme le principal facteur explicatif de la contamination des œufs. Sur des sols reconnus contaminés, en zone urbaine ou industrielle, des œufs excédant largement les 3 pg OMS-TEQ PCDD / F.g^{-1} MG ont été collectés (Schuler *et al.,* 1997 ; Harnly *et al.,* 2000 ; Pussemier *et al.,* 2004, Kan, 2005).

De Vries *et al.,* (2006) synthétisent des résultats d'enquêtes portant sur des élevages de type biologique menées aux Pays-Bas et en Belgique. Ils ont rapporté que des œufs dépassaient la limite réglementaire de 3 pg OMS-TEQ PCDD / F.g^{-1} MG dans 25% de ces élevages

[10] A titre indicatif, la réglementation en cours d'élaboration propose une limite dans l'œuf de 50 ng PCB-NDL/g MG (Afssa-saisine n°2006-SA-0305)

enquêtés. Ces résultats suggèrent ainsi une contamination possible y compris dans des zones rurales a priori assez peu contaminées. Plus récemment, des enquêtes[11], menées dans des élevages familiaux en Belgique, révèlent la sensibilité de ces systèmes d'élevage vis-à-vis des POP présents dans l'environnement (Van Overmeire *et al.,* 2009). La même observation a été faite en France par Travel *et al.* (2008), avec des teneurs en PCB, PCDD/F et PBDE environ 5 fois supérieures dans les élevages familiaux par rapport aux élevages professionnels (Figure I-4).

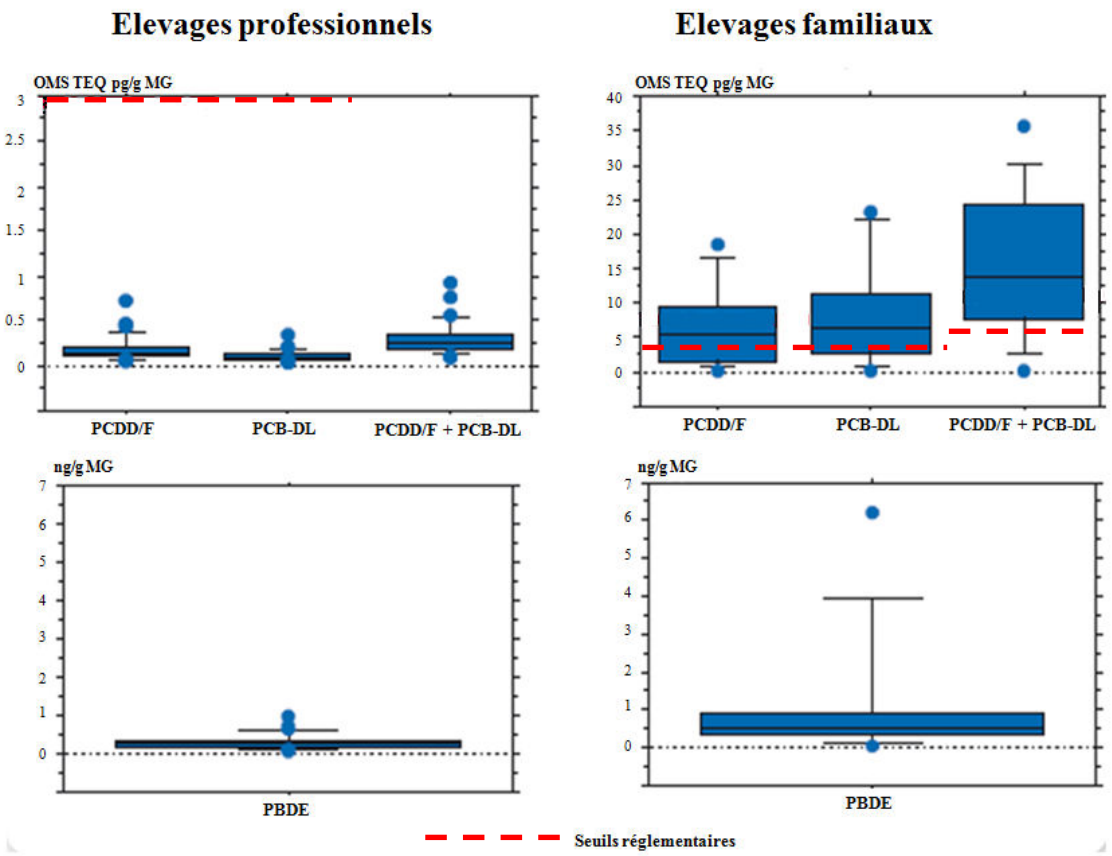


Figure I- 4 : Teneurs en PCDD/F, PCB-DL et PBDE des œufs collectés dans 34 élevages professionnels et 10 élevages familiaux (Travel *et al.,* 2008)

Les valeurs obtenues sont comparées aux valeurs maximales règlementaires lorsqu'elles existent (Règlement CE 1881/2006) de 3 pg OMS-TEQ PCDD/F / g MG et 6 pg OMS-TEQ PCDD/F + PCB-DL. g^{-1} MG

En ce qui concerne les POP non règlementés à l'heure actuelle, certains retardateurs de flammes, tels que les PBDE et l'HBCD, ont été retrouvés dans les œufs de poules d'élevages familiaux (Covaci *et al.*, 2009). Pour d'autres molécules, seul le constat de l'existence d'un transfert de ces molécules vers l'œuf peut être établi. Ainsi, aucune donnée sur la présence de HAP dans les produits avicoles n'est disponible dans la littérature (Kan et Meijer, 2007), seul

[11] Enquêtes réalisées en Belgique dans le cadre du projet CONTEGG (chemical CONTamination of home-produced chicken EGGs)

le rapport de l'étude CONTEGG a cherché d'éventuelles traces dans les œufs, qui se sont révélées inexistantes. Cependant, certains HAP sont retrouvés dans les œufs d'oiseaux de mer (Shore *et al.*, 1999) ce qui laisse supposer un transfert possible de ces substances.

Ainsi, les poules les plus contaminées par les polluants de l'environnement sont celles ayant accès à un parcours et parmi elles, les poules d'élevages familiaux présentent les niveaux de contamination les plus élevés.

2.2.2. Place des élevages alternatifs dans la filière

Certains cahiers des charges (Label Rouge, Plein Air, Biologique) imposent une sortie des animaux qui sont alors en contact avec diverses matrices environnementales, dont le sol. Parmi les élevages professionnels, ces pratiques de production dites alternatives ont fortement augmenté en France depuis les années 1990 (Figure I-5) et sont de plus en plus mises en œuvre en Europe (Figure I-6). En effet, en 2008, 19% des poules pondeuses élevées dans l'Union Européenne l'étaient dans des systèmes de type plein air (17%) ou biologique (2%). En France, ces pourcentages s'élevaient en 2008 et 2009 à respectivement 12-13 et 4-5% (Magdelaine *et al.,* 2010, 2011). Ce phénomène se répercute sur la part d'œufs en coquille consommés, issus de ces élevages. Cette dernière avoisine les 30% en France (Figure I-7). En raison de l'entrée en vigueur de la Directive bien être, on prévoit entre 2010 et 2012, une augmentation dans l'union Européenne de 35% des effectifs de poules biologiques (code 0) et de 25% des effectifs de poules élevées en plein air (code 1). En France la part des poules en cage diminuerait de 78 à 66% au bénéfice principal des élevages de type plein air (œufs de code 1 et 0). Ces chiffres montrent la place grandissante que prennent, ces dernières années, les élevages alternatifs, face à la demande du consommateur et exposent l'importance que prend la maîtrise du risque de contamination des œufs de ces élevages pour la filière.

Les élevages familiaux sont assez répandus en zone rurale, mais les données concernant leur recensement à l'échelle de la commune ne sont ni compilées, ni diffusées. Il reste donc difficile d'en évaluer le nombre exact.

Les élevages de poules ayant potentiellement accès à un parcours prennent une place de plus en plus grande dans la filière. Compte tenu des teneurs de POP retrouvés dans certains œufs issus de ces élevages (professionnels et familiaux), il est important de bien identifier les voies potentielles d'exposition des poules.

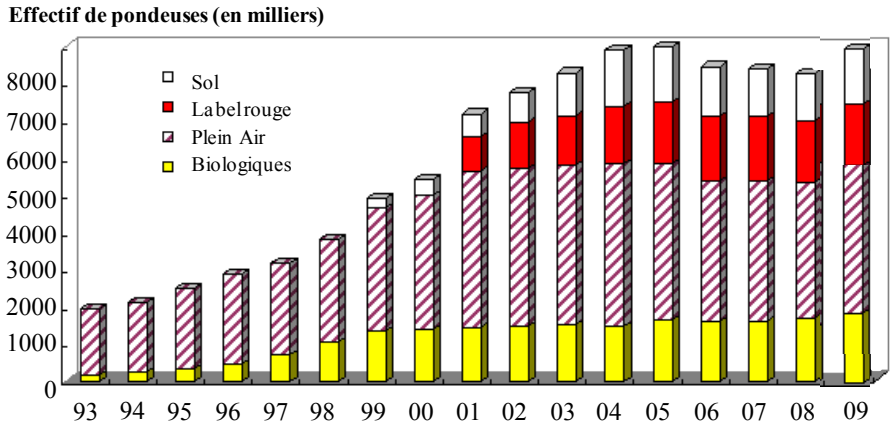


Figure I- 5 : Evolution de l'effectif de poules pondeuses des différents modes d'élevages alternatifs en France de 1993 à 2008
(ITAVI 2010, d'après Agence Bio, DGAL, Synalaf et enquêtes)

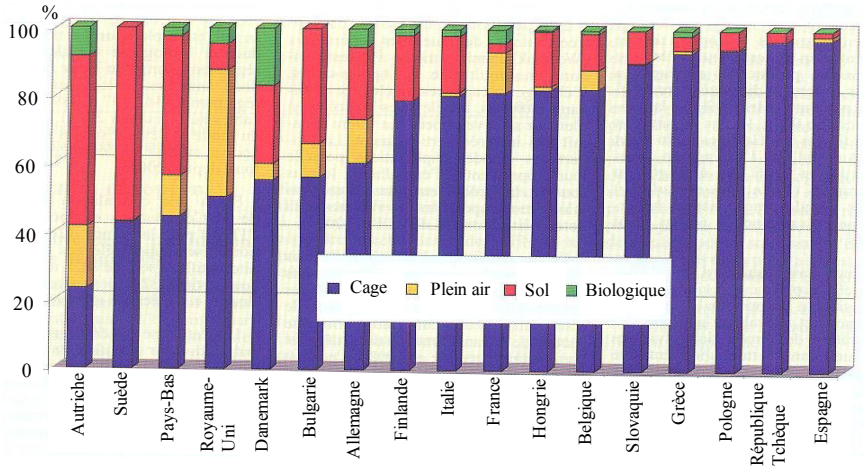


Figure I- 6 : Part des systèmes alternatifs dans certains Etats membres de l'Union Européenne en 2008
(ITAVI, d'après enquêtes et Commission européenne, cité par Magdelaine et Braine, 2010)

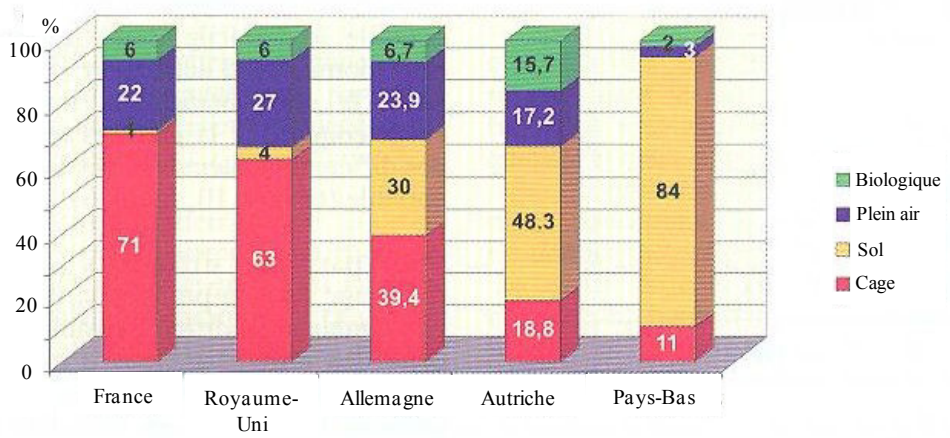


Figure I- 7 : Part des différents types d'œufs dans la consommation d'œufs en coquilles dans différents Etats membres de l'Union Européenne en 2007
(d'après Nielsen, BEIC (Britsh Egg Industry Council), Gfk (Institut d'étude de la consommation et de la distribution), ZMP, cité par Magdelaine et Braine, 2010)

2.2.3. Voies possibles d'exposition

2.2.3.1. Ingestion

Cette voie d'exposition est considérée comme étant de loin la plus importante (McLachlan *et al.*, 1990, Fries, 1995). Les POP peuvent être ingérés *via* l'ingestion d'aliment, de matrices environnementales ou encore de poussières, comme cela a été étudié chez l'homme (Roosens *et al.,* 2009).

2.2.3.1.1. Alimentation

Certains aliments peuvent être une source d'entrée de POP dans la chaîne alimentaire *via* l'animal : par exemple les céréales, tout comme le fourrage, peuvent être contaminées par les retombées atmosphériques de POP (Feidt *et al.,* 2005 ; Costera *et al.,* 2006). De façon plus générale, la contamination des aliments pour animaux par les POP a pour principales origines : la contamination de l'environnement liée à une activité ancienne, ou la contamination accidentelle liée à des déversements de quantités importantes par suite de fuites, de mauvaises pratiques de recyclage, d'explosions, d'incendies, de rejets fortuits ou de malveillance (AFSSA, 2005). Ce fut le cas lors de la crise belge de 1999 qui toucha la filière avicole. La source de contamination était alors l'utilisation d'huiles alimentaires contaminées par les PCB. Cependant, cette voie de contamination est ponctuelle et accidentelle. De plus, comme cela a été noté (Tableau I-1), la règlementation fixe des teneurs maximales dans les aliments pour animaux pour plusieurs de ces POP.

2.2.3.1.2. Matrices environnementales : végétaux, sol, pédofaune

Les poules d'élevage en plein air ont la possibilité d'ingérer des matrices environnementales présentes sur les parcours, telles que sols, végétaux, pédofaune, en parallèle de leur ration même si l'aliment à disposition répond à l'ensemble de leurs besoins nutritifs. Il a été observé précédemment une tendance à une contamination des œufs par les POP, plus élevée lorsque les animaux sont en plein air (Pussemier *et al.*, 2004 ; Kan, 2005). Ces augmentations sont particulièrement sensibles à proximité de zones urbaines ou industrielles (Pussemier *et al.*, 2004). Or, l'air et l'apport en eau et en nourriture sont les mêmes pour ces différents types d'élevage. La seule différence est l'ingestion de sol possible dans le cas de poules élevées sur parcours (cas des filières Label Rouge, AOC ou biologique et des élevages familiaux). De ce fait, l'ingestion de sol et de pédofaune par les poules est souvent avancée comme le principal

facteur explicatif de la contamination des œufs (Schuler *et al.,* 1997; Pussemier *et al.*, 2004 ; Kan, 2005 ; Kijlstra *et al*., 2007) et, sur un site donné, la limitation de l'accès des animaux à l'extérieur diminue significativement la contamination des œufs (Schuler *et al.*, 1997).

Le sol, par sa composition en argiles, matières organiques et par sa faune (vers de terre, insectes) est, en effet, un compartiment susceptible d'accumuler des POP. La concentration en ces composés y atteint des niveaux supérieurs à ceux observés dans les fourrages et les céréales (Bakker *et al.,* 2000 ; Schulz *et al.,* 2005). Les animaux élevés en plein air sont susceptibles d'ingérer du sol en quantité, soit de manière volontaire (phénomène de pica) soit de manière involontaire (particules de sol projetées sur les fourrages, aliments déposés directement au sol). La quantité de sol ingéré par une poule pondeuse élevée en plein air peut représenter de 2 à 30 g (Stephens *et al.*, 1995 ; Waegeneers *et al.*, 2009). Cependant, les facteurs d'élevage (temps de séjour à l'extérieur, densité d'élevage, déséquilibre alimentaire) sont susceptibles de modifier cette proportion de matrice (sol et pédofaune) ingérée. Dans ce contexte, les œufs peuvent ainsi parfois être proposés comme bio-indicateurs de la contamination du sol (Chang *et al.,* 1989).

Plusieurs études permettent de mettre en relation les concentrations de POP dans les sols contaminés avec celles présentes dans les œufs des poules ayant accès à ces derniers (Figures I-8 et I-9). La compilation de ces données met en évidence le fait que le niveau de contamination du sol n'est pas suffisant pour expliquer les niveaux de polluants retrouvés dans les œufs. Il convient en effet d'étudier quelles sont les quantités de sol ingéré et les facteurs ayant un impact sur le transfert de contaminant de l'ingéré vers l'œuf de poule.

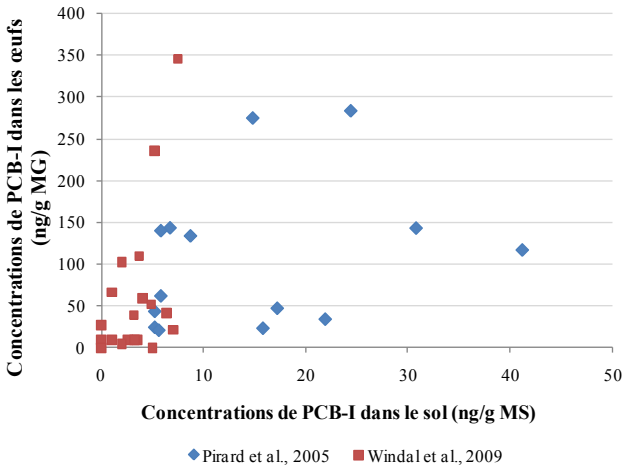


Figure I- 8 : Evolution de la concentration de PCB-I[12] dans les œufs de poules élevées en plein air en fonction de la concentration de PCB-I dans le sol prélevé sur les parcours

[12] PCB-I : PCB indicateurs. Ils sont considérés comme étant les PCB les plus présents et persistants dans l'environnement. Ils regroupent les 6 NDL-PCB : PCB 28, 52, 101, 138, 153, 180 et le PCB 118.

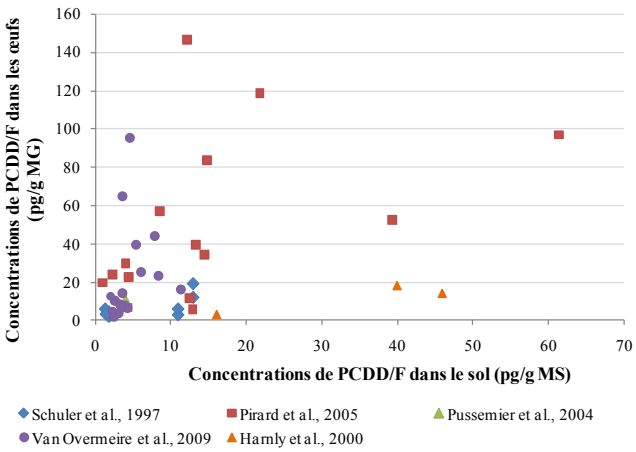


Figure I- 9 : Evolution de la concentration de PCDD/F dans les œufs de poules élevées en plein air en fonction de la concentration de PCDD/F dans le sol prélevé sur les parcours

2.2.3.1.3. Autres matrices ingérées

Les matériaux utilisés pour les bâtiments et installations d'élevage sont aujourd'hui exempts de contamination en PCB, suite à l'interdiction datant de 1985 (Directive 85/467/CEE). Ils contiennent en revanche dans leur grande majorité des Retardateurs de Flammes Bromés (RFB), de type PBDE ou HBCD. Ces contaminants, en plus d'être potentiellement retrouvés dans le sol des parcours de poules élevées en plein air (Covaci *et al.*, 2009), peuvent ainsi être ingérés par les poules en claustration *via* des poussières provenant de ces matériaux. Le phénomène de pica sur les installations (cages, mangeoires…) peut également participer à l'exposition. L'exposition *via* l'ingestion de particules provenant de matériau concerne ainsi l'ensemble des types d'élevage : aussi bien les poules plein air qu'en claustration, mais n'a pas été réellement étudiée.

Enfin, l'exposition par l'eau est peu renseignée, cependant vu le caractère hydrophobe des POP, elle est considérée comme négligeable pour des animaux abreuvés avec l'eau du réseau ou sur captage filtré (Fries, 1995).

2.2.3.2. Autres voies d'exposition

Il a été suggéré que l'exposition par l'air est plus importante chez les oiseaux que chez les mammifères, compte tenu d'un taux de ventilation plus élevé et d'une barrière d'échanges respiratoires plus fine chez les oiseaux (Brown *et al.*, 1997). Cependant, l'exposition aérienne, qui peut se traduire par l'inhalation de poussières contaminées (Hansen *et al.,* 1989) reste

considérée comme mineure par rapport à l'exposition alimentaire (McLachlan *et al.,* 1990 ; Fries, 1995 ; Smith *et al.,* 2007).

Enfin, de même que pour la voie aérienne, peu de données concernent l'exposition cutanée des oiseaux aux POP et le transfert qui en résulte. Smith *et al.* (2007), dans sa synthèse, classent ces voies d'exposition comme étant moins importantes que l'ingestion (Tableau I-2). Il est donc choisi de négliger ces voies d'exposition dans la suite de cette thèse.

Tableau I- 2 : Récapitulatif des voies d'exposition des oiseaux aux polluants et contribution (d'après Smith *et al.,* 2007)

Voie d'exposition	**Age et stade physiologique**	**Contribution à l'exposition totale**
Ingestion	tous	haute
Voie cutanée	tous	modérée
Inhalation	tous	faible
Transfert maternel	embryon	modérée

Les poules d'élevages professionnels et familiaux sont donc susceptibles d'être exposées aux POP, notamment *via* l'ingestion de matrice contaminée, dont le sol (Tableau I-2). Les facteurs de variation de cette ingestion doivent être déterminés afin de minimiser les risques.

2.3. Les pratiques d'élevage : potentiels facteurs de risque

La contamination de l'environnement est donc à la base de l'exposition des poules pondeuses et d'un transfert éventuel vers l'œuf. Cependant, il est difficile de maîtriser la contamination des matrices environnementales telles que le sol. Face à ce constat, il est intéressant d'étudier les facteurs de variations de l'ingestion de sol et du transfert de la molécule au sein de l'animal, qui représentent de potentiels leviers pouvant réduire les risques de contamination des œufs (Tableau I-3 et I-4). En effet, les systèmes d'élevage « plein air » présentent des relations complexes entre l'animal et son environnement, de par les interactions de la poule avec son milieu selon les pratiques d'élevage qui sont choisies par l'éleveur (Figure I-10).

Ces pratiques sont en partie définies pour les élevages professionnels par les cahiers des charges (Label Rouge, Bio…). En revanche, les élevages familiaux, montrés comme fragiles vis-à-vis de la contamination des œufs en POP, présentent typiquement des conditions et pratiques d'élevage variables et non standardisées.

Tableau I- 3 : Facteurs relatifs aux pratiques d'élevages influant sur la quantité de sol ingéré par la poule pondeuse en élevage plein air

Facteurs	Actions	Références
Génétique de la poule	L'utilisation du parcours dépendrait de la génétique (montré chez le poulet).	Baeza *et al.*, 2010
Gestion du parcours	La présence d'arbustes sur le parcours peut favoriser la sortie des volailles. Plus la couverture végétale du parcours est faible, plus la quantité de sol ingéré est élevée. Plus la densité du troupeau sur le parcours est élevée, plus la quantité de sol ingéré est élevée.	Lubac *et al.*, 2003 Waegeneers *et al.*, 2009
Taille du troupeau	Plus la taille du troupeau est petite, plus les poules sortent facilement sur le parcours.	Hegelund *et al.*, 2005 Kijlstra *et al.,* 2007
Durée d'ouverture des trappes	Une limitation du temps de contact poule-parcours, limite les quantités de sol ingéré	Schuler *et al.*, 1997 Traag *et al.,* 2002 Schoeters et Hoogenboom, 2006 Waegeneers *et al.*, 2009
Composition de la ration	Une ration déséquilibrée favorise une ingestion de sol. L'apport de blé complet dans la ration favorise l'ingestion de sol.	Horsted et Hermansen, 2007 Waegeneers *et al.*, 2009 Jondreville *et al.*, 2010

Tableau I- 4 : Facteurs relatifs aux pratiques d'élevage influant sur les paramètres physiologiques de la poule pondeuse

Facteurs	Action	Références
Génétique de la poule	La courbe de performance de ponte en fonction du temps est dépendante de la génétique de la poule	Données des sélectionneurs (ISA, SASSO)
Age	Le taux d'engraissement de la poule peut dépendre de son âge. L'intensité[13] de ponte diminue en fonction de l'âge. Passé le pic de ponte (à 24 semaines), l'intensité de ponte diminue. Des périodes de mue[14], durant lesquelles la ponte s'arrête et le poids vif peut chuter de 25%, ont lieu chez les poules conservées plusieurs saisons de suite.	Tlustos *et al.*, 2004 Sauveur, 1988
Température	Une réduction du poids de l'œuf est observée avec une augmentation de la température (-1g/°C entre 25 et 35°C)	Thapon et Bourgeois, 1994
Photopériode	Une durée d'éclairement optimale (entre 12 et 16h/j) diminue l'âge de la maturité sexuelle (donc l'âge à la première ponte) et permet d'obtenir une performance de ponte maximale	Sauveur, 1988

[13] L'intensité de ponte caractérise les performances de ponte d'un troupeau. Elle est calculée comme étant le nombre d'œufs pondus par 100 poules à un temps donné.
[14] La mue est une période de plusieurs semaines durant laquelle, la poule perd ses plumes, perd du poids et interrompt parallèlement sa ponte.

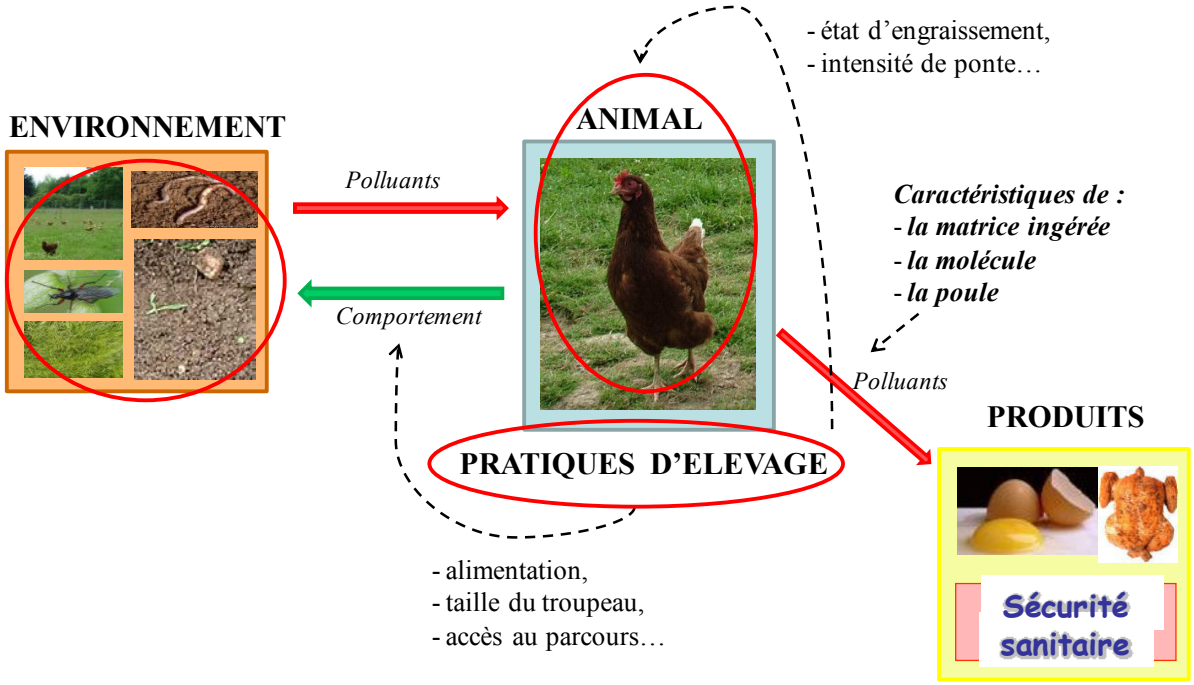


Figure I- 10 : Schéma synthétisant les relations existantes entre les différentes composantes du système d'élevage sur parcours

Il est donc important d'évaluer l'impact, sur le transfert de POP, des paramètres comportementaux et physiologiques (engendrés par ces facteurs), afin d'optimiser les pratiques d'élevage dans le cadre de la gestion des risques de contamination des œufs. Les paramètres comportementaux influant sur la quantité de sol potentiellement contaminé et sur la dose d'exposition ne seront pas étudiés dans la suite de la thèse. Seuls les paramètres liés au transfert de la molécule au sein de l'animal, après ingestion, seront considérés.

Les POP sont donc susceptibles de contaminer les produits avicoles. L'élevage en plein air présente un risque vis-à-vis de cette contamination, notamment *via* l'ingestion de sol potentiellement contaminé par les poules. Plus particulièrement, il est constaté que les élevages familiaux, pour lesquels les pratiques ne sont pas standardisées, se révèlent plus fragiles. Face à ce constat, il est important pour la filière de comprendre et modéliser le transfert des POP vers l'œuf, afin de le maîtriser. Pour cela, il est indispensable de connaître les mécanismes de transfert ADME mis en jeu à l'échelle de l'animal, afin d'évaluer l'importance des paramètres influençant ce processus.

3. Transfert des xénobiotiques chez la poule

Connaître les modalités et cinétiques de transfert, à l'échelle de la poule, des composés auxquels elle est exposée, est indispensable à l'évaluation de l'occurrence de ces composés dans les œufs. Suite à son ingestion, la molécule doit être bioaccessible, c'est-à-dire, libérée de toute liaison avec la matrice ingérée, afin de pouvoir être absorbée. Ensuite, le devenir d'une substance dans l'organisme peut être divisé en quatre étapes clés : l'**Absorption**, la **Distribution**, le **Métabolisme** et l'**Excrétion** (processus « ADME », Renwick, 2001) qu'il convient donc de définir et de quantifier ou d'estimer. Ces différentes étapes peuvent avoir lieu en même temps et dépendre les unes des autres. Ainsi, une substance distribuée et stockée dans les graisses sera éliminée plus lentement qu'un composé rapidement métabolisé ou excrété. Dans tous les cas, la molécule est d'abord absorbée puis distribuée dans le corps par un fluide biologique (sang, lymphe), en pouvant faire intervenir différents processus de transport (ex : transporteurs sanguins, diffusion). Ensuite la substance est soit stockée (ex : dans les graisses ou les muscles), soit éliminée *via* métabolisation ou excrétion (Aiache *et al.,* 2008).

Dans cette partie, ces processus d'accessibilité et d'ADME, ainsi que les facteurs pouvant les moduler seront présentés en priorité à partir de données chez l'oiseau et seront parfois complétés par des résultats d'études chez les mammifères.

3.1. Absorption

Les poules pondeuses ayant accès à un parcours sont potentiellement exposées aux POP, principalement *via* l'ingestion de sol[15] contaminé suite à un dépôt atmosphérique. Les contaminants déposés peuvent interagir avec les particules du sol et subir un processus de maturation qui consiste principalement en des phénomènes d'adsorption mais également de piégeage dans les micropores du sol ou par la matière organique (Reid *et al.,* 2000). Une fois ingérés, les POP doivent donc être libérés de toute liaison avec la matrice et éventuellement solubilisés dans le tractus digestif, afin de pouvoir franchir la barrière intestinale. Cela correspond au phénomène de bioaccessibilité de la molécule.

L'absorption intestinale, au sens strict du terme, peut être définie comme le passage d'une molécule de la lumière intestinale à la voie lymphatique ou à la circulation générale. Mais le

[15] L'exemple du sol comme matrice environnementale est choisi, car il représente une des principales sources de contamination pour les poules.

terme d'absorption peut, notamment lors des calculs et estimations, prendre également en compte la bioaccessibilité de la molécule.

3.1.1. Bioaccessibilité

3.1.1.1. Définitions

La maturation du sol contaminé qui contribue à la limitation de l'accessibilité des POP dans le tube digestif est considérée comme réduisant la quantité potentiellement absorbable. La capacité à être accessible dans le tractus digestif, ou à être extrait du sol correspond à la bioaccessibilité de la molécule. On parle de fraction « bioaccessible » (Semple *et al.*, 2004). Certains auteurs utilisent la notion d'extractibilité, phénomène qui correspond à la capacité de la molécule à être détachée de son substrat sous l'action de solvants (Lutz, 2006).

La notion de bioaccessibilité (Figure I-11-A) ne doit pas être confondue avec la notion de biodisponibilité. Dans cette thèse, la fraction dite « biodisponible » correspond à la fraction de contaminant ingéré, qui est absorbée et atteint la circulation systémique (Kelley *et al.*, 2002). La quantité de molécules atteignant la circulation générale est fonction de la quantité absorbée par l'épithélium digestif (et donc de la dose ingérée) mais aussi d'autres processus d'élimination pré-systémique :

- dégradation dans la lumière intestinale
- métabolisme au niveau des entérocytes
- captage hépatique important au premier passage. Lorsque la molécule a une affinité élevée pour l'hépatocyte et les enzymes hépatiques, une fraction est captée lors du premier passage, c'est-à-dire avant d'atteindre la circulation générale et est éventuellement éliminée par voie biliaire. La quantité retrouvée dans cette circulation est alors diminuée. C'est l'effet de premier passage hépatique (cela peut se traduire par une mauvaise biodisponibilité).

Cependant, en première approche, il peut être supposé une corrélation entre les mesures de biodisponibilité et d'accessibilité, comme cela a été mis en évidence pour les éléments traces métalliques (Caboche, 2009). L'estimation de la réduction de la bioaccessibilité permet alors d'évaluer la réduction de la biodisponibilité.

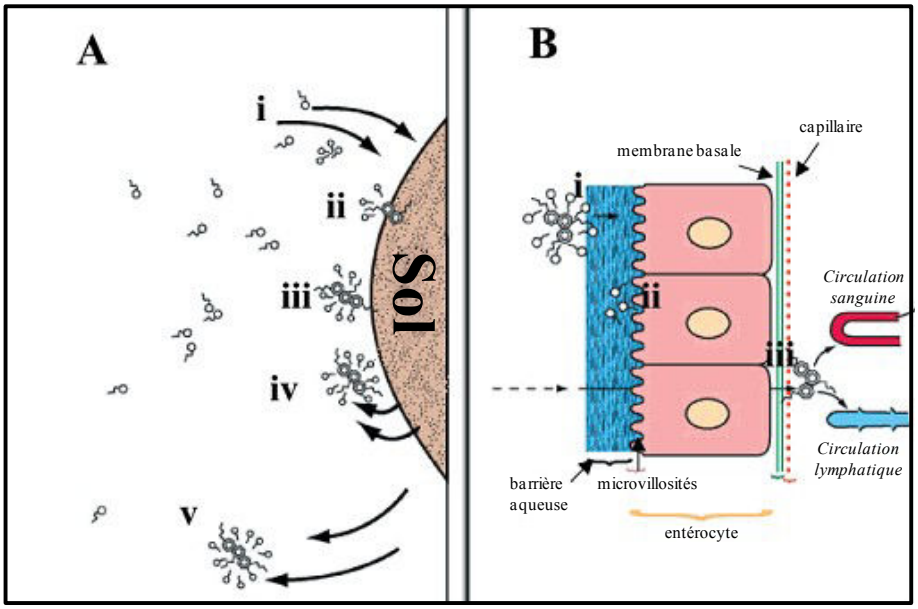


Figure I- 11 : Diagramme schématique illustrant (A) les mécanismes de solubilisation et libération des POP liés aux particules de sol dans la lumière de l'intestin et (B) les mécanismes de transport des molécules de la lumière de l'intestin jusqu'à la circulation systémique (d'après Holman *et al.,* 2002).

A : Phase de solubilisation : Des sels biliaires diffusent (i) et s'adsorbent (ii) sur la surface du sol, réagissent avec les POP pour former des micelles contenant ces POP (iii). Les micelles sont ensuite désorbés de la surface du sol (iv) et permettent la dispersion des POP dans la phase aqueuse du chyme intestinal.

B : Phase d'absorption : Les micelles pénètrent dans la barrière aqueuse (i), se disloquent suite à une acidification du milieu et libèrent les POP qui sont absorbés au niveau des microvillosités des entérocytes (ii) et traversent la barrière intestinale jusqu'à rejoindre la circulation sanguine ou lymphatique.

3.1.1.2. Impact du sol sur la bioaccessibilité des POP

Chez les oiseaux, peu d'études concernent l'effet du sol sur la bioaccessibilité des POP. Mais plusieurs études *in vitro* ou *in vivo* chez les rongeurs et les ruminants mettent en évidence le rôle du sol sur la disponibilité des POP (Van Schooten *et al.,* 1997 ; Ounnas *et al.*, 2009). Seuls Van Eijkeren *et al.* (2006) comparent des niveaux de contamination retrouvés dans les œufs de poules exposées à un aliment contaminé en PCDD/F et PCB-DL *via* du sol ou de l'huile contaminés. Ils estiment que l'accessibilité des PCDD/F et PCB-DL présents dans le sol est inférieure de 40% à celle des contaminants présents dans l'huile. Mais cette valeur ne constitue qu'une première approximation quant au rôle du sol sur la rétention des POP car la nature et l'importance des interactions entre sol et contaminant dépendent de différents facteurs, en particulier : des propriétés du sol et de la molécule.

3.1.1.3. Facteurs influençant la bioaccessibilité

Différents types de facteurs, susceptibles de limiter ou de favoriser l'accessibilité des POP au niveau du tractus digestif lors d'ingestion de matrices contaminées, ont été identifiés

au cours d'études, menées le plus souvent *in vitro*. Ces facteurs, liés aux caractéristiques de la contamination, aux propriétés de la molécule, aux propriétés du sol et aux conditions présentes dans le tube digestif de l'animal, sont présentés dans le tableau I-5.

Tableau I- 5 : Facteurs influant sur la bioaccessibilité des POP présents dans la matrice contaminée ingérée

Facteurs	Actions	Références
Caractéristiques de la matrice contaminée		
Age de la contamination de la matrice	La durée de la maturation d'un sol avec un contaminant, diminue l'accessibilité de ce dernier.	Pu *et al.*, 2003
Propriétés de la molécule		
Lipophilicité	Plus une molécule est lipophile, plus son accessibilité (*in vitro*) diminue.	Tang *et al.*, 2006 Tao *et al.,* 2009
Composition et propriétés du sol		
Argile	L'argile peut favoriser la rétention des HAP, en permettant l'adsorption de ces molécules sur les particules du sol.	Billeret *et al.*, 2000 Pu *et al.*, 2004
Matière organique	Les POP peuvent se fixer sur la matière organique du sol. Le niveau de carbone organique du sol diminuerait la solubilisation micellaire.	Billeret *et al.*, 2000 Holman *et al.*, 2002 Pu *et al.,* 2004 Lu *et al*., 2009
Conditions présentes dans le tube digestif		
pH	La baisse du pH favorise la déstructuration de la matrice et augmente la surface de contact de la matrice avec les solvants organiques (fluides du tractus gastro-intestinal). Or le pH du suc gastrique chez la poule pondeuse est de 1 à 2 (Larbier et Leclercq, 1992). Cependant cette seule baisse du pH n'a pas d'effet sur l'extractibilité, d'autres facteurs doivent accompagner cette baisse du pH pour expliquer une meilleure extractibilité.	Van de Wiele *et al.*, 2004 MacLachlan, 2008
Sels biliaires	Les sels biliaires ont une action positive sur l'extractibilité. Les POP s'adsorbent sur ces molécules et sont rendus ainsi plus solubles. Cependant, si les complexes formés sont trop volumineux, cela sera un frein à l'absorption. Cette solubilisation micellaire dépend de la lipophilicité et des concentrations luminales en sels biliaires. Ce processus de solubilisation micellaire peut varier suivant la composition des acides gras des aliments. Des différences de solubilisation ont en effet été observées pour les dioxines et surtout pour les HAP.	Wittsiepe *et al.*, 2001 Holman *et al.*, 2002 Oomen *et al.*, 2004 Van de Wiele *et al.*, 2004 Tang *et al*., 2006
Substrat organique alimentaire	La matière organique (de l'aliment) augmente l'extractibilité des POP du sol. Ces derniers sont adsorbés sur des substrats organiques. Des micelles sont formés (avec l'aide de bile et de coproduits de la digestion des lipides), ce qui favorise la solubilisation de POP (cas des HAP).	Hack et Selenka, 1996
Ratio liquide/sol	Plus la proportion de liquide est grande, plus cela favorise la libération des POP du sol.	Van de Wiele *et al.*, 2004

3.1.2. Transfert à travers la barrière intestinale : l'absorption

Peu d'études sont consacrées à l'absorption des POP chez l'oiseau et plus particulièrement aux mécanismes mis en jeu lors de ce processus. Cependant, en première approche, les mécanismes généraux d'absorption de ces composés au niveau du tractus gastro-intestinal peuvent être considérés comme indépendants de l'espèce (Van den Berg *et al.,* 1994). D'autre part, il a été montré chez différentes espèces que le caractère lipophile des POP impliquait le même type de prise en charge pour ces composés que pour les acides gras, le cholestérol, les phospholipides et les vitamines liposolubles, lors de leur absorption (Dulfer et Govers, 1995 ; Charman *et al.*, 1997 ; Dulfer *et al.*, 1998). Ainsi, les mécanismes généraux de l'absorption des POP, détaillés par la suite, font la synthèse des mécanismes d'absorption connus pour des molécules liposolubles (voire dans certains cas, pour les POP) tout en prenant en compte les spécificités anatomiques et physiologiques aviaires.

Le captage des lipides par les entérocytes se fait par simple diffusion passive (Larbier et Leclercq, 1992). Le même phénomène est souvent considéré pour le passage de la barrière intestinale par les POP : la molécule diffusant passivement du milieu le plus concentré vers le milieu le moins concentré (Sharifi *et al.,* 1997 ; Kelly *et al.,* 2004). Cependant le transfert de la molécule de la lumière de l'intestin au milieu intracellulaire nécessite de traverser la barrière aqueuse bordant la bordure en brosse des entérocytes. Une solubilisation micellaire des molécules dans la lumière de l'intestin permet à ces dernières le franchissement de cette barrière (Figure I-12-B). En effet, durant le processus de digestion des lipides chez les vertébrés, les composés insolubles comme les acides gras, le cholestérol, les phospholipides et les vitamines liposolubles sont incorporés dans des micelles de sels biliaires (Dulfer et Govers, 1995 ; Dulfer *et al.*, 1996). Les micelles formées pénètrent ainsi dans la barrière aqueuse dont l'acidité favorise la dissociation des micelles et la libération des monomères liposolubles au niveau de la bordure en brosse (Thomson *et al.*, 1993). Ce mécanisme d'absorption est considéré comme le plus fréquent pour les POP (Figure I-12-B), même si quelques molécules - comme certains HAP de deux ou trois cycles aromatiques et de lipophilicité moins importante que les HAP lourds ou les PCB, par exemple - ne semblent pas nécessiter d'intermédiaire pour franchir la barrière aqueuse (Rahman *et al.*, 1986).

Une fois dans le milieu intracellulaire, les molécules peuvent être sécrétées dans le sang ou la lymphe sous forme de molécules-parents ou de molécules transformées suite à un métabolisme entérocytaire (Van den Berg *et al.,* 1994). Des études chez le rat mettent en évidence l'absorption de xénobiotique (TCDD) au niveau du tractus gastro-intestinal et le

transport de celui-ci dans la lymphe *via* des chylomicrons (Lakshmanan *et al*., 1986). Or, chez les oiseaux, le système lymphatique est très peu développé. Les lipides entrés sous forme monomoléculaire dans l'entérocyte en ressortent alors du côté basolatéral, sous forme de lipoprotéines directement sécrétées dans le système portal, d'où le terme de portomicrons employé à la place de chylomicrons chez les oiseaux (Larbier et Leclercq, 1992). Les portomicrons passent dans le foie avant d'atteindre la circulation générale (Hermier, 1997).

3.1.3. Mesures et valeurs de l'absorption des POP chez l'oiseau

3.1.3.1. Méthodes utilisées pour estimer l'absorption et limites

Les méthodes de détermination de l'absorption intestinale reposent sur deux principes : l'un mesure la disparition des nutriments de la lumière intestinale, tandis que l'autre s'intéresse à leur apparition au niveau de la veine porte. Ainsi, l'absorption est estimée à partir des concentrations de contaminants retrouvées dans les fèces ou dans le sang (ou la carcasse) par différence avec la dose ingérée. Ces méthodes mesurent sans distinction l'ensemble des processus « accessibilité de la molécule + passage de la barrière intestinale ».

Il est souvent question d'efficience d'absorption (AbE) ou d'assimilation (ou AE), définie par les équations 1 et 2. La différence entre ces deux équations réside dans la prise en compte ou non dans la fraction absorbée, des molécules séquestrées au niveau de certains tissus (tractus digestif, foie, cerveau, plumes, pattes). Ces tissus sont inclus dans la carcasse pour le calcul de l'AbE et exclus pour celui de l'AE.

Equation 1 (Drouillard et Norstrom, 2000) : $$AbE = 1 - \frac{C_{fèces} \times M_{fèces}}{C_{ing} \times M_{ing}}$$

avec $C_{fèces}$ et C_{ing} les concentrations de contaminant dans l'excrété et dans l'ingéré (en $ng.g^{-1}$ de matière fraîche) et $M_{fèces}$ et M_{ing} les masses d'ingéré et d'excrété (en g de frais) durant la période d'étude (31h dans l'étude de Drouillard et Norstrom, 2000).

Equation 2 (Drouillard et Norstrom, 2003) : $$AE = \frac{C_{carc} \times PV}{C_{ing} \times M_{ing}}$$

avec C_{carc} et C_{ing} les concentrations de contaminant dans l'organisme et dans l'ingéré (en $ng.g^{-1}$ MS) et M_{ing} et PV les masses d'ingéré (en g MS) et de poids vif au moment de l'abattage (g) durant la période d'étude.

Notons que ce calcul est effectué par ces auteurs à différents points de la cinétique de contamination. Il peut donc exister un biais dû au fait que l'oiseau n'est pas à l'équilibre.

Ces paramètres utilisés pour caractériser le niveau d'absorption d'une molécule, notamment l'AbE, sont parfois mal distingués et nommés de façon plus générale « taux d'absorption » par les auteurs. Cependant, ces notions ne sont que des estimations de l'absorption, puisque la notion d'AE néglige les quantités présentent dans certains tissus et que l'AbE peut parfois être sous-estimée lors de mesure des quantités de POP dans les fèces. En effet, un retour biliaire dans l'intestin, de la molécule absorbée est possible, ainsi qu'un retour par équilibre des concentrations entre le contenu intestinal et les entérocytes. Mais ces voies d'élimination sont négligées, car considérées minoritaires (Drouillard et Norstrom, 2000).

En considérant constants tous les autres phénomènes de l'ADME, la biodisponibilité peut être utilisée pour évaluer des différences d'absorption.

3.1.3.2. Absorption des POP chez l'oiseau

Comme suggéré précédemment, les conditions d'exposition de l'animal et les points de prélèvements des échantillons variant d'une étude à l'autre, les valeurs obtenues lors de chacune d'elles ne sont donc pas toujours comparables. Il est donc difficile d'établir un classement relatif des absorptions des POP qui pourrait servir de référence pour l'étude de leur transfert chez la poule pondeuse, d'autant plus que la plupart des études sont effectuées chez d'autres espèces d'oiseaux et que la liste de POP, dont l'absorption est étudiée, est loin d'être exhaustive. C'est pourquoi, les valeurs de l'absorption de différents POP chez les oiseaux, ou leur estimation, sont davantage à considérer à titre indicatif qu'à titre quantitatif strict. Par exemple, pour les PCB, Drouillard (2001) synthétise des taux d'absorption, issus de la littérature, compris entre 70 et 98% selon le congénère et l'espèce étudiée.

3.1.4. Facteurs influençant l'absorption intestinale

Le passage de la barrière intestinale peut être modulé par des propriétés liées à la molécule et à la physiologie de l'animal.

Caractéristiques de la molécule

L'absorption des PCDD/F et des PCB est spécifique de chaque congénère (Van den Berg *et al.*, 1994 ; Drouillard et Norstrom, 2000). Elle dépend à la fois de la lipophilicité et de

l'encombrement stérique de la molécule. Drouillard et Norstrom (2000) ont mis en évidence la relation existant entre l'efficience d'absorption (AbE) et la lipophilicité, caractérisée par le log K_{ow}, des différents PCB (Figure I-12).

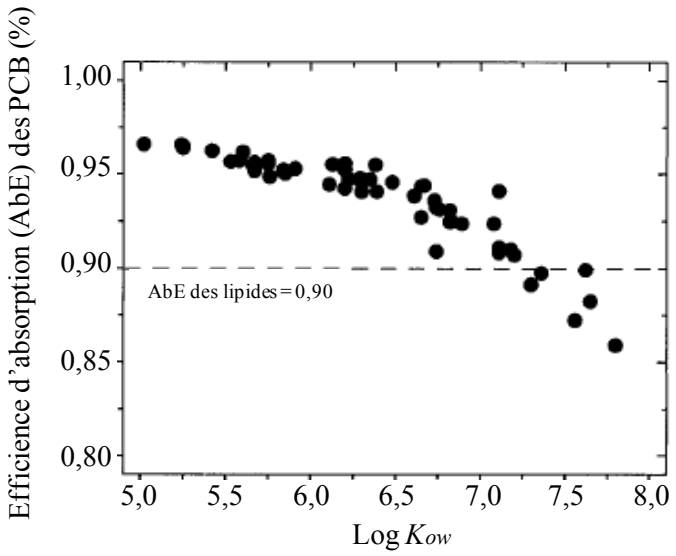


Figure I- 12 : Relation entre le log Kow des molécules PCB et leur assimilation intestinale (d'après Drouillard et Norstrom, 2000)

L'étude montre une AbE d'environ 95 % pour les PCB ayant un log K_{ow} inférieur à 6,5. Pour les molécules plus lipophiles, l'AbE diminue pour atteindre des valeurs de 85 % pour les PCB fortement chlorés, présentant un log K_{ow} proche de 7,75 (ex : PCB 189).

Chez les poissons (Gobas *et al.*, 1988) et les mammifères (Tanabe *et al.*, 1981 ; McLachlan, 1993, 1994 ; Moser et McLachlan, 1999), le même type de relation a été observé pour les PCB et les PCDD/F. Ainsi chez le ruminant, une diminution du taux d'absorption est également constatée pour les POP dont le log K_{ow} est supérieur à 6,5. Cependant l'effet de la lipophilicité de la molécule sur son absorption est davantage marqué, avec un taux d'absorption passant de 80 à 10 % (McLachlan, 1994) et une AE passant de 50 à 10 % chez le poisson (Gobas *et al.,* 1988) sur le même intervalle de log K_{ow} borné par les valeurs de 6,5 et 8,5. Notons que pour un autre phénomène de passage de membrane, cette fois au niveau de l'œuf, une corrélation négative du même type est observé entre le log K_{ow} des PBDE (ayant des valeurs de 6,8 à 8,4) et le taux d'absorption par des œufs d'oiseaux en incubation, suite à une injection de PBDE dans la poche d'air de l'œuf (McKernan *et al.,* 2010). L'encombrement stérique de la molécule semble avoir un impact sur le passage de la membrane des entérocytes (Van den Berg *et al.*, 1994 ; Dimitrov *et al.,* 2002). Mais ce facteur ne doit pas être considéré seul car il n'est pas suffisant pour expliquer les différences d'absorption entre molécules, comme le rapporte plusieurs études comparatives concernant la

mise en relation des caractéristiques de la molécule et le facteur de bioaccumulation (Dimitrov *et al.,* 2002 ; Laurent, 2003 ; Arnot *et al.,* 2009). En effet, des combinaisons de facteurs interviennent : log K_{ow}, encombrement stérique, chaos moléculaire[16], etc.

Caractéristiques de l'animal : anatomiques, physiologiques et métaboliques

Tout d'abord, notons que l'âge du tissu intestinal ne semble pas avoir d'incidence sur le niveau d'absorption (Hebert *et al*., 1987). En revanche, certaines caractéristiques liées au contenu du tractus digestif et à la digestion influencent ce dernier. Il semble en effet que plus le temps de résidence de la molécule au niveau du site d'absorption dans l'intestin est important plus l'absorption de la molécule est favorisée (Grass, 1997 ; MacLachlan, 2008). Cette durée est fonction de la surface d'absorption du petit intestin, du niveau d'irrigation sanguine au niveau intestinal (Serafin, 1984), et est déterminée par la vitesse de transit intestinal. Celle-ci pourrait être accélérée par la présentation de l'aliment en granulé mais aussi par un jeûne préalable à l'alimentation (Larbier et Leclercq, 1992). D'autre part, la présence de lipides dans le duodenum ralentit la vidange gastrique et augmente le temps de passage des digesta tout au long du tractus digestif (Mateos et Eastwood, 1982). Ce dernier élément est cependant à prendre avec précaution, puisque Drouillard et Norstrom (2003) ainsi que De Vos *et al.* (2005) mettent tout de même en évidence une AE des PCB similaire chez l'oiseau pour des régimes alimentaires présentant des teneurs en lipides différentes (de 1,4 à 9,1% de lipides). Ce même constat a également été fait chez le poisson rouge (*Carassius auratus*) (Sharifi *et al.,* 1997). Parallèlement, la nature des lipides est un facteur important. En effet, la présence de lipides non absorbables (ex : paraffine, olestra) réduit l'absorption des xénobiotiques hydrophobes (Jandacek et Tso, 2007).

Parallèlement, il a été montré en condition *in vitro* que la perméabilité intestinale[17] pouvait varier selon la localisation tout au long du tractus gastro-intestinal (Grass, 1997).

Au niveau de l'intestin, les processus d'absorption des POP peuvent être maximisés par des différences de pH localisées, qui favorisent l'étape de solubilisation (Grass, 1997), et par l'intervention de micelles, sels biliaires, lipides ou produits de la digestion lipidique, qui peuvent réduire la résistance de transport des PCB à travers la couche aqueuse du tractus intestinal (Dulfer *et al.*, 1996, 1998).

[16] Le chaos moléculaire fait référence ici à l'agitation et à la vitesse des particules à proximité de la surface d'absorption.
[17] La perméabilité intestinale est une mesure de la capacité d'une molécule à traverser la barrière intestinale.

Enfin, le devenir des molécules elles-mêmes dans l'entérocyte influe sur le processus d'absorption puisque le transfert passif est basé sur une différence de concentrations entre deux compartiments. Aussi la séquestration ou disparition de la molécule au niveau de l'entérocyte sont-elles à considérer. En particulier, un métabolisme entérocytaire peut avoir lieu durant l'absorption (Grass, 1997 ; Cavret et Feidt, 2005 ; Bonnefille *et al.,* 2011). Il a été montré pour les HAP, qu'une enzyme située au niveau intestinal serait induite par les POP eux-mêmes (Van Veld *et al*., 1987 ; Van den Berg *et al*., 1994). Ce phénomène dépend de la molécule (Bosveld *et al.,* 2002).

L'accessibilité des POP ainsi que leur franchissement de la paroi intestinale, sont influencés par les caractéristiques de la molécule et les caractéristiques physiologiques liées à la digestion, propres à l'animal.

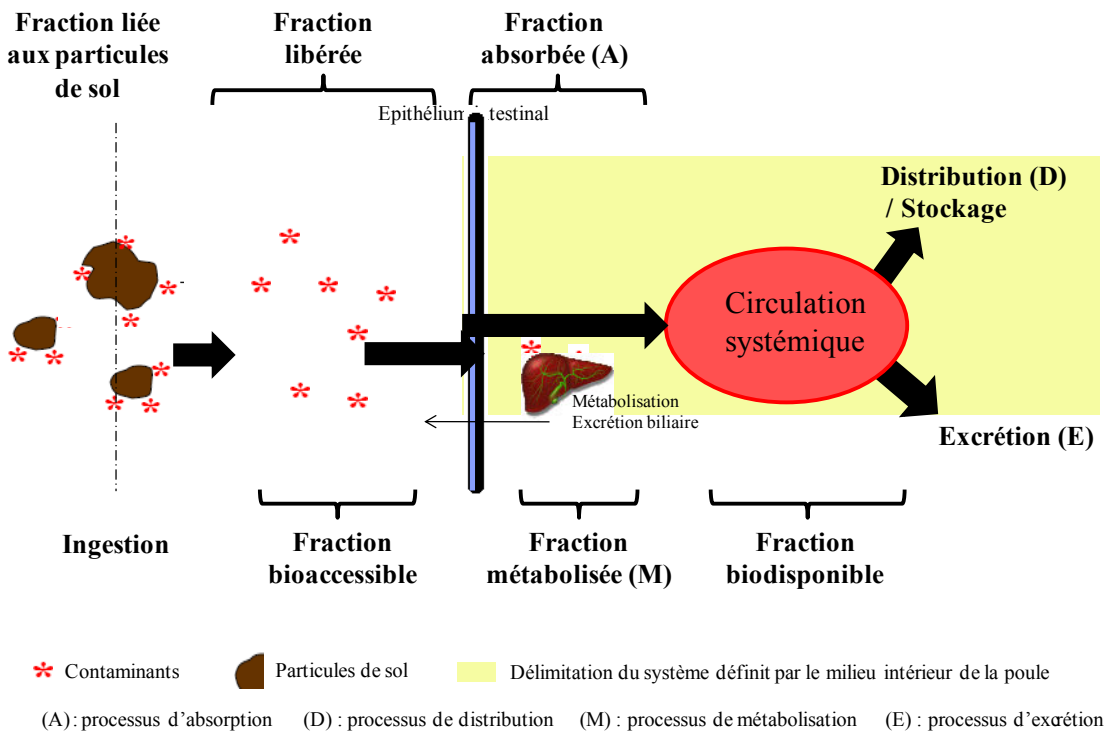


Figure I- 13 : Modèle conceptuel du processus de biodisponibilité orale

(d'après Caboche, 2009)

3.2. Distribution

La distribution tissulaire des POP correspond au processus de répartition des POP dans les tissus de l'organisme. Cela implique leur transport dans la circulation générale suivi de leur captation par les différents tissus de l'organisme. Ces étapes dépendent de facteurs

physiologiques de l'animal (débit sanguin, perfusion des organes…) et des propriétés de la molécule. La substance peut ensuite être stockée au niveau du tissu, bioconcentrée puis, à un moment donné, mobilisée.

3.2.1. Prise en charge des POP par les différents constituants du sang

Une fois dans le sang, les POP sont distribués vers les tissus *via* les constituants du sang avec lesquels les POP s'associent. Il a en effet été montré chez différentes espèces, qu'une portion significative de molécules chimiques pouvait s'associer à des lipoprotéines[18] et à des protéines présentes dans le sang. Ces dernières permettent le transport des molécules hydrophobes, telles que certains polluants organiques (PCB, B[a]P, pesticides organochlorés), dans la circulation sanguine et leur distribution jusqu'aux différents tissus (Maliwal et Guthrie, 1982 ; Soine *et al.*, 1982 ; Soues *et al.,* 1989 ; Borlakoglu *et al.,* 1989 ; Mohammed *et al.,* 1990 ; Gomez-Catalan *et al.,* 1991 ; Noren *et al.,* 1999 ; Hjelmborg *et al.,* 2008). Ainsi l'affinité des POP pour les composants du sang a-t-elle un impact sur leur distribution finale vers les tissus (Gallenberg et Vodicnik, 1987).

Les xénobiotiques peuvent par exemple être captés par les VLDL (Very Low Density Lipoprotein) en cours de circulation dans le plasma ou bien au niveau du foie, par des VLDL nouvellement synthétisés. En effet, il a été montré que les hépatocytes étaient capables de libérer le PCB 153 en lien avec des lipoprotéines synthétisées *de novo* (Gallenberg et Vodicnik, 1987). Cette même étude a permis l'isolement de toutes les fractions lipoprotéiques du sang chez le rat, et a montré que chacune d'elles était capable de prendre en charge les PCB sans être saturée (dans des limites de contamination non extrême). Certaines protéines, telles que l'albumine et l'hémoglobine sont également susceptibles de jouer le rôle de transporteurs après la formation d'adduits avec le xénobiotique, comme cela a été montré chez le lapin et les bovins pour les formes parentes et métabolisées des HAP (Viau et Carrier, 1995 ; Sugihara et James, 2003 ; Wu *et al.*, 2007).

Un transfert de xénobiotiques est possible entre les différentes fractions sanguines. Notamment, il a été noté des échanges entre les lipoprotéines et protéines du plasma (Shu et Nichols, 1979 ; Maliwal et Guthrie, 1982 ; Spindler-Vomachka *et al.*, 1984 ; Gallenberg et

[18] Différentes catégories de lipoprotéines sont répertoriées, selon leur taille et leur densité :
- les portomicrons
- les HDL (High Density Lipoprotein)
- les LDL (Low Density Lipoprotein)
- les VLDL (Very Low Density Lipoprotein)

Vodicnik, 1987) et entre hémoglobine et lipoprotéines (pour les HAP) (Smith et Doody, 1981 cité *in* Laurent, 2003). Au sein de ces échanges, les VLDL semblent jouer un rôle important dans la distribution *in vitro* des xénobiotiques vers les protéines plasmatiques. Ce phénomène a également été suggéré dans une expérimentation *in vivo* chez la souris. Il a été mis en évidence une répartition différentielle des PCB totaux entre les fractions selon le stade physiologique (ex : gestation), due à une quantité de VLDL 2,5 à 6 fois plus élevée chez la gestante que chez la non gestante et non à un changement d'affinité de la molécule pour son transporteur (Gallenberg et Vodicnik, 1987). Le profil et la quantité de lipoprotéines sont donc fonction de l'état physiologique de l'animal, tel que la lactation pour les mammifères. Des variations de même nature sont observables lorsque l'oiseau est en période de ponte, de mue ou encore au stade juvénile. Sont ainsi rapportées des variations au niveau des quantités de lipides dans le sang (Balnave, 1971), du métabolisme et du profil des lipoprotéines (Gornall et Kuksis, 1973 ; Walzem, 1996 ; Salvante *et al.,* 2007 ; Gorman *et al.*, 2009). En effet, durant la mue, il y a une diminution de la fraction de VLDL (25% des lipoprotéines *vs* 60% avant la mue) au profit de la fraction des HDL (65% *vs* 32%) (Barron *et al*., 1999). En parallèle de ces modifications plasmatiques, l'hématocrite varie également (entre 40 et 55%), probablement en réponse à des dynamiques d'osmorégulation (Williams *et al.*, 2004).

Ainsi l'équilibre entre la synthèse et le catabolisme des différents constituants des lipoprotéines détermine-t-il la durée de vie de ces complexes lipides-protéines (Spindler-Vomachka *et al.*, 1984). Il résulte de ce métabolisme une proportion donnée de chacune des fractions sanguines. L'impact de cette proportion sur la contribution des fractions sanguines à se lier avec les résidus a également été mis en évidence chez le rat et l'homme (Gomez-Catalan *et al.*, 1991).

En revanche, certaines expérimentations mettent en évidence une association préférentielle d'un xénobiotique avec une des fractions lipoprotéiques ou protéiques plasmatiques en fonction du congénère considéré (Borlakoglu *et al.*, 1990). Par exemple, l'étude des hépatocytes montre que la majeure partie (80 %) des molécules PCB 153 s'associe aux VLDL (Gallenberg et Vodicnik, 1987). L'impact du degré de chloration des PCDD/F sur leur affinité pour l'une ou l'autre des fractions a été montré chez l'homme (Paterson *et al.*, 1989). Ainsi les congénères les moins chlorés seraient-ils davantage liés aux lipoprotéines, tandis que les plus chlorés privilégieraient les associations avec les protéines plasmatiques telles que l'albumine.

Les associations « xénobiotiques-transporteurs plasmatiques » sont donc dépendantes de la nature du xénobiotique considéré. La répartition de la quantité totale de xénobiotiques considérés entre les fractions lipoprotéiques dépend de la proportion en chacune de ces fractions dans le plasma de l'animal. Ces proportions sont liées à l'espèce considérée et à un état physiologique donné de l'animal.

3.2.2. Distribution tissulaire

3.2.2.1. Le passage sang-tissu et cinétique de distribution

La captation cellulaire des xénobiotiques transportés *via* les lipoprotéines semble s'effectuer au niveau des tissus, par diffusion passive (Plant *et al.*, 1985 ; Aungst et Shen, 1986 cité par Schlummer *et al.*, 1998 ; Gobas *et al.*, 1993). En revanche, la captation tissulaire des molécules liées à l'albumine impliquerait chez certaines espèces un récepteur spécifique à cette protéine, sur lequel viendrait se lier le complexe POP-albumine (Van Veld, 1990 cité par Laurent, 2003).

Les travaux concernant le transfert de POP vers les tissus animaux mettent en évidence un transfert privilégié vers le tissu adipeux et le foie (Lakshmanan *et al.,* 1986 ; Diliberto *et al.*, 2001). Or, selon les processus de transfert décrits précédemment, la distribution tissulaire des POP dépendrait principalement des teneurs en lipides des différents tissus et de la présence de récepteurs à l'albumine. Le tissu adipeux est donc un tissu cible de par sa teneur en lipides, quant au foie, c'est sa vascularisation importante conjuguée à la présence de récepteurs et de protéines liées au processus de détoxification qui en fait un organe privilégié lors de la distribution des POP. Ces protéines (AHH, EROD, CYP, etc), peuvent être induites par les POP, ce qui justifie la place prise par le foie dans la distribution tissulaire (Diliberto *et al,* 2001 ; Golor *et al.*, 2001).

Des travaux menés chez les mammifères ont permis de distinguer deux phases dans la distribution des PCB, des dioxines, du mirex et des SCCP (Ivie *et al*., 1974 ; Lakshmanan *et al*., 1986 ; Traag *et al*., 2004 ; Ueberschär *et al*., 2007). Une distribution rapide du sang vers le foie et le muscle, liée à une perfusion importante de ces tissus est observée, tandis qu'une distribution plus lente a lieu vers le tissu adipeux et la peau.

La capacité des molécules à s'accumuler dans le tissu adipeux dépend aussi de la vitesse avec laquelle elles sont métabolisées par rapport à la cinétique de distribution dans les tissus

(Tanabe *et al.,* 1981 ; Uberschär *et al.,* 2007). Ainsi, la distribution lente n'est pas observable pour les molécules rapidement métabolisées.

La description des processus de distribution met en lumière l'impact du taux d'irrigation du tissu et de sa teneur en lipides, mais aussi des propriétés de la molécule (lipophilicité, propension à la métabolisation) sur la distribution tissulaire.

3.2.2.2. Répartition tissulaire

Comme précisé précédemment (3.2.2.1), en dehors du foie, la distribution des POP au sein de l'animal est fonction de la teneur en lipides des tissus. Le volume de distribution[19] des PCB d'un animal entier ou d'un tissu est donc dépendant, du contenu lipidique de l'animal et de celui de ses tissus (De Freitas et Norstrom, 1974 ; Braune et Norstrom, 1989 ; Henriksen *et al*., 1996 , 1998 ; Haddad *et al*., 2000). Exprimées sur la base des lipides, les concentrations en PCB dans les différents tissus sont peu variables et de faibles différences de profil de congénères (PCB) sont relevées entre les tissus (Henriksen *et al*., 1996). Chez les oiseaux, la famille des PCB est une de celles dont la distribution tissulaire des molécules est la mieux renseignée. Leur répartition dans les tissus en proportion de la dose absorbée a été classée par Drouillard (2001) suite à une étude bibliographique. L'ordre général suivant a ainsi été établi (hors tissu adipeux) : reins > foie > muscle > cerveau > sang. Cependant, des différences inter-individus peuvent être observées en ce qui concerne la distribution des lipides entre ces tissus.

En effet la répartition tissulaire est un phénomène multifactoriel et la teneur en lipides des tissus ne suffit pas à l'expliquer. Il est également nécessaire de prendre en compte la présence ou non de récepteurs à certaines protéines (albumine), voire lipoprotéines (HDL), conjointement à la répartition plasmatique des POP (Soine *et al*., 1982). Le vecteur de transport du POP influe donc sur l'affinité du POP avec les tissus, et par suite, sur la répartition tissulaire de façon générale (Gallenberg et Vodicnik, 1987). Des répartitions différentes peuvent ainsi être observées selon les molécules. Par exemple, des ratios de concentration de PCDD/F dans le foie et dans le tissu adipeux ($[PCB]_{foie}/[PCB]_{TA}$) ont été trouvés plus élevés que ceux de PCB. Braune et Norstrom (1989) rapportent en effet chez

[19] Le volume de distribution est le volume hypothétique nécessaire à la dilution de la dose administrée pour obtenir la concentration plasmatique mesurée.

l'oiseau 5 à 55% de la teneur corporelle totale en PCDD/F présente dans le foie, contre 1 à 5% pour les autres molécules organochlorées.

Parallèlement à l'impact des transporteurs sanguins, certains tissus présentent des caractéristiques particulières. D'après la synthèse de Drouillard (2001), des variations de répartition sont notamment relevées au niveau des tissus du cerveau, qui semblent limiter la rétention des PCB hautement chlorés (hepta- et octo-chlorés) comparés aux autres tissus (Henriksen *et al*., 1996 ; Sagerup *et al*., 2009). Les plus faibles concentrations de PCB observées dans le cerveau ont été attribuées au fait que le phénomène de partition est lié à la nature plus polaire des lipides du cerveau (phosphoglycérides, sphingoglycérides et cholestérol) alors que les autres tissus sont composés en majorité de triglycérides. De plus, il est important de noter que le transfert vers le cerveau est limité par la barrière hémato-encéphalique (Risau et Wolburg, 1990).

Chez la poule pondeuse, des profils différents de PCB et PCDD/F (avec une variation plus ou moins marquée selon les molécules) sont également retrouvés dans chacun des compartiments de l'organisme (Stephens *et al.*, 1995 ; Huyghebaert *et al.*, 2002). Cependant, dans certains cas, les variations de rapport de concentrations de POP dans les tissus peuvent être simplement dues à des durées d'exposition différentes au contaminant (Traag *et al.,* 2004), ce qui suggère une vitesse de répartition différente ou une activité métabolique différente selon le tissu. Ce constat implique qu'il est difficile de généraliser des pourcentages de répartition entre tissus pour chaque POP, à partir des données de la bibliographie. En effet, de nombreuses études rapportent des valeurs de répartition tissulaire, mais elles sont généralement obtenues sur des données de contamination conséquentes à une exposition non contrôlée et chez des espèces différentes.

Le niveau lipidique des tissus et la nature du vecteur de transport de la molécule sont les facteurs fondamentaux régulant la distribution tissulaire, auxquels il convient d'ajouter la capacité de la molécule à être métabolisée (cf. I-3.3.2).

3.2.3. Stockage, bioaccumulation et remobilisation

Les mécanismes d'accumulation, à l'échelle d'un organisme, conduisent à l'augmentation, au cours du temps, des concentrations de contaminants au sein de cet organisme (ou plus particulièrement au niveau de différents tissus), par rapport aux concentrations retrouvées dans les matrices auxquelles il a accès. Ces matrices sont considérées comme des vecteurs de

POP et peuvent être de diverses natures comme cela a été exposé précédemment (air, eau, sol, alimentation…). Un facteur de bioaccumulation (BAF) ou de bioconcentration (BCF), notion équivalente dans le cas des organismes terrestres, est ainsi calculable par le ratio, à l'équilibre, entre la concentration dans l'organisme et la concentration dans les vecteurs de contamination de cet organisme.

Les mécanismes d'accumulation dépendent de nombreux facteurs tels que l'âge de l'exposition, les propriétés des polluants (caractère hydrophobe, persistance, etc), mais aussi d'autres facteurs propres à l'espèce ou à l'individu comme la teneur en lipides, la capacité métabolique vis-à-vis du contaminant ou encore l'état physiologique de l'individu (âge, sexe, stade physiologique). En effet, certaines conditions liées au cycle de vie peuvent provoquer une baisse de la concentration de polluants. C'est le cas, par exemple, de la croissance ou du niveau d'engraissement qui engendrent un phénomène de dilution pondérale (mis en évidence chez le poulet, Hoogenboom *et al.,* 2004), ou encore de la ponte qui représente une sortie du polluant hors de l'animal (voir paragraphe I-3.3.3). A ces facteurs, il convient d'ajouter les facteurs environnementaux, tels que les variations de température et de photopériode au cours des saisons, qui peuvent avoir un impact indirect sur l'évolution des concentrations dans les tissus *via* une modulation des caractéristiques physiologiques de l'animal (taux d'engraissement, intensité de ponte…). Les dépôts de lipides jouent en effet un rôle clé dans la variation de la quantité de POP (DDT, PCB) présente dans les tissus et ont un impact sur la fraction de PCB rendue disponible pour les processus de redistribution et d'élimination (Ecobichon et Saschenbrecker, 1969 ; Paterson *et al.,* 2005).

Les oiseaux présentent de grandes fluctuations annuelles en ce qui concerne la quantité de leurs réserves totales en lipides (Blem, 1976 ; Clark *et al.,* 1987). Ces changements répondent à des demandes énergétiques associées au changement de saison, à l'engraissement pré-migratoire en cas d'oiseaux migrateurs et au cycle de reproduction. Même si ces phénomènes sont moindres chez les poules pondeuses, notamment en élevages professionnels, ces dernières peuvent tout de même subir le phénomène de mue naturelle ou artificielle. Durant cette période, les poules présentent de grandes variations de poids vif (diminution de 25 %) accompagnées d'une diminution de gras corporel, affectant en premier lieu le tissu adipeux mais aussi certains organes spécifiques tels que l'ovaire, l'oviducte et le foie dont la régression représente un tiers de la perte corporelle totale (Sauveur, 1988 ; Aksit *et al.,* 2003).

Plusieurs études sur les oiseaux sauvages rapportent des corrélations négatives entre teneurs en lipides d'une part et en résidus (par g de poids frais) de POP (composés organochlorés)

d'autre part, au cours des saisons et des cycles de reproduction (Findlay et DeFreitas, 1971 ; Clark *et al.,* 1987 ; Henriksen *et al*., 1996). Par exemple, Clark *et al.,* (1987) observent qu'une augmentation d'environ 75% de la teneur en lipides corporels s'accompagne d'une diminution de 50 à 60% de la concentration plasmatique ($mg.L^{-1}$) de pesticides organochlorés.

Certains éléments relevant de la mobilisation des POP ont été mis en évidence chez les mammifères. Par exemple, l'intervalle de temps entre la séquestration initiale de la molécule (PCB 153) dans le compartiment et la mobilisation de lipides, ainsi que le taux de mobilisation de lipides se sont révélés influents sur celui du xénobiotique (Colburn et Matthews, 1979). Chez des rattes en lactation, les résultats confortent l'hypothèse selon laquelle le PCB 153 retrouvé dans la glande mammaire provient bien du stock de molécules présent dans le tissu adipeux. Cela illustre une mobilisation de la réserve de POP du tissu adipeux (Gallenberg et Vodicnik, 1987).

Des études comparatives de concentrations de lipides et de POP (PCB, DDT) réalisées chez des mammifères mobilisant leurs réserves énergétiques (cas de gestation, de lactation ou de restriction alimentaire), indiquent que les POP et les lipides ne sont pas mobilisés de façon proportionnelle. Les lipides ont tendance à être plus rapidement mobilisés et les concentrations de POP dans le tissu adipeux augmentent lors d'une diminution de la teneur en lipides du tissu (Dale, 1962 ; Backman et Kolmodin-Hedman, 1978 ; Gallenberg et Vodicnik, 1987).

Une fois dans la circulation plasmatique, les xénobiotiques sont acheminés grâce à leurs transporteurs jusqu'à des compartiments de stockage, comme le tissu adipeux. Par la suite, notamment pour la composition de produits contenant des lipides tels que les œufs ou lors de puisement dans les réserves, les taux de mobilisation des lipides et du xénobiotique ne sont pas proportionnels.

En conclusion, l'étude de la répartition tissulaire des POP congénère-dépendante et du processus d'accumulation a mis en évidence l'impact sur ces phénomènes, des propriétés intrinsèques des xénobiotiques mais également des propriétés biologiques de l'organisme et de l'espèce étudiée (Tableau I-6). Norstrom et Letcher (1996) ont représenté sur leur diagramme (Figure I-14) l'importance des caractères hydrophobe et apolaire de la molécule et des processus de métabolisation (cf. I-3.3.2) sur le phénomène de bioaccumulation.

Tableau I- 6 : Synthèse des principaux facteurs influençant la distribution des POP au sein de l'animal

Facteurs liés aux caractéristiques …	**Etapes de la distribution**		
	Prise en charge par les constituants du sang	**Répartition tissulaire**	**Stockage, bioaccumulation et remobilisation**
… de la molécule	- affinité pour les constituants du sang	- susceptibilité à être métabolisée - hydrophobicité	- hydrophobicité et persistance
… de l'animal	- proportion des différents constituants du sang	- teneur en lipides et nature des lipides du tissu -vascularisation du tissu - transporteurs sanguins	- teneur en lipides - capacité métabolique vis-à-vis de la molécule - équilibre énergétique - état physiologique et d'engraissement

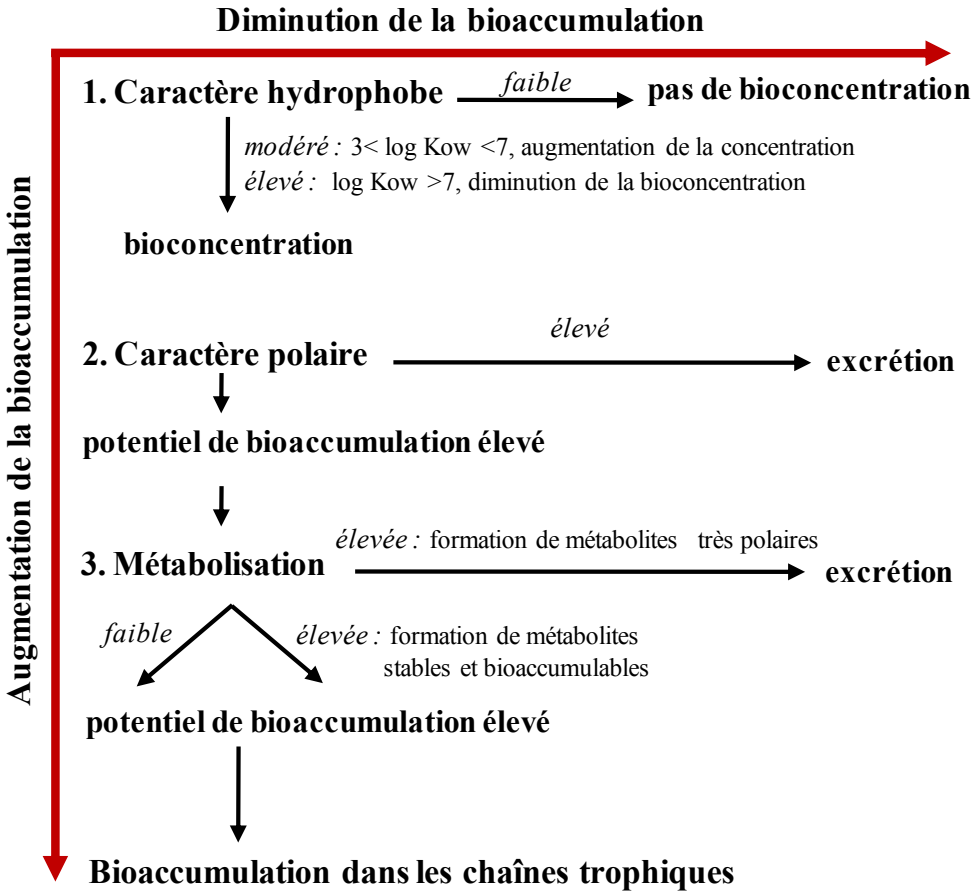


Figure I- 14 : Paramètres agissant sur les processus de bioaccumulation d'un xénobiotique (d'après Norstrom et Letcher, 1996)

3.3. Elimination

3.3.1. Taux d'élimination au niveau de l'organisme entier et demi-vie

La comparaison des taux d'élimination de molécules différentes est souvent faite par la comparaison des demi-vies[20]. Ces dernières peuvent être calculées[21] à partir de données de clairance[22] (ou d'élimination) au niveau de l'organisme entier, ou bien elles peuvent dériver de données qui rapportent des temps d'atteinte de l'équilibre. Dans ce dernier cas, il est classiquement supposé que l'équilibre est atteint après cinq demi-vies (Moulin et Coquerel, 1998 ; Page *et al.,* 1999). Les demi-vies supposent implicitement des cinétiques de transfert de premier ordre.

Les demi-vies sont calculées sur la base de l'évolution des concentrations au niveau des tissus. Leurs valeurs sont donc sensibles à la dilution due à la croissance, comme à la perte de poids pouvant arriver au cours de l'étude. Cela montre l'importance et l'intérêt de prendre en compte des variations de taille du corps ou de volume du tissu adipeux lors de modélisation des phénomènes de transfert de POP à l'échelle de l'animal (Clark *et al.,* 1987). De plus, une corrélation entre le « turn-over[23] » des réserves adipeuses et le taux d'élimination a été rapportée par De Freitas et Norstrom (1974). Ainsi, chez le poisson, plus le turn-over est important, plus la vitesse d'élimination du polluant est rapide (Paterson *et al.*, 2005). Suivant la même logique, il a été montré qu'une personne obèse éliminera moins vite qu'une personne mince (Pelletier *et al.*, 2003). La valeur de la demi-vie est également l'illustration de la susceptibilité de chacune des molécules à être métabolisée chez l'oiseau et reflète le comportement de la molécule lors de son accumulation et de son épuration. Enfin, les POP peuvent aussi être éliminés de l'organisme par la production d'œufs et par une excrétion urinaire ou biliaire.

3.3.2. Biotransformation

Le métabolisme est le processus de transformation chimique de la substance par les enzymes au sein d'un organe. Les molécules mères sont ainsi transformées en métabolites, formes

---

[20] Pour une même espèce et un même individu, la demi-vie est un indicateur de la durée de la persistance du xénobiotique dans l'organisme. Elle pourra être affectée par des modifications de la clairance ou du volume de distribution (Toutain et Bousquet-Mélou, 2007).

[21] Calcul de la demi-vie pour une cinétique de 1er ordre : $t_{1/2}=\ln 2/k_e$ avec k_e la constante d'élimination (en s^{-1})

[22] La clairance est la capacité globale de l'organisme à éliminer une molécule. Elle correspond au volume de plasma totalement épuré par unité de temps. La clairance totale est égale à la somme des clairances de chaque organe susceptible d'intervenir dans l'élimination du xénobiotique. La notion de clairance recouvre deux aspects : la biotransformation et l'excrétion (*via* les reins) du composé sous sa forme initiale.

[23] Est compris ici par « turn-over », l'ensemble du processus menant au renouvellement des réserves lipidiques.

généralement plus hydrosolubles et donc plus facilement éliminées. Le métabolisme est un des facteurs influençant le taux d'élimination et les propriétés de bioaccumulation des PCB chez les vertébrés (Bailey et Bunyan, 1972 ; De Freitas et Norstrom, 1974 ; Drouillard *et al.*, 2001 ; 2007 ; MacLachlan, 2008). La capacité des oiseaux à métaboliser[24] les PCB est souvent considérée comme intermédiaire entre celle des mammifères et celle des poissons (Bailey et Bunyan, 1972 ; Braune et Norstrom, 1989).

3.3.2.1. Mécanismes de biotransformation des POP

Les réactions de biotransformation sont classiquement séparées en deux phases (Williams, 1959) (Figure I-15):

- phase I = phase de fonctionnalisation : ensemble des réactions d'hydrolyse, de réduction ou d'oxydation. La molécule formée est un peu plus hydrosoluble, mais surtout a incorporé un groupement fonctionnel, permettant au métabolite d'être pris en charge au cours de la phase II.
- phase II = phase de conjugaison : les métabolites issus de la phase I forment un complexe avec des groupements hydrophiles, nommés co-facteurs, *via* l'action d'enzymes dites de phase II. Ils peuvent être excrétés par voie urinaire ou biliaire.

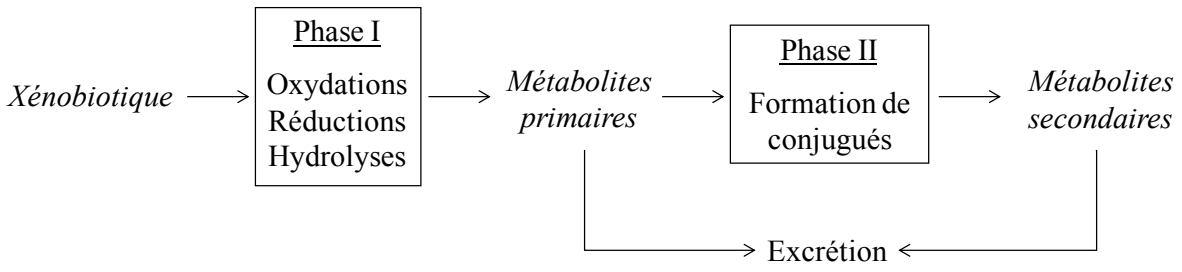


Figure I- 15 : Schéma général du métabolisme de phase I et de phase II

Les réactions de biotransformation font intervenir différents types d'enzymes et de co-facteurs selon le xénobiotique et l'espèce considérée.

Ce phénomène a principalement lieu au niveau du foie, comme le rapportent de nombreux auteurs d'après la thèse de Drouillard (2001). Il peut intervenir au moment de l'absorption,

[24] Cette capacité est parfois appelée « clairance métabolique ». Elle dépend de la capacité du système enzymatique hépatique à métaboliser le xénobiotique.

avant la distribution dans l'organisme : on parle alors de métabolisme de premier passage (cf. paragraphe 3.1.1). Les réactions de phases I et II se produisent au niveau du cytosol, des microsomes ou des mitochondries de la cellule. Les mécanismes mis en jeu lors de ces différentes phases ont plus souvent été étudiés chez les mammifères (rongeurs, humains) ou chez le poisson. En première approche, il est considéré que les mécanismes mis en jeu chez l'oiseau sont du même type que chez le mammifère, avec cependant une intensité de métabolisme plus faible (Bailey et Bunyan, 1972 ; Gilday *et al.,* 1998). Par exemple, il a en effet été observé une bioaccumulation de pesticides, tels que la dieldrine et le DDE, plus élevée chez les oiseaux que chez les mammifères, et ce, en raison d'une différence de métabolisme (Walker, 1983).

Plus particulièrement, les cytochromes P450 sont connus pour être impliqués dans le métabolisme oxydatif (phase I) qui représente la voie principale de biotransformation de nombreux POP, en particulier : les HAP, les PCB, les PCDD/F, les RFB ainsi que certains pesticides (Rozemeijer *et al.*, 1995 ; Walker, 1998 ; Hakk et Letcher, 2003 ; Watanabe *et al*., 2005). Ils peuvent être induits par ces mêmes molécules (Bailey et Bunyan, 1972 ; Walker, 1998). Les xénobiotiques, après avoir subi les réactions d'oxydation, de réduction ou d'hydrolyse de la phase I, peuvent se lier, sous l'action d'une enzyme, avec un groupement hydrophile, appelé co-facteur, tel que le glutathion, les glucuronides ou les sulfates par exemple. Cela a lieu durant la phase de conjugaison. Ce mécanisme augmente la polarité des xénobiotiques ce qui facilite leur excrétion (Mulder *et al.,* 1990 ; Commandeur *et al.,* 1995).

D'autres types de réactions peuvent être observées, notamment des réactions de débromination pour les PBDE (Hakk et Letcher, 2003 ; Hakk *et al.*, 2010). Cependant les mécanismes des voies de dégradation de ces molécules plus récentes sont multiples et restent peu connus chez l'oiseau.

Pour finir, il est important de noter que les métabolites formés ne sont pas à négliger car ils peuvent présenter une toxicité équivalente ou supérieure à la molécule mère (Hakk et Letcher, 2003).

3.3.2.2. Un métabolisme actif vis-à-vis des POP identifié chez les oiseaux

Certaines familles de POP sont réputées pour être très métabolisées par rapport à d'autres, par exemple les HAP par rapport aux PCB. Au sein d'une même famille, des susceptibilités à la métabolisation différentes sont également constatées. Par exemple, il a été montré chez les

oiseaux, que les PCB 52 et 101 sont très métabolisés par rapport aux autres congénères (cf. I-3.3.2.3.) (de Vos *et al.,* 2003 ; Maervoet *et al.,* 2004 ; de Vos *et al.,* 2005).

Un panel de réactions de biotransformation existe vis-à-vis des POP chez l'oiseau. Cette diversité est mise en évidence par l'étude des produits du métabolisme et de marqueurs du métabolisme. Par exemple, des PBDE débromés ou méthoxylés (McKernan *et al.* 2010 ; Hakk *et al.*, 2010), des hydroxy- et méthylsulfone-PCB (Bailey et Bunyan, 1972 ; De Freitas et Norstrom 1974 ; Borlakoglu et Wilkins, 1993 ; Helgason *et al.*, 2010 ; Jôrundsdottir *et al.*, 2010), ou encore du pentabromocyclododécène (métabolite de l'HBCD) (Hiebl et Vetter, 2007) ont notamment été retrouvés dans les œufs ou les tissus d'oiseaux. Quant aux activités enzymatiques et teneurs en enzymes témoins de la biotransformation des POP (ex : activité ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD), protéine CYP), elles ont fait l'objet de nombreuses études, mettant en évidence le métabolisme de différents POP, dont entre autres celui des PCDD/F et des PCB (Guruge et Tanabe, 1997 ; Gilday *et al*., 1998 ; Borga *et al.,* 2005 ; Kubota *et al.*, 2005 ; Watanabe *et al.,* 2005 ; Numata *et al.,* 2008 ; Hervé *et al.,* 2010).

3.3.2.3. Facteurs influençant le métabolisme

Caractéristiques de l'exposition

Les enzymes sont induites par certaines substances (parfois il s'agit de la molécule même à métaboliser : on parle d'auto-induction). Cette induction est dépendante des molécules présentes (donc du profil de l'exposition) (Van den Berg *et al.,* 1994), mais aussi de la dose de xénobiotique absorbée, comme cela a été montré chez la caille du Japon (*Coturnix coturnix japonica*) exposée à des niveaux croissants de PCB (Marsili *et al.*, 1996).

Propriétés de l'animal

Comme cela a été noté précédemment (I-3.3.2.1), le métabolisme diffère selon s'il s'agit des oiseaux, des mammifères ou encore des poissons (Guruge et Tanabe, 1997). Certains auteurs ont observé des profils de métabolites différents selon les espèces d'oiseaux, ce qui suggère des modulations de l'expression du métabolisme selon l'espèce, notamment en ce qui concerne les PCB (Helgason *et al.*, 2010 ; Jörundsdottir *et al.*, 2010) ou les PCDD/F (Gilday *et al*., 1998 ; Watanabe *et al.*, 2005 ; Hervé *et al.*, 2010).

Propriétés de la molécule

Les congénères d'une même famille de POP peuvent présenter une propension à la métabolisation différente les uns des autres. Notamment, la relation entre la structure des PCB et leur degré de métabolisation a été étudiée chez les mammifères et l'oiseau, ce qui a conduit à classer certaines molécules selon leur comportement. Les premières informations sur ces relations structure-activité (SAR) décrivant une biotransformation des PCB par les oiseaux sont le produit d'observation de différences entre les profils de congénères retenus dans les tissus et ceux de l'ingéré (ou de l'exposition environnante). De Freitas et Norstrom (1974), en réalisant une des premières études en milieu contrôlé chez l'oiseau, ont établi que le taux de métabolisme des PCB dépendait principalement de la position des atomes de chlore (-Cl), plutôt que du degré de chloration. Différents types de classes de PCB ont été proposées par la suite : tout d'abord en fonction de la présence de deux atomes de carbone non substitués aux positions adjacentes *méta* et *para* ou *ortho* et *méta* (Borlakoglu *et al.*, 1989 ; Braune et Norstrom, 1989) (Figure I-16). Ce critère de positionnement des atomes de carbone non substitués avait déjà été mis en avant lors d'études *in vitro* du métabolisme des polybromobiphenyls (PBB) (Mills *et al.*, 1985). Les molécules possédant de tels sites non substitués sont plus facilement métabolisées que les autres, d'où la dénomination de deux groupes de congénères: « readily cleared » et « persistent » par certains auteurs (Drouillard, 2001 ; Drouillard et Norstrom, 2003). Puis des catégories intermédiaires de molécules ont été ajoutées afin d'affiner la classification, en prenant en compte le nombre d'atomes de chlore en position *ortho* comme critère supplémentaire, défavorisant la métabolisation (Rozemeijer *et al.*, 1995 ; Borga *et al.*, 2005) (cf. Tableau I-7). Pour finir et afin de relier l'impact de ces critères de positionnement à l'effet global du degré de chloration sur la capacité des PCB à être métabolisé, il est cohérent qu'un nombre croissant d'atomes de chlore sur la molécule diminue la probabilité d'avoir deux carbones adjacents non substitués.

Certains PCB sont finalement moins métabolisés chez les oiseaux que ne pourrait le prédire leur classe structurelle. Guruge et Tanabe (1997) avancent comme explication à ce phénomène, une moindre activité du matériel enzymatique impliqué dans le métabolisme des molécules non substituées en *ortho* et *méta* chez l'oiseau.

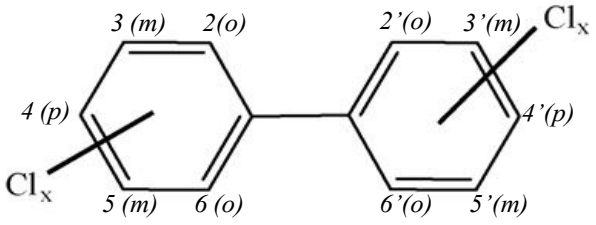


Figure I- 16 : Dénomination des sites de chloration des PCB
(*o : ortho ; m : méta ; p : para ; CL_x : atome de Chlore*)

Tableau I- 7 : Classification des PCB reliant les caractéristiques structurelles et leur capacité à être métabolisés (d'après Borlakoglu *et al.*, 1989 ; Braune et Norstrom, 1989 ; Rozemeijer *et al.*, 1995 ; Drouillard, 2001; Borga *et al.*, 2005) – Application aux PCB-I.

Tendance à la métabolisation	**Première classification**		**Deuxième classification**		**Classification des PCB-I**				
	groupe	critère	**groupe**	critère	**PCB-I**	Caractéristiques du congénère			
		Position de 2 -H adjacents		nb de -Cl en *ortho*		nb -Cl	m,p	o,m	nb -Cl en *ortho*
+++	**1**	en *méta-para*	**1a**	> 2	**-**				
			1b	≤ 2	**CB 52**	4	2	0	2
					CB 101	5	1	0	2
+	**2**	seulement en *ortho-méta*	**2a**	< 2	**CB 28**	3	0	3	1
					CB 118	5	0	1	1
			2b	≥ 2	**CB 138**	6	0	1	2
	3	absence	**3**		**CB 153**	6	0	0	2
					CB 180	7	0	0	2

+++ : « readily cleared » dans la classification de Drouillard (2001)
+ : « persistent » dans la classification de Drouillard (2001)

Les études concernant le métabolisme des PBDE émergent depuis quelques années. Un comportement propre à chaque congénère, vis-à-vis de leur biotransformation, a été observé chez l'oiseau (McKernan *et al.*, 2010). Une mise en relation entre la structure moléculaire et la propension à la dégradation métabolique suggère des taux de dégradations plus élevés pour les PBDE faiblement bromés, avec un atome de brome (-Br) en position *ortho* et des sites adjacent non substitués en *méta* et *para* (Harju *et al.*, 2007).

Il existe donc plusieurs systèmes impliqués dans le métabolisme des POP, leur présence et activité varient cependant en quantité et qualité d'une espèce à l'autre. Cela a pour conséquence qu'une même molécule peut être métabolisée à des intensités différentes d'une espèce à l'autre. Il convient donc d'être attentif à ces différences avant d'effectuer des extrapolations d'une espèce à l'autre.

De par leurs différentes structures, les POP présentent une propension variée à la métabolisation. Le panel des réactions de biotransformation est vaste et met en jeu de nombreuses enzymes et co-facteurs. Les métabolites produits, généralement plus hydophiles que les molécules mères sont plus facilement excrétés *via* l'urine ou la bile. Une autre voie d'élimination, telle que la production d'œuf, peuvent prendre en charge les molécules mères lipophile

3.3.3. Production d'œuf : une voie d'élimination des POP

3.3.3.1. Contamination et composition de l'œuf

L'élimination des POP *via* l'œuf peut représenter un mécanisme d'élimination potentiellement non négligeable chez les poules pondeuses. Par exemple, à l'équilibre, la quantité de PCDD/F éliminée dans un œuf pondu à un temps t peut représenter entre 1 et 5 % de la quantité stockée au niveau du gras de la poule (Stephens *et al.,* 1995). Cette proportion de la quantité éliminée par rapport à la quantité stockée est variable selon les molécules et les espèces (Drouillard, 2001). Certains auteurs ont mis en évidence l'impact de la ponte sur la teneur corporelle en xénobiotiques, par comparaison des teneurs dans le gras corporel d'un mâle et d'une femelle d'une même espèce. La concentration de contaminants (PBB, PCB, PBDE) dans les tissus du mâle est deux à quatre fois plus élevée que chez la femelle en ponte (Babish *et al.,* 1975 ; Guruge et Tanabe, 1997 ; Luo *et al*., 2009). Ce rapport peut être encore plus élevé : un facteur 26 est observé dans le cas de décontamination du mirex chez la caille du Japon (Ivie *et al.,* 1974). Cependant, les différences observées entre les deux sexes peuvent aussi provenir de variations au niveau de l'ingestion et du métabolisme.

Les POP, dont les transferts vers les différentes parties de l'œuf sont connus (pesticides organochlorés, PCB, SCCP), sont principalement retrouvés dans les lipides du jaune (Zabik et Dugan, 1971 ; Huyghebaert *et al.*, 2002 ; Ueberschär *et al*., 2007). Les quantités retrouvées dans le blanc sont négligeables. De par leur hydrophobicité, les POP se déposent en effet majoritairement avec les lipides de l'œuf, qui sont pour leur part localisés dans le jaune d'œuf. Ces lipides représentent pour un œuf de poule de 60 g de poids frais, 63% de la MS du jaune contre 0,25% de la MS de l'albumen (Thapon et Bourgeois, 1994). La composition de l'œuf est rappelée dans le tableau I-8. Les précurseurs du jaune viennent essentiellement du foie. Cet organe joue un rôle essentiel dans la synthèse des lipides chez l'oiseau. Recevant directement les produits de la digestion en l'absence de système lymphatique développé, il est

responsable de la majeure partie des synthèses lipidiques de l'organisme. Les lipides utilisés pour les précurseurs du jaune peuvent avoir des origines variées. Il peut s'agir de :

- lipides endogènes mobilisés à partir de tissus extra-hépatiques,

- lipides *de novo* synthétisés par le foie à partir de carbohydrates et de protéines,

- lipides alimentaires récemment absorbés (Leclercq, 1972).

La répartition de POP dans les différentes fractions de l'œuf a été étudiée : il en résulte que ces molécules sont stockées avec les lipoprotéines du jaune, en particulier avec les LDL (lipovitellenine), mais également avec une autre lipoprotéine majeure : la lipovitelline, et avec une protéine soluble dans l'eau : la livétine (Zabik et Dugan, 1971).

Tableau I- 8 : Composition du jaune d'œuf (Sauveur, 1988)

Molécules	**% de la matière sèche du jaune**
Protéines	33
Livetine	4 – 10
Vitelline	4 – 15
Vitellenine	8 – 9
Phosvitine	5 – 6
Lipides	63
Glucose libre	0,4
Minéraux et vitamines	3,6

3.3.3.2. Cinétique de contamination et formation de l'œuf

Jaune

Plusieurs expérimentations montrent que les xénobiotiques apparaissent dans l'œuf les jours suivant l'exposition. Cela suggère que les xénobiotiques de l'aliment sont déposés dans les jaunes durant leur dernière phase de croissance (phase d'une durée de huit à dix jours) (Ivie *et al.,* 1974 ; Donoghue *et al.*, 1997 ; Donoghue, 2001). Afin de mieux comprendre les mécanismes de transfert de xénobiotiques vers le jaune, plusieurs auteurs ont mis en place des protocoles permettant de visualiser le devenir des molécules dans le jaune, après leur administration à des poules. Le dépôt quotidien de jaune, en anneaux, lors du développement du vitellus (Sauveur, 1988), est visible par teinture (Warren et Conrad, 1939) ou par imagerie par résonance magnétique (IRM) (Donoghue, 2001). Par exemple, l'incorporation de médicament, tel que le magnevist (gadopentetate de diméglumine) a été visualisée par IRM (Donoghue, 2001). Cette substance a été administrée par intraveineuse à des poules pour

évaluer son transfert vers le jaune à chacune des étapes du développement de ce dernier. Les images des jaunes obtenues ont démontré que l'incorporation de résidus chimiques dans la structure annulaire dépend de la phase à laquelle se trouvait le jaune en formation au moment de l'exposition (Figure I-17). Un œuf pondu peu après l'injection (par exemple à deux jours) présente des résidus de xénobiotiques dans les dernières couches de dépôt du jaune, tandis qu'un œuf pondu plus tard (jusqu'à environ huit à dix jours, durée correspondant à la formation du jaune) présente des résidus dans les couches internes, déposées au début de la formation du jaune. Ces résultats viennent confirmer le fait que les xénobiotiques peuvent être incorporés au cours de la formation préovulatoire[25] du jaune d'œuf, en même temps que sont déposés les lipides du jaune (Figure I-18). L'ensemble des jaunes à des stades différents de la dernière phase d'accroissement forme la grappe ovarienne.

A- B- C-

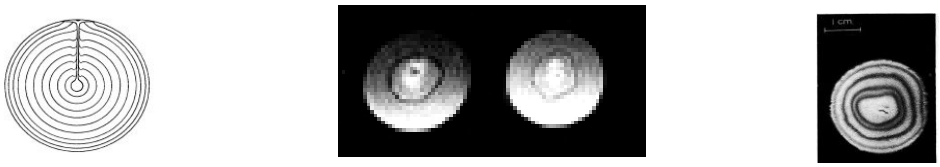


Figure I- 17 : Visualisation de la structure en anneaux du jaune,
A – Dessin réalisé à partir d'une coloration au Bleu Soudan III (Warren et Conrad, 1939) ; B- Visualisation par IRM après injection de Magnevist (Donoghue, 2001) ; C- Coloration au Soudan noir et rouge écarlate (Lacassagne, 1957)

Figure I- 18 : Grappe de follicules à différents stades de développement
(cliché pris lors de l'abattage de nos animaux expérimentaux)

Les lipides du foie à destination du jaune, transportés jusqu'aux ovocytes par les VLDL – également potentiels transporteurs de POP (Ikeda *et al.,* 2004) – représentent 93 % des lipides du jaune (Speake *et al*., 1998) et proviennent du foie. Chez la poule pondeuse, ils ne subissent pas de lipolyse sur le trajet allant du foie à l'oocyte (Griffin, 1992; Walzem, 1996) et sont réduit à un diamètre de 25 à 30 nm de diamètre chez une poule en production contre 50 à 60 nm chez une poule ne pondant pas (Thapon et Bourgeois, 1994 ; Walzem, 1996). Ces précurseurs lipidiques sont acheminés dans la paroi folliculaire par voie sanguine et libérés à

[25] La formation dite préovulatoire correspond à la dernière phase d'accroissement du jaune d'œuf (=phase d'accroissement rapide) d'une durée de 8 à 10 jours.

proximité de la membrane baso-latérale grâce à la présence de grandes fenestrations des capillaires sanguins présents à ce niveau (Griffin *et al.,* 1984 cité par Thapon et Bourgeois, 1994). Cette membrane empêche le passage des portomicrons de grande taille (150 nm). Elle permet en revanche le passage des VLDL et de la vitellogénine qui transitent entre les cellules de la granulosa (Figure I-19). Ensuite ces précurseurs du jaune entrent dans l'ovocyte par endocytose. Ce processus est rendu possible grâce à des récepteurs membranaires de l'ovocyte qui sont différents des récepteurs aux VLDL situés au niveau des cellules somatiques (Nimpf et Schneider, 1991; Bujo *et al.*, 1997). A l'extrême, l'absence de ces récepteurs fonctionnels entraîne une absence de ponte (Nimpf et Schneider, 1991).

Un processus analogue permettrait la pénétration des protéines liant les vitamines ou les immunoglobines (Thapon et Bourgeois, 1994).

Blanc

La formation du blanc et de la coquille s'effectue en 24 heures. Cette durée ainsi que la composition du blanc sont à prendre en compte pour comprendre les différences de présence éventuelle de résidus et de leur cinétique dans chacune des parties de l'œuf. En effet le blanc, milieu très hydrophile, peut éventuellement contenir des résidus de POP ou de leur métabolites, *via* un transport supposé de POP avec l'albumine qui s'est révélée s'associer à certains xénobiotiques dans le plasma des mammifères (Viau et Carrier, 1995).

L'ensemble des étapes de la formation de l'œuf est rappelé sur la figure I-20.

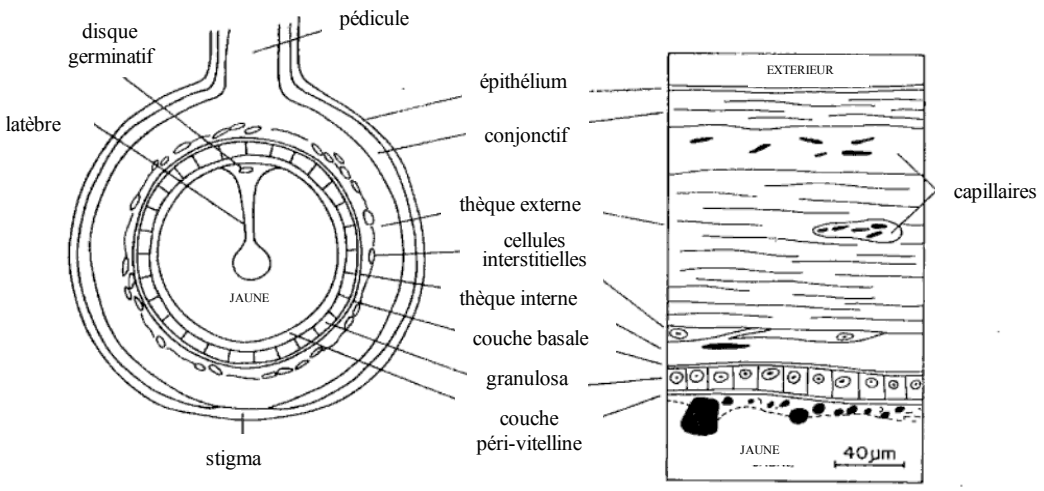


Figure I- 19 : Structure de la paroi d'un follicule en phase d'accroissement rapide
(Sauveur, 1988 d'après Gilbert, 1979)

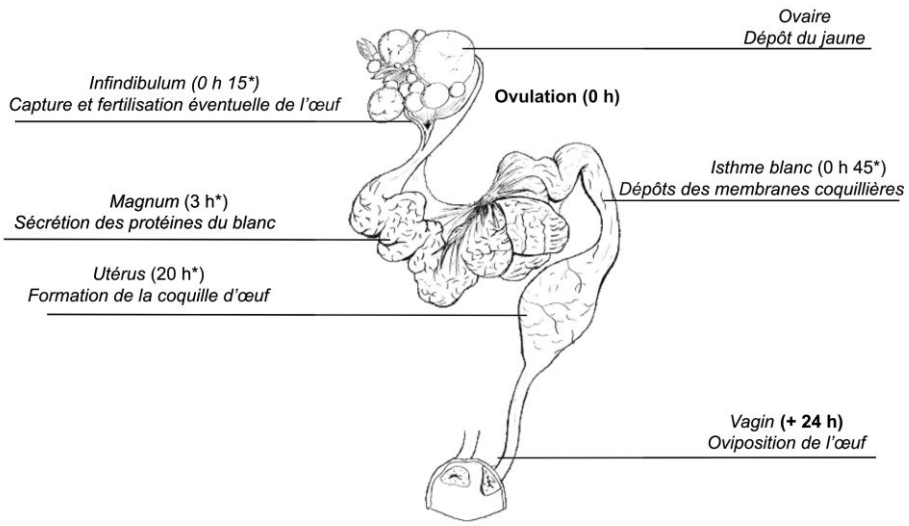


Figure I- 20 : Représentation de l'oviducte de poule et de la séquence spatiale et temporelle de la formation de l'œuf
(Travel *et al.*, 2010 d'après Romanoff et Romanoff, 1949)

3.3.3.3. Lien entre la contamination dans l'œuf, le tissu abdominal et l'aliment : les mécanismes sous-jacents

L'observation du profil de contaminants (lors de l'exposition à un mélange de molécules) et de la cinétique de contamination de l'œuf d'une part et du tissu adipeux d'autre part, renseignent sur les mécanismes potentiellement mis en jeu lors du transfert de xénobiotiques vers l'œuf.

Les concentrations de contaminants dans l'œuf suivent une évolution du même type que celles des résidus dans les tissus de la poule, que cela soit en période d'exposition ou d'épuration, avec cependant des variations selon les caractéristiques des molécules, comme leur propension à la métabolisation (Kan et Jonker-den Rooyen, 1978 ; Traag *et al.*, 2004).

Le ratio des concentrations de PCB dans l'œuf et dans la carcasse est plus ou moins égal à 1 (données synthétisées par Drouillard (2001)). Cependant des variations sont observables comme cela a été évoqué pour la répartition entre tissus (paragraphe 3.2.2.2).

Il convient alors de s'intéresser au métabolisme des lipides, pour mieux comprendre les liens existant entre les lipides des réserves corporelles et du jaune d'œuf. Le foie est l'organe de première importance dans ce processus. Il élabore des lipides vitellins dont les éléments (principalement les acides gras) proviennent préférentiellement du régime alimentaire (Leclercq, 1972). En effet, les acides gras des réserves adipeuses ne participent que pour une faible part à la vitellogenèse (ex : 30 % pour l'acide palmitique). Parallèlement au dépôt d'acides gras qu'elle effectue au niveau de l'œuf, la poule en dépose chaque jour presque

autant dans ses réserves corporelles. La relation entre l'intensité de ces deux dépôts n'est pas toujours linéaire. En cas de lipogenèse intense, la part destinée aux réserves adipeuses s'accroît plus vite que la part destinée à l'œuf. Au contraire, en cas de régime lipidoprive, la synthèse d'acides gras destinée au jaune d'œuf est supérieure à celle destinée au gras de stockage (Leclercq, 1972). Cela est lié au fait que le tissu adipeux est essentiellement un lieu de stockage, dans lequel, en conditions normales, le dépôt revêt une importance supérieure à l'utilisation. Ainsi, en cas de léger rationnement (ration représentant 95% de la ration à volonté), les performances de ponte ne changent pas. Le léger rationnement ne modifie pas la vitesse de lipolyse (environ 1,5 g par jour) mais réduit celle du dépôt (1,66 contre 2,95 g par jour) (Leclercq, 1975). L'intensité de ce dépôt est en partie liée à celle de la vitellogenèse. De ce fait, l'état d'engraissement peut être lié à la ponte. La figure I-21 résume le transport des lipides chez l'oiseau.

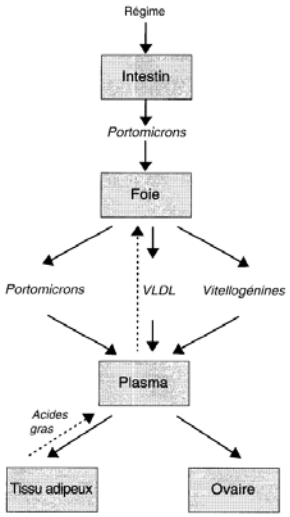


Figure I- 21 : Transport des lipides chez l'oiseau (Hermier, 1994)

3.3.3.4. Facteurs influençant le transfert vers l'œuf

Le transfert vers l'œuf est donc très intimement lié au métabolisme lipidique et au fait que les xénobiotiques sont pris en charge dans le plasma par les lipoprotéines, qui entreront dans la composition du jaune. A partir de ce constat, plusieurs facteurs pouvant intervenir au niveau du transfert vers l'œuf sont à considérer, en plus de l'intensité de ponte qui traduit une diminution du flux de sortie et donc une augmentation de la charge corporelle en POP. Ces facteurs sont répertoriés dans le Tableau I-9.

Tableau I- 9 : Facteurs influençant l'élimination des POP via la production d'œuf

Facteurs	Actions	Références
Caractéristiques de l'exposition		
Durée de l'exposition	A mettre en lien avec la durée de la formation du jaune	Donoghue *et al*., 1997
Propriétés de la molécule		
Nature du transporteur	Tous les POP n'ont pas la même affinité pour les différents transporteurs sanguins. L'affinité pour les VLDL à destination du jaune favorise le transfert vers l'œuf.	Borlakoglu *et al*., 1990
Susceptibilité métabolique du POP	La cinétique d'une molécule très métabolisée présentera un état d'équilibre dans le jaune plus rapidement qu'une molécule très persistante.	Traag *et al.,* 2004 MacLachlan, 2010
Physiologie de l'animal		
Quantité de lipides déposés dans l'œuf	Augmentation du poids du jaune en fonction de l'âge	Thapon et Bourgeois, 1994
Interruption de ponte / /mue	Modification de la proportion des fractions lipidiques du sang.	Barron *et al.*, 1999

L'âge de la poule et certains facteurs environnementaux (température et photopériode) peuvent jouer sur les caractéristiques de ponte et de l'œuf chez la poule (intensité de ponte, poids des œufs) (Zakaria *et al*., 1983 ; Sauveur, 1988 ; Thapon et Bourgeois, 1994).

La formation et la composition lipidique du jaune d'œuf fait de ce dernier une matrice d'élimination des POP ayant une forte affinité pour les VLDL. Les performances de ponte ont de ce fait des répercussions sur la charge corporelle de l'animal.

3.3.4. Excrétion fécale et urinaire

Après avoir été distribué et éventuellement métabolisé, le xénobiotique, s'il n'est pas éliminé *via* la ponte, peut sortir de l'organisme par des fonctions d'excrétion au niveau rénal, biliaire, pulmonaire, cutané (sueur) ou encore *via* l'efflux dans les intestins (Jandacek et Tso, 2001).

La voie urinaire est difficile à étudier chez l'oiseau à cause du mélange de l'urine avec les fèces, mais étant donné le milieu hydrophile que présente l'urine, et aux vues des expériences menées chez les mammifères, la voie urinaire est souvent considérée comme négligeable pour les POP, notamment face à l'excrétion fécale (Hakk *et al.,* 2001 ; Drouillard, 2001 ; Jandacek et Tso, 2001). Cette dernière peut être la résultante d'une excrétion par voie biliaire ou non-

biliaire - regroupant l'exfoliation de l'épithélium ou la diffusion à travers la muqueuse (Abraham *et al*., 1996 ; Jandacek et Tso, 2001*)*. Une étude chez l'aigle à tête blanche (*Haliaeetus leucocephalus*) a permis d'estimer, pour les PCDD/F et PCB, l'excrétion par voie biliaire entre 0,015 à 0,025% de la charge stockée dans le gras par jour (Kumar *et al.,* 2002).

Clark *et al.* (1987) et Drouillard et Norstrom (2003) rapportent que l'excrétion fécale dépend du pourcentage de lipides dans les fèces, ainsi que de l'espèce animale et du type d'alimentation. Cela est à relier avec l'équilibre de diffusion allant dans le sens inverse de l'absorption (retour des POP du milieu intérieur à la lumière de l'intestin). Cependant ces voies restent difficiles à évaluer.

L'étude de la fraction excrétée *via* les fientes de poule pondeuse a rapporté une présence de 5 % des PCB ingérés cumulés avec un profil de PCB proche de celui de l'aliment contaminé. Cela met en évidence le faible impact de la microflore gastro-intestinale sur le profil de PCB ingérés. Ce résultat montre également que le profil de contaminants de l'excréta peut renseigner quant au profil de la source de contamination. Cela peut aider à déterminer quelle est la source de contamination par comparaison des profils de PCB dans les différentes matrices étudiées (Huyghebaert *et al.*, 2002). De plus, la concentration de PCB retrouvée dans les excréta de la poule pondeuse chute brusquement dès que les poules ne sont plus exposées à un aliment contaminé. Cela indique une faible mobilisation des PCB des tissus en direction de la voie urinaire (Huyghebaert *et al.*, 2002) par rapport à la fraction excrétée correspondant à la partie non absorbée de l'ingéré.

3.3.5. Autres voies d'élimination

Drouillard (2001) répertorie le peu de données concernant les autres voies d'élimination des PCB. Il en résulte que l'élimination par :

- exhalation est un processus très lent et négligeable,

- voie uropygiale, c'est-à-dire au niveau des glandes sécrétrices d'huile pour l'entretien des plumes, existe puisque des PCB ont été retrouvés au niveau de ces sécrétions chez certains oiseaux (Van den Brink *et al*., 1998). Plus généralement, le PCB 153 a été retrouvé dans les plumes et il est supposé que le transfert de POP ait lieu durant leur formation, lorsqu'elles sont fortement connectées avec le réseau sanguin (Van den Steen *et al.*, 2007).

Au cours des différentes étapes du processus d'accessibilité et de l'ADME, les propriétés de la matrice contaminée, de la molécule et de l'animal peuvent intervenir (Figure I-22). A l'échelle de l'élevage, les pratiques mises en œuvre, ainsi que les conditions environnementales peuvent influencer directement ou indirectement le niveau de contamination des produits avicoles (Figure I-23).

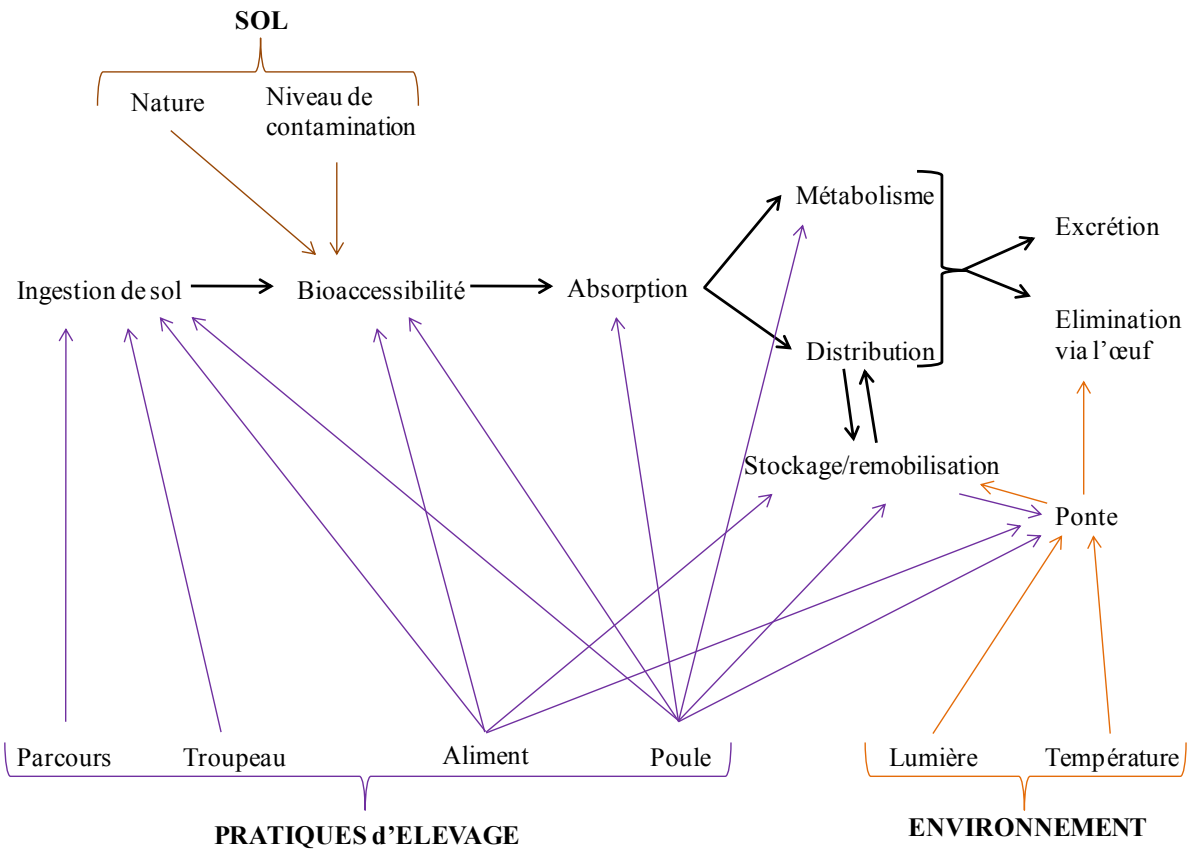


Figure I- 22 : Devenir des xénobiotiques et facteurs influençant chaque processus à l'échelle de l'élevage et de la poule pondeuse

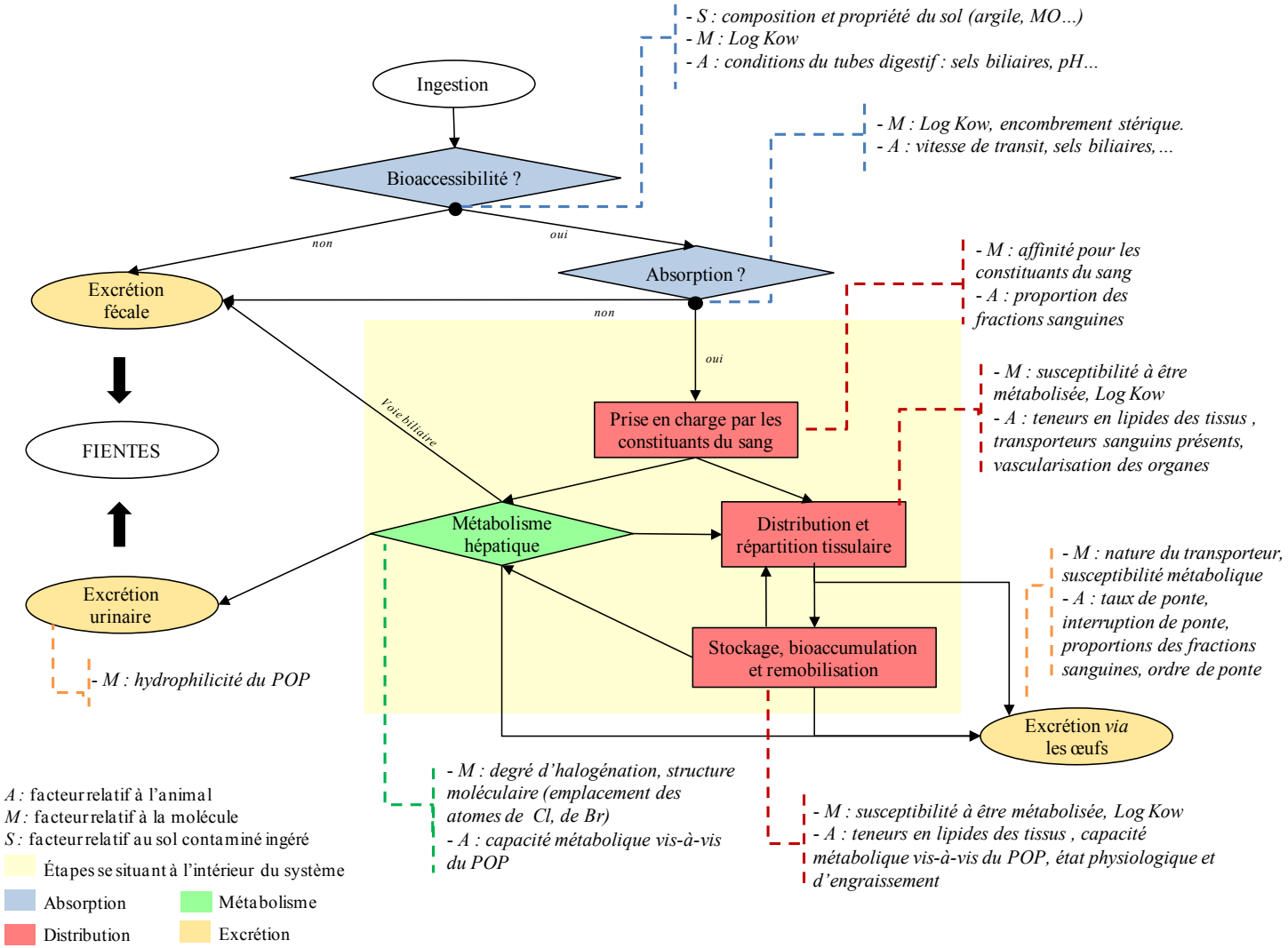


Figure I- 23 : Schéma récapitulatif des principaux facteurs liés au sol, à la molécule et à l'animal, intervenant dans les différentes étapes du transfert des POP au sein de l'animal

4. Modélisation du transfert de xénobiotiques vers l'œuf

4.1. Contexte et objectif du développement des modèles toxicocinétiques

La modélisation pharmacocinétique ou toxicocinétique[26] permet de formaliser les connaissances, de comprendre les mécanismes ADME mis en jeu lors du transfert de xénobiotiques dans l'organisme et de tester des hypothèses concernant ces derniers.

Ces modèles ont souvent pour objectif de décrire mathématiquement l'évolution des concentrations d'un xénobiotique au cours du temps dans un tissu ou le plasma. Cette évolution étant la résultante des processus ADME, ces processus sont pris en compte dans la construction des modèles toxicocinétiques, de façon plus ou moins directe et précise. Il existe ainsi un panel de modèles. Parmi eux, il convient de distinguer les approches empiriques, qui se basent sur les données observées et considèrent le système étudié comme une « boîte noire », des approches mécanistes, qui se basent sur une représentation plus ou moins détaillée des phénomènes sous-jacents, ce qui revient à expliciter les phénomènes ayant lieu dans la « boîte noire ». Un formalisme classique des modèles en dynamique mécaniste est celui des équations différentielles ordinaires. Ces équations décrivent les variations des variables d'état du système, ce qui se représente sous forme de diagramme par des compartiments, dont les entrées et sorties sont régies par des flux. Le nombre de compartiments utilisés traduit le nombre de variables d'intérêt considérées et dont la dynamique est décrite. Enfin, ces modèles diffèrent également par le choix et les méthodes d'estimation des paramètres impliqués dans le modèle.

Les modèles développés peuvent exploiter et combiner différentes approches de modélisation. Ainsi, il n'existe pas un modèle de transfert ou un modèle unique par type d'approche modélisatrice, mais une multitude de modèles selon les choix effectués par le modélisateur pour prendre en compte chaque mécanisme, selon les objectifs recherchés et le type de données à disposition.

Depuis plusieurs années, le transfert de POP vers les produits animaux est étudié et modélisé en faisant appel aux divers types d'approches. Ces modèles ont été élaborés principalement dans le cadre d'études relatives à la pollution de l'environnement et à la qualité sanitaire des produits animaux destinés à la consommation humaine. Ainsi, chez les oiseaux, de nombreux modèles ont été établis à partir de données collectées chez des espèces sauvages – aquatiques

[26] Le terme pharmacocinétique est utilisé lorsque le xénobiotique considéré est un médicament, tandis que celui de toxicocinétique est préféré lorsqu'il s'agit d'un contaminant.

ou terrestres- lors d'études de « monitoring », d'accumulation des POP le long de la chaîne alimentaire, ou de transfert vers l'œuf (Glaser et Connolly, 2002 ; Lundstedt-Enkel *et al.*, 2006). Parallèlement, des études concernant la qualité sanitaire des ovoproduits mettent en œuvre des modèles de transfert, en particulier pour les POP et les molécules pharmaceutiques employées en aviculture (Van Eijkeren *et al.*, 2006 ; MacLachlan, 2008). Notons qu'aucun modèle strictement empirique n'a été recensé pour étudier le transfert de xénobiotiques chez l'oiseau. Cette approche « boîte noire » ne semble en effet pas adaptée à l'étude d'un transfert dont on cherche à représenter les mécanismes ou à prendre en compte les facteurs intervenant au niveau de certaines étapes. Pour ces raisons, l'approche empirique ne sera que peu développée tandis que les autres approches sont présentées dans la suite de cette partie. Le principe général de chaque méthode est présenté avant de développer pour chacune d'elles, les modèles de transfert de xénobiotiques existants chez les oiseaux, ainsi que leurs intérêts et limites.

Cette synthèse a pour objectif de dégager les structures de base des modèles utilisés, les conditions dans lesquelles ils sont applicables ainsi que leurs avantages et limites. Enfin, un accent sera porté sur la prise en compte, dans ces modèles, des facteurs liés à la molécule et à la physiologie de l'animal, pouvant intervenir lors des étapes du transfert. Cela nous permettra de positionner notre travail de modélisation.

4.2. Différents modèles pour différents objectifs

4.2.1. Approche non compartimentale : les modèles empiriques

L'approche non compartimentale consiste à décrire de façon statistique le passage d'un contaminant dans le compartiment « central » d'un organisme. Ce type de modèle peut rendre compte des phénomènes de stockage, d'élimination et de persistance au niveau de l'animal entier (Barron *et al.*, 1990). Dans cette approche, différents paramètres sont classiquement calculés et peuvent donner lieu à des interprétations physiologiques. Le plus utilisé d'entre eux est l'aire sous la courbe des concentrations (AUC) (généralement dans le sang). Elle peut être calculée quelle que soit l'allure de la courbe, sous réserve d'avoir un nombre suffisant de points de concentration, chaque point correspondant à un prélèvement sanguin. L'AUC est un paramètre utilisé pour estimer la biodisponibilité absolue ou relative d'une molécule (Pu *et al.,* 2003 ; Van Schooten *et al.,* 1997).

Les modèles non compartimentaux sont principalement utilisés dans le cadre des études pharmacocinétiques. Le calcul de l'AUC et l'étude de la courbe cinétique de façon générale,

peuvent renseigner sur la durée de la demi-vie plasmatique d'une molécule, et donc renseigner son taux d'élimination (Barron *et al.,* 1990).

Ce type de modèle n'est cependant pas adapté à l'étude de l'influence de paramètres intervenants au niveau des étapes du transfert d'une molécule dans l'organisme.

4.2.2. Modèles à compartiments

Un modèle cinétique à compartiments est une représentation simplifiée, parfois à l'extrême, de la réalité biologique. Selon les cas, il peut être constitué d'un ou de plusieurs compartiments. Un compartiment correspond à une variable d'état dont la dynamique est décrite par des équations différentielles. Il est défini comme étant un ensemble homogène de molécules sur le plan cinétique. C'est une unité fonctionnelle. Il peut représenter le sang, le plasma, un tissu ou un organe, un ensemble de plusieurs d'entre eux, ou encore l'organisme dans son ensemble. La quantité de molécules présente dans le compartiment est régie par un taux d'entrée et un taux de sortie (Page *et al.,* 1999).

Outre les variables d'état, la modélisation compartimentale fait appel à différentes grandeurs telles que : les paramètres d'entrée et de structure (valeurs fixées dans un système particulier, ex : constantes de transfert), les variables indépendantes (ex : temps), les variables dépendantes (résultant des paramètres du système, ex : concentration plasmatique). Dans les modèles linéaires, les constantes de transfert sont des constantes de temps (t^{-1}) et elles expriment des réactions d'ordre 1 (Barron *et al.,* 1990 ; Casas, 2005 ; Fenneteau, 2009).

4.2.2.1. Modèles à un compartiment

Dans le cas des modèles à un compartiment, l'accumulation et les pertes de xénobiotiques au sein de l'organisme sont liées à la concentration de xénobiotique dans l'ingéré, mais sont indépendantes de l'état physiologique. L'animal est considéré comme une boîte noire dans laquelle une quantité de xénobiotique entre – avec un taux d'entrée k_{ing} – et de laquelle une autre quantité de ce xénobiotique ressort – avec un taux de sortie k_{elim} (Figure I-24). Ces entrées et sorties sont supposées s'effectuer durant la même unité de temps (par exemple par jour) lorsque des calculs de bilan sont effectués. Dans un tel système, la quantité de contaminant dans l'organisme (Q_{orga}) est la résultante de l'accumulation et des pertes de contaminants au niveau de l'organisme. La quantité éliminée se calcule comme suit :

Equation I-3 : $$Q_{elim} = k_{elim} \times Q_{orga}$$

Les variations de Q_{orga} (Equation I-4) résultent donc de la dose reçue (Q_{ing}) et du niveau d'élimination (lié à la constante k_{elim}). L'équation différentielle décrivant l'évolution de la quantité de contaminant dans l'organisme (Q_{orga}) en fonction du temps s'écrit donc :

Equation I-4 : $$\frac{dQ_{orga}}{dt} = Q_{ing} - k_{elim} \times Q_{orga}$$

Figure I- 24 : Représentation d'un modèle toxicocinétique à un compartiment représentant l'animal

Q_{orga} = quantité de contaminant dans l'organisme (ng) ; Q_{ing} = quantité de contaminant absorbée (ng) ; Q_{elim} = quantité de contaminant éliminée (ng) ; k_{elim} : taux d'élimination du contaminant (t^{-1})
Le compartiment de couleur délimite le système d'étude (ici système = organisme)

Au sein d'un organisme, lorsque la quantité de xénobiotiques entrant est égale à celle qui en ressort et que cette situation est stable, un équilibre est considéré comme étant atteint entre les différents tissus de l'organisme. Il est alors possible de calculer certains paramètres (cf. I-3.2.3, Tableau I-10) caractérisant la bioconcentration dans l'animal, ou dans un tissu particulier de l'animal. Concernant l'accumulation des POP chez l'oiseau, on considère sans distinction les facteurs de bioconcentration (BCF) et d'accumulation (BAF). Le facteur de bioamplification (BMF) permet quant à lui de rendre compte de la bioamplification, c'est-à-dire de l'accroissement de la concentration par gramme de lipides, du bas vers le haut de la chaîne trophique.

Tableau I- 10 : Paramètres caractérisant la bioconcentration de l'animal

C_{orga} : concentration de contaminant dans l'organisme (µg.g^{-1} MG, certaines études utilisent µg.g^{-1} MS (Stephens *et. al.,* 1995)) ;C_{eau} : concentration de contaminant dans l'eau (µg.ml^{-1}) ; C_{alim} : concentration de contaminant dans l'aliment (µg.g^{-1} MS) ; C_{proie} : concentration de contaminant dans la proie ingérée (µg.g^{-1} MG)

Nom	Abréviation	Equation	Utilisation
Facteur de bioconcentration	BCF	BCF= C_{orga}/C_{eau}	défini à l'origine pour les organismes aquatiques, mais notion étendue aux organismes terrestres, en remplaçant l'eau par toute matrice ingérée
Facteur de bioaccumulation	BAF	BAF = C_{orga}/C_{alim}	utilisé pour l'ensemble du règne animal
Facteur de bioamplification	BMF	BMF = C_{orga}/C_{proie}	utilisé pour l'ensemble du règne animal

Chez l'oiseau

Chez l'oiseau, Drouillard *et al.* (2001) ainsi que Lundstedt-Enkel *et al.* (2005 ; 2006) ont respectivement étudié, par ce type de modèle, les BMF de PCB chez la crécerelle d'Amérique *(Falco sparverius)*, d'organochlorés et de retardateurs de flammes bromés chez le guillemot *(Ulria aalge).* Byrne et Ferrario (2003) ont également établi des BAF pour les PCDD/F chez le poulet *(Gallus domesticus).* Ce type de modèle est classiquement utilisé en toxicologie environnementale et en évaluation des risques pour prédire le niveau d'accumulation au sein d'un animal exposé.

4.2.2.2. Modèles à plusieurs compartiments

L'animal peut être représenté par plusieurs compartiments, afin de mieux prendre en compte, en les individualisant, les différents mécanismes de l'ADME. Notamment, les transferts ou échanges de xénobiotiques entre les différents compartiments internes de l'organisme peuvent être représentés. Ils peuvent être réversibles ou irréversibles et se faire par transport physique (*via* le débit sanguin) ou suite à des réactions chimiques éliminant la molécule hors du compartiment considéré (biotransformation[27]). Les échanges entre compartiments peuvent être linéaires d'ordre 1 ou d'ordre 0, ce qui traduit respectivement une diffusion passive ou un mécanisme actif à vitesse constante, ou encore elles peuvent être non linéaires, par exemple lors d'un phénomène de saturation. Les constantes de transfert entre les compartiments sont des constantes de proportionnalité qui permettent de calculer des débits massiques encore appelés vitesse de transfert.

Ainsi, dans le modèle schématisé en figure I-25, l'évolution de la quantité de contaminant dans le compartiment Q_1, en fonction du temps, s'écrit :

Equation I-5 : $$\frac{dQ_1}{dt} = Q_{ing} + k_{2-1} \times Q_2 - k_{1-2} \times Q_1 - k_{elim} \times Q_1$$

Avec Q_{ing}, la quantité de contaminant dans l'ingéré (ng) ; Q_{elim}, la quantité de contaminant dans l'ingéré (ng) ; k_{elim}, le taux d'élimination du contaminant (t^{-1}) ; k_{1-2}, le coefficient de distribution pour le flux allant du compartiment Q_1 vers le compartiment Q_2 (t^{-1}) et k_{2-1}, le coefficient de distribution pour le flux allant du compartiment Q_2 vers le compartiment Q_1 (t^{-1})

[27] La biotransformation est considérée dans la majorité des modèles comme un processus permettant de faire sortir la molécule du système. Peu d'auteurs modélisent la circulation des métabolites après leur formation (Buur et al., 2009)

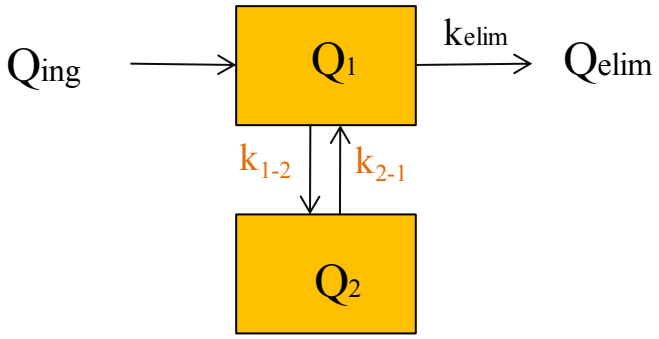


Figure I- 25 : Représentation d'un modèle à deux compartiments représentant l'animal

Q_{ing} = quantité de contaminant dans l'ingéré (ng) ; Q_{elim} = quantité de contaminant dans l'ingéré (ng) ; k_{elim} = taux d'élimination du contaminant (t^{-1}) ; k_{1-2} = coefficient de distribution pour le flux allant du compartiment Q_1 vers le compartiment Q_2 (t^{-1}) ; k_{2-1} = coefficient de distribution pour le flux allant du compartiment Q_2 vers le compartiment Q_1 (t^{-1}). Les compartiments de couleur délimitent le système d'étude (ici système = organisme).

Les modèles multi-compartimentaux ont été exploités par plusieurs équipes pour modéliser le transfert de contaminants chez l'oiseau (Clark *et al.*, 1987 ; Drouillard *et al.*, 2001 ; Van Eijkeren *et al.*, 2006). Dans chacun de ces modèles, un compartiment central représente le plasma et un compartiment périphérique est ajouté pour le tissu adipeux, ce qui permet de modéliser les échanges existants au niveau de ces compartiments lors du stockage et déstockage des xénobiotiques, notamment pour les molécules persistantes. L'entrée du contaminant dans le système se fait au niveau du compartiment plasmatique. Il en est de même pour la (ou les) sortie(s) du contaminant hors du système. Cette perte de xénobiotique au niveau du système peut avoir lieu *via* différentes voies, telles que le métabolisme, l'excrétion urinaire ou bien la ponte d'œufs. Ces différentes voix d'élimination sont plus ou moins détaillées selon les modèles. Ainsi, Clark *et al.* (1987) ne représentent qu'une élimination globale, tandis que Van Eijkeren *et al.* (2006) distingue la ponte de la clairance (terme regroupant l'excrétion urinaire et le métabolisme ayant lieu au niveau du foie).

De par leur compartimentation, ces modèles peuvent faire évoluer la masse lipidique des tissus représentés par les compartiments, au cours du temps. Cela est particulièrement important pour les oiseaux en croissance, ou bien présentant d'importantes variations saisonnières au niveau de leurs réserves adipeuses (Clark *et al.*, 1987). Dans ce dernier cas, une relation entre la taille du tissu gras et la température a été établie chez le goéland argenté (*Larus argentatus)* (Norstrom *et al.*, 1986).

Figure I- 26 : A- structure du modèle à compartiments de Clark *et al.,* 1987 ; B- structure du modèle à compartiments de Van Eijkeren *et al*., 2006.

Q_{ing} = quantité de contaminant dans l'ingéré (ng) ; Q_{elim} = quantité de contaminant dans l'ingéré (ng) ; k_{elim} = taux d'élimination du contaminant ; k_{oeuf} = coefficient d'éléimnation du contaminant via l'œuf ; k_{pta}= coefficient de distribution pour le flux allant du compartiment plasma vers le compartiment tissu adipeux (t^{-1}) ; k_{tap}= coefficient de distribution pour le flux allant du compartiment tissu adipeux vers le compartiment plasma (t^{-1}). Les compartiments de couleur délimitent le système d'étude (ici système = organisme)

Il n'est donc pas rare d'utiliser des modèles à plusieurs compartiments pour interpréter l'accumulation de contaminants dans les organismes biologiques dont les oiseaux (Drouillard, 2001 ; Van Eijkeren *et al.*, 2006), ces modèles se limitent généralement à deux ou trois compartiments.

4.2.3. Modèles cinétiques à base physiologique

Les modèles résultant d'une approche physiologique sont dits « modèles pharmacocinétiques basés sur la physiologie ». L'acronyme du terme anglais est souvent retenu pour désigner ces modèles : PBPK pour « Physiologically Based PharmacoKinetics ». Les premiers travaux présentant ce type de modèle mécaniste et physiologique datent de 1937 (Teorell, 1937 cité par Toutain, 2007). Ce modèle a été développé et précisé par la suite par Bischoff et Brown (1966) qui ont proposé un modèle général de distribution d'une substance chez un mammifère. D'abord utilisés pour mieux comprendre cette distribution au sein d'un organisme et pouvoir prédire les profils d'évolution de sa concentration dans différents organes, les modèles PBPK ont ensuite été développés en toxicologie, notamment pour l'évaluation des risques encourus suite à l'exposition d'un toxique (Andersen, 1995 ; Clewell, 1995).

Le principe des modèles PBPK est de prendre en compte l'ensemble des connaissances sur les structures et fonctions biologiques de l'organisme, ainsi que les propriétés physico-chimiques de la substance considérée, pour décrire les processus ADME. L'organisme est matérialisé en

plusieurs compartiments correspondant à des organes ou tissus ayant chacun une signification physiologique et étant caractérisé par leur volume, leur taux d'irrigation, leur coefficient de partition vis-à-vis du xénobiotique. Les échanges entre les différents compartiments, rendus possibles par la mise en circulation de fluides biologiques, sont représentés par des flèches. De même que pour les modèles à compartiments, un bilan de masse peut être calculé de part et d'autre d'un compartiment (US-EPA, 2006).

Deux types de modèles sont souvent utilisés selon les hypothèses formulées au niveau de la distribution de la molécule. En effet, le processus de distribution alimentant le compartiment est déterminé soit par la perfusion sanguine au tissu, soit par la vitesse de diffusion à travers les membranes vasculaire ou cellulaire. Dans le premier cas, l'hypothèse principale est que la répartition du xénobiotique dans le tissu est homogène et instantanée. Seul le débit sanguin est limitant pour la distribution de la substance. Le modèle correspondant est dit « à perfusion limitante ». Dans le deuxième cas, le modèle « à perméabilité limitante » rend compte du frein limitant la distribution aux niveaux des membranes, en subdivisant le compartiment, afin de représenter les tissus vasculaire et cellulaire (Hoang, 1995).

Chez l'oiseau

Lors de la modélisation du transfert de xénobiotiques chez les oiseaux, la démarche de modélisation mécaniste, basée sur la physiologie, n'est pas toujours mise en place avec le même degré de précision, pour chacun des mécanismes ADME. Cortright *et al.* (2009) et MacLachlan (2010) ont travaillé récemment sur la modélisation PBPK du transfert de substances lipophiles chez le poulet et la poule pondeuse respectivement et Nichols *et al.* (2010) sur celle du transfert de méthylmercure chez la Crécerelle d'Amérique.

Un des objectifs de ces études était d'appliquer le modèle obtenu chez d'autres espèces aviaires. Cortright *et al.*, (2009) ont développé un modèle PBPK de transfert de midazolam, administré en intraveineuse, chez le poulet. Le modèle est constitué de flux reliant des compartiments correspondant à chacun des tissus ayant fait l'objet de mesures (plasma, foie, rein, muscle, gras), un dernier compartiment regroupant les tissus restants, dans lesquels le xénobiotique n'a pas été dosé. Chacun des compartiments est caractérisé par une série de paramètres anatomiques et physiologiques). Chacun des mécanismes ADME est pris en compte. L'absorption est représentée avec un paramètre destiné à caractériser la bioaccessibilité du xénobiotique et un taux d'absorption. La distribution est modélisée *via* les flux plasmatiques et les coefficients de partage entre tissu et plasma, propre à chaque tissu. Le

métabolisme et la clairance ayant lieu au niveau hépatique et rénal, sont considérés comme limités par la perfusion de l'organe (donc comme non limitants). Ils sont regroupés *via* un paramètre de clairance (constante d'élimination).

Le modèle de MacLachlan (2010) concerne le transfert de molécules organiques chez la poule. MacLachlan reprend la structure du modèle qu'il avait développée pour les bovins, ovins, caprins et porcins (MacLachlan, 2009). Celle-ci est proche de celle décrite par Cortright *et al.* (2009) et considère un flux sanguin limitant. Les compartiments décrits sont : le plasma, le foie, le gras, le muscle et l'œuf. La formation du jaune d'œuf sur une durée de 10 jours est prise en compte. Ce modèle permet de tester l'impact des propriétés physicochimiques telles que la capacité à être métabolisée et la lipophilicité en conduisant des simulations avec différents taux de clairance et coefficient de partition gras-sang. Ce modèle présente la possibilité supplémentaire d'une division du compartiment gras permettant de distinguer les lipides du sang irriguant le tissu adipeux, des lipides de ce tissu. La mise en place de ces sous-compartiments permet de moduler, *via* un coefficient de diffusion[28] la prise en charge du POP par le tissu gras selon la portion de POP présente sous forme libre dans le sang (non lié à une lipoprotéine) (comme décrit par Lee *et al.,* (2002) dans un modèle chez la souris).

Nichols *et al*., (2010) ont développé le même type de modèle en considérant une sortie supplémentaire *via* la croissance des plumes et en ajoutant un compartiment correspondant aux hématies afin de modéliser la liaison du contaminant avec l'hémoglobine.

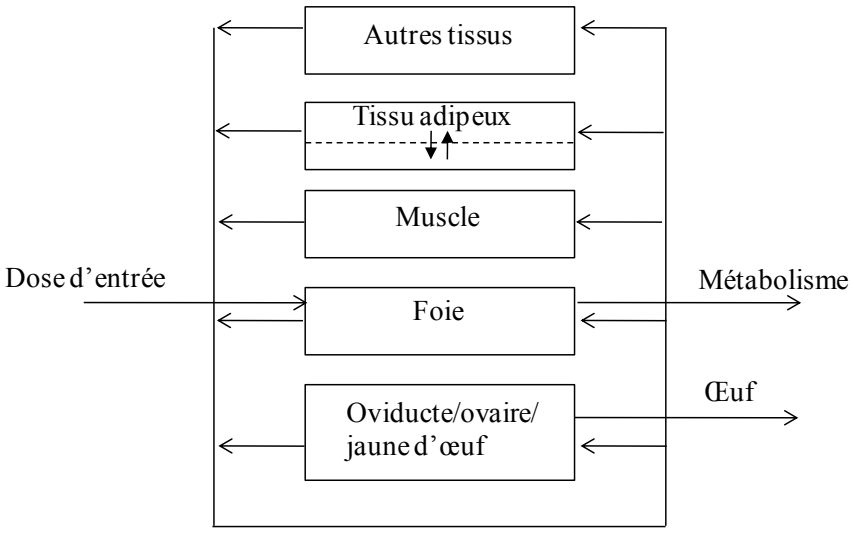


Figure I- 27 : Structure du modèle PBPK développé par MacLachlan (2010)

[28] PAFC : Diffusion Permeation in Fat Constant

4.2.4. Modèles bioénergétiques

Une approche modélisatrice à base énergétique, plus récente et moins répandue, est parfois utilisée. Elle est intermédiaire entre les modèles cinétiques à base physiologique et les modèles cinétiques à compartiments. Ce type de modèle est particulièrement utilisé pour améliorer la modélisation des cinétiques d'entrée et d'élimination qui sont souvent établies à partir d'un modèle mono-compartimental en supposant un état d'équilibre pour les autres processus physiologiques de l'organisme. Or, ces modèles simples ne sont pas toujours satisfaisants notamment lorsque les conditions physiologiques de l'individu (en lien avec la croissance, la reproduction, les conditions extérieures) évoluent au cours du temps et influent de façon non négligeable sur l'entrée et l'élimination.

Le principe des modèles bioénergétiques est que les taux d'entrée et d'élimination du xénobiotique dépendent des besoins et des dépenses énergétiques de l'organisme. Pour un contaminant lipophile, sa charge corporelle et sa distribution varient en fonction de la quantité et de la dynamique des lipides qui évoluent au cours du temps. Pour d'autres types de contaminants, d'autres réserves énergétiques pourront être également utilisées, telles que les carbohydrates et les protéines. Ainsi, dans ces modèles, l'entrée de contaminant provient de la nourriture et/ou de l'environnement alors que l'élimination se fait *via* la reproduction et /ou directement dans l'environnement (Kooijman et van Haren, 1990).

Chez l'oiseau

Il existe différents types de modèles bioénergétiques utilisés pour étudier le transfert de contaminant chez l'oiseau et plus particulièrement la bioaccumulation (Nichols *et al.,* 1995 ; Glaser et Connolly, 2002 ; Debruyn et Gobas, 2006 ; Norstrom *et al*., 2007). Dans ces études, la distribution du contaminant entre les différents compartiments n'est pas abordée. La modélisation bioénergétique est principalement développée pour caractériser l'exposition. Suivant l'hypothèse où le contaminant est apporté *via* la nourriture, le modèle bioénergétique permet d'évaluer la ration de l'animal, suite à un calcul de bilan énergétique prenant en compte l'ensemble des principaux processus physiologiques consommateurs d'énergie, en tenant compte du stade physiologique de l'animal. Les paramètres illustrant les conditions environnementales sont parfois également pris en compte et interviennent dans les calculs de besoins énergétiques, notamment la température et la photopériode (Norstrom *et al*., 2007).

Cette évaluation des besoins énergétiques est surtout utilisée dans des études concernant les oiseaux en milieu naturel, où les conditions peuvent être très variables selon les saisons et de ce fait, où l'ingestion peut varier considérablement.

Une fois le taux d'entrée de contaminants établi, la bioaccumulation étant dépendante de la masse et de la taille de l'animal, des équations représentant la croissance de l'individu sont utilisées pour pouvoir estimer la bioaccumulation du contaminant dans l'organisme. L'élimination de la molécule peut également être prise en compte (Nichols *et al*., 1995).

Drouillard *et al*. (2003) utilisent de la même façon un sous-modèle bioénergétique pour l'élaboration d'un modèle destiné à prédire la cinétique des PCB dans l'embryon de goéland (*Larus argentatus*). Contrairement aux modèles précédents, la répartition de lipides entre les différents compartiments - ici compartiments embryon et jaune inclus dans l'œuf - est prise en compte. Une relation, fonction du nombre de jours d'incubation, permet de déterminer cette fraction. Puis, la fraction lipidique est reliée *via* un modèle empirique à la fraction de PCB, ce qui permet de suivre l'évolution de la concentration en PCB dans l'embryon et le jaune d'œuf.

Certains modèles ne sont pas qualifiés par leurs auteurs de « bioénergétiques » mais font appel au même principe en reliant flux de lipides et flux de contaminants (notamment pour les contaminants hydrophobes). C'est le cas des modèles sur le transfert de substances lipophiles vers le jaune d'œuf développés par Donoghue *et al.* (1997).

4.2.5. Intérêts et limites des grandes catégories de modèles toxicocinétiques

Les approches décrites ci-dessus pour modéliser le transfert de contaminants présentent des intérêts et limites variés, qui sont répertoriés dans le tableau I-11.

Tableau I- 11: Comparaison synthétique des intérêts (vert) et limites (rouges) de quelques caractéristiques des différents types de modèles toxicocinétiques
La plupart des points évoqués sont synthétisés dans les thèses de Casas (2005) et de Fenneteau (2009)

Caractéristiques du modèle	**Non compartimental**	**Compartimental**	**PBPK**	**Bioénergétique**
Caractérisation toxicocinétique / niveau de représentation mécanistique	Faible : l'organisme est une boîte noire	Bonne : les processus d'ADME peuvent être représentés selon le nombre de compartiments et de flux considérés	Bonne : les processus d'ADME peuvent être représentés selon le nombre de compartiments et de flux considérés	Moyenne : seules l'ingestion et l'excrétion sont généralement prises en compte Bonne : dans le cas de modèle de flux lipides à l'échelle de l'animal
Hypothèses de modélisation sur la répartition du xénobiotique entre les tissus	Peu nombreuses	Oui : paramètres physiologiques (débit sanguin, etc) considérés constants dans le temps. Distribution instantanée et linéaire (Gibaldi et Perrier, 1982 cité par Barron *et al.*, 1990)	Oui : deux hypothèses peuvent être choisies : la distribution est à diffusion ou perfusion limitante (Hoang, 1995)	Oui : Hypothèse d'une relation entre flux d'énergie et flux de POP, partitionnement instantané entre les fractions plasmatique Mais : Pas d'hypothèse d'équilibre
Adaptabilité à une exposition répétée	Faible	Bonne	Bonne	Bonne
Suivi dynamique des concentrations	Non	Oui	Oui	Oui : dans le cas d'un modèle de flux à l'échelle de l'animal
Paramètres nécessaires	Peu nombreux	Moins nombreux que pour le modèle PBPK. Des paramètres restent inconnus mais sont ajustés aux valeurs expérimentales (Van Eijkeren *et al.*, 2006 ; Drouillard *et al.*, 2007)	Nombreux et estimation difficile de l'ensemble des (nombreux) paramètres nécessaires au modèle (Clark *et al.,* 1987)	Assez nombreux : relations reliant les besoins énergétiques (lipides) aux conditions environnementales (T°C, photopériode), la valeur énergétique de l'ingéré, le détail des flux lipidiques au sein de l'organisme.
Prise en compte de la molécule dans les flux	Non	Possible	Possible	Possible
Adaptabilité aux variations des caractéristiques physiologiques ou environnementales	Difficile	Possible	Possible mais difficile : Nécessite la réévaluation des paramètres à chaque variation	Possible : *via* le calcul des besoins énergétiques fonction de ces caractéristiques

4.2.6. Les modèles mixtes

En pratique, dans de nombreux cas, les auteurs font appel à plusieurs des approches décrites ci-dessus et les combinent pour construire leur modèle mathématique. Notamment, l'approche compartimentale est souvent couplée aux autres approches. Les différentes combinaisons de modèles pouvant être rencontrées chez l'oiseau sont décrites ci-desous, en mettant en exergue les avantages de ces couplages.

Compartiment/non compartiment

Les modèles à compartiment peuvent faire appel à une démarche non compartimentale pour l'évaluation de certains paramètres nécessaires à une bonne représentation des flux de contaminants. Par exemple, le paramètre régissant la clairance (k_{pc}) peut être estimé à partir de l'AUC (Drouillard *et al.*, 2001).

Compartiment : 1 et 2 compartiments

Par manque d'analyse de chacun des compartiments sang et gras, Drouillard *et al.* (2007) ont choisi de réduire leur modèle toxicocinétique à un seul compartiment. Cependant, l'expression du paramètre d'élimination fait appel aux paramètres caractérisant l'échange entre le plasma et le tissu adipeux, déterminé dans un modèle préalable (Drouillard *et al.*, 2001). Il s'agit donc d'un modèle mono-compartimental reprenant dans l'expression de ses paramètres des données mécanistes provenant d'une formalisation multi-compartimentale, ce qui rend le système moins opaque vis-à-vis des mécanismes du transfert.

Compartiment/bioénergétique

Différents auteurs (Nichols *et al.*, 1995 ; Glaser et Conolly, 2002 ; Drouillard *et al.*, 2003 ; Norstrom *et al.*, 2007) ont développé des modèles de transfert et de bioaccumulation de xénobiotiques chez l'oiseau, comprenant deux sous-modèles. Un sous-modèle bioénergétique, permettant généralement de quantifier l'entrée de contaminants dans l'organisme, et un sous-modèle compartimental. Pour ces modèles, l'approche bioénergétique permet principalement d'évaluer la quantité d'ingéré potentiellement contaminé - difficile en milieu naturel, non contrôlé - et de prendre en compte les variations métaboliques saisonnières des oiseaux (variation des besoins énergétiques et donc de la prise alimentaire).

Compartiment/PBPK

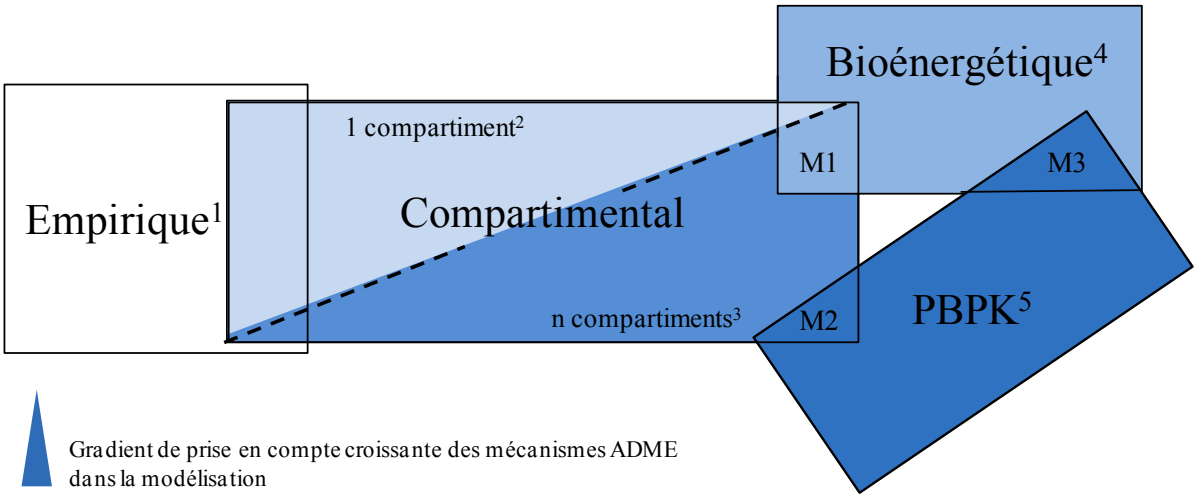
Van Eijkeren *et al.* (2006) développent un modèle à compartiment, mais intègre la physiologie de la poule par la prise en compte des variations de la masse lipidique du compartiment représentant le tissu adipeux et la prise en compte de l'intensité de la ponte. Ce modèle est parfois qualifié de PBPK (Traag *et al.*, 2004).

PBPK/bioénergétique

Dans le modèle PBPK de MacLachlan (2010), le transfert de contaminants est en partie basé sur la fraction lipidique du sang. L'équilibre des lipides entre les compartiments influence la répartition des xénobiotiques. Ainsi, même si l'auteur ne qualifie pas ce modèle de bioénergétique, il peut être constaté que ce type de modèle, faisant intervenir en parallèle les flux de lipides et de contaminants, fait appel à des notions de bioénergétique, ce qui permet d'affiner et de paramétrer le modèle global final. De plus, la quantité ingérée est évaluée à partir des besoins énergétiques de l'animal, comme dans les modèles dits « bioénergétiques ».

4.2.7. Modélisation du transfert de contaminant chez l'oiseau : Synthèse

Les modèles décrits ci-dessus permettent de répondre à différents objectifs, allant du simple calcul de bioaccumulation chez l'oiseau soumis à une exposition environnementale, à la modélisation détaillée de la toxicocinétique des xénobiotiques dans un ou plusieurs tissus de l'animal, comme le dépôt de POP dans le jaune d'œuf. Selon l'objectif visé, les auteurs ont choisi de modéliser plus ou moins finement le transfert de contaminants, en prenant en compte, ou non, chacun des processus ADME. Par un gradient de couleur du bleu clair vers le bleu foncé, la Figure I-28 illustre le nombre croissant de mécanismes de l'ADME intégrés par les différents modèles.



M1 : modèle mixte compartiment/bioénergétique (Nichols *et al*., 1995; Glaser et Connolly, 2002; Norstrom *et al*., 2007)
M2 : modèle mixte compartiment/PBPK (Van Eijkeren *et al*., 2006)
M3 : modèle mixte bioénergétique/PBPK (MacLachlan *et al*., 2010)
[1] aucun modèle dit « empirique » n'a été référencé pour le transfert de POP chez l'oiseau
[2] Lundstedt-Enkel *et al*., 2006; Byrne et Ferrario, 2003
[3] Clark *et al.,* 1987; Drouillard *et al.,* 2001; Van Eijkeren *et al*., 2006; MacLachlan, 2008
[4] Donoghue *et al.,* 1997
[5] Cortright *et al.,* 2009; MacLachlan, 2010; Nichols et al., 2010

Figure I- 28: Synthèse des modèles existants pour représenter le transfert de POP chez l'oiseau

4.3. Modélisation des étapes du transfert

Les modèles de transfert permettent de représenter un nombre variable d'étapes du transfert et ce, de façon plus ou moins mécaniste et précise.

Ingestion

L'ingestion est une étape en amont du transfert de contaminant à l'échelle de l'animal. La quantité de matrices ingérée peut être modélisée *via* les modèles énergétiques. MacLachlan (2010) détermine ainsi le niveau d'aliment contaminé ingéré, par une équation dépendante de la température ambiante et du poids d'œuf pondu, du poids vif et de l'énergie métabolisable de l'aliment (équation du National Research Council, 1987).

Absorption

La modélisation du flux de POP entrant dans l'animal est souvent obtenue en multipliant le taux d'ingestion G de l'organisme (g aliment /g oiseau / jour) par la concentration C de POP ($ng.g^{-1}$ aliment) présente dans la matrice ingérée et en appliquant à l'ensemble une constante

d'efficacité d'absorption AE (sans dimension) (Clark *et al.*, 1988 ; Nichols *et al.*, 1995 ; Karasov *et al.*, 2007).

Equation I-6 : $$\text{Dose} = C \times G \times AE$$

Cette approche permet de calculer directement le flux entrant utilisé pour la conception des modèles bioénergétiques et a l'avantage de pouvoir faire varier le taux d'ingestion G au cours des saisons et de la vie de l'animal (Norstrom *et al.*, 1986 ; Nichols *et al.*, 1995). Drouillard et Norstrom (2003) utilisent également l'approche modélisant le flux de contaminants ingérés par une fonction directe du taux d'alimentation de l'animal. Enfin, l'absorption des POP, molécules lipophiles, est souvent assimilée à l'efficience d'absorption des lipides (Traag *et al.*, 2004).

Distribution

La distribution peut être modélisée par des modèles PBPK ou compartimentaux. Deux approches sont rencontrées. Les compartiments intervenant dans la représentation de la distribution sont :

- soit un compartiment central : image du plasma et un compartiment de stockage (le tissu gras) (Clark *et al.*, 1988 ; Van Eijkeren *et al.*, 2006 ; Drouillard *et al.*, 2001, 2007),

- soit plusieurs compartiments représentant différents groupes de tissus (ou organes) : les pauvrement irrigués et fortement irrigués, traversés par un flux sanguin (Cortright *et al.*, 2009 ; MacLachlan, 2010 ; Nichols *et al.*, 2010).

Dans ces deux approches, les équations traduisant ces flux sont alors des lois d'action de masse suivant une cinétique du premier ordre. Des coefficients de partage entre le plasma et le (ou les) tissu(s) (notés généralement k indicés de lettres correspondant aux compartiments impliqués) permettent de moduler le niveau du transfert du contaminant vers le tissu, en intervenant directement dans ces équations.

Dans le premier cas décrit, un flux de retour du compartiment gras vers le plasma peut être modélisé. Les coefficients impliqués dans le stockage et la remobilisation (souvent notés k_{pf} et k_{fp} pour les flux allant respectivement du plasma vers le gras et du gras vers le plasma) peuvent être combinés pour n'obtenir qu'une constante de transfert résultante, notée K_{pf} (Drouillard *et al.*, 2001).

Equation I-7 : $$K_{pf} = \frac{k_{fp} \times V_f}{k_{pf} \times V_p}$$

Où V_f et V_p sont respectivement les volumes du compartiment gras et du compartiment plasmatique.

Les coefficients k intervenant dans les équations définissant les flux « plasma – tissu » sont exprimés différemment selon les modèles. Ils peuvent être :

- une valeur globale ajustée sur les valeurs expérimentales de transfert (Van Eijkeren *et al.*, 2006),

- une valeur calculée à partir de données expérimentales : par exemple, K_{pf} est calculé comme étant le rapport des concentrations de PCB dans la carcasse et dans le plasma (Drouillard *et al.*, 2001),

- une valeur fonction de la teneur en lipides de chacun des compartiments et/ou de la valeur du log K_{ow} du xénobiotique (MacLachlan, 2010).

La modélisation des échanges entre tissus peut en effet se baser sur les fractions lipidiques de chacun des compartiments mis en jeu, en délaissant l'effet frein pouvant être imposé par les membranes à traverser (ex : cas du cerveau). Cette relation, entre le coefficient de partage « plasma-tissu » d'une molécule et le rapport des fractions lipidiques des compartiments concernés, est développée et considérée comme valable pour les molécules ayant un log K_{ow} supérieur à 3 (Haddad *et al.*, 2000). Dans ce cas, le coefficient de partage entre les tissus est indépendant du log K_{ow} de la molécule, ce qui est mis en évidence par les travaux de Clark *et al.* (1987) et de Drouillard *et al.* (2001). Ces études suggèrent que le K_{pf} pour les PCB chez l'oiseau peut être déterminé à partir des concentrations en lipides du plasma. Cela fournit un outil pour une estimation du K_{pf} chez différentes espèces avicoles où les données expérimentales de distribution du contaminant manquent.

Le transfert vers les tissus de la poule (tissu gras ou poule entière) peut être pris en compte lors de la modélisation du transfert vers l'œuf. En effet, l'équation visant à déterminer la concentration de xénobiotiques dans l'œuf, peut inclure : le taux de transfert vers le tissu adipeux (MacLachlan, 2008) ou la concentration de contaminant dans l'organisme entier (Norstrom *et al.*, 2007) (voir la modélisation de l'élimination *via* l'œuf, ci-après).

Elimination

Elimination totale

La modélisation de l'élimination peut être globale *via* un taux d'élimination (en j^{-1}) prenant en compte à la fois le métabolisme, la dilution pondérale, l'élimination fécale voire même l'élimination *via* la ponte d'œuf. Ainsi, les valeurs de taux d'élimination ont été déterminées en utilisant les données de toxicocinétique et de bioaccumulation. La dilution pondérale est prise en compte *via* l'expression du taux de croissance de l'animal (Glaser et Connolly, 2002).

Il est difficile de distinguer l'origine de la disparition plasmatique du xénobiotique. Cependant, en cas de ponte, cette dernière est souvent séparée du reste de l'élimination. Il est alors possible de conclure quant à l'impact de la transformation chimique de la molécule en cas d'absence de croissance et de situation d'équilibre. En cas contraire, le suivi en parallèle d'une cinétique tissulaire est nécessaire.

Métabolisme

La constante de clairance plasmatique, prenant en compte le métabolisme (et /ou l'excrétion fécale (Norstrom *et al.*, 2007)), peut être considérée comme une variable d'ajustement de sortie du modèle (Van Eijkeren *et al.*, 2006), mais peut aussi faire l'objet de calcul plus précis, en utilisant des données toxicocinétiques du plasma. La détermination de la constante de clairance se fait *via* l'utilisation de l'AUC (Clark *et al.*, 1987 ; Drouillard *et al.*, 2001). Ce paramètre peut également s'exprimer en fonction des caractéristiques de la molécule (cf. paragraphe I-4.4).

Transfert vers l'œuf

Le transfert vers l'œuf peut être représenté dans différents cas : les études environnementales s'intéressant aux oiseaux sauvages ont tendance à considérer le transfert vers l'œuf et plus particulièrement vers l'embryon (Glaser et Connolly, 2002 ; Drouillard *et al.*, 2003), pour des oiseaux ayant un niveau de ponte assez faible. D'autres études s'intéressent davantage au transfert vers l'œuf, en tant que produit de consommation pour l'homme (Huyghebaert *et al.*, 2002 ; Van Eijkeren *et al.*, 2006 ; Cortright *et al.*, 2009 ; MacLachlan, 2008, 2010). La notion de couvée sera prise en compte dans le premier cas tandis que celle d'intensité de ponte sera abordée dans le second.

La modélisation du transfert de contaminant vers l'œuf prend, ou non, en compte la phase de croissance particulière du jaune d'œuf. La croissance de l'œuf est modélisée en considérant le

dépôt journalier de contaminants et constituants du jaune durant les dix derniers jours de sa croissance, c'est-à-dire en considérant le dépôt de xénobiotiques dans chacun des jaunes en croissance de la grappe ovarienne *via* une équation individualisant chacun des jaunes en croissance (Donoghue *et al.* 1997 ; Traag *et al.*, 2004 ; MacLachlan, 2008) ou en considérant le taux de croissance de l'œuf (Cortright *et al.*, 2009).

La concentration de contaminants dans l'œuf peut être calculée *via* l'utilisation du taux de transfert vers l'œuf propre à chaque molécule, déterminé au préalable (MacLachlan, 2008). Dans ce modèle, le ratio des taux de transfert vers l'œuf et le gras marque la prise en compte de la spécificité de la molécule étudiée. MacLachlan (2010) utilise l'équilibre entre les fractions lipidiques pour le transfert vers l'œuf, de même que pour le transfert entre le plasma et le tissu gras. Ce ratio prend classiquement la valeur 0,1 (en considérant 10% de lipides dans un œuf entier et 100% dans le tissu adipeux), cependant le ratio prend la valeur 0,5 dans les cas où l'œuf représente la voie d'élimination principale. Ce ratio, indépendant des propriétés de la molécule dans son expression, peut être modulé arbitrairement, pour traduire une élimination *via* l'œuf plus importante, selon le type de molécule étudiée. La prise en compte du comportement de la molécule est donc effectuée empiriquement, *a posteriori* Drouillard *et al.* (2003) basent également la modélisation de la répartition des PCB entre l'embryon et les réserves de l'œuf sur les fractions lipidiques de chacun de ces compartiments.

Elimination via les fientes

Le ratio k_{exc} des concentrations dans les fientes et dans l'aliment (en $ng.g^{-1}$ MS) (Drouillard et Norstrom, 2003), entre dans la définition de la constante du taux d'élimination fécale ($k_{fèces}$) dont l'équation est ::

Equation I-8 : $$k_{fèces} = G_{exc} \times k_{exc}$$

avec G_{exc} le taux de production d'excreta (g excreta/g oiseau/jour).

4.4. Facteurs influençant le transfert et leur modélisation

4.4.1. Prise en compte des facteurs influençant le transfert dans les modèles existants

Parmi les modèles représentant une ou plusieurs des étapes du transfert (ADME), certains prennent en compte dans la modélisation de ces dernières, l'impact de la physiologie de l'oiseau et/ou de certaines propriétés de la molécule étudiée.

Le tableau I-12 référence les différents niveaux d'intégration de chacune de ces deux composantes dans la modélisation du transfert à l'échelle de la poule.

Tableau I- 12 : Intégration des paramètres liés à la physiologie de la poule et aux propriétés de la molécule, dans chacun des modèles de transfert existant chez l'oiseau.

Références	**Paramètres liés à la physiologie de la poule**								**Paramètres liés aux propriétés de la molécule**			
	Age /croissance/PV	engraissement	poids ou volume des organes /tissu	Volume du plasma	Débit cardiaque / Flux sanguin	Fraction lipidique sanguine	Intensité de ponte[a]	Croissance de l'œuf / volume	Log K_{ow}	structure	molécule de transport[b]	Propension à la métabolisation
Nichols *et al.*, 1995	(I)D	-	-	-	-	-	-	E	-	-	-	-
Donoghue *et al.*, 1997	-	-	-	-	-	-	-	E	-	-	-	-
Glaser et Connolly, 2002	D	D	-	-	-	D	-	E	A	-	-	-
Clark *et al.*, 1987	-	D	-	-	-	D	-	-	D[c]	-	-	-
Huyghebaert *et al.*, 2002	-	-	-	-	-	-	-	E	-	-	-	-
MacLachlan, 2008	(I)DE	D	-	-	-	-	E	E	-	-	-	M
Norstrom *et al.*, 2007	-	(I)	-	-	-	D	(I)E	(I)E	-	-	-	-
Drouillard *et al.,* 2007	D	-	-	-	-	D[d]	-	-	M	M	-	M
Drouillard *et al.*, 2001	DM	D	-	D	-	D	-	-	M	M	-	M
Van Eijkeren *et al.,* 2006	-	D	-	D	-	-	E	E	-	-	-	-
Cortright *et al.*, 2009	D	D	D	D	D	-	-	-	-	-	D	-
MacLachlan *et al.,* 2010	(I)	D	D	-	D	D	-	E	D	-	-	M
Nichols *et al.,* 2010	(I)X	D	D	D	D	-	-	E	-	-	D	-

[a] valeur fixe, non fonction du temps
[b] au moins un type de transporteur est mis en avant à une étape de la modélisation
[c] le log K_{ow} n'est pas pris en compte dans l'expression des équations de distribution mais il est montré que ce paramètre n'influe que peu sur la distribution
[d] il s'agit en réalité ici de la fraction de lipide neutre dans l'organisme entier
PV : poids vif ; X : le paramètre est pris en compte dans le calcul d'autres paramètres intervenant directement au niveau de la modélisation de l'une des étapes du transfert (ADME) (ex : poids vif pris en compte dans l'estimation du poids d'un tissu ou du débit cardiaque *via* des relations allométriques) ; I : Ingestion ; A : Absorption ; D : Distribution ; M : Métabolisme ; E : Excrétion.

Les facteurs environnementaux (température et photopériode) sont rarement rapportés et peu détaillés dans les modèles de transfert chez l'oiseau (Clark *et al.,* 1987 ; Norstrom *et al.,* 2007 ; MacLachlan, 2010). Ils ne sont pas intégrés au tableau I-12 précédent, mais sont pris en compte indirectement dans les paramètres liés à la physiologie de la poule (engraissement, ponte).

4.4.2. Expression des paramètres liés à l'animal et à la molécule dans les équations des modèles

4.4.2.1. Paramètres liés à la physiologie de la poule

Les paramètres liés à la poule interviennent principalement au niveau de la modélisation de la distribution et de l'élimination vers l'œuf (Tableau I-12). Leur prise en compte et impact ont été détaillés en partie 4.3. et en début de partie 4.4.

Notons que le volume plasmatique peut être considéré comme dépendant du temps et ainsi être modélisé comme étant fonction du poids vif (lui-même étant une fonction du temps) (Clark *et al.*, 1987). L'intensité de ponte peut être prise en compte en réduisant le poids moyen de chaque œuf pondu quotidiennement, sur une période donnée de simulation (Traag *et al.*, 2004 ; Van Eijkeren *et al.*, 2006).

4.4.2.2. Paramètres liés aux caractéristiques de la molécule

Les propriétés de la molécule peuvent être directement intégrées dans l'expression des équations régissant les transferts ou l'élimination de la molécule hors du système. C'est le cas pour le log de K_{ow} qui est une donnée chiffrée pour traduire l'hydrophobicité de la molécule. En revanche, il est plus délicat de mettre en équation les caractéristiques structurales de la molécule ou encore, plus généralement, la propension à la métabolisation de cette dernière.

Coefficient ajusté

Le plus souvent les propriétés de la molécule ne sont pas prises en compte. Le métabolisme de la molécule peut cependant être illustré par un coefficient de sortie du système. La valeur prise par ce coefficient peut varier selon le contaminant, mais n'est pas particulièrement liée à une propriété de ce dernier. Ce coefficient, résultant du comportement de la molécule au sein de l'animal, prend une valeur par ajustement (Van Eijkeren *et al.*, 2006 ; Norstrom *et al.*, 2007).

Demi-vie ($t_{1/2}$)

La demi-vie est utilisée pour le calcul de la constante d'élimination k_e, définie par l'équation suivante (MacLachlan, 2008) :

Equation I-9 :

$$k_e = \frac{\ln 2}{t_{1/2}}$$

Cette relation correspond à l'équation de la constante de disparition d'une molécule suivant une cinétique de premier ordre. Des relations allométriques permettent d'obtenir des valeurs de demi-vie, à partir d'une valeur mesurée, pour des animaux ayant des caractéristiques différentes (MacLachlan, 2008).

Extraction ratio (ER)

Ce paramètre représente la fraction de la substance ayant disparu du sang après passage dans un organe (tel que le foie). Ce ratio est théoriquement calculé à partir de l'équation I-10.

Equation I-10 : $$ER = \frac{A - V}{A}$$

où A et V sont respectivement les concentrations de la substance dans le plasma artériel et veineux, traversant l'organe. Cette notion peut ainsi être utilisée pour exprimer la clairance plasmatique, qui correspond alors au produit du débit sanguin et de l'ER, avec ER allant de 0 à 1, selon le niveau d'élimination de la molécule (Toutain, 2002). MacLachlan (2010) emploie cet ER pour représenter le niveau de métabolisme du xénobiotique. Les valeurs de ER sont rarement disponibles chez les volailles. Pour cette raison, la durée de la demi-vie plasmatique chez le rat a été utilisée en première approche par cet auteur, pour obtenir une valeur de ER chez les volailles.

Catégories de molécule selon leur degré de métabolisation

Drouillard *et al.* (2001 ; 2007) ont calculé les valeurs de constante de clairance plasmatique (k'_{pc}) de chaque congénère de PCB à partir de données expérimentales, en utilisant l'AUC. Par suite, ces auteurs ont établi des équations permettant de prédire le k'_{pc} de chaque congénère en fonction de leurs propriétés. Cette équation (I-11) est fonction du log de K_{ow} et prend en compte la catégorie à laquelle appartient la molécule (« persistent » ou « readily cleared ») :

Equation I-11 : $$k'_{pc} = k'_{met} + k'_{eg}$$

avec $k'_{met} = 67{,}582 * K_{ow}^{-0.387} * M$ et $k'_{eg} = 26{,}607 * K_{ow}^{-0.387}$,

où M est une variable booléenne égale à 0 en cas de molécule « persistent » et à 1 dans le cas contraire, k'_{met} est la constante de clairance due à la biotransformation métabolique et k'_{eg} est la constante de clairance due à l'égestion.

Un transport privilégié des POP avec les différentes fractions du sang selon les molécules a été rapporté. Le type de transporteur est rarement pris en compte dans les modèles, mais

apparaît parfois indirectement dans la structure du modèle. Par exemple chez l'oiseau, Cortright *et al.* (2009) corrigent la valeur du débit cardiaque en incluant l'hématocrite pour traduire au mieux la perfusion plasmatique des tissus et prendre en compte la liaison du midazolam avec les protéines du plasma. Nichols *et al.* (2010) représentent le compartiment sanguin par deux sous-compartiments : le plasma et les globules rouges, afin de pouvoir modéliser la liaison du méthylmercure avec l'hémoglobine, et de pouvoir ajuster la taille de ce compartiment selon l'espèce considérée.

4.4.2.3. Influence des paramètres liés à la molécule et à l'animal sur les constantes impliquées dans les mécanismes du transfert

La prise en compte des différents paramètres (liés à l'animal et/ou à la molécule) dans les équations gérant les flux inter-compartiments est fonction de leurs effets sur les différentes étapes du transfert. Certains auteurs ont étudié la contribution ou l'impact de ces paramètres dans le transfert. Ainsi, Cortright *et al.* (2009) et MacLachlan (2010), grâce aux modèles développés, ont testé une série de scenarii dans le but d'identifier les paramètres ayant une influence sur la quantité de résidus dans l'œuf et les tissus, et d'étudier leur importance relative.

Tableau I- 13 : Paramètres principaux utilisés pour chaque étape du transfert et leurs variations en fonction des paramètres physiologiques de la poule (rouge) et des propriétés de la molécule (bleu)

Mécanismes	Paramètres	Variation selon les paramètres	Références
Absorption	k_{abs}	✓ AE ↓ quand log Kow ↑	Drouillard et Norstrom, 2000.
Distribution	K_{pf}	✓ Indépendant du log Kow ✓ Fonction du contenu lipidique de chacun des compartiments ✓ Fonction de l'espèce	Clark *et al.*, 1987 Drouillard *et al.*, 2001 ; 2007 Haddad *et al.*, 2000 ; MacLachlan, 2010
Métabolisme /clairance	k_{pc}	✓ ↓ quand log Kow ↑ ✓ Fonction de la classe de la molécule (degré de métabolisation) ✓ Fonction de l'espèce	Drouillard *et al.*, 2001 ; 2007
Elimination *via* l'œuf	k_{egg}	✓ Fonction de la molécule (voie principale d'élimination)	MacLachlan *et al.*, 2010
Transfert*	(BMF)	✓ ↑ quand log Kow ↑ ✓ Fonction de la classe de la molécule (degré de métabolisation) ✓ Peu d'incidence du débit sanguin	Braune et Norstrom, 1989 Drouillard *et al.*, 2001 Nichols *et al.*, 2010

*action sur le transfert global

4.5. Conclusion : Intérêts et limites des modèles existants chez l'oiseau

Les modèles développés jusqu'à présent chez l'oiseau permettent d'apporter de l'information et une prédiction quant au transfert vers l'œuf de certaines molécules. Les approches utilisées vont de l'empirique au mécaniste (modèle PBPK). Ces derniers modèles récemment développés chez la poule ont pour avantage d'être au plus proche de la physiologie de la poule, cependant ils requièrent un nombre important de paramètres qui ne sont pas toujours disponibles dans la littérature, ce qui les rend plus difficilement adaptables à des oiseaux de caractéristiques différentes. De plus, au niveau de l'élimination du xénobiotique, la ponte n'est pas toujours prise en compte de façon distincte dans l'élimination. La formation particulière du jaune d'œuf, en une dizaine de jour, n'est pas représentée dans ces modèles, ce qui peut biaiser les concentrations prédites durant les dix premiers jours d'exposition ou d'épuration. La succession de période de ponte et de non-ponte au cours de la vie de l'animal n'est pas non plus représentée dans les modèles existants.

Concernant la prise en compte de la molécule, certains modèles ne sont calibrés que pour un congénère ou une famille de congénères (Drouillard *et al.,* 2001 ; Van Eijkeren *et al.,* 2006), tandis que d'autres présentent l'avantage de pouvoir faire varier leurs paramètres en fonction des caractéristiques de la molécule. Cependant ces modèles sont rares et il n'y a pas d'homogénéisation des critères utilisés. Par exemple, certains mettent en avant le log de K_{ow} de la molécule (Drouillard *et al*., 2001), alors que d'autres utilisent la demi-vie (MacLachlan, 2008). De plus cette notion est parfois ambiguë, car elle n'est pas seulement liée à la molécule, mais est bien une résultante de plusieurs phénomènes. Ainsi, il a été observé des demi-vies différentes pour deux souches de poules pour le diflubenzuron (Opdycke et Menzer, 1984). Au niveau de la modélisation de la distribution, la prise en compte du mode de transport de la molécule au sein de l'animal n'est que peu traitée.

Ainsi, le transfert de POP à l'échelle de la poule pondeuse, en prenant en compte les variations de performances de ponte au cours de sa vie, n'a jamais été modélisé à notre connaissance. De même, la modélisation de l'état d'engraissement et son impact sur les flux de POP n'ont pas été traités chez la poule. De plus, en ce qui concerne la prise en compte de la molécule, les modèles existants sont parfois calibrés pour un mélange de composés et ne sont pas aisément ajustables à une seule molécule ou un mélange différent.

5. Références

Abad, E.; Llerena, J. J.; Saulò, J.; Caixach, J.; Rivera, J., Comprehensive study on dioxin contents in binder and anti-caking agent feed additives. Chemosphere 2002, 46, (9-10), 1417-1421.

AFSSA, Dioxines, furanes et PCB de type dioxine: Evaluation de l'exposition de la population française, 34609-34610, 2005, 57p. [consulté le 12/04/11]. <http://www.anses.fr/Documents/RCCP-Ra-DixionesPCB.pdf>

AFSSA-Saisine n°2006-SA-0305 Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments, relatif à l'établissement de teneurs maximales pertinentes en polychlorobiphényles qui ne sont pas de type dioxine (PCB « non dioxin-like », PCB-NDL) dans divers aliments, 27 octobre 2007, 28p.

Aiache, J.-M . ; Beyssac, E. ; Cardot, J.-M.; Hoffart, V.; Renoux, R., Initiation à la connaissance du medicament. 5ième Ed, Masson, Issy-les-Moulineaux, 2008, 413p.

Aksit, M.; Yalçin, S.; Karul, A. B., Physiological stress parameters during food withdrawal period in force moulted hens. Archiv fur Geflugelkunde 2003, 67, (5), 212-216.

Andersen, M. E., Physiologically based pharmacokinetic (PB-PK) models in the study of the disposition and biological effects of xenobiotics and drugs. Toxicology Letters 1995, 82-83, 341-348.

Ansari, G. A. S.; Kaphalia, B. S.; Firoze Khan, M., Fatty acid conjugates of xenobiotics. Toxicology Letters 1995, 75, (1-3), 1-17.

Appery, N. R. C.; Tillier, C.; Condé, J.; Giraudeau, P.; Henry, Y., Dioxines dans des oeufs et sols de poulaillers aux alentours de l'incinérateur de Besançon, 2006, 8p. [consulté le 12/04/11]. < http://www.franche-comte.sante.gouv.fr/img/pdf/article_.pdf>

Arnot, J. A.; Arnot, M. I.; Mackay, D.; Couillard, Y.; MacDonald, D.; Bonnell, M.; Doylek, P., Molecular size cutoff criteria for screening bioaccumulation potential: Fact or fiction? Integrated Environmental Assessment and Management 2009, 6, (2), 210-224.

Aungst, B.; Shen, D.D., Gastrointestinal absorption of toxic agents. In Gastrointestinal Toxicology (Rozman, K., Hänninen, O., Eds.), 29–56. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1986, 606p.

Babish, J. G.; Gutenmann, W. H.; Stoewsand, G. S., Polybrominated biphenyls: tissue distribution and effect on hepatic microsomal enzymes in Japanese quail. Journal of Agricultural and Food Chemistry 1975, 23, (5), 879-882.

Backman, L.; Kolmodin-Hedman, B., Concentration of DDT and DDE in plasma and subcutaneous adipose tissue before and after intestinal bypass operation for treatment of obesity. Toxicology and Applied Pharmacology 1978, 46, (3), 663-669.

Baeza, E. ; Couty, M. ; Damange, J-.P. ; Le Bihan-Duval, E. ; Guemene, D. ; Arnould, C., Effet du sexe et du génotype sur l'occupation des parcours par les poulets et leur réponse en corticostérone à une situation de stress. Thema 2010, 13, 24-30.

Bailey, S.; Bunyan, P. J., Interpretation of persistence and effects of polychlorinated biphenyls in birds. Nature 1972, 236, (5340), 34-36.

Bakker, M. I.; Casado, B.; Koerselman, J. W.; Tolls, J.; Kollöffel, C., Polycyclic aromatic hydrocarbons in soil and plant samples from the vicinity of an oil refinery. Science of the Total Environment 2000, 263, (1-3), 91-100.

Balnave, D., Relationship between blood linoleic acid and laying activity in the laying hen. Journal of the Science of Food and Agriculture 1971, 22, (9), 467–469.

Barron, L. G.; Walzern, R. L.; Hansen, R. J., Plasma lipoprotein changes in hens (Gallus domesticus) during an induced molt. Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology 1999, 123, (1), 9-16.

Barron, M. G.; Stehly, G. R.; Hayton, W. L., Pharmacokinetic modeling in aquatic animals. I. Models and concepts. Aquatic Toxicology 1990, 17, (3), 187-212.

Bernard, A.; Broeckaert, F.; De Poorter, G.; De Cock, A.; Hermans, C.; Saegerman, C.; Houins, G., The Belgian PCB/dioxin incident: Analysis of the food chain contamination and health risk evaluation. Environmental Research 2002, 88, (1), 1-18.

Blem, C. R., Patterns of lipid storage and utilization in birds. Integrative and Comparative Biology 1976, 16, (4), 671-684.

Billeret, M.; Berny, P.; Mazallon, M.; Buronfosse, T., Bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls in rats from naturally contaminated soils - preliminary evaluation of the influence of soil parameters. Environmental Toxicology and Chemistry 2000, 19, (10), 2614-2620.

Bischoff, K.B.; Brown, R.G., Drug distribution in mammals. Chemical Engineering Progress Symposium Series 1966, 62 (66), 33–45.

Bonnefille, P.; Sezgin-Bayindir, Z.; Belkhelfa, H.; Arellano, C.; Gandia, P.; Woodley, J.; Houin, G., The use of isolated enterocytes to study Phase I intestinal drug metabolism: Validation with rat and pig intestine. Fundamental and Clinical Pharmacology 2011, 25, (1), 104-114.

Borgå, K.; Wolkers, H.; Skaare, J. U.; Hop, H.; Muir, D. C. G.; Gabrielsen, G. W., Bioaccumulation of PCBs in Arctic seabirds: Influence of dietary exposure and congener biotransformation. Environmental Pollution 2005, 134, (3), 397-409.

Borlakoglu, J. T.; Walker, C. H., Comparative aspects of congener specific PCB metabolism. European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics 1989, 14, (2), 127-131.

Borlakoglu, J. T.; Welch, V. A.; Wilkins, J. P. G.; Dils, R. R., Transport and cellular uptake of polychlorinated biphenyls (PCBs) - I. Association of individual PCB isomers and congeners with plasma lipoproteins and proteins in the pigeon. Biochemical Pharmacology 1990, 40, (2), 265-272.

Borlakoglu, J. T.; Wilkins, J. P. G., Metabolism of di-, tri-, tetra-, penta- and hexachlorobiphenyls by hepatic microsomes isolated from control animals and animals treated with Aroclor 1254, a commercial mixture of polychlorinated biphenyls (PCBs). Comparative Biochemistry and Physiology - C Pharmacology Toxicology and Endocrinology 1993, 105, (1), 95-106.

Bosveld, A. T. C.; De Bie, P. A. F.; Van den Brink, N. W.; Jongepier, H.; Klomp, A. V., In vitro EROD induction equivalency factors for the 10 PAHs generally monitored in risk assessment studies in The Netherlands. Chemosphere 2002, 49, (1), 75-83.

Braune, B. M.; Norstrom, R. J., Dynamics of organochlorine compounds in herring gulls: III. Tissue distribution and bioaccumulation in Lake Ontario gulls. Environmental Toxicology and Chemistry 1989, 8, (10), 957-968.

Brown, R. E.; Brain, J. D.; Wang, N., The Avian Respiratory System: A unique model for studies of respiratory toxicosis and for monitoring air quality. Environmental Health Perspectives 1997, 105, (2), 188-200.

Bujo, H.; Hermann, M.; Lindstedt, K. A.; Nimpf, J.; Schneider, W. J., Low density lipoprotein receptor gene family members mediate yolk deposition. Journal of Nutrition 1997, 127, (5 SUPPL.).

Buur, J. L.; Baynes, R. E.; Smith, G. W.; Riviere, J. E., A physiologically based pharmacokinetic model linking plasma protein binding interactions with drug disposition. Research in Veterinary Science 2009, 86, (2), 293-301.

Byrne, C.; Ferrario, J., Bioaccumulation factors and intake of 2,3,7,8 -polychlorinated dibenzo-p-dioxins in the domestic chicken Organohalogen Compounds 2003, 64, 1-4.

Cabidoche, Y. M.; Achard, R.; Cattan, P.; Clermont-Dauphin, C.; Massat, F.; Sansoulet, J., Long-term pollution by chlordecone of tropical volcanic soils in the French West Indies: A simple leaching model accounts for current residue. Environmental Pollution 2009, 157, (5), 1697-1705.

Caboche, J., Validation d'un test de mesure de bioaccessibilité – Application à 4 éléments traces métalliques dans les sols : As, Cd, Pb et Sb, Thèse, Sciences Agronomiques, INPL, 2009.

Cavret, S.; Feidt, C., Intestinal metabolism of PAH: In vitro demonstration and study of its impact on PAH transfer through the intestinal epithelium. Environmental Research 2005, 98, (1), 22-32.

Casas, S., Modelisation de la bioaccumulation de metaux traces (Hg, Cd, Pb, Cu et Zn) chez la moule, *Mytilus galloprovincialis*, en milieu mediterraneen, Thèse, Océanologie biologique, Environnement marin, Université du Sud Toulon Var, 2005.

Chang, R.; Hayward, D.; Goldman, L.; Harnly, M.; Flattery, J.; Stephens, R., Foraging farm animals as biomonitors for dioxin contamination. Chemosphere 1989, 19, (1-6), 481-486.

Charman, W. N.; Porter, C. J. H.; Mithani, S.; Dressman, J. B., Physicochemical and physiological mechanisms for the effects of food on drug absorption: The role of lipids and pH. Journal of Pharmaceutical Sciences 1997, 86, (3), 269-282.

CITEPA, Centre Interprofessionnel Technique d'Etudes de la Pollution Atmosphérique [site en ligne].Paris (France), [consulté le 15/02/11]. <http://www.citepa.org/>

Clark, T. P.; Norstrom, R. J.; Fox, G. A.; Won, H. T., Dynamics of organochlorine compounds in herring gulls (*Larus argentatus*): II. A two-compartment model and data for ten compounds. Environmental Toxicology and Chemistry 1987, 6, (7), 547-559.

Clark, T.; Clark, K.; Paterson, S.; Mackay, D.; Norstrom, R. J., Wildlife monitoring, modeling, and fugacity. Environmental Science and Technology 1988, 22, (2), 120-127.

Clewell III, H. J., The application of physiologically based pharmacokinetic modeling in human health risk assessment of hazardous substances. Toxicology Letters 1995, 79, (1-3), 207-217.

Colburn, W. A.; Matthews, H. B., Pharmacokinetics in the interpretation of chronic toxicity tests: The last-in, first-out phenomenon. Toxicology and Applied Pharmacology 1979, 48, (3), 387-395.

Commandeur, J.N.M. ; Stijntjes, G.J., Vermeulen, N.P.E., Enzymes and transport systems involved in the formation and disposition of glutathione S-conjugates. Role in bioactivation and detoxication mechanisms of xenobiotics. Pharmacology Revue 1995, 47, 271-330.

CONTEGG, Contaminatie van eieren afkomstig van kippen gehouden bij particulieren. Projet rt-06/9-CONTEGG, 2008, 196p.

Cortright, K. A.; Wetzlich, S. E.; Craigmill, A. L., A PBPK model for midazolam in four avian species. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics 2009, 32, (6), 552-565.

Costera, A.; Feidt, C.; Marchand, P.; Bizec, B. L.; Rychen, G., PCDD/F and PCB transfer to milk in goats exposed to a long-term intake of contaminated hay. Chemosphere 2006, 64, (4), 650-657.

Covaci, A.; Roosens, L.; Dirtu, A. C.; Waegeneers, N.; Van Overmeire, I.; Neels, H.; Goeyens, L., Brominated flame retardants in Belgian home-produced eggs: Levels and contamination sources. Science of the Total Environment 2009, 407, (15), 4387-4396.

Dale, W.E.; Gaines, T.B.; Hayes, W.J.J., Storage and excretion of DDT in starved rats. Toxicology and Applied Pharmacology 1962, 4, 89-106.

Debruyn, A. M. H.; Gobas, F. A. P. C., A bioenergetic biomagnification model for the animal kingdom. Environmental Science and Technology 2006, 40, (5), 1581-1587.

De Freitas, A. S.; Norstrom, R. J., Turnover and metabolism of polychlorinated biphenyls in relation to their chemical structure and the movement of lipids in the pigeon. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology 1974, 52, (6), 1080-1094.

De Vos, S.; Maervoet, J.; Schepens, P.; De Schrijver, R., Polychlorinated biphenyls in broiler diets: Their digestibility and incorporation in body tissues. Chemosphere 2003, 51, (1), 7-11.

De Vos, S.; Verschueren, D.; De Schrijver, R., Digestibility, retention and incorporation of low-level dietary PCB contents in laying hens. Chemosphere 2005, 58, (11), 1553-1562.

De Vries, M.; Kwakkel, R.; Kijlstra, A., Dioxins in organic eggs: a review. NJAS Wageningen Journal of Life Sciences 2006, 54, (2), 207-222.

Diliberto, J. J.; DeVito, M. J.; Ross, D. G.; Birnbaum, L. S., Subchronic exposure of [3H]-2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in female B6C3F1 mice: Relationship of steady-state levels of disposition and metabolism. Toxicological Sciences 2001, 61, (2), 241-255.

Dimitrov, S. D.; Dimitrova, N. C.; Walker, J. D.; Veith, G. D.; Mekenyan, O. G., Predicting bioconcentration factors of highly hydrophobic chemicals. Effects of molecular size. Pure and Applied Chemistry 2002, 74, (10), 1823-1830.

Directive 85/467/CEE du Conseil du 1er octobre 1985 portant sixième modification (polychlorobiphényles /polychloroterphényles) de la directive 76/769/CEE concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives des États membres relatives à la limitation de la mise sur le marché et de l'emploi de certaines substances et préparations dangereuses. Journal Officiel des Communautés Européennes, L269, 56-58.

Directive 1999/74/CE du Conseil du 19 juillet 1999 établissant les normes minimales relatives à la protection des poules pondeuses. Journal Officiel des Communautés Européennes, L203, 53-57

Directive 2002/95/CE du Parlement Européen et du Conseil du 27 janvier 2003 relative à la limitation de l'utilisation de certaines substances dangereuses dans les équipements électriques et électroniques modifiée (DecaBDE). Journal Officiel des Communautés Européennes, L37, 19-23.

Directive 2002/32/CE du Parlement Européen et du Conseil du 7 mai 2002 sur les substances indésirables dans les aliments pour animaux. Journal Officiel des Communautés Européennes, L140, 10-21.

Directive 2003/11/CE du Parlement Européen et du Conseil du 6 février 2003 portant vingt-quatrième modification de la directive 76/769/CEE du Conseil relative à la limitation de la mise sur le marché et de l'emploi de certaines substances et préparations dangereuses (pentabromodiphényléther, octabromodiphényléther). Journal Officiel des Communautés Européennes, L42, 45-46.

Directive 2006/13/CE de la Commission du 3 février 2006 modifiant les annexes I et II de la directive 2002/32/CE du Parlement européen et du Conseil sur les substances indésirables dans les aliments pour animaux, en ce qui concerne les dioxines et les PCB de type dioxine. Journal Officiel des Communautés Européennes, L32, 44-53.

Directive 2006/77/CE de la Commission du 29 septembre 2006 modifiant l'annexe I de la directive 2002/32/CE du Parlement européen et du Conseil en ce qui concerne les teneurs maximales en composés organochlorés des aliments pour animaux. Journal Officiel des Communautés Européennes, L271, 53-55.

Donoghue, D. J.; Schenck, F. J.; Hairston, H.; Podhorniak, L. V., Modeling drug residue uptake by eggs: Evidence of a consistent daily pattern of contaminant transfer into developing preovulatory yolks. Journal of Food Protection 1997, 60, (10), 1251-1255.

Donoghue, D. J., Mechanisms regulating drug and pesticide residue uptake by egg yolks: Development of predictive models. World's Poultry Science Journal 2001, 57, (4), 378-380.

Drouillard, K. G.; Norstrom, R. J., Dietary absorption efficiencies and toxicokinetics of polychlorinated biphenyls in ring doves following exposure to aroclor® mixtures. Environmental Toxicology and Chemistry 2000, 19, (11), 2707-2714.

Drouillard, K. G. Modeling the toxicokinetics and biomagnification of polychlorinated biphenyls (PCBs) in birds. Trent University, Peterborough, Ontario, Canada, 2001.

Drouillard, K. G.; Fernie, K. ;, Smits, J.E. ; Bortolotti, G.R. ; Bird, D.M. ; Norstrom, R.J., Bioaccumulation and toxicokinetics of 42 polychlorinated biphenyl congeners in American Kestrels (*Falco sparverius*). Environmental Toxicology and Chemistry 2001, 20, (11), 2514-2522.

Drouillard, K. G.; Norstrom, R. J., The influence of diet properties and feeding rates on PCB toxicokinetics in the ring dove. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 2003, 44, (1), 97-106.

Drouillard, K. G.; Norstrom, R.J. ; Fox, G.A.; Gilman, A.; Peakall, D.B., Development and validation of a Herrig gull Embryo toxicokinetic model for PCBs. Ecotoxicology 2003, 12, 55-68.

Drouillard, K. G.; Fernie, K. J.; Letcher, R. J.; Shutt, L. J.; Whitehead, M.; Gebink, W.; Bird, D. M., Bioaccumulation and biotransformation of 61 polychlorinated biphenyl and four polybrominated diphenyl ether congeners in juvenile American kestrels (Falco sparverius). Environmental Toxicology and Chemistry 2007, 26, (2), 313-324.

Dulfer, W. J.; Govers, H. A. J., Solubility and micelle-water partitioning of polychlorinated biphenyls in solutions of bile salt micelles. Chemosphere 1995, 30, (2), 293-306.

Dulfer, W. J.; Groten, J. P.; Govers, H. A. J., Effect of fatty acids and the aqueous diffusion barrier on the uptake and transport of polychlorinated biphenyls in Caco-2 cells. Journal of Lipid Research 1996, 37, (5), 950-961.

Dulfer, W. J.; Govers, H. A. J.; Groten, J. P., Kinetics and conductivity parameters of uptake and transport of polychlorinated biphenyls in the Caco-2 intestinal cell line model. Environmental Toxicology and Chemistry 1998, 17, (3), 493-501.

Ecobichon, D. J.; Saschenbrecker, P. W., The redistribution of stored DDT in cockerels under the influence of food deprivation. Toxicology and Applied Pharmacology 1969, 15, (2), 420-432.

EFSA (European Food Safety Authority), 2005, Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the Commission related to the presence on non dioxin-like polychlorinated biphenyls

(PCB) in feed and food. Question N°EFSA-Q-2003-114, European Food Safety Authority, The EFSA Journal, 284, 1-137.

EFSA (European Food Safety Authority), 2008. Polycyclic aromatic hydrocarbons in food. Scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain. Question N° EFSA-Q-2007-136, European Food Safety Authority, The EFSA Journal, 724, 1-114.

Esteve-Garcia, E.; García-Regueiro, J. A., In Egg quality: Chemical residues in respect to food safety, XI th European Symposium on the Quality of Eggs and Egg Products, Doorwerth, The Netherlands, 2005, 23-26 May eggs, C. r. i., Ed. Doorwerth, The Netherlands, 2005, 23-26 May pp 154-163.

Fabre, B.; Roth, E.; Kergaravat, O., Analysis of the insecticide hexachlorocyclohexane isomers in biological media. A review. Environmental Chemistry Letters 2005, 3, (3), 122-126.

Feidt, C.; Cavret, S.; Grova, N.; Laurent, C.; Rychen, G., Evaluation of the Risk of PAHs and Dioxins Transfer to Humans via the Dairy Ruminant. In Environmental Chemistry, Lichtfouse, E.; Schwarzbauer, J.; Robert, D., Eds. Springer Berlin Heidelberg: 2005; pp 419-430.

Fenneteau, F., Prédiction des impacts pharmacocinétiques des interactions médicamenteuses impliquant les CYP3A et les glycoprotéines-P: Développement de modèles physiologiques et analyse de sensibilité, Université de Montréal, 2009

Findlay, G. M.; DeFreitas, A. S. M., DDT movement from adipocyte to muscle cell during lipid utilization. Nature 1971, 229, 63-65.

Fries, G. F., A review of the significance of animal food products as potential pathways of human exposures to dioxins. Journal of animal science 1995, 73, (6), 1639-1650.

Gallenberg, L. A.; Vodicnik, M. J., Potential mechanisms for redistribution of polychlorinated biphenyls during pregnancy and lactation. Xenobiotica 1987, 17, (3), 299-310.

Garban, B.; Ollivon, D.; Teil, M.J.; Blanchard, M.; Blanchoud, H.; Moteley-Massei, A.; Chesterikoff, C.; Hanselin, L.; Rolet, J.; Le Genti L.; Chevreuil, M. ,2002. Rapport PIREN-Seine, 31p.

Gilbert, A.B., Female genital organs. In: Form and function in birds (King A.S., McLelland, J., Ed), 237-360. Academic Press, London, 1979.

Gilday, D.; Bellward, G. D.; Sanderson, J. T.; Janz, D. M.; Rifkind, A. B., 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) induces hepatic cytochrome P450-dependent arachidonic acid epoxygenation in diverse avian orders: Regioisomer selectivity and immunochemical comparison of the TCDD-induced P450s to CYP1A4 and 1A5. Toxicology and Applied Pharmacology 1998, 150, (1), 106-116.

Glaser, D.; Connolly, J. P., A model of *p,p'*-DDE and total PCB bioaccumulation in birds from the Southern California Bight. Continental Shelf Research 2002, 22, (6-7), 1079-1100.

Gobas, F.A.P.C.; Muir, D.C.G.; Mackay, D., Dynamics of dietary bioaccumulation and faecal elimination of hydrophobic organic chemicals in fish. Chemosphere 1988, 17, (5), 943-962.

Gobas, F. A. P. C.; McCorquodale, J. R.; Haffner, G. D., Intestinal absorption and biomagnification of organochlorines. Environmental Toxicology and Chemistry 1993, 12, (3), 567-576.

Gomez-Catalan, J.; To-Figueras, J.; Rodamilans, M.; Corbella, J., Transport of organochlorine residues in the rat and human blood. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 1991, 20, (1), 61-66.

Golor, G.; Yamashita, K.; Körner, W.; Hagenmaier, H.; Neubert, D., Kinetics and inductive potency of 1,2,3,4,6,7,8-heptachlorodibenzo-p-dioxin (H7CDD) in rats. Life Sciences 2001, 69, (5), 493-508.

Gorman, K. B.; Esler, D.; Walzem, R. L.; Williams, T. D., Plasma yolk precursor dynamics during egg production by female greater scaup (aythya marila): Characterization and indices of reproductive state. Physiological and Biochemical Zoology 2009, 82, (4), 372-381.

Gornall, D. A.; Kuksis, A., Alterations in lipid composition of plasma lipoproteins during deposition of egg yolk. Journal of Lipid Research 1973, 14, (2), 197-205.

Grass, G. M., Simulation models to predict oral drug absorption from in vitro data. Advanced Drug Delivery Reviews 1997, 23, (1-3), 199-219.

Griffin, H.D.; Perry, M.M.; Gilbert, A.B., Yolk formation. In: Physiology and biochemistry of the fowl (Freeman Ed.), chap.11, 346-380, Academic Press, London, 1984.

Griffin, H.D., Manipulation of egg yolk cholesterol: a physiologist's view. World's Poultry Science Journal 1992, 48, 101-112.

Guruge, K. S.; Tanabe, S., Congener specific accumulation and toxic assessment of polychlorinated biphenyls in common cormorants, phalacrocorax carbo, from Lake Biwa, Japan. Environmental Pollution 1997, 96, (3), 425-433.

Hack, A.; Selenka, F., Mobilization of PAH and PCB from contaminated soil using a digestive tract model model. Toxicology Letters 1996, 88, (1-3), 199-210.

Haddad, S.; Poulin, P.; Krishnan, K., Relative lipid content as the sole mechanistic determinant of the adipose tissue: Blood partition coefficients of highly lipophilic organic chemicals. Chemosphere 2000, 40, (8), 839-843.

Hakk, H.; Larsen, G.; Feil, V., Tissue distribution, excretion, and metabolism of 1,2,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in the rat. Chemosphere 2001, 42, (8), 975-983.

Hakk, H.; Letcher, R. J., Metabolism in the toxicokinetics and fate of brominated flame retardants - A review. Environment International 2003, 29, (6), 801-828.

Hakk, H.; Huwe, J. K.; Murphy, K.; Rutherford, D., Metabolism of 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (BDE-47) in chickens. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2010, 58, (15), 8757-8762.

Hansen, L. G.; Sullivan, J. M.; Neff, C. C.; Sanders, P. E.; Lambert, R. J.; Beasley, V. R.; Storr-Hansen, E., Polychlorinated biphenyl contamination of domestic turkeys from building materials. Journal of Agricultural and Food Chemistry 1989, 37, (1-2), 135-139.

Harju, M.; Hamers, T.; Kamstra, J. H.; Sonneveld, E.; Boon, J. P.; Tysklind, M.; Andersson, P. L., Quantitative structure-activity relationship modeling on in vitro endocrine effects and metabolic stability involving 26 selected brominated flame retardants. Environmental Toxicology and Chemistry 2007, 26, (4), 816-826.

Harnly, M. E.; Petreas, M. X.; Flattery, J.; Goldman, L. R., Polychlorinated dibenzo-p-dioxin and polychlorinated dibenzofuran contamination in soil and home-produced chicken eggs near pentachlorophenol sources. Environmental Science and Technology 2000, 34, (7), 1143-1149.

Hébert, C. D.; Birnbaum, L. S., The influence of aging on intestinal absorption of TCDD in rats. Toxicology Letters 1987, 37, (1), 47-55.

Hegelund, L.; Sørensen, J. T.; Kjær, J. B.; Kristensen, I. S., Use of the range area in organic egg production systems: Effect of climatic factors, flock size, age and artificial cover. British Poultry Science 2005, 46, (1), 1-8.

Helgason, L. B.; Arukwe, A.; Gabrielsen, G. W.; Harju, M.; Hegseth, M. N.; Heimstad, E. S.; Jørgensen, E. H.; Mortensen, A. S.; Wolkers, J., Biotransformation of PCBs in Arctic seabirds: Characterization of phase I and II pathways at transcriptional, translational and activity levels. Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology 2010, 152, (1), 34-41.

Hiebl, J.; Vetter, W., Detection of hexabromocyclododecane and its metabolite pentabromocyclododecene in chicken egg and fish from the official food control. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2007, 55, (9), 3319-3324.

Henriksen, E. O.; Gabrielsen, G. W.; Skaare, J. U., Validation of the use of blood samples to assess tissue concentrations of organochlorines in glaucous gulls, Larus hyperboreus. Chemosphere 1998, 37, (13), 2627-2643.

Hermier, D., Modifications du cholestérol et des acides gras de l'œuf : bases physiologiques et nutritionnelles. INRA Productions Animales, 7, (4), 245-252.

Hermier, D., Lipoprotein metabolism and fattening in poultry. INRA- conférence 1997.

Hervé, J. C.; Crump, D.; Giesy, J. P.; Zwiernik, M. J.; Bursian, S. J.; Kennedy, S. W., Ethoxyresorufin O-deethylase induction by TCDD, PeCDF and TCDF in ring-necked pheasant and Japanese quail hepatocytes: Time-dependent effects on concentration-response curves. Toxicology in Vitro 2010, 24, (4), 1301-1305.

Hjelmborg, P. S.; Andreassen, T. K.; Bonefeld-Jørgensen, E. C., Cellular uptake of lipoproteins and persistent organic compounds-An update and new data. Environmental Research 2008, 108, (2), 192-198.

Hoang, K. C. T., Physiologically based pharmacokinetic models: Mathematical fundamentals and simulation implementations. Toxicology Letters 1995, 79, (1-3), 99-106.

Holman, H. Y. N.; Goth-Goldstein, R.; Aston, D.; Yun, M.; Kengsoontra, J., Evaluation of gastrointestinal solubilization of petroleum hydrocarbon residues in soil using an in vitro physiologically based model. Environmental Science and Technology 2002, 36, (6), 1281-1286.

Hoogenboom, L. A. P.; Kan, C. A.; Bovee, T. F. H.; Van Der Weg, G.; Onstenk, C.; Traag, W. A., Residues of dioxins and PCBs in fat of growing pigs and broilers fed contaminated feed. Chemosphere 2004, 57, (1), 35-42.

Hoogenboom, L. A. P.; Kan, C. A.; Zeilmaker, M. J.; Van Eijkeren, J.; Traag, W. A., Carry-over of dioxins and PCBs from feed and soil to eggs at low contamination levels - Influence of mycotoxin binders on the carry-over from feed to eggs. Food Additives and Contaminants 2006, 23, (5), 518-527.

Horsted, K.; Hermansen, J. E., Whole wheat versus mixed layer diet as supplementary feed to layers foraging a sequence of different forage crops. Animal 2007, 1, (4), 575-585.

Huyghebaert, G.; Daeseleire, E.; Grijspeerdt, K.; Van Renterghem, R., The deposition profile of oxy-carotenoids, fat and PCBs in egg yolks. Archiv fur Geflugelkunde 2002, 66, (5), 216-223.

Ikeda, M.; Matsushita, S.; Yamashita, J.; Ikeya, M.; Iwasawa, T.; Tomita, T., The Transfer of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin into Eggs and Chicks following Exposure to Hens. Recent Advances in TCDD Toxicology 2004, 66, 3305-3309.

ITAVI, Document de synthèse : résultats 2008 des enquêtes poulettes et pondeuses, 2009. [consulté le 12/04/11].<http://www.itavi.asso.fr/economie/references/synthesepondeuses2008.pdf >

Ivie, G. W.; Gibson, J. R.; Bryant, H. E.; Begin, J. J.; Barnett, J. R.; Dorough, H. W., Accumulation, distribution, and excretion of mirex-^{14}C in for long periods to the insecticide in the diet. Journal of Agricultural and Food Chemistry 1974, 22, (4), 646-653.

Jandacek, R. J.; Tso, P., Factors affecting the storage and excretion of toxic lipophilic xenobiotics. Lipids 2001, 36, (12), 1289-1305.

Jandacek, R.J.; Tso P., Enterohepatic circulation of organochlorine compounds: a site for nutritional intervention. Journal of Nutritional Biochemistry 2007, 18, 163-167.

Jondreville, C., Travel, A., Besnard, J., Dziurla, M.-A., Feidt, C., 2010. Intake of herbage and soil by free-range laying hens offered a complete diet compared to a whole-wheat diet. XIIIth European Poultry Conference, M. Duclos and Y. Nys, Eds, Tours, 23-27 August 2010, France World's Poultry Science Journal, 66 Supp, 4 pp.

Jôrundsdottir, H.; Löfstrand, K.; Svavarsson, J.; Bignert, A.; Bergman, A. , Organochlorine compounds and their metabolites in seven Icelandic seabird species – a comparative study. Environmental Science and Technology 2010, 44, 3252–3259.

Kan, C. A.; Jonker-den Rooyen, J. C., Accumulation and depletion of some organochlorine pesticides in high-producing laying hens. Journal of Agricultural and Food Chemistry 1978, 26, (4), 935-940.

Kan, K. In Chemical residues in poultry and eggs produced in freerange or organic systems, XVII th European Symposium on the Quality of Poultry Meat, XI th European Symposium on the Quality of Eggs and Egg Products, Doorwerth, The Netherlands, 2005, 23-26 May; products:, C. r. i. p., Ed. Doorwerth, The Netherlands, 2005, 23-26 May; pp 28 - 36.

Kan, C. A.; Meijer, G. A. L., The risk of contamination of food with toxic substances present in animal feed. Animal Feed Science and Technology 2007, 133, (1-2), 84-108.

Karasov, W. H.; Kenow, K. P.; Meyer, M. W.; Fournier, F., Bioenergetic and pharmacokinetic model for exposure of common loon (Gavia immer) chicks to methylmercury. Environmental Toxicology and Chemistry 2007, 26, (4), 677-685.

Kelley, M.E., Brauning, S.E., Schoof, R.A., Ruby, M.V. Assessing oral bioavailability of metals in soil. Battelle Press, Columbus, OH., 2002.

Kelly, B. C.; Gobas, F. A. P. C.; McLachlan, M. S., Intestinal absorption and biomagnification of organic contaminants in fish, wildlife, and humans. Environmental Toxicology and Chemistry 2004, 23, (10), 2324-2336.

Kijlstra, A.; Traag, W. A.; Hoogenboom, L. A. P., Effect of flock size on dioxin levels in eggs from chickens kept outside. Poultry Science 2007, 86, (9), 2042-2048.

Kooijman, S. A. L. M.; Van Haren, R. J. F., Animal energy budgets affect the kinetics of xenobiotics. Chemosphere 1990, 21, (4-5), 681-693.

Kubota, A.; Iwata, H.; Tanabe, S.; Yoneda, K.; Tobata, S., Hepatic CYP1A induction by dioxin-like compounds, and congener-specific metabolism and sequestration in wild common cormorants from Lake Biwa, Japan. Environmental Science and Technology 2005, 39, (10), 3611-3619.

Kumar, K. S.; Kannan, K.; Giesy, J. P.; Masunaga, S., Distribution and elimination of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins, dibenzofurans, biphenyls, and *p,p'*-DDE in tissues of bald eagles from the Upper Peninsula of Michigan. Environmental Science and Technology 2002, 36, (13), 2789-2796.

Lacassagne, L., Contribution à l'étude de la phase de grand accroissement des follicules chez la poule domestique. Annales de zootechnie 1957, 2, 85-93.

Lakshmanan, M. R.; Campbell, B. S.; Chirtel, S. J., Studies on the mechanism of absorption and distribution of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in the rat. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 1986, 239, (3), 673-677.

Larbier, M.; Leclercq, B., Nutrition et alimentation des volailles. INRA Editions, Paris, 1992, 355p.

Laurent, C., Evaluation de l'absorption et de la distribution tissulaire de micropolluants organiques suite à l'ingestion de lait contaminé, Thèse, Sciences Agronomiques, INPL, 2003.

Leclercq, B., Biosynthesis and utilization of fatty acids in laying hens. Etude de la biosynthe?se et de l'utilisation des acides gras chez la poule pondeuse. 1972, 12, (3), 441-452.

Leclercq, B., Détermination simultanée et *in vivo* des intensités de dépôt et de mobilisation des acides gras du tissu adipeux de la poule pondeuse. Influence du rationnement. Ann Biolanim Bioch Biophys 1975, 15, (1), 63-71.

Lee, S.K.; Ou, Y.C.; Yang, R.S.H., Comparison of pharmacokinetic interactions and Physiologically Based Pharmacokinetic modeling of PCB 153 and PCB 126 in nonpregnant mice, lactating mice, and suckling pups. Toxicological Sciences 2002, 65, 26-34.

Lu, M. ; Yuan, D. ; Lin, Q. ; Ouyang, T., Assessment of the bioaccessibility of polycyclic aromatic hydrocarbons in topsoils from different urban functional areas using an in vitro gastrointestinal test. Environmental Monitoring and Assessment 2010, 166, (1-4), 29-39.

Lubac, S. ; Senecaille, M. ; Spérandio, D. ; Desquennes, A. ; Arnould, C. ; Faure, J.-M. ; Mirabito L., Influence de la présence detaillis à très courte rotation sur la fréquentation des parcours par les poulets label. Cinquièmes journées de la recherche avicole, Tours, 26 et 27 Mars 2003, France, p. 77-80.

Lundstedt-Enkel, K.; Tysklind, M.; Trygg, J.; Schuller, P.; Asplund, L.; Eriksson, U.; Häggberg, L.; Odsjo, T.; Hjelmberg, M.; Olsson, M.; Örberg, J., A statistical resampling method to calculate biomagnification factors exemplified with organochlorine data from herring (Clupea harengus) muscle and Guillemot (Uria aalge) egg from the baltic sea. Environmental Science and Technology 2005, 39, (21), 8395-8402.

Lundstedt-Enkel, K.; Lek, P.M.; Lundstedt, T.; Öberg, J., QSBMR—Quantitative structure biomagnification relationships: Physicochemical and structural descriptors important for the biomagnification of organochlorines and brominated flame retardants. Journal of Chemometrics 2006, 20, 392-401.

Luo, X. J.; Liu, J.; Luo, Y.; Zhang, X. L.; Wu, J. P.; Lin, Z.; Chen, S. J.; Mai, B. X.; Yang, Z. Y., Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in free-range domestic fowl from an e-waste recycling site in South China: Levels, profile and human dietary exposure. Environment International 2009, 35, (2), 253-258.

Lutz, S., Evaluation du risque de transfert des hydrocarbures aromatiques polycycliques du sol vers le lait chez le ruminant laitier, Thèse, Sciences Agronomiques, INPL, 2006.

MacLachlan, D. J., Transfer of fat-soluble pesticides from contaminated feed to poultry tissues and eggs. British Poultry Science 2008, 49, (3), 290-298.

MacLachlan, D. J., Influence of physiological status on residues of lipophilic xenobiotics in livestock. Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment 2009, 26, (5), 692-712.

MacLachlan, D. J., Physiologically based pharmacokinetic (PBPK) model for residues of lipophilic pesticides in poultry. Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment 2010, 27, (3), 302-314.

Maervoet, J.; Chu, S. G.; De Vos, S.; Covaci, A.; Voorspoels, S.; De Schrijver, R.; Schepens, P., Accumulation and tissue distribution of selected polychlorinated biphenyl congeners in chickens. Chemosphere 2004, 57, (1), 61-66.

Magdelaine, P.; Braine, A., Panorama mondial et européen de la production et de la consommation d'œufs. INRA Productions Animales 2010, 23, (2), 111-122.

Magdelaine , P. ; Gonnier, V. ; Jez, C., Situation, perspectives et enjeux pour les filières œufs européennes à la veille de la mise en œuvre de la directive bien-être, Neuvièmes journées de la recherche avicole, Tours, 29 et 30 mars 2011, 9 pp.

Maliwal, B. P.; Guthrie, F. E., In vitro uptake and transfer of chlorinated hydrocarbons among human lipoproteins. Journal of Lipid Research 1982, 23, (3), 474-479.

Marsili, L.; Fossi, M. C.; Casini, S.; Focardi, S., PCB levels in bird blood and relationship to MFO responses. Chemosphere 1996, 33, (4), 699-710.

Mateos, G. G.; Sell, J. L.; Eastwood, J. A., Rate of food passage (transit time) as influenced by level of supplemental fat. Poultry science 1982, 61, (1), 94-100.

McKernan, M. A.; Rattner, B. A.; Hatfield, J. S.; Hale, R. C.; Ann Ottinger, M., Absorption and biotransformation of polybrominated diphenyl ethers DE-71 and DE-79 in chicken (Gallus gallus), mallard (Anas platyrhynchos), American kestrel (Falco sparverius) and black-crowned night-heron (Nycticorax nycticorax) eggs. Chemosphere 2010, 79, (1), 100-109.

McLachlan, M. S.; Thoma, H.; Reissinger, M.; Hutzinger, O., PCDD/F in an agricultural food chain. Part 1: PCDD/F mass balance of a lactating cow. Chemosphere 1990, 20, (7-9), 1013-1020.

McLachlan, M. S., Mass balance of polychlorinated biphenyls and other organochlorine compounds in a lactating cow. Journal of Agricultural and Food Chemistry 1993, 41, (3), 474-480.

McLachlan, M. S., Model of the fate of hydrophobic contaminants in cows. Environmental Science Technology 1994, 28, (13), 2407-2414.

Meunier, S. Etude de la gestion de crise survenue suite à une contamination des productions animales par des dioxines dues à l'incinérateur de Gilly-sur-Isère. Ecole Nationale Vétérinaire, Lyon, 2003, pp. 163.

Mills, R. A.; Millis, C. D.; Dannan, G. A., Studies on the structure-activity relationships for the metabolism of polybrominated biphenyls by rat liver microsomes. Toxicology and Applied Pharmacology 1985, 78, (1), 96-104.

Mohammed, A.; Eklund, A.; Ostlund-Lindqvist, A. M.; Slanina, P., Distribution of toxaphene, DDT, and PCB among lipoprotein fractions in rat and human plasma. Archives of Toxicology 1990, 64, (7), 567-571.

Moser, G. A.; McLachlan, M. S., A non-absorbable dietary fat substitute enhances elimination of persistent lipophilic contaminants in humans. Chemosphere 1999, 39, (9), 1513-1521.

Moulin, M. ; Coquerel, A., Pharmacologie, Masson, 2eme Ed., Paris, 2002, 845p.

Mulder, G.J.; Coughty, M.W.H.; Burchell, B., Glucuronidation. In: Conjugation reactions in drug metabolism; an integrated approach. Mulder G.J., (Eds.) Taylor and Francis, London, 1990, 413p.

National Research Council (NRC). Predicting feed intake of food-producing animals. chap. 4, 42-27, Washington (DC): Subcommittee on Feed Intake, NRC, National Academy Press. 1987, 96p.

Nichols, J. W.; Larsen, C. P.; McDonald, M. E.; Niemi, G. J.; Ankley, G. T., Bioenergetics-based model for accumulation of polychlorinated biphenyls by nestling tree swallows, Tachycineta bicolor. Environmental Science and Technology 1995, 29, (3), 604-612.

Nichols, J. W.; Bennett, R. S.; Rossmann, R.; French, J. B.; Sappington, K. G., A physiologically based toxicokinetic model for methylmercury in female American kestrels. Environmental Toxicology and Chemistry 2010, 29, (8), 1854-1867.

Nimpf, J.; Schneider, W. J., Receptor-mediated lipoprotein transport in laying hens. Journal of Nutrition 1991, 121, (9), 1471-1474.

Norèn, K.; Weistrand, C.; Karpe, F., Distribution of PCB congeners, DDE, hexachlorobenzene, and methylsulfonyl metabolites of PCB and DDE among various fractions of human blood plasma. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 1999, 37, (3), 408-414.

Norstrom, R. J.; Clark, T. P.; Jeffrey, D. A.; Won, H. T.; Gilman, A. P., Dynamics of organochlorine compounds in herring gulls (Larus argentatus): I. Distribution and clearance of [^{14}C]dde in free-living herring gulls (Larus argentatus). Environmental Toxicology and Chemistry 1986, 5, (1), 41-48.

Norstrom, R. J.; Letcher, R.J., Role of biotransformation in bioconcentration and bioaccumulation. Annex I. In Biotransformation in environmental risk assessment; a SETAC Workshop Noordwijkerhout, the Netherlands, 28 April-1 May 1996. Sijm, D.T.H.M.; de Bruijn, J; de Voogt, P. & de Wolf W. Editions 1997. 130p.

Norstrom, R. J.; Clark, T. P.; Enright, M.; Leung, B.; Drouillard, K. G.; Macdonald, C. R., ABAM, a model for bioaccumulation of POPs in birds: Validation for adult herring gulls and their eggs in Lake Ontario. Environmental Science and Technology 2007, 41, (12), 4339-4347.

Numata, M.; Fawcett, J. P.; Saville, D. J.; Rosengren, R. J., Hepatic cytochrome P450 activity and pollutant concentrations in paradise shelducks and southern black-backed gulls in the South Island of New Zealand. Ecotoxicology 2008, 17, (8), 697-708.

Oomen, A. G.; Rompelberg, C. J. M.; Van de Kamp, E.; Pereboom, D. P. K. H.; De Zwart, L. L.; Sips, A. J. A. M., Effect of Bile Type on the Bioaccessibility of Soil Contaminants in an In Vitro Digestion Model. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 2004, 46, (2), 183-188.

Opdycke, J. C.; Menzer, R. E., Pharmacokinetics of diflubenzuron in two types of chickens. Journal of Toxicology and Environmental Health 1984, 13, (4-6), 721-733.

Ounnas, F.; Jurjanz, S.; Dziurla, M. A.; Guiavarc'h, Y.; Feidt, C.; Rychen, G., Relative bioavailability of soil-bound polycyclic aromatic hydrocarbons in goats. Chemosphere 2009, 77, (1), 115-122.

Page, C.P. ; Curtis, M.J. ; Sutter, M.C. ; Walker, M.J. ; Hoffman, B.B., Pharmacologie intégrée. Edition De Boeck Université, Bruxelles, 1999, 616p.

Paterson, G.; Huestis, S. Y.; Whittle, D. M.; Drouillard, K. G.; Haffner, G. D., In situ measurement of tissue turnover and energy conversion efficiencies in lake trout (Salvelinus namaycush) using a novel toxicokinetic approach. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 2005, 62, (2), 464-471.

Pelletier, C.; Imbeault, P.; Tremblay, A., Energy balance and pollution by organochlorines and polychlorinated biphenyls. Obesity Reviews 2003, 4, (1), 17-24.

Pirard, C.; Eppe, G.; Massart, A. C.; Fierens, S.; De Pauw, E.; Focant, J. F., Environmental and human impact of an old-timer incinerator in terms of dioxin and PCB level: A case study. Environmental Science and Technology 2005, 39, (13), 4721-4728.

Plant, A.L.; Benson, D.M.; Smith, L.C., Cellular uptake benzo(a)pyrene and intracellular localization of by digital fluorescence imaging microscopy. The Journal of Cell Biology1985, 100, 1295-1308.

Pu, X.; Carlson, G. P.; Lee, L. S., Oral bioavailability of pentachlorophenol from soils of varying characteristics using a rat model. Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A 2003, 66, (21), 2001-2013.

Pu, X.; Lee, L. S.; Galinsky, R. E.; Carlson, G. P., Evaluation of a rat model versus a physiologically based extraction test for assessing phenanthrene bioavailability from soils. Toxicological Sciences 2004, 79, (1), 10-17.

Pussemier, L.; Mohimont, L.; Huyghebaert, A.; Goeyens, L., Enhanced levels of dioxins in eggs from free range hens; A fast evaluation approach. Talanta 2004, 63, (5), 1273-1276.

Rahman, A.; Barrowman, J. A.; Rahimtula, A., The influence of bile on the bioavailability of polynuclear aromatic hydrocarbons from the rat intestine. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology 1986, 64, (9), 1214-1218.

Règlement 396/2005/CE du Parlement européen et du Conseil du 23 février 2005 concernant les limites maximales applicables aux résidus de pesticides présents dans ou sur les denrées alimentaires et les aliments pour animaux d'origine végétale et animale. Journal Officiel des Communautés Européennes, L70, 1-16.

Règlement 1881/2006/CE de la Commission du 19 décembre 2006 portant fixation de teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires. Journal Officiel des Communautés Européennes, L364, 5-24.

Règlement 149/2008/CE de la Commission du 29 janvier 2008 modifiant le règlement (CE) no 396/2005 du Parlement européen et du Conseil pour y ajouter les annexes II, III et IV fixant les limites maximales applicables aux résidus des produits figurant à son annexe I. Journal Officiel des Communautés Européennes, L53, 1-398.

Règlement 839/2008/CE de la Commission du 31 juillet 2008 modifiant le règlement (CE) no 396/2005 du Parlement européen et du Conseil en ce qui concerne ses annexes II, III et IV relatives aux limites maximales applicables aux résidus de pesticides présents dans ou sur certains produits. L234, 1-216.

Reid, B. J.; Jones, K. C.; Semple, K. T., Bioavailability of persistent organic pollutants in soils and sediments--a perspective on mechanisms, consequences and assessment. Environmental Pollution 2000, 108, (1), 103-112.

Renwick A.G., 2001. Toxicokinetics: Pharmacokinetics in toxicology. In: Principles and methods of toxicology. Hayes A.W. (Eds). Taylor Francis, Philadelphia, PA, USA, 137-191.

Risau, W.; Wolburg, H., Development of the blood-brain barrier. Trends in Neurosciences 1990, 13, (5), 174-178.

Romanoff, A.L.; Romanoff, .J., The avian egg. John Wiley & Sons (Eds.), NY, USA, 1949, 998p.

Roosens, L.; Abdallah, M. A. E.; Harrad, S.; Neels, H.; Covaci, A., Exposure to hexabromocyclododecanes (HBCDs) via dust ingestion, but not diet, correlates with concentrations in human serum: Preliminary results. Environmental Health Perspectives 2009, 117, (11), 1707-1712.

Rozemeijer, M. J. C.; Boon, J. P.; Swennen, C.; Brouwer, A.; Murk, A. J., Dioxin type and mixed type induction of the cytochrome P-450 system of common elder ducklings (Somateria Mollissima) by PCBs: With indications for biotransformation. Aquatic Toxicology 1995, 32, (2-3), 93-113.

Rychen, G.; Ducoulombier-Crépineau, C.; Grova, N.; Jurjanz, S.; Feidt, C., Modalités et risques de transfert des polluants organiques persistants vers le lait. INRA Productions Animales 2005, 18, (5), 355-366.

Sagerup, K.; Helgason, L. B.; Polder, A.; Strøm, H.; Josefsen, T. D.; Skåre, J. U.; Gabrielsen, G. W., Persistent organic pollutants and mercury in dead and dying glaucous gulls (Larus hyperboreus) at Bjørnøya (Svalbard). Science of the Total Environment 2009, 407, (23), 6009-6016.

Salvante, K. G.; Lin, G.; Walzem, R. L.; Williams, T. D., Characterization of very-low density lipoprotein particle diameter dynamics in relation to egg production in a passerine bird. Journal of Experimental Biology 2007, 210, (6), 1064-1074.

Sauveur, B., Reproduction des volailles et production d'œufs. INRA Editions, Paris, 1988, 449 p.

Schlummer, M.; Moser, G. A.; McLachlan, M. S., Digestive tract absorption of PCDD/Fs, PCBs, and HCB in humans: Mass balances and mechanistic considerations. Toxicology and Applied Pharmacology 1998, 152, (1), 128-137.

Schmid, P.; Gujer, E.; Degen, S.; Zennegg, M.; Kuchen, A.; Wüthrich, C., Levels of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in food of animal origin. The Swiss dioxin monitoring program. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2002, 50, (25), 7482-7487.

Schoeters, G.; Hoogenboom, R., Contamination of free-range chicken eggs with dioxins and dioxin-like polychlorinated biphenyls. Molecular Nutrition and Food Research 2006, 50, (10), 908-914.

Schuler, F.; Schmid, P.; Schlatter, C., The transfer of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans from soil into eggs of foraging chicken. Chemosphere 1997, 34, (4), 711-718.

Schulz, A. J.; Wiesmüller, T.; Appuhn, H.; Stehr, D.; Severin, K.; Landmann, D.; Kamphues, J., Dioxin concentration in milk and tissues of cows and sheep related to feed and soil contamination. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition 2005, 89, (3-6), 72-78.

Semple, K. T.; Doick, K. J.; Jones, K. C.; Burauel, P.; Craven, A.; Harms, H., Defining bioavailability and bioaccessibility of contaminated soil and sediment is complicated. Environmental Science and Technology 2004, 38, (12).

Serafin, J. A., Avian species differences in the intestinal absorption of xenobiotics (PCB, dieldrin, Hg^{2+}). Comparative Biochemistry and Physiology - C Pharmacology Toxicology and Endocrinology 1984, 78, (2), 491-496.

Sharifi, M.; Connell, W. D.; Gabric, A., Influence of dietary fat on the intestinal absorption of lipophilic compounds in goldfish (Carassius auratus). Ecotoxicology and Environmental Safety 1997, 38, (3), 316-321.

Shore, R. F.; Wright, J.; Horne, J. A.; Sparks, T. H., Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) Residues in the Eggs of Coastal-Nesting Birds from Britain. Marine Pollution Bulletin 1999, 38, (6), 509-513.

Shu, H. P.; Nichols, A. V., Benzo(a)pyrene uptake by human plasma lipoproteins in vitro. Cancer Research 1979, 39, (4), 1224-1230.

Smith, L.C. ; Doody, M.C., Kinetics of benzo[a]pyrene transfer between human plasma lipoproteins. In: Chemical analysis and fate: Polycyclic aromatic hydrocarbons. 5th International Symposium 1981. Eds Mr Cooke and A.J. Dennis, Colombus, Ohio: Battelle Press, 615-624.

Smith, P. N.; Cobb, G. P.; Godard-Codding, C.; Hoff, D.; McMurry, S. T.; Rainwater, T. R.; Reynolds, K. D., Contaminant exposure in terrestrial vertebrates. Environmental Pollution 2007, 150, (1), 41-64.

Soine, P. J.; Blanke, R. V.; Guzelian, P. S.; Schwartz, C. C., Preferential binding of chlordecone to the protein and high density lipoprotein fractions of plasma from humans and other species. Journal of Toxicology and Environmental Health 1982, 9, (1), 107-118.

Soues, S.; Fernandez, N.; Souverain, P.; Lesca, P., Intracellular lipoproteins as carriers for 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and benzo(a)pyrene in rat and mouse liver. Biochemical Pharmacology 1989, 38, (17), 2841-2847.

Speake, B. K.; Murray, A. M. B.; C. Noble, R., Transport and transformations of yolk lipids during development of the avian embryo. Progress in Lipid Research 1998, 37, (1), 1-32.

Spindler-Vomachka, M.; Vodicnik, M. J.; Lech, J. J., Transport of 2,4,5,2',4',5'-hexachlorobiphenyl by lipoproteins in vivo. Toxicology and Applied Pharmacology 1984, 74, (1), 70-77.

Stephens, R. D.; Petreas, M. X.; Hayward, D. G., Biotransfer and bioaccumulation of dioxins and furans from soil: Chickens as a model for foraging animals. Science of the Total Environment 1995, 175, (3), 253-273.

Stockholm Convention on POPs, 2009. [site en ligne], [consulté le 15/02/11]. <http://chm.pops.int/Convention/POPsRevieuwCommittee/Chemicalsunderreview/tabid/243/language/en-US/Default.aspx>

Sugihara, N.; James, M. O., Binding of 3-hydroxybenzo[a]pyrene to bovine hemoglobin and albumin. Journal of Biochemical and Molecular Toxicology 2003, 17, (4), 239-247.

Tanabe, S.; Nakagawa, Y.; Tatsukawa, R., Absorption efficiency and biological half-life of individual chlorobiphenyls in rats treated with Kanechlor products. Agricultural and Biological Chemistry 1981, 45, (3), 717-726.

Tang, X. Y.; Tang, L.; Zhu, Y. G.; Xing, B. S.; Duan, J.; Zheng, M. H., Assessment of the bioaccessibility of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils from Beijing using an in vitro test. Environmental Pollution 2006, 140, (2), 279-285.

Tao, S.; Lu, Y.; Zhang, D.; Yang, Y.; Yang, Y.; Lu, X.; Sai, D., Assessment of oral bioaccessibility of organochlorine pesticides in soil using an in vitro gastrointestinal model. Environmental Science and Technology 2009, 43, (12), 4524-4529.

Teorell, T., Kinetics of distribution of substances administered to the body. Archives Internationales de Pharmacodynamie, 1937, 57, 205-240.

Thapon, J.-L; Bourgeaois, C.-M., L'œuf et les ovoproduits. Paris, Lavoisier Tec&doc, Collection Sciences et techniques agro-alimentaires, juin 1994. 344p.

Thebault, A. Analyse des déterminants de la contamination en dioxines et furanes (PCB non compris) des oeufs issus d'élevages de volailles en plein-air de particuliers; AFSSA: 2005; p 17pp.

Thomson, A. B. R.; Schoeller, C.; Keelan, M.; Smith, L.; Clandinin, M. T., Lipid absorption: Passing through the unstirred layers, brush-border membrane, and beyond. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology 1993, 71, (8), 531-555.

Tlustos, C.; Pratt, I.; Moylan, R.; Neilan, R.; White, S.; Fernandes, A., Investigation into levels of dioxins, furans and PCBs in battery, free range, barn and organic eggs. Organohalogen compounds 2004, 66, 1901-1907.

Toutain, P. L., Pharmacokinetic/pharmacodynamic integration in drug development and dosage-regimen optimization for veterinary medicine. AAPS PharmSci 2002, 4, (4), 1-29.

Toutain, P. L., Bousquet-Mélou, A., Les modèles compartimentaux, Ecole Nationale Vétérinaire, Toulouse, 2007. 23p. [consulté le 12/04/11]. <http://physiologie.envt.fr/spip/IMG/pdf/modeles_compartimentaux.pdf>

Traag, W.A.; Portier, L.; Bovee, T.F.; van der Weg, G.; Onstenk, C.; Elghouch, N.; Coors, R.; Kraats, C.; Hoogenboom, R., 2002. Residues of dioxins and coplanar PCBs in eggs of free range chickens. Organohalogens Compounds 57, 245-248.

Traag, W.; Kan, K.; Zeilmaker, M.; Hoogerbrugge, R.; van Eijkeren, J.; Hoogenboom, R., Carry-over of dioxins and PCBs from feed and soil to eggs at low contamination levels - Influence of binders on the carry-over from feed to eggs, Report 2004.016, RIKILT, 2004. [consulté le 12/04/11]. http://www.rikilt.wur.nl/NR/rdonlyres/BDEEDD31-F58C-47EB-A0AA-3CB9956CE18/10719/R2004016.pdf>

Travel, A. J., C.; Guinvarch, J., Chabault, M., Lubac, S., Feidt, C., Marchand, P., Bonnard, R., Le Bouquin-Le Neveu, S., Allain, V., Thebault, A., Gonnier, V., Nys, Y., La filière fait le point sur le risque de transfert de Polluants Organiques Persistants vers les oeufs. Thema 2008, 6, 11-19.

Travel, A. ; Nys, Y.; Lopes, E., Facteurs physiologiques et environnementaux influençant la production et la qualité de l'œuf. INRA Productions Animales 2010, 23 (2), 155-166

Ueberschär, K. H.; Dänicke, S.; Matthes, S., Dose-response feeding study of short chain chlorinated paraffins (SCCPs) in laying hens: Effects on laying performance and tissue distribution, accumulation and elimination kinetics. Molecular Nutrition and Food Research 2007, 51, (2), 248-254.

US-EPA, Approaches for the application of Physiologically Based Pharmacokinetic (PBPK) models and Supporting data in risk assessment EPA/600/R-05/043F, 2006, 123p.

van den Brink, N.W.; van Franeker, J.A.; de Ruiter-Dijkman, E.M., Fluctuating concentrations of organochlorine pollutants during a breeding season in two antarctic seabirds: ade´ lie penguin and southern fulmar. Environmental Toxicology and Chemistry 1998, 17, (4), 702-709.

Van Den Berg, M.; De Jongh, J.; Poiger, H.; Olson, J. R., The toxicokinetics and metabolism of polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDDs) and dibenzofurans (PCDFs) and their relevance for toxicity. Critical Reviews in Toxicology 1994, 24, (1), 1-74.

Van Den Berg, M.; Birnbaum, L.; Bosveld, A. T. C.; Brunström, B.; Cook, P.; Feeley, M.; Giesy, J. P.; Hanberg, A.; Hasegawa, R.; Kennedy, S. W.; Kubiak, T.; Larsen, J. C.; Van Leeuwen, F. X. R.; Liem, A. K. D.; Nolt, C.; Peterson, R. E.; Poellinger, L.; Safe, S.; Schrenk, D.; Tillitt, D.; Tysklind, M.; Younes, M.; Wærn, F.; Zacharewski, T., Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife. Environmental Health Perspectives 1998, 106, (12), 775-792.

Van den Steen, E.; Covaci, A.; Jaspers, V. L. B.; Dauwe, T.; Voorspoels, S.; Eens, M.; Pinxten, R., Experimental evaluation of the usefulness of feathers as a non-destructive biomonitor for polychlorinated biphenyls (PCBs) using silastic implants as a novel method of exposure. Environment International 2007, 33, (2), 257-264.

Van De Wiele, T. R.; Verstraete, W.; Siciliano, S. D., Polycyclic aromatic hydrocarbon release from a soil matrix in the in vitro gastrointestinal tract. Journal of Environmental Quality 2004, 33, (4), 1343-1353.

Van Eijkeren, J. C. H.; Zeilmaker, M. J.; Kan, C. A.; Traag, W. A.; Hoogenboom, L. A. P., A toxicokinetic model for the carry-over of dioxins and PCBs from feed and soil to eggs. Food Additives and Contaminants 2006, 23, (5), 509-517.

Van Overmeire, I.; Waegeneers, N.; Sioen, I.; Bilau, M.; De Henauw, S.; Goeyens, L.; Pussemier, L.; Eppe, G., PCDD/Fs and dioxin-like PCBs in home-produced eggs from Belgium: Levels, contamination sources and health risks. Science of the Total Environment 2009, 407, (15), 4419-4429.

Van Schooten, F. J.; Moonen, E. J. C.; Van Der Wal, L.; Levels, P.; Kleinjans, J. C. S., Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and their metabolites in blood, feces, and urine of rats orally exposed to PAH contaminated soils. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 1997, 33, (3), 317-322.

Van Veld, P. A.; Vetter, R. D.; Lee, R. F.; Patton, J. S., Dietary fat inhibits the intestinal metabolism of the carcinogen benzo[a]pyrene in fish. Journal of Lipid Research 1987, 28, (7), 810-817.

Van Veld, P.A., Absorption and metabolism of dietary xenobiotics by intestine of fish. Critical Reviews in Aquatic Sciences 1990, 2, 185-203.

Viau, C.; Carrier, G., Kinetics of hemoglobin and albumin adducts in rabbits subchronically exposed to benzo[a]pyrene. Fundamental and Applied Toxicology 1995, 24, (1), 140-144.

Waegeneers, N.; De Steur, H.; De Temmerman, L.; Van Steenwinkel, S.; Gellynck, X.; Viaene, J., Transfer of soil contaminants to home-produced eggs and preventive measures to reduce contamination. Science of the Total Environment 2009, 407, (15), 4438-4446.

Walker, C. H., Pesticides and birds - mechanisms of selective toxicity. Agriculture, Ecosystems and Environment 1983, 9, (2), 211-226.

Walker, C. H., Avian forms of cytochrome P450. Comparative Biochemistry and Physiology - C Pharmacology Toxicology and Endocrinology 1998, 121, (1-3), 65-72.

Walzem, R. L., Lipoproteins and the laying hen: form follows function. Poultry and Avian Biology Reviews 1996, 7, (1), 31-64.

Warren, D.C.; Conrad, R.M., Growth of the hen's ovum. Journal of Agriculture and Research, 1939, 58, 875-893.

Watanabe, M. X.; Iwata, H.; Okamoto, M.; Kim, E. Y.; Yoneda, K.; Hashimoto, T.; Tanabe, S., Induction of cytochrome P450 1A5 mRNA, protein and enzymatic activities by dioxin-like compounds, and congener-specific metabolism and sequestration in the liver of wild jungle crow (Corvus macrorhynchos) from Tokyo, Japan. Toxicological Sciences 2005, 88, (2), 384-399

Williams, R.T., Detoxication mechanisms, 2nd Ed. London, Chapman & Hall, 1959, 288p.

Williams, T. D.; Challenger, W. O.; Christians, J. K.; Evanson, M.; Love, O.; Vezina, F., What causes the decrease in haematocrit during egg production? Functional Ecology 2004, 18, (3), 330-336.

Windal, I.; Hanot, V.; Marchi, J.; Huysmans, G.; Van Overmeire, I.; Waegeneers, N.; Goeyens, L., PCB and organochlorine pesticides in home-produced eggs in Belgium. Science of the Total Environment 2009, 407, (15), 4430-4437.

Wittsiepe, J.; Schrey, P.; Hack, A.; Selenka, F.; Wilhelm, M., Comparison of different digestive tract models for estimating bioaccessibility of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans (PCDD/F) from red slag 'Kieselrot'. International Journal of Hygiene and Environmental Health 2001, 203, (3), 263-273.

Wu, T.; Wu, Q.; Guan, S.; Su, H.; Cai, Z., Binding of the Environmental pollutant naphthol to bovine serum albumin. Biomacromolecules 2007, 8, (6), 1899-1906.

Zabik, M. E., Location of lindane, dieldrin, and DDT compounds in eggs. Journal of Agricultural and Food Chemistry 1971, 19, (5), 904-908.

Zakaria, A. H.; Miyaki, T.; Imai, K., The effect of aging on the ovarian follicular growth in laying hens. Poultry science 1983, 62, (4), 670-674.

Objectifs de thèse et démarche

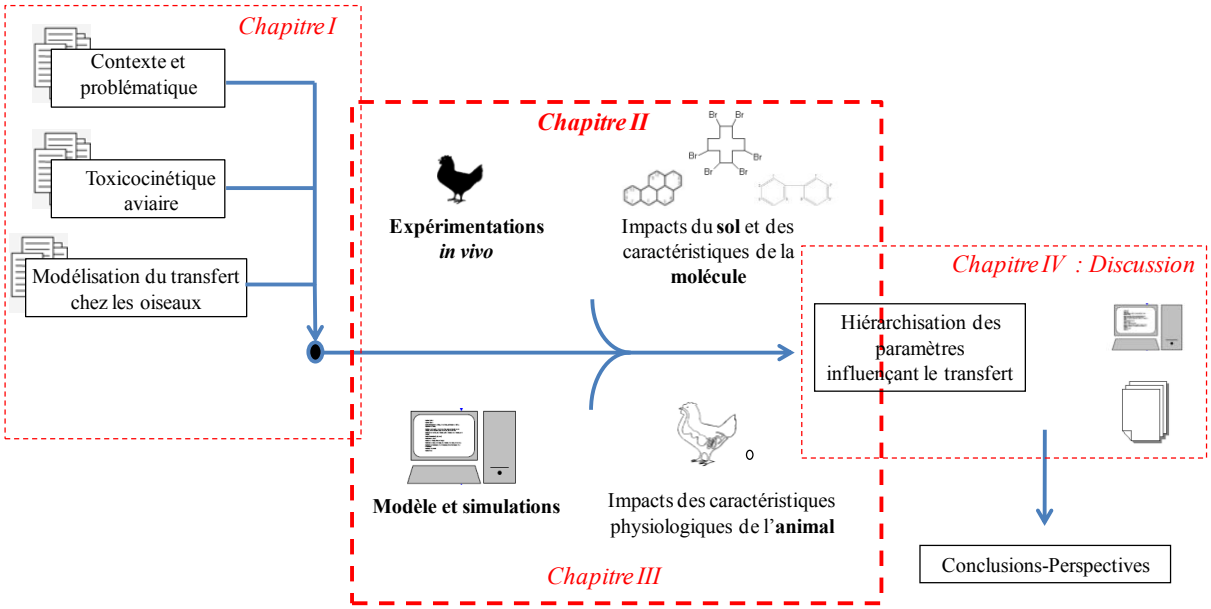
L'étude bibliographique précédente permet de conclure que le transfert de POP à l'échelle de la poule pondeuse dépend de multiples facteurs, en particulier liés à la matrice ingérée en ce qui concerne l'étape d'accessibilité de la molécule, mais aussi liés aux caractéristiques de la molécule et à la physiologie de l'animal. Cependant les informations disponibles ne permettent ni de quantifier tous ces effets et encore moins de les hiérarchiser.

Notre objectif est de contribuer à la progression des connaissances sur ces différents points afin de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu lors du transfert des polluants vers l'œuf et de mettre en lumière certains facteurs d'importance à privilégier lors d'une évaluation du risque. Pour cela deux approches ont été mises en œuvre : l'expérimentation *in vivo* et la modélisation mathématique.

Les expérimentations *in vivo* ont pour but d'apporter des réponses aux questions pour lesquelles l'absence d'information préexistante est avérée. Cela est le cas pour l'évaluation de l'impact du sol sur la biodisponibilité du POP ou du transfert de certaines molécules (notamment les molécules émergentes) dont le comportement chez la poule pondeuse reste inconnu.

La modélisation mathématique est quant à elle mise en œuvre pour explorer l'impact des caractéristiques physiologiques de la poule sur le transfert des POP. Les connaissances existantes au niveau de la physiologie ont été intégrées et reliées au transfert de POP à l'échelle de la poule pondeuse *via* l'élaboration d'un modèle dynamique.

Ensuite, une discussion générale intègre l'ensemble des résultats obtenus, ce qui permet de hiérarchiser les facteurs de risques et d'identifier les leviers à étudier plus précisément dans le cadre de la sécurité des systèmes d'élevage avicole. Par ailleurs, la confrontation du modèle à des cinétiques de transfert connues, pour des molécules au comportement varié, apporte des informations quant aux variations des paramètres impliqués dans les différentes étapes du transfert selon la nature de la molécule. Enfin, des applications du modèle à des situations concrètes mettent en évidence l'intérêt d'un tel modèle lors de la gestion de crise sanitaire. Pour finir, des perspectives sont proposées afin de poursuivre l'étude du transfert de POP à l'aide des différentes techniques d'investigation utilisées dans la thèse.


Chapitre I
Contexte et problématique
Toxicocinétique aviaire
Modélisation du transfert chez les oiseaux
Chapitre II
Expérimentations in vivo
Impacts du sol et des caractéristiques de la molécule
Modèle et simulations
Impacts des caractéristiques physiologiques de l'animal
Chapitre III
Chapitre IV : Discussion
Hiérarchisation des paramètres influençant le transfert
Conclusions-Perspectives

Chapitre II : Impacts des caractéristiques de la molécule sur différentes étapes du transfert à l'échelle de l'animal : Expérimentations *in vivo*

1. Introduction

Les familles de POP les plus étudiées au niveau du transfert vers l'œuf sont les PCB et les PCDD/F. Les PCB ont été choisis pour étudier une des étapes qui reste très peu renseignée chez la poule pondeuse : la biodisponibilité des contaminants du sol ingéré. Une première expérimentation a ainsi été mise en place afin d'étudier la biodisponibilité relative des PCB d'un sol naturellement contaminé suite à un incendie, en comparaison à des PCB ingérés *via* une matrice de référence : l'huile.

La synthèse bibliographique montre que le log K_{ow} est insuffisant pour expliquer l'accumulation de la molécule, un autre phénomène est à considérer : la métabolisation. Une deuxième expérimentation a donc été menée afin d'étudier un groupe de molécules assez bien métabolisées chez les autres espèces mais non étudiées jusqu'à présent chez la poule : les HAP. Cette étude nous a permis de mieux comprendre le transfert du POP à l'échelle de la grappe pour des molécules présentant des niveaux contrastés de susceptibilité à la métabolisation.

Enfin, très peu de données de la bibliographie concernent le transfert de molécules émergentes pourtant parfois retrouvées lors de plans de surveillance, comme cela a été le cas ces dernières années pour l'hexabromocyclododécane (HBCD) (DGAL, 2009). Une première approche du transfert de cette molécule a consisté en une expérimentation permettant d'établir des niveaux de concentration et les demi-vies de l'HBCD dans le gras abdominal, le foie et l'œuf, suite à une exposition chronique à de faibles doses par voie orale.

Chacune de ces expérimentations a donné lieu à la rédaction d'un article scientifique qui correspond à une des sous-parties de ce chapitre.

2. Biodisponibilité des PCB-I du sol

Cette partie est basée sur une publication intitulée *« Relative bioavailability to hens of indicator polychlorobiphenyls present in soil »*, soumis sans la revue Chemosphere. L'article présente un essai réalisé chez les poules pondeuses, ayant pour objectif de déterminer la biodisponibilité relative des PCB-I d'un sol contaminé suite à un incendie. Les tissus cibles étudiés sont le gras abdominal, le jaune d'œuf et le foie. Nous avons, de plus, comparé le profil des différents congénères de PCB-I dans ces différents tissus à la fin de l'exposition.

Relative bioavailability to laying hens of indicator polychlorobiphenyls present in soil

Agnès Fournier[a,b*], Cyril Feidt[a], Angélique Travel[b], Bruno Le Bizec[c], Philippe Marchand[c], Catherine Jondreville[a]

[a] Nancy Université, INRA, UR AFPA, 2 avenue de la Forêt de Haye B.P. 172 F-54505 Vandœuvre-lès-Nancy, France

[b] ITAVI, Unité de Recherches Avicoles, Centre de Tours, BP 1, F-37380 Nouzilly, France

[c] ONIRIS, LABERCA, Route de Gachet, 44307 NANTES Cedex 3, France

*Corresponding author. A. Fournier. E-mail: agnes.fournier@ensaia.inpl-nancy.fr

ABSTRACT

Transfer of indicator polychlorobiphenyls (I-PCBs) from soil into hen eggs may occur in hens reared outdoor, which ingest significant amounts of soil. This transfer depends on the bioavailability of the ingested compounds. The impact of soil on the bioavailability of I-PCBs was assessed by means by a relative bioavailability (RBA) trial, in which their deposition in egg yolk and in abdominal fat, in response to their ingestion through contaminated-soil and through spiked-oil were compared. A sandy soil was collected in the vicinity of a former fire involving treated wood and was analyzed to contain 709 ng I-PCBs.g^{-1} dry matter. Twenty-eight laying hens aged 25 weeks were individually housed and fed one of the seven experimental diets during 14 days (4 replicates per diet). The seven experimental diets were a control diet without contaminant, three diets in which contaminated soil was introduced at levels of 3, 6 and 9% and three diets in which spiked oil was introduced to achieve similar levels and profile of contaminants. Egg yolk, abdominal fat and liver were collected at the end of exposure. I-PCBs were extracted by ASE (Accelerated Solvent Extraction system) and analyzed by GC-HMRS. Within each ingested matrix, concentration of I-PCBs in egg yolk and in abdominal fat linearly increased with the amount of I-PCB ingested ($P < 0.001$). Except for PCB 28, the slopes of the responses to soil and to oil could not be differentiated ($P > 0.1$). RBA estimates did not differ from 1 for all I-PCBs except for PCB 28, for which it was 0.58-0.59. Measurements performed on liver confirm these conclusions.

Keywords: hen, PCBs, egg, liver, abdominal fat, soil, bioavailability

2.1. Introduction

Due to its large capacity for these compounds, soil is a major reservoir for persistent organic pollutants (POPs), especially chlorinated compounds such as dioxins, furans and polychlorinated biphenyls (PCBs). According to numerous authors, ingestion of soil by hens reared outdoor is the main cause of eggs contamination by these compounds (Schuler *et al.*, 1997; Windal *et al.*, 2009). Beside soil POPs concentration, two inputs are required for risk assessment in rearing conditions. The first one is the amount of ingested soil, which may vary between 2 and 30 g daily, according to several characteristics such as animal density, nutritional imbalance or outdoor run coverage by plants (Waegeneers *et al.*, 2009; Jondreville *et al.*, 2010). The second lies in the potential of soil to release POPs in the digestive tract. Indeed, soil characteristics such as organic carbon and clay concentrations, particle size and pH impact sorption and desorption processes of POPs after they are deposited (Reid *et al.*, 2000). These interactions between soil and POPs may modulate POPs availability to animals, and, in turn, their transfer to animal products. This impact of soil on POPs availability is usually assessed through relative bioavailability (RBA) studies, in which the response of POP ingestion through soil is compared to the response of animals achieved with POP ingestion through a reference matrix, often spiked oil. To date, available literature does not provide sound information on RBA of POPs present in soil, although it is an essential input for risk characterization. Especially, as demonstrated by Budinsky *et al.* (2008), RBA of POPs in soil strongly depends on the animal species, even within mammals. These authors reported RBA values of dioxins and furans present in two soils ranging from 0.37 to 0.66 and from 0.23 to 0.27 in rats and in pigs, respectively. In laying hens, RBA of dioxins, furans and dioxin-like-PCBs (DL-PCBs) from two soils were reported to range between 0.45 and 0.65, without any information on soils characteristics (Hoogenboom *et al.*, 2006; van Eijkeren *et al.*, 2006). This is to our knowledge, the only study conducted in chickens.

In August 2008, an accident involving treated wood fire happened in a rural area of France. This fire caused emission of smoke for several weeks. Analyses revealed that agricultural soils were contaminated with organic pollutants including polycyclic aromatic hydrocarbons, dioxins, furans and PCBs. Particularly, the concentration of indicator PCBs (I-PCBs) was abnormally high. I-PCBs form a group of seven congeners of six non dioxin-like PCBs (NDL-PCBs) and one DL-PCBs (PCB118). Maximum legal concentrations of NDL-PCBs in food are still not set at the European Union level, but the value of 50 $ng.g^{-1}$ fat for animal products is likely to be adopted. The aim of the current study was to contribute to risk

management in this area, where hens are reared outdoor. Therefore, an experiment, in which hens were orally given diets contaminated with graded levels of I-PCBs either from soil or from spiked oil, was carried out. PCBs being lipophilic coumpounds, their concentration in abdominal fat, in egg yolk and in liver were chosen as response criteria to estimate RBA.

2.2. Material and methods

2.2.1. Contaminated matrices and experimental diets

Surface soil (A horizon) was collected in the vicinity of the fire location, three months after the accident. It was stored for one year in containers hermetically sealed. After stones and plant fragments were manually eliminated, soil was air-dried during 20 days at 20°C in a dark room, then sieved to a 2 mm-fraction. Relative contribution of clay, silt and sand in soil were 6.3, 11.1 and 82.6%, respectively. It contained 1.2% organic matter (OM), 0.71% organic carbon and displayed a pH of 6.72.

In order to achieve the same profile of I-PCBs in spiked oil and in soil, the mixture of PCBs incorporated in oil was extracted from soil. Extraction was performed by ASE (Accelerated Solvent Extraction) using a mixture of toluene and acetone (70:30, v/v). Solvents were evaporated from extracts by drying at 40°C under vacuum. Extract diluted in toluene was analyzed for I-PCBs concentration. At this step, the extract was enriched in PCB 138 (Sigma Aldrich, Oekanal®, 35494, 99% purity), PCB 153 (Sigma Aldrich, Oekanal®, 35602, 99% purity) and PCB 180 (Sigma Aldrich, Oekanal®, 35495, 99% purity) in order to balance the PCB profile. This enriched extract was introduced in oil. Oil was spiked so that 5 g of oil delivered the same dose of I-PCBs than 90 g of soil. Spiked oil was heated at 40°C under vacuum to evaporate toluene before it was incorporated in diets.

Seven experimental diets were formulated by mixing soil or oil with a laying hen basal diet (Table 1). A control diet was formulated by introducing sand and uncontaminated oil in the basal diet at levels of 90 and 5 $g.kg^{-1}$, respectively. Three soil-diets were made by replacing 30, 60 or 90 g of sand by contaminated soil. Similarly, three oil-diets were formulated by replacing 1.7, 3.3 or 5.0 g of blank oil by spiked oil. Diets were presented as 2 mm-pellets.

2.2.2. Birds and management

The experiment was conducted under the guidelines of the French Ministry of Agriculture for Animal Research. Twenty-eight laying hens (Isa Brown, 24 weeks old and weighing

1.68±0.09 kg) were placed in individual cages. They were divided in four blocks of seven hens each on the basis of body weight (BW). The experiment was conducted in a 7-day adaptation period followed by a 14-day exposure period. The daily allowance of feed was adjusted to 6.2% BW and offered in two equal meals. During the adaptation period, control diet with 90 g of sand and 5 g blank oil was provided to hens in the morning, whereas the evening meal was made of the basal laying hen diet. During the exposure period, the control diet was replaced by one of the seven experimental diets.

During the entire experiment, water was continuously available, room temperature was maintained at 20°C and conditions of lighting were 16 hours light daily. The amount of ingested feed and the number and weight of eggs laid were individually recorded daily. At the end of the experiment each hen was weighed and slaughtered by electronarcosis followed by exsanguination. Abdominal fat and liver were collected, weighed and freeze dried before analysis. The eggs laid the day before and the day of slaughter were collected and weighed. Each egg was removed from shell and yolk and albumen were separated. The yolks from the two collected eggs were pooled and freeze dried before analysis.

Table II- 1 : Composition and contamination level of the experimental diets

	Control	Soil			Oil		
Level		1	2	3	1	2	3
Composition ($g.kg^{-1}$)							
Basal diet[1]	905	905	905	905	905	905	905
Sand	90	60	30		90	90	90
Contaminated soil[2]		30	60	90			
Blank oil	5.0	5.0	5.0	5.0	3.3	1.7	
Contaminated oil					1.7	3.3	5.0
Indicator PCBs ($ng.g^{-1}$)	0.586	21.1	35.4	48.5	16.5	32.2	42.0
Profile (%)							
PCB 28	9.6	3.1	2.9	2.9	3.4	3.1	3.0
PCB 52	10.6	3.5	3.9	3.7	3.3	3.4	3.7
PCB 101	16.2	10.6	11.2	10.0	8.0	8.2	8.1
PCB 118	5.9	7.8	7.9	8.1	6.9	7.1	6.9
PCB 138	16.5	22.9	22.8	22.9	21.0	20.7	20.9
PCB 153	27.4	29.8	28.8	29.7	27.3	28.0	27.9
PCB 180	13.8	22.2	22.5	22.6	30.1	29.5	29.5

[1] The basal diet was made of ($g.kg^{-1}$) : maize, 639.6; soybean meal, 160; alfalfa meal, 22.3; maize gluten meal, 55.0; rapeseed oil, 15.0; oyster shells, 50.0; calcium carbonate, 34.7; dicalcium phosphate, 12.8; sodium chloride, 4.0; DL-methionin, 0.10; L lysine HCl, 1.0; minerals and vitamins, 5.5

[2] Indicator PCBs concentration in soil was 709 $ng.g^{-1}$ DM of which (%): PCB 28, 3.6; PCB 52, 3.5; PCB 101, 9.5; PCB 118, 6.7; PCB 138, 21.8; PCB 153, 30.1; PCB 180, 24.9

2.2.3. Indicator PCBs analysis

I-PCBs were analyzed in each experimental diet and in the 28 pooled egg yolk and abdominal fat samples. They were analyzed in 16 samples of liver collected from hens on the three diets containing spiked oil and from hens on the diet containing 90 g soil.kg^{-1}.

Before extraction, seven ^{13}C-labelled PCBs were added in samples as internal standards. PCBs were then extracted using an Accelerated Solvent Extraction system (ASE). The extraction solvent was a mixture of toluene/acetone 70:30 (v/v). Resulting extracts were evaporated to dryness, permitting the gravimetric determination of the fat content. Finally, a three-step purification was performed, using successively a multilayer silica gel column, Florisil, and Celite/carbon columns. The external standard $^{13}C_{12}$-PCB 111 was added for the recovery calculation. The GC/HRMS detection was performed on a Hewlett-Packard 6890 gas chromatograph, equipped with a DB-5MS column (30 m x 0.25 mm, 0.25 µm film thickness), coupled to a Jeol JMS-800D high-resolution mass spectrometer. The mass filter operated at a resolution of 10000 in the selected ion-monitoring (SIM) mode using Electronic Impact as ionisation technique.

Limits of detection were 0.001 ng.g^{-1} in feed and 0.01, 0.04 and 0.01 ng.g^{-1} fat in abdominal fat, egg yolk and liver, respectively.

2.2.4. Calculations and statistical analysis

The amount of I-PCBs ingested by each hen during the exposure period was calculated from the measured I-PCBs concentration in experimental diet and the amount of feed ingested. The amount of I-PCBs originating from contaminated soil or from spiked oil ingested was calculated as the difference between the amount of I-PCBs ingested and the amount of I-PCBs ingested by the hen on the control diet in the same block.

All the data were analyzed using the GLM procedure of SAS statistical software with a model appropriate for a randomized complete block design and using the hen as the experimental unit. The models included the block. Weights of egg yolk (mean value of the two collected yolks) and of abdominal fat were introduced as covariate in the models relative to PCBs concentration in egg yolk and in abdominal fat, respectively. The differences were considered significant when $P < 0.05$ and trends were noticed for $P < 0.10$.

Bioavailability of I-PCBs present in soil relative to I-PCBs present in oil was estimated from I-PCBs concentration in egg yolk and in abdominal fat by means of the slope ratio method. The method described by Littell *et al.* (1997), which involves a one-way analysis of covariance was followed. First, three assumptions were sequentially tested for validity of the

model: the response of I-PCBs concentration in target tissues to ingested I-PCBs is linear for each matrix (oil and soil), the intercepts for the two lines are equal (common intercept) and the response to the zero level (control diet) is equal to the common intercept value. After these assumptions were checked, the regression of I-PCBs concentration in egg yolk and in abdominal fat to the amount of I-PCBs ingested was fitted for each of the two matrices. Relative bioavailability of I-PCBs present in soil was calculated from abdominal fat and egg yolk data, as the ratio of the slope of the response fitted with soil to the slope of the response fitted with oil.

Because all liver samples were not analyzed, this method could not be followed to estimate RBA. Therefore, linearity of the response of liver I-PCBs to I-PCBs ingested from oil was firstly checked by means of an analysis of covariance. Secondly, RBA of each I-PCB was calculated as follows (Wendling *et al.*, 1989):

RBA = (Ls/Is)*(Io/Lo), where Ls and Lo are PCB concentrations in liver of hens given the highest doses of PCB from soil and from oil, respectively ($ng.g^{-1}$ fat) and Is and Io are the amount of ingested PCB by hens given the highest doses of PCB from soil and from oil, respectively ($ng.d^{-1}$).

2.3. Results and discussion

I-PCBs concentration in soil was 709 $ng.g^{-1}$ dry matter (DM) and, accounting for 1.2% OM, 59 $\mu g.g^{-1}$ OM. This level of contamination largely exceeds the soil background concentration of 0.03 to 97 $ng.g^{-1}$ DM or 0.33 to 335 $ng.g^{-1}$ OM recorded by Meijer *et al.* (2003) from 191 samples of soil collected worldwide from remote areas. I-PCBs profile was clearly dominated by most chlorinated and lipophilic congeners (PCB 153, 30%, PCB 180, 25% and PCB 138, 22%). This profile was expected because soil was collected in the vicinity of the site where treated wood had been burnt. Indeed, more volatile compounds are preferentially transported whereas less volatile compounds remain closer to the source of emission (Wilcke *et al.*, 2006). The control diet contained 0.6 ng I-PCBs.g^{-1}, which corresponds to a normal background level in animal feed (De Vos *et al.*, 2005). Analytical concentrations of I-PCBs in contaminated feed were close to target concentrations. They ranged between 21.1 and 48.5 $ng.g^{-1}$ in soil-diets and between 16.5 and 42.0 $ng.g^{-1}$ in oil-diets. Thus, soil-diets were by 1.1 to 1.3 more concentrated in I-PCBs than oil-diets. As expected, the profile of I-PCBs in diets was very similar to the one in soil (Table 1).

Hens ingested daily 107±7.6 g feed of which 54.2±3.14 and 52.8±5.54 g of contaminated and uncontaminated feed, respectively. Thus, daily ingestion of I-PCBs originating from soil or

from oil ranged between 1.07 and 2.62 µg and between 0.865 and 2.30 µg, respectively. Initial and final body weights, number and weight of laid eggs during the exposure period (1680±87.8 g, 1673±95.4 g, 13.7±0.27 g and 58.2±1.8 g, respectively) were independent of the contamination level of feed. Similarly, abdominal fat and egg yolk collected at slaughter weighed 43.0±10.4 g and 14.8±0.55 g, respectively, irrespective of the level of feed contamination (results not shown).

The absence of any effect of contaminated feed on hen performance is in accordance with previous results. Traag *et al.* (2006) did not record any reduction of performance in hens ingesting during 7 days 350 µg I-PCB daily, i.e a daily dose around 100 times higher than in the current study. Similarly, hens submitted to diets containing 32 ng PCB.g^{-1} during 56 days, i.e four times longer than in the current study, performed normally (Hoogenboom *et al.*, 2006).

Responses of I-PCBs concentrations in abdominal fat, egg yolk and liver to ingested I-PCBs are presented in figures 1 and 2. Parameters of the fitted models are presented in tables 2 and 3. Models relative to abdominal fat and to egg yolk were fitted with coefficients of determination ranging between 0.91 and 0.98 (Table 2). The three hypotheses necessary for a relevant comparison of slopes were checked: the response to ingested I-PCBs from each of the two matrices was not quadratic ($P > 0.10$), the intercepts adjusted for the two lines were equal ($P > 0.10$) and did not differ from the response obtained with the control diet ($P > 0.10$). In most cases, the covariates abdominal fat and egg yolk weight were introduced in the models ($P < 0.05$). The adjusted parameters for the latter variables were negative, in accordance with the expected dilution of I-PCBs when the weight of the target tissue increases. Models of the response of liver I-PCBs concentration to ingested I-PCBs were fitted for oil only. Coefficients of determination were between 0.77 and 0.93. As for abdominal fat and egg yolk, the quadratic component was not significant ($P > 0.10$).

In the absence of any significant quadratic component in the models, the response to graded levels of ingested I-PCBs from oil or from soil was proved to be linear. Similarly, I-PCBs concentration in egg yolk laid by hens given diets containing 0.2 to 32 ng I-PCBs.g^{-1} during 10, 28 or 56 days was proportional to ingested I-PCBs (Hoogenboom *et al.*, 2006). This linearity suggests that not only the absorption rate was independent of the dose ingested but also that the elimination rate was the same whatever the dose absorbed. As pointed out by Budinsky *et al.* (2008), this latter condition must be fulfilled in order to avoid any bias in RBA calculation, due to induction of hepatic metabolism for example.

Table II- 2 : Parameters of the linear response of indicator PCBs concentration in egg yolk and in abdominal fat (ng.g^{-1} fat) to the amount of ingested indicator PCBs (µg.d^{-1}) originating from contaminated soil or from contaminated oil[6]

	Intercept		Weight (g)[1]		Ingested PCBs (µg/d)				Ingested PCB x matrix[5]	rsd[2]	R^2	RBA[4]
					Soil		Oil					
	Parameter	*P-value*[3]	Parameter	*P-value*	Parameter	*P-value*	Parameter	*P-value*	*P-value*			
Egg yolk												
PCB 28	6.46	<0.001	-0.440	<0.001	51.6	<0.001	88.5	<0.001	<0.001	0.311	0.98	0.58
PCB 52	0.165	<0.01		NS	14.0	<0.001	14.5	<0.001	NS	0.155	0.91	0.97
PCB 101		NS		NS	14.5	<0.001	14.4	<0.001	NS	0.320	0.95	1.01
PCB 118	14.2	<0.01	-0.985	<0.01	65.0	<0.001	71.3	<0.001	0.047	0.862	0.97	0.91
PCB 138	25.9	0.035	-1.85	0.04	69.6	<0.001	67.7	<0.001	NS	3.16	0.96	1.03
PCB 153	68.1	<0.01	-4.74	<0.001	74.9	<0.001	82.0	<0.001	0.072	4.35	0.96	0.91
PCB 180	65.8	<0.01	-4.69	<0.001	114	<0.001	102	<0.001	<0.01	4.34	0.97	1.11
Indicator PCBs	178	<0.01	-12.5	<0.001	72.6	<0.001	76.7	<0.001	NS	11.3	0.98	0.95
Abdominal fat												
PCB 28	0.942	0.045	-0.0198	0.048	71.5	<0.001	121	<0.001	<0.001	0.632	0.95	0.59
PCB 52	0.179	<0.01		NS	15.9	<0.001	16.7	<0.001	NS	0.157	0.93	0.95
PCB 101	0.799	<0.01	-0.0155	<0.01	14.3	<0.001	14.2	<0.001	NS	0.271	0.96	1.01
PCB 118	2.73	0.012	-0.0601	<0.001	55.6	<0.001	59.1	<0.001	NS	0.928	0.95	0.94
PCB 138	6.27	<0.01	-0.126	<0.001	38.8	<0.001	36.5	<0.001	NS	1.79	0.95	1.06
PCB 153	9.23	<0.01	-0.175	<0.001	37.9	<0.001	42.1	<0.001	0.082	2.65	0.94	0.90
PCB 180	5.83	<0.001	-0.103	<0.001	28.2	<0.001	24.7	<0.001	0.058	1.85	0.92	1.14
Indicator PCBs	26.3	<0.01	-0.526	<0.001	35.2	<0.001	36.2	<0.001	NS	7.22	0.95	0.97

[1] Mean weight of the two pooled egg yolks (collected at days 13 and 14) and weight of abdominal fat (g)
[2] rsd, residual standard deviation
[3] NS, not significant (P > 0.1)
[4] RBA, relative bioavailability of PCBs present in soil, calculated as the ratio of the slope of the response fitted with soil to the slope of the response fitted with oil
[5] If P-value < 0.05, the two slopes are significantly different and RBA significantly differs from 1.
[6] The equation is: PCB concentration in egg yolk or in abdominal fat (ng.g^{-1} fat) = a + b weight + c * ingested PCBs from soil + d * ingested PCBs from oil, where a is the intercept, and b, c and d are the estimates of the parameters attributed to the weight of egg yolk or of abdominal fat (g) and to the amount of PCBs ingested from soil and from oil, respectively (µg^{-1} d)

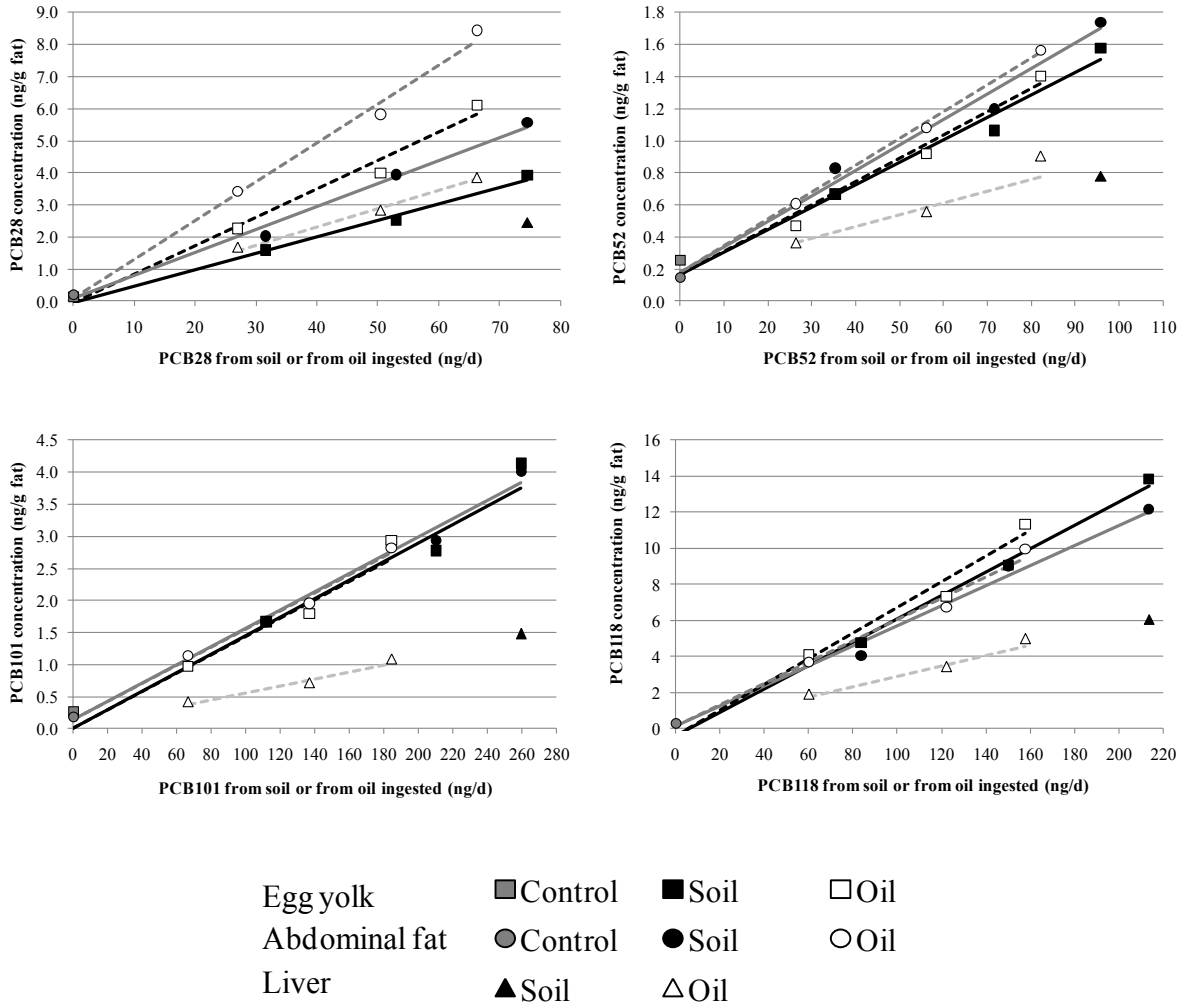
Table II- 3 : Parameters of the linear response of indicator PCBs concentration in liver (ng.g^{-1} fat) to the amount of ingested indicator PCBs (µg.d^{-1}) originating from contaminated oil

	Ingested PCB (µg.d^{-1})		rsd[1]	R^2	RBA[2]
	Parameter	*P-value*			
PCB 28	51.4	<0.001	0.295	0.91	0.57
PCB 52	9.40	<0.001	0.117	0.77	0.74
PCB 101	5.46	<0.001	0.118	0.84	0.96
PCB 118	28.8	<0.001	0.372	0.92	0.90
PCB 138	28.1	<0.001	1.02	0.93	0.93
PCB 153	33.9	<0.001	2.40	0.87	0.73
PCB 180	34.3	<0.001	1.97	0.91	1.12
Indicator PCBs	29.7	<0.001	5.01	0.93	0.86

[1] rsd, residual standard deviation
[2] Calculated as (Ls/Is)*(Io/Lo), where Ls and Lo are PCB concentrations in liver of hens given the highest doses of PCB from soil and from oil, respectively (ng.g^{-1} fat) and Is and Io are the amount of ingested PCB by hens given the highest doses of PCB from soil and from oil, respectively (ng.d^{-1})

For PCBs 52, 101, 138 and the sum of I-PCBs, the slopes of the two fitted lines could not be differentiated (ingested PCB x matrix, P > 0.10). This indicates that RBA of these congeners did not differ from 1. In other words, soil did not modulate their bioavailability compared to oil. Estimates of RBA derived from egg yolk and from abdominal fat responses were slightly lower than 1 for PCB 118 (0.91, P < 0.05 and 0.94, P > 0.1, respectively) and for PCB 153 (0.91 and 0.90, P < 0.10, respectively). However, only the value obtained for PCB 118 in egg yolk significantly (P < 0.05) differed from 1. PCB 180 was found to be slightly more available in soil than in oil. However, the difference between soil and oil was significant with egg yolk (RBA = 1.11, P < 0.01) but not with abdominal fat (RBA = 1.14, P < 0.1). As pointed out by Fries *et al.* (1989), such small variations of bioavailability are not great enough to warrant consideration when assessing risk associated with environmental contamination. The only compound for which soil clearly reduced bioavailability compared to oil (P < 0.001) was PCB 28, with estimates of RBA of 0.58 and of 0.59 with egg yolk and with abdominal fat, respectively. RBA estimates from liver data rely on two treatment points only. Therefore, they may be less reliable than the previous ones. Particularly, their statistical significance cannot be properly tested. Nevertheless, they comply with estimates presented above, with the only variation of great magnitude being obtained with PCB 28.

Figure II- 1 : Response of PCBs 28, 52, 101 and 118 concentration in egg yolk[1], in abdominal fat[2] and in liver[3] ($ng.g^{-1}$ fat) to the amount ingested originating from contaminated soil or from contaminated oil ($ng.d^{-1}$)

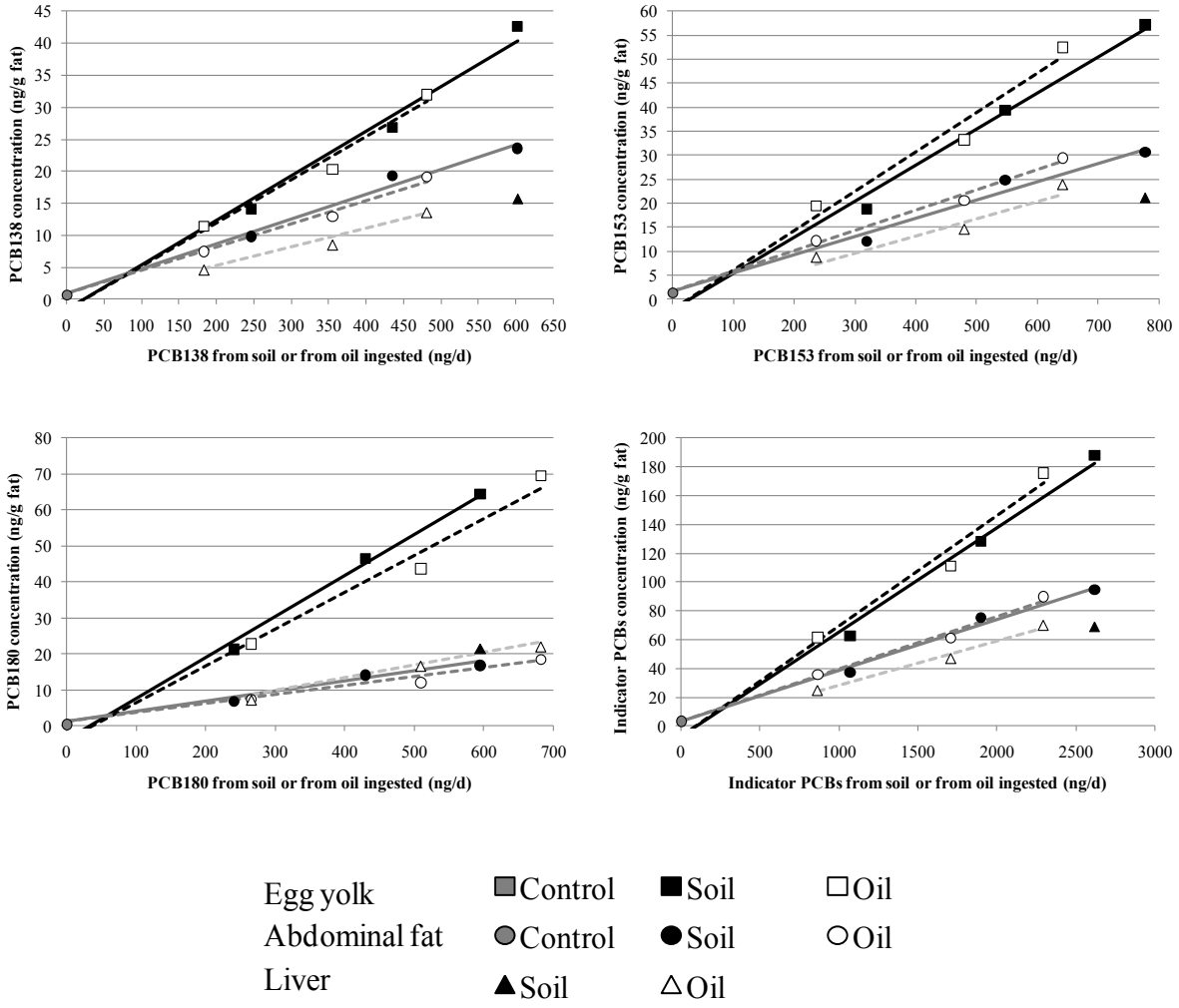


[1]Values are adjusted means (n=4) for an egg yolk weighing 14 g
[2] Values are adjusted means (n=4) for an abdominal fat weighing 43 g
[3] Values are means (n=4)
Linear models are calculated from parameters presented in table 2 for egg yolk (in black) and for abdominal fat (in dark grey) and in table 3 for liver (in light grey). Continuous and dashed lines correspond to the responses to ingestion of PCBs from soil and from oil, respectively

To our knowledge, the only study dealing with relative bioavailability of POPs present in soil conducted with hens was published by Van Eijkeren *et al.* (2006) based on the experimental data reported Hoogenboom *et al.* (2006). In contrast to our results, these authors reported that RBA of DL-PCBs and PCDD/Fs present in two soils was around 45 to 65%. However, no information about the characteristics of the assayed soils and the origin of the contamination was provided. The overall high RBA of I-PCBs observed in the current study may be due to the high sand content of the assayed soil. Indeed, the compounds likely to interact with chlorinated compounds and to limit their availability are clay and organic carbon (Reid *et al.*,

2000). However, even this assertion is questionable. Indeed, in rats given five soils differing for their organic carbon and clay contents (0.52 to 2.9 % and 8 to 38%, respectively) and spiked with PCB 52 and PCB 101, Pu *et al.* (2006) did not observe any reduction in availability compared to oil.

Figure II- 2 : Response PCBs 138, 153, 180 and indicator PCBs concentration in egg yolk[1], in abdominal fat[2] and in liver[3] ($ng.g^{-1}$ fat) to the amount ingested originating from contaminated soil or from contaminated oil ($ng.d^{-1}$)



[1]Values are adjusted means (n=4) for an egg yolk weighing 14 g
[2] Values are adjusted means (n=4) for an abdominal fat weighing 43 g
[3] Values are means (n=4)
Linear models are calculated from parameters presented in table 2 for egg yolk (in black) and for abdominal fat (in dark grey) and in table 3 for liver (in light grey)
Continuous and dashed lines correspond to the responses to ingestion of PCBs from soil and from oil, respectively

Alternatively, the absence of effect of soil on most I-PCBs availability may be inherent to the methodology implemented in the current study, in which soil was mixed with feed. This method was selected because animals, in practical rearing conditions, ingest soil and feed

together and are not starved when ingesting soil. First, it is possible that feed manufacturing, which involved mechanical mixing of soil with the relatively lipid-rich feed, and subsequent storage time before administration to hens resulted in some mobilization of the soil bound I-PCBs into the feed lipids. However, digestibility of I-PCBs in diets fed to laying hens was not altered by fat contents ranging from 15 to 45 $g.kg^{-1}$ (De Vos *et al.*, 2005). Secondly, *in vitro* (Hack and Selenka, 1996; Oomen *et al.*, 2000) and *in vivo* (Fries *et al.*, 1989), bioavailability of organic components was shown to be enhanced in the presence of alimentary proteins and fat. This is thought to be caused by mixed micelles, which are formed by components of the bile and by-products of lipids digestion such as fatty acids and monoglycerides. Mixed micelles readily solubilize organic contaminants in an aqueous environment and may facilitate their passage through the unstirred water layer next to the intestinal membrane.

The slopes of the responses of the concentration of I-PCB congeners in target tissues differed between congeners within one tissue. In addition, they differed between tissues within one congener. These differences cannot be attributed to selective absorption of different congeners, which were shown to be all readily absorbed in chickens (e.g. De Vos *et al.*, 2003, 2005; Maervoet *et al.*, 2004). They most likely result of the structure-activity relationship of I-PCBs in birds (Drouillard and Norstrom, 2003), which pilots the distribution of ingested congeners to tissues and its modulation with time. First, PCBs 52 and 101 displayed the smallest slopes in all tissues, in accordance with their known high elimination rate in birds (e.g. Maervoet *et al.*, 2004; Traag *et al.*, 2006) attributed to the vicinal hydrogen atoms in meta/para position. In birds, the elimination rate of the other congeners decreases as the degree of chlorination increases. At the end of the current experiment, the most chlorinated congeners were less concentrated in abdominal fat than in egg yolk. The ratios of the slopes of the responses of I-PCBs in abdominal fat and in egg yolk were 1.4, 0.84, 0.55, 0.51 and 0.24 for PCB 28, PCB 118, PCB 138, PCB 153 and PCB 180, respectively. This can be ascribed to the short duration of the current experiment. Indeed, tissue distribution of I-PCBs was reported to be time-related (De Vos *et al.*, 2005; Traag *et al.*, 2006): I-PCBs accumulate first preferentially in well perfused tissues and more persistent congeners can be distributed to the less perfused tissues thereafter (Maervoet *et al.*, 2004).

Probably, if hens had been exposed to experimental diets for a longer time, the level of I-PCBs in tissues would have been higher and the profile would have been more similar between tissues. Therefore, the current study does not allow predicting the expected contamination of eggs in hens raised on such a soil. Nevertheless, it demonstrates that, as

soon as 14 days after the exposure started, hens given the less soil-contaminated diet laid eggs containing 60 ng I-PCBs.g^{-1} fat, exceeding the expected regulatory level of 50 ng NDL-PCBs.g^{-1} fat. This diet corresponds to a level of incorporation of soil of 3% and a daily ingestion of soil of 1.6 g. This amount of soil ingested can be considered very low compared to hens reared outdoor, in which it is estimated to range between 2 and 30 g daily (Waegeneers *et al.*, 2009; Jondreville *et al.*, 2010). Thus, rearing hens on such a soil would probably result in inedible eggs.

2.4. Conclusion

Soil assayed in the current study did not significantly modulate I-PCBs availability in hens. Hens reared outdoor being likely to ingest soil, it must therefore be considered as a potential contributor to risk of contamination of animal products, especially eggs, by these compounds. However, the current study, in common with many other studies, involved only one soil and one source of contamination. Further investigations are required to determine the potential importance of these characteristics, especially soil properties, on the impact of soil on availability of I-PCBs, and more generally of POPs.

2.5. Acknowledgements

The authors are grateful to the French Ministry for Agriculture and Fisheries in the frame of the Compte d'Affectation Spéciale Développement Agricole et Rural (CASDAR project n°7106) and to the French Environment and Energy Management Agency for financial support. They thank S. Denys and K. Tack (INERIS) for contaminated soil provision, N. Besnes and M. Gibelin (INRA, PEAT) for experimental feed manufacturing and P. Hartmeyer (INRA, URAFPA) for care to the hens.

2.6. References

Budinsky, R.A., Rowlands, J.C., Casteel, S., Fent, G., Cushing, C.A., Newsted, J., Giesy, J.P., Ruby, M.V., Aylward, L.L., 2008. A pilot study of oral bioavailability of dioxins and furans from contaminated soils: Impact of differential hepatic enzyme activity and species differences. Chemosphere 70, 1774-1786.

De Vos, S., Maervoet, J., Schepens, P., De Schrijver, R., 2003. Polychlorinated biphenyls in broiler diets: Their digestibility and incorporation in body tissues. Chemosphere 51, 7-11.

De Vos, S., Verschueren, D., De Schrijver, R., 2005. Digestibility, retention and incorporation of low-level dietary PCB contents in laying hens. Chemosphere 58, 1553-1562.

Drouillard, K.G., Norstrom, R.J., 2003. The influence of diet properties and feeding rates on PCB toxicokinetics in the ring dove. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 44, 97-106.

Fries, G.F., Marrow, G.S., Somich, C.J., 1989. Oral bioavailability of aged polychlorinated biphenyl residues contained in soil. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 43, 683-690.

Hack, A., Selenka, F., 1996. Mobilization of PAH and PCB from contaminated soil using a digestive tract model. Toxicology Letters 88, 199-210.

Hoogenboom, L.A.P., Kan, C.A., Zeilmaker, M.J., Van Eijkeren, J., Traag, W.A., 2006. Carry-over of dioxins and PCBs from feed and soil to eggs at low contamination levels - Influence of mycotoxin binders on the carry-over from feed to eggs. Food Additives and Contaminants 23, 518-527.

Jondreville, C., Travel, A., Besnard, J., Dziurla, M.-A., Feidt, C., 2010. Intake of herbage and soil by free-range laying hens offered a complete diet compared to a whole-wheat diet. XIIIth European Poultry Conference, M. Duclos and Y. Nys, Eds, Tours, 23-27 August 2010, France World's Poultry Science Journal, 66 Supp, 4 pp.

Littell, R.C., Henry, P.R., Lewis, A.J., Ammerman, C.B., 1997. Estimation of Relative Bioavailability of Nutrients Using SAS Procedures. Journal of Animal Science 75, 2672-2683.

Maervoet, J., Chu, S.G., De Vos, S., Covaci, A., Voorspoels, S., De Schrijver, R., Schepens, P., 2004. Accumulation and tissue distribution of selected polychlorinated biphenyl congeners in chickens. Chemosphere 57, 61-66.

Meijer, S.N., Ockenden, W.A., Sweetman, A., Breivik, K., Grimalt, J.O., Jones, K.C., 2003. Global distribution and budget of PCBs and HCB in background surface soils: Implications for sources and environmental processes. Environmental Science and Technology 37, 667-672.

Oomen, A.G., Sips, A.J.A.M., Groten, J.P., Sijm, D.T.H.M., Tolls, J., 2000. Mobilization of PCBs and lindane from soil during in vitro digestion and their distribution among bile salt micelles and proteins of human digestive fluid and the soil. Environmental Science and Technology 34, 297-303.

Pu, X., Lee, L.S., Galinsky, R.E., Carlson, G.P., 2006. Bioavailability of 2,3′,4,4′,5-pentachlorobiphenyl (PCB118) and 2,2′,5,5′-tetrachlorobiphenyl (PCB52) from soils using a rat model and a physiologically based extraction test. Toxicology 217, 14-21.

Reid, B.J., Jones, K.C., Semple, K.T., 2000. Bioavailability of persistent organic pollutants in soils and sediments--a perspective on mechanisms, consequences and assessment. Environmental Pollution 108, 103-112.

Schuler, F., Schmid, P., Schlatter, C., 1997. The transfer of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans from soil into eggs of foraging chicken. Chemosphere 34, 711-718.

Traag, W.A., Kan, C.A., van der Weg, G., Onstenk, C., Hoogenboom, L.A.P., 2006. Residues of dioxins (PCDD/Fs) and PCBs in eggs, fat and livers of laying hens following consumption of contaminated feed. Chemosphere 65, 1518-1525.

Van Eijkeren, J.C.H., Zeilmaker, M.J., Kan, C.A., Traag, W.A., Hoogenboom, L.A.P., 2006. A toxicokinetic model for the carry-over of dioxins and PCBs from feed and soil to eggs. Food Additives and Contaminants 23, 509-517.

Waegeneers, N., De Steur, H., De Temmerman, L., Van Steenwinkel, S., Gellynck, X., Viaene, J., 2009. Transfer of soil contaminants to home-produced eggs and preventive measures to reduce contamination. Science of the Total Environment 407, 4438-4446.

Wendling, J., Hileman, F., Orth, R., Umbreit, T., Hesse, E., Gallo, M., 1989. An analytical assessment of the bioavailability of dioxin contaminated soils to animals. Chemosphere 18, 925-932.

Wilcke, W., Krauss, M., Safronov, G., Fokin, A.D., Kaupenjohann, M., 2006. Polychlorinated biphenyls (PCBs) in soils of the Moscow region: Concentrations and small-scale distribution along an urban-rural transect. Environmental Pollution 141, 327-335.

Windal, I., Hanot, V., Marchi, J., Huysmans, G., Van Overmeire, I., Waegeneers, N., Goeyens, L., 2009. PCB and organochlorine pesticides in home-produced eggs in Belgium. Science of the Total Environment 407, 4430-4437.

3. Dépôt dans l'œuf de molécules ayant des degrés de métabolisation différents

L'étude du transfert de molécules ayant différents niveaux de propension à la métabolisation s'appuie sur un article publié dans la revue Chemosphere en janvier 2010, intitulé : *« Transfer kinetics to egg yolk and modeling residue recovered in yolk of readily metabolized molecules: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons orally administered to laying hens ».* Cet article présente la cinétique d'incorporation dans le jaune de deux familles de molécules au comportement varié : les HAP et le lindane. Le but est d'observer l'impact du métabolisme sur la cinétique de dépôt de polluants dans le jaune d'œuf.

Chemosphere 78 (2010) 1004–1010

Contents lists available at ScienceDirect

Chemosphere

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chemosphere

Transfer kinetics to egg yolk and modeling residue recovered in yolk of readily metabolized molecules: Polycyclic aromatic hydrocarbons orally administered to laying hens

Agnès Fournier [a,b,*], Cyril Feidt [a], Marie-Antoinette Dziurla [b], Christine Grandclaudon [a], Catherine Jondreville [a]

[a] Nancy Université, INRA, UR AFPA, 2 avenue de la Forêt de Haye B.P. 172, F-54505 Vandœuvre-lès-Nancy, France
[b] ITAVI, UMT Bird, INRA, UR83 Recherches Avicoles, BP 1, F-37380 Nouzilly, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 4 September 2009
Received in revised form 2 December 2009
Accepted 4 December 2009
Available online 8 January 2010

Keywords:
Hen
Pollutants
POP
Yolk deposition
Hydroxylated metabolites
Model

ABSTRACT

The kinetic of transfer into egg yolk of Persistent Organic Pollutants with contrasting properties regarding biotransformation and bioaccumulation was investigated. Twenty-four Hy line hens, aged 26 weeks, were orally administered, during 1 or 3 consecutive days, 6 mg of a mixture of three PAHs (phenanthrene, pyrene, benzo[a]pyrene) in equal amounts (w:w) or 3 mg of lindane per kg body weight daily. Each day, contaminants were administered 1 h after oviposition in one gelatin capsule. Eggs were collected daily during the 12 d following the first dosing. Concentrations of PAHs and their main hydroxylated metabolites in yolk were determined using HPLC coupled with fluorimetric detection, while lindane was analysed by GC–ED. At the end of the experiment, hens were sacrified and preovulatory yolks were collected and weighed.

All three PAHs were recovered in yolks, mainly as metabolites, indicating an active biotransformation of these compounds in hens. Within 10 d, PAHs and metabolites concentrations in yolks were back to initial values. However, the recovery rate of these compounds to yolk calculated over the 12-d experiment, was very low, reaching 0.089%, 0.034% and 0.006% for Phe, Pyr and B[a]P, respectively. Daily deposition of yolk and of PAHs and metabolites were found to be directly proportional, indicating that no significant body storage of these PAHs occurred and that they were rapidly hydroxylated after ingestion. In contrast, lindane and yolk deposition could not be related. Storage of lindane in body fat explains its slower elimination via eggs.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Ingestion of food contaminated with persistent organic pollutants (POPs) is considered to be one of the main ways of human exposure to these compounds (Lioy et al., 1988). In this respect, securing quality of hen eggs, which are one of the main sources of protein in human food all around the world, is an issue for human food safety.

POPs are lipophilic compounds that, among other properties, accumulate in the environment and bioaccumulate in the food chain (UNECE, Aarhus Protocol, 1998). Evidence of substantial transfer of some of them into hen eggs, especially into yolk, their lipidic fraction, was reported for some pesticides, polychlorobiphenyls (PCBs), polychlorodibenzo-p-dioxins (PCDDs) and polychlorodibenzofurans (PCDFs) (Zabik and Dugan, 1971; Kan and Meijer, 2007). Such phenomenon may particularly occur in hens reared outdoor, which ingest significant amounts of plant material and soil (Horsted and Hermansen, 2007). Accounting for the increasing demand of eggs from alternative systems by consumers, information regarding the transfer of these ubiquitous compounds into eggs is required.

The transfer of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) into hen eggs has not yet been characterized (Kan and Meijer, 2007), although, belonging to the group of POPs, they display a significant persistence in soils (Laurent et al., 2005). PAHs are known to be rapidly metabolized in mammals, as well as in birds (Albers, 2006; Troisi et al., 2006). They are converted into monohydroxylated PAHs during their transfer across epithelial barrier and in liver. PAHs may subsequently be conjugated with glucuronides, sulfates and glutathion, before being excreted via urine and bile. However, their presence in eggs of seabirds (Lebedev et al., 1998; Shore et al., 1999) suggests that they may also be transferred to hen eggs from the environment.

* Corresponding author. Address: Nancy Université, INRA, UR AFPA, 2 avenue de la Forêt de Haye B.P. 172, F-54505 Vandœuvre-lès-Nancy, France. Tel.: +33 (0) 383595889; fax: +33 (0) 383595889.
E-mail address: agnes.fournier@ensaia.inpl-nancy.fr (A. Fournier).

0045-6535/$ - see front matter © 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.chemosphere.2009.12.008

Besides the determination of the recovery rate of xenobiotics, characterisation of risk of egg contamination requires modeling of their transfer into products. Methodologies that allow modeling of xenobiotic deposition, mainly veterinary drugs, in relation to the one of yolk into preovulatory yolks were previously developed (Donoghue et al., 1996; Donoghue and Hairston, 1999). Relying on lindane and ampicillin, Donoghue et al. (1997) pointed out that the relationship between yolk and xenobiotic deposition depended on its tissue stability and body storage.

The aim of the current study was to characterise the transfer of PAHs as parent molecules and hydroxylated metabolites and to model PAHs deposition in yolk of laid eggs, through a methodology similar to the one previously followed for veterinary drugs (Donoghue et al., 1996; Roudaut, 1998; Donoghue and Hairston, 1999). In addition, the current experiment compares the kinetics of transfer into egg yolk of these readily metabolized compounds to the one of γ-hexachlorocyclohexane (γ-HCH or lindane), known to accumulate in the body (Kan, 1978).

2. Materials and methods

2.1. Birds and management

The experiment was conducted under the guidelines of the French Ministry of Agriculture for Animal Research. Twenty-four hens (Hy line, 23 weeks old and weighing 1.763 ± 0.070 kg) were placed in individual cages under conventional conditions of lighting (16 h light d^{-1}). They were offered *ad libitum* a standard diet covering all their nutrient requirements and water. After a 3-weeks adaptation period, they were blocked on the basis of body weight (BW) in six blocks of four hens each. At the end of the experiment, hens were sacrified by electronarcosis and ovaries were dissected in order to collect and weigh preovulatory yolks (>0.2 g).

Three representative PAHs, phenanthrene (Phe), pyrene (Pyr) and benzo[a]pyrene (B[a]P), were selected. They were purchased from Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA) with purity over 97%, 98% and 96%, respectively. They were previously used as models for PAHs transfer into ruminants milk (Lapole et al., 2007) and through intestinal epithelium (Cavret et al., 2005) because of their contrasting physicochemical properties (rings number: 3, 4 and 5, Log $K_{octanol/water}$: 4.5, 5.3 and 6.0 and molecular weight: 178, 202 and 252 for Phe, Pyr and B[a]P, respectively). Moreover, all of them were reported to be recovered in eggs of seabirds (Shore et al., 1999). Lindane (Log $K_{octanol/water}$: 3.8 and molecular weight: 290) was used as a model of persistent molecule. This compound was purchased from Sigma Aldrich (St-Quentin Fallavier, France). Thus, the current experiment aims at assessing the kinetics of transfer into egg yolk of PAHs, supposed to be readily metabolized, and to compare it to the kinetics of transfer of lindane, known to accumulate.

The experiment consisted in a 1 or 3-d exposure to the organic micropollutants (a mixture of 2 mg of each PAH kg^{-1} BW or 3 mg lindane kg^{-1} BW) and a daily collection of eggs during 12 d from the first dosing. This quite high dosing of PAHs was chosen to ensure a satisfactory level of parent compounds and metabolites in yolk at the different time points of the kinetics. Dosing of lindane was similar to the one used by Donoghue et al. (1997). Pollutants were mixed with icing sugar and administrated orally to hens in gelatine capsules. In accordance with the protocol described by Donoghue et al. (1996, 1997), daily administration of the capsule to each hen was performed 1 h after oviposition to synchronize the time of dosing with yolk and follicular development. Thus, hens were dosed at the very beginning of the daily phase of yolk accumulation because ovulation occurs within approximately 30 min after oviposition (Sauveur, 1988). Therefore, egg yolk collected at day 0 (Y0), 1 h before the first dosing, was not expected to contain PAHs or lindane residues from capsule, since it was laid before pollutant treatment. Similarly egg yolk collected within 24 h after the first dosing (Y1) was expected to be free of pollutants residues from capsule, since it was ovulated before pollutant treatment (Fig. 1).

Just after laying, eggs were removed from shell and yolk and albumen were separated. Yolks were weighed, freeze-dried and stored at +4 °C before analysis.

2.2. Chemical analyses

PAHs and metabolites were analysed by HPLC in Y0 and Y2 to Y12. In addition to parent molecules, the following hydroxylated metabolites were analysed: 2-OH Phe, 3-OH Phe, 1-OH Pyr and 3-OH B[a]P. They were chosen because they are considered as major products of metabolism of PAHs present in animal tissues or fluids (Honey et al., 2000; Jacob and Seidel, 2002; Grova et al., 2005, 2008). Concentration of these compounds in Y1 was supposed to be equal to the one in Y0 because yolk Y1, ovulated, had completed its growth at the time of first dosing of hens.

2.2.1. Chemicals and enzymes used for extracting PAHs and their metabolites in egg yolk

Solvents were of analytical or HPLC-grade. Enzymes, β-glucuronidase type H-2 from *Helix pomatia* (G0876) and sulfatase type H-2 from *Helix pomatia* (S9751), with a volume activity higher than 85,000 and 2000 units mL^{-1}, respectively, were provided from Sigma–Aldrich (St-Quentin Fallavier, France), as well as standard solutions of Phe, Phe-*d*10, Pyr, Perylene-*d*12 and B[a]P, at a concentration above 100 ng μL^{-1} in either cyclohexane, dichloromethane or methanol. Standard solutions of Pyr-*d*10 and Chrysene-*d*12, at 100 ng μL^{-1} acetonitrile, and of 2- and 3-OH Phe and 1-OH Pyr, at 10 ng μL^{-1} acetonitrile, were provided by Cluzeau Info Labo (Sainte-Foy-La-Grande, France). Solutions with 100 ng B[a]P-*d*12 μL^{-1} toluene and 200 ng 6-OH Chrysene μL^{-1} acetonitrile were prepared with compounds purchased from Cluzeau Info Labo (Sainte-Foy-La-Grande, France). 3-OH B[a]P was purchased from Chiron (Trondheim, Norway) and dissolved at 10 ng μL^{-1} in acetonitrile.

2.2.2. Extraction of PAHs and metabolites in egg yolk

PAHs and metabolites were extracted in freeze-dried egg yolk, according to a method adapted from the one designed for milk (Grova et al., 2005; Chahin et al., 2008). Prior to extraction, glucuronide and sulfate conjugates of PAH metabolites were hydrolyzed by incubating 0.5 g yolk with 50 μL β-glucuronidase and 50 μL of sulfatase in 2.5 mL acetate buffer (200 mM, pH 5.2) at 39 °C for 12 h. After addition of internal standards (Phe-*d*10, Pyr-*d*10, B[a]P-*d*12, and 6-OH Chrysene), PAHs and their metabolites were extracted with 7 mL ethyl acetate and 7 mL cyclohexane using ultrasound treatment (Branson Ultrasonics Corporation, Danbury, USA) at 42 kHz for 30 min. After centrifugation (15 min, 3400g, 0 °C) in a Jouan CR41 centrifuge (Chateau-Gontier, France), the supernatant was evaporated under nitrogen flow at 40 °C, using a

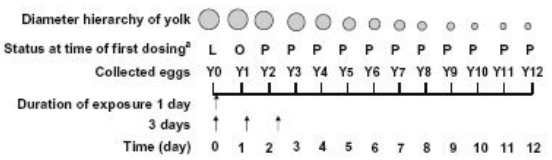


Fig. 1. Dates of collection of eggs after the 1- and 3-d exposure periods starting at day 0 and status of eggs at time of first dosing.[a]L, laid; O, ovulated; P, preovulatory yolk, still growing.→ Time of gelatine capsule administration, one hour after oviposition.

multi-channels evaporator (Liebisch, Bielefeld, Germany). PAHs and metabolites were then purified by solid-phase extraction (SPE) using Envi-Chrom P cartridges (Supelco, St-Quentin Fallavier, France), and separated by liquid–liquid extraction according to the method described by Chahin et al. (2008). The entire extraction procedure resulted in a cyclohexane phase containing PAHs, and in an ethyl acetate phase containing PAH metabolites.

The cyclohexane phase was partially evaporated under nitrogen flow at 40 °C and mixed with an external standard (Perylene-*d*12) in 20 μL dimethylsulfoxide (DMSO). Extracts were finally evaporated to dryness and dissolved in 180 μL acetonitrile. They were stored at 4 °C until analyses. The ethyl acetate phase was evaporated and then mixed with an external standard (Chrysene-*d*12) and 30 μL DMSO. Extracts were then evaporated to dryness and dissolved in 270 μL acetonitrile. They were stored at 4 °C and diluted twice with acetate buffer (10 mM, pH 4) before analysis. Recovery of PAHs and metabolites ranged between 58% and 66 %.

2.2.3. Quantification of PAHs and metabolites by HPLC–Fluorimetry

Quantification of Phe, Pyr and B[a]P by HPLC–Fluorimetry was performed according to the method described by Ounnas et al. (2009). Fluorimetric detection of PAHs was carried out using the following excitation and emission wavelengths: 0–40 min, 250–375 nm for Phe-*d*10 and Phe; 40–53 min, 333–390 nm for Pyr-*d*10 and Pyr; 53–64.8 min, 408–438 nm for Perylene-*d*12; after 64.8 min, 295–405 nm for B[a]P-*d*12 and B[a]P.

Metabolites were simultaneously analysed by HPLC, according to the method described in Chahin et al. (2008). Detection wavelength adapted program was: 0–38 min, 256–370 nm for 2- and 3-OH-Phe, 38–46.5 min, 240–387 nm for 1-OH Pyr, 46.5–60.6 min, 270–378 nm for 6-OH Chrysene and Chrysene-*d*12 and over 60.6 min, 270–378 nm for 3-OH B[a]P.

For both parent molecules and metabolites, standard curves were obtained by spiking a mixture of yolks collected during the adaptation period preceding the experiment, with known amounts of PAHs or metabolites. Quantification of 3-OH B[a]P lacked reproducibility, so that the results regarding this compound are not presented. Detection (DL) and quantification (QL) limits were calculated according to the statistical method described by Feinberg (2001). DL were equal to 3.5, 0.66, 0.093, 13, 1.7 and 3.8 ng g^{-1} dry yolk for Phe, Pyr, B[a]P, 2-OH Phe, 3-OH Phe and 1-OH Pyr, respectively. QL were equal to 8.9, 4.1, 2.0, 55, 11 and 18 ng g^{-1} dry yolk, respectively.

2.2.4. Extraction and quantification of lindane

Lindane was extracted and analysed by the Laboratoire Départemental d'Analyses 22 (LDA 22, Ploufragan, France) in yolks 1–10. Cryogenic extraction was performed according to AFNOR (1997). Extracts were purified with two successive SPE clean up (C_{18} and Florisil®) and analysed by Gas Chromatography–Electron Capture Detector (GC–ECD) as described by Bordet et al. (2002).

2.3. Calculations and statistical analysis

Concentrations of PAHs, of their metabolites and of lindane in yolk were analysed statistically using repeated measures in the MIXED procedure of the Statistical Analysis Systems software package (SAS, version 9.1, SAS® Institute, Cary, NC) and considering the hen as experimental unit. The model included the block as random effect. Exposure duration (1 vs. 3 d), the date of collection (days 0–12 for PAHs and metabolites and days 1–10 for lindane) and their interaction were considered as fixed effects. Student's *t*-test was used for comparison of means. Differences were considered significant for *P*-values < 0.05.

Attempt was made to assess the relationship between daily yolk deposition during the rapid growth phase of yolk, which occurs during the 9–12 d before ovulation (Sauveur, 1988), and the daily deposition of each contaminant and metabolite. The approach was similar to the one described by Donoghue et al. (1996), except that daily yolk deposition was estimated by derivating a logistic model adjusted to the weight of preovulatory yolks in the current study, while Donoghue et al. (1996) simply calculated daily the difference between the weight of two successive yolks.

The logistic model was fitted by means of the NLIN procedure of SAS. The model was as follows, for $1 < t \leqslant N$:

$$y = \frac{Y_{max}}{\left[1 + \left(\frac{Y_{max}}{Y_{min}} - 1\right)e^{(-kY_{max}(N-t))}\right]}$$

Because the egg does not accumulate yolk the day before it is laid: $y(t = 0) = y(t = 1)$.

Where y is the weight of preovulatory yolk (g), Y_{max} asymptote for $t = \infty$ (g), Y_{min} is the weight of preovulatory yolk at the start of the rapid growth phase (g), N is the duration of the rapid growth phase of yolk (day) (i.e. from the entrance of the preovulatory yolk to its laying), k is the parameter, expressed as $d^{-1}\,g^{-1}$, which defines the growth rate of the preovulatory yolk , and t is the duration before the egg is laid (day), starting from the first day of hen exposure. Taking one egg laid at $t \geqslant N$, its weight at $t = 0$ was Y_{min}.

For the current experiment N was estimated to equal the average number of preovulatory yolks dissected in each hen (i.e. 9) + the ovulated yolk (1) + the egg laid at $t = 0$ (1), i.e. $N = 11$.

Derivated with respect to t, this relation provides the daily yolk deposition in large preovulatory yolks, before they are ovulated as follows, for $1 < t < N$:

$$\frac{dy}{dt} = ky(Y_{max} - y)$$

At a second step, yolk accumulation in a given preovulatory egg during a *j*-d exposure period was calculated according to its rank in the preovulatory yolks, as:

$$Q_{n,j} = \sum_{i=n-j+1}^{n} q_i$$

where $Q_{n,j}$ is the quantity of yolk material deposited during the *j*-d exposure period in yolk of egg laid at day n (g), i is the rank of the considered yolk in the preovulatory yolks at $t = 0$ ($i = n + j - 1$), q_i is quantity of yolk deposited in 1 d of exposure in the considered preovulatory yolk i(g), j is the duration of exposure to the contaminant (day).

Proportionality between the quantity of pollutant (PAH, metabolite or lindane) excreted in each laid yolk following 3-d exposure and yolk accumulation was checked by linear regression. The model was as follows:

$$X_{n,3} = \alpha Q_{n,3} + \beta$$

where $X_{n,3}$ is the total amount of PAH, metabolite or lindane incorporated into egg yolk laid at day n following the 3-d exposure period (ng or μg), α is the concentration of the pollutant in yolk deposited (μg or ng g^{-1}), $Q_{n,3}$ is the quantity of yolk material deposited during the 3-d exposure period in the yolk of the egg laid at day n (g) and β is the intercept. When not significant ($P > 0.05$), the intercept β was removed from the model.

3. Results

Hens remained healthy throughout the experiment. The laying performance and the daily feed intake were unaffected by exposure to PAHs and to lindane (results not shown). Concentrations of Phe, Pyr and 3-OH Phe in hens exposed during 1 d to the mixture of PAHs were below the QL. Consequently, these results are not

presented. Besides, metabolites could not be detected in yolk laid before exposure (Y0), while concentrations of Pyr and B[a]P reached 1.7 and 1.0 to 1.5 ng g^{-1} dry yolk, respectively. In addition, except for B[a]P, no parent PAH or metabolite could be detected from Y10.

For 1 and 3-d exposure, PAHs and metabolites concentration in yolk increased to reach a maximum between the third and the sixth day after the first dosing. The maximum values were, for 3-d exposure, around 34, 12 and 15 ng g^{-1} dry yolk for Phe, Pyr and B[a]P, and around 180, 27 and 95 ng g^{-1} dry yolk for 2-OH Phe, 3-OH Phe and 1-OH Pyr, respectively. Thereafter they decreased down to the initial level within 10 d after the first dosing (date of collection, $P < 0.001$). Overall, yolks collected after the 1-d exposure were less concentrated in PAHs and metabolites than after the 3-d exposure (duration, $P < 0.001$). However, the two durations could be differentiated only in yolks 3–8 (duration × date of collection, $P < 0.001$). Maximum concentrations in yolks from hens exposed during 3 d exceeded by around 2–4 times the ones collected from hens exposed during 1 d (Fig. 2, Table 1).

Problems were encountered during the analytical determination of lindane in some eggs. Therefore eggs collected 8 and 10 d, and 9 d after the first dosing in hens exposed during 1 and 3 d, respectively, were removed from the data set. Lindane concentration in Y1 was 0.06 μg g^{-1} egg yolk fat. After 1 and 3-d exposure, this concentration increased to reach a maximum of 3.5 μg g^{-1} egg yolk fat at day 4 and of 16 μg g^{-1} egg yolk fat at day 6, respectively. In contrast to PAHs and metabolites, it only slightly decreased thereafter (date of collection, $P < 0.001$). Overall, yolks collected after the 1-d exposure were less concentrated in lindane than after the 3-d exposure (duration, $P < 0.05$). In addition, the two durations of exposure could be differentiated from day 4 (duration × date of collection, $P < 0.001$). Maximum concentrations in yolks from hens exposed during 3 d exceeded by around 3–4.5 times the ones collected from hens exposed during 1 d (Fig. 2; Table 1).

With a coefficient of determination (R^2) of 0.97 and a residual standard deviation of 1.35 g, the logistic model fitted well with the weight of preovulatory yolks. Estimates of Y_{max}, Y_{min} and k were 14.9 g, 0.137 g, 0.046 g^{-1} d^{-1}, respectively.

The relationship between the flow of PAHs and metabolites into egg yolk and yolk deposition following the 3-d exposure period was clearly linear ($P < 0.001$), with coefficients of determinations over 0.93 for B[a]P and the three metabolites, of 0.90 for Phe and of 0.79 for Pyr (Table 2). Moreover, the absence of significant intercept ($P > 0.10$) demonstrates a direct proportionality between the flow of PAHs and metabolites and the one of yolk. From the value of α, it is estimated that each g of yolk deposited during these 3 d of exposure contained 30.5, 10.6, 12.5, 161, 23.8 and 74.5 ng Phe, Pyr, B[a]P, 2-OH Phe, 3-OH Phe and 1-OH Pyr, respectively.

In contrast, yolk deposition and lindane flow were not linearly related ($P > 0.1$).

4. Discussion

Although they were not expected to be contaminated, yolks of eggs laid before the first dosing (Y0) and within 24 h after the first dosing (Y1) contained low but quantifiable amounts of Pyr and B[a]P and of lindane, respectively. Presence of PAHs in these yolks probably reveals their ubiquity in the environment (Laurent et al., 2005). Similarly, although the use of lindane was banned in 1998, this persistent compound is still recovered in the environment (Fabre et al., 2005).

Within 10 d, PAHs and metabolites concentration in yolks was back to the initial value. This rapid decontamination of yolks in hens exposed to PAHs and the presence of hydroxylated metabolites of Phe and Pyr in yolk confirm that these compounds are not persistent in vertebrates and undergo a significant biotransformation in these birds (Albers, 2006; Troisi et al., 2006). In mammals, Lapole et al. (2007) reported a half-life below 24 h for the same mixture of PAHs orally given at 2 mg of each PAH kg^{-1} BW to dairy goats.

In the current experiment, only a minor proportion of ingested PAHs were excreted via egg yolk, as parent molecule or hydroxylated metabolite. The recovery rate in yolk, calculated as the proportion of excreted compounds in yolk over the 12-d experiment relative to ingested PAHs during the 3-d exposure, was very low, reaching 0.089%, 0.034% and 0.006% for Phe, Pyr and B[a]P, respectively.

The analysis of PAHs metabolites, we managed only for Phe and Pyr, shows that the bulk of PAHs excretion in eggs was in hydroxylated form (17%, 73% and 10% of Phe recovered in egg yolk were in the form Phe, 2-OH Phe and 3-OH Phe, respectively, and 15% and 85% of Pyr in egg yolk were as parent molecule and 1-OH Pyr, respectively). Similar proportions were reported in liver of seabirds with 23% and 77% for Phe and 2-OH Phe, respectively and 9% and 91% for Pyr and 1-OH Pyr, respectively (Troisi et al., 2006). Although current estimates of recovery rate are minimum values because all possible metabolites were not analysed, these values suggest that hens are capable of effective biotransformation and elimination of absorbed PAHs and that egg, at least yolk, is only a minor way of body depuration. However, before safety of hen eggs with regards to PAHs can be ensured, carry-over to albumen should be estimated. To date, no literature data allows the estimation of the possible excretion of these compounds via albumen, nor their partition between egg yolk and albumen. However, transport of PAHs and of hydroxylated metabolites with proteins in blood was reported (Viau and Carrier, 1995; Sugihara and James, 2003). In addition, hydroxylated metabolites being more soluble in water than parent molecules, they may be more readily excreted via albumen (Atta and El-Zeini, 2001). In this case, the transfer to albumen would occur during the passage of egg in the oviduct, i.e. during the 24 h preceding oviposition. Derivation of the logistic model we adjusted to the weight of preovulatory yolks resulted in a typical curve of yolk deposition during the fast growing phase in hens: in 10 d, each yolk was estimated to grow from 0.14 g to 13.3 g at ovulation, with a maximum daily yolk accumulation of 2.5 g d^{-1} occurring in the middle of the growing phase. These estimates are in agreement with the results reported by Etches et al. (1983) and Donoghue et al. (1996). Daily deposition of yolk and of PAHs were directly proportional, indicating that no significant body storage of these compounds occurred. The molecules we used in the current experiment, as well as other POPs, were reported to be transported in blood by lipoproteins (Borlakoglu et al., 1990; Monteverdi and Di Giulio, 2000), which are major constituents of yolk. Therefore, similar pattern for yolk and PAHs deposition was expected. The direct proportionality between metabolites and yolk deposition confirms the quickness of PAHs biotransformation. However, because only one dose of PAH was tested in the current experiment, the value of the regression coefficient (α) between egg yolk and PAH deposition for other levels of exposure cannot be stated. In contrast, lindane and yolk deposition could not be related. Donoghue et al. (1997) reported an experiment in which the developing yolks of hens orally given 3 mg lindane kg^{-1} BW were dissected and analysed. These authors demonstrated a direct relationship between yolk and lindane deposition in developing preovulatory yolks. In contrast to the current experiment, in which yolks still grew after the end of lindane administration, the study by Donoghue et al. (1997) provided a state of preovulatory yolks at a given date. Therefore, it did not account for the storage of this molecule in body fat, nor for its progressive elimination via egg yolk, once exposition has stopped. Indeed, lindane, in contrast to

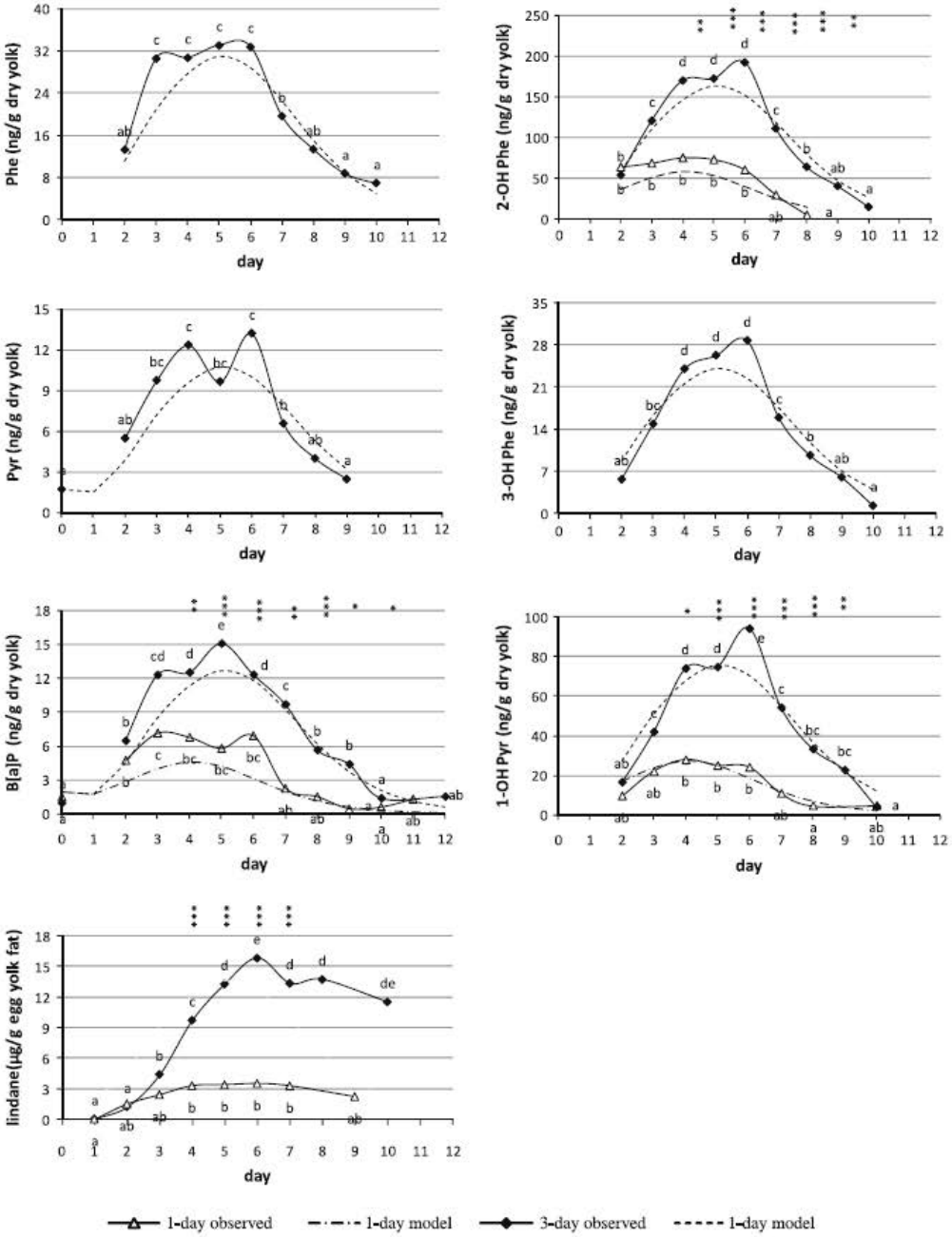


Fig. 2. Concentration of PAHs and metabolites in yolks collected from hens orally exposed to 2 mg Phe, Pyr and B[a]P or 3 mg lindane kg^{-1} body weight daily during 1 or 3 d from day 0. Values are adjusted means a, b, c, d, e: within each duration of exposure (1 or 3 days), values not followed 13 by the same letter differ significantly ($P < 0.05$). Differences between duration of exposure within day of collection are noticed as follows: *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$. Model: Concentration of each compound was estimated from the deposition of yolk according to the model presented in Table 2 and accounting for an average dry matter content of 7.0 g in each egg yolk.

PAHs, is stored in body fat and was reported to display a half-life of elimination in laying hens of 5–10 d (Kan and Meijer, 2007; MacLachlan, 2008).

Thus the current model is valid for readily metabolized compounds, such as PAHs in the current experiment, or such as ampicillin (Donoghue et al., 1997). In contrast, storage of lindane in body fat explains its slower elimination via eggs. Thus, more complex models, involving a storage compartment, must be implemented to depict the kinetic of transfer of such compounds into egg yolk (van Eijkeren et al., 2006). However, because the kinetics of lindane body storage was not investigated in the current experiment, such a model could not be adjusted. Nevertheless, although

Table 1
Statistical significance[a] of the effects of exposure duration (1 vs. 3 d) and of date of egg collection on B[a]P, Lindane, 2-OH Phe and 1-OH Pyr concentration in egg yolk and of exposure duration (1 vs. 3 d) on Phe, Pyr and 3-OH Pyr concentration in egg yolk[a,b].

Compound	Phe[b]	Pyr[b]	B[a]P	Lindane	2-OH Phe	3-OH Phe[b]	1-OH Pyr
Date	***	***	***	***	***	***	***
Duration	–	–	***	*	***	–	***
Date×duration	–	–	**	***	***	–	***
rsd[c]	6.46	3.18	2.76	1.40	27.8	5.03	15.4

* $P < 0.05$.
** $P < 0.01$.
*** $P < 0.001$.
[a] Adjusted means are presented in Fig. 2.
[b] Concentrations in yolks following 1 d of exposure were below the quantification limit, so that duration of exposure was removed from the model.

Table 2
Parameters of the linear relationship between the flow of PAHs or metabolites and of yolk in eggs collected from hens orally exposed to 2 mg Phe, Pyr and B[a]P kg^{-1} body weight daily 3 d from day 0[a].

Compound	α	*P*-value***	R^2[b]	rsd[c]
Phe	30.5	***	0.90	65.0
Pyr	10.6	***	0.79	26.6
B[a]P	12.5	***	0.93	25.4
2-OH Phe	161	***	0.97	301
3-OH Phe	23.8	***	0.96	40.5
1-OH Pyr	74.5	***	0.91	110

The intercept, never significant ($P > 0.10$), was removed from the model.
*** $P < 0.001$.
[a] The model was $X_n = \alpha\ Q_n + \beta$, with X_n, quantity of PAH or metabolite excreted with the egg laid at day *n* (ng); α, concentration of PAH or metabolite in yolk deposited (ng g^{-1}); Q_n, quantity of yolk material deposited during the 3-d exposure period in the yolk of the egg laid at day *n* (g); β, intercept.
[b] R^2, coefficient of determination.
[c] rsd, residual standard deviation.

depuration was clearly not completed, it can be calculated that 2.7% of lindane ingested during 3 d had been excreted via yolk by the end of the experiment. This recovery rate is in agreement with 2% of ingested lindane recovered in total hen's ovary reported by Donoghue et al. (1997). This 100–1000 times higher figure compared to PAHs may be ascribed to the higher absorption rate and to the lower metabolism of lindane and is in agreement with the higher persistence of lindane.

Although it must be confirmed experimentally, the current model adjusted for PAHs may be extended to an exposure period exceeding 3 d. Concentration of PAHs in egg yolk is expected to increase until exposure duration equals the 10 d during which yolk rapidly grows. Beyond this duration, it is expected to remain steady, because similar amounts of contaminants are transferred to each yolk in the course of its growth. Similar figures are reported by MacLachlan (2008) for pesticides exhibiting half lives below 1 d and no significant body accumulation.

5. Conclusion

The current experiment confirms active and rapid biotransformation of PAHs in hens and their low recovery rate into egg yolk. The direct proportionality between deposition of yolk and of PAHs and their metabolites demonstrates that they do not accumulate in body fat, in contrast to lindane. The developed model is valid for a daily dosis of 2 mg of each PAH kg^{-1} BW and should be completed by assessing the proportionality between daily dosis and PAHs and metabolites excretion via egg yolk.

Acknowledgements

The authors are grateful to the French Ministry for Agriculture and Fisheries for financial support in the frame of the Compte d'Affectation Spéciale Développement Agricole et Rural (CASDAR project no 7106).

References

AFNOR, 1997. Aliments gras - Dosage des pesticides et des polychlorobiphényles (PCB). NF EN 1528, Association Française de Normalisation, Paris-La Défense, France.
Albers, P.H., 2006. Birds and polycyclic aromatic hydrocarbons. Avian Poult. Biol. Rev. 17, 125–140.
Atta, A.H., El-Zeini, S.A., 2001. Depletion of trimethoprim and sulphadiazine from eggs of laying hens receiving trimethoprim/sulphadiazine combination. Food Control 12, 269–274.
Bordet, F., Inthavong, D., Fremy, J.-M., Aspe, D., Durand, T., Ducher, M., Fontayne, N., Grignon, E., Herbreteau, C., Hulot, S., Le Bigot, C., Marengue, E., Martin, V., Ranneaud, S., Sartre, L., Vouillon, B., 2002. Interlaboratory study of a multiresidue gas chromatographic method for determination of organochlorine and pyrethroid pesticides and polychlorobiphenyls in milk, fish, eggs, and beef fat. J. AOAC Int. 85, 1398–1409.
Borlakoglu, J.T., Welch, V.A., Wilkins, J.P.G., Dils, R.R., 1990. Transport and cellular uptake of polychlorinated biphenyls (PCBs) – I. Association of individual PCB isomers and congeners with plasma lipoproteins and proteins in the pigeon. Biochem. Pharmacol. 40, 265–272.
Cavret, S., Feidt, C., Laurent, F., 2005. Differential transfer of organic micropollutants through intestinal barrier using Caco-2 cell line. J. Agric. Food Chem. 53, 2773–2777.
Chahin, A., Guiavarc'h, Y.P., Dziurla, M.A., Toussaint, H., Feidt, C., Rychen, G., 2008. 1-Hydroxypyrene in milk and urine as a bioindicator of polycyclic aromatic hydrocarbon exposure of ruminants. J. Agr. Food Chem. 56, 1780–1786.
Donoghue, D.J., Hairston, H., 1999. Oxytetracycline transfer into chicken egg yolk or albumen. Poultry Sci. 78, 343–345.
Donoghue, D.J., Hairston, H., Gaines, S.A., Bartholomews, M.J., Donoghue, A.M., 1996. Modeling residue uptake by eggs 1. Similar drug residue patterns in developing yolks following injection with ampicillin or oxytetracycline.. Poultry Sci. 75, 321–328.
Donoghue, D.J., Schenck, F.J., Hairston, H., Podhorniak, L.V., 1997. Modeling drug residue uptake by eggs: evidence of a consistent daily pattern of contaminant transfer into developing preovulatory yolks. J. Food Protect. 60, 1251–1255.
Etches, R.J., MacGregor, H.E., Morris, T.F., Williams, J.B., 1983. Follicular growth and maturation in the domestic hen (gallus domesticus). J. Reprod. Fertil. 67, 351–358.
Fabre, B., Roth, E., Heintz, V., 2005. Les isomères de l'hexachlorocyclohexane, ADEME, France, 126pp. <http://www.ademe.fr/alsace/pdf/PDF_LINDANE.pdf>.
Feinberg, M., 2001. Validation interne des méthodes d'analyse. Techniques de l'Ingénieur, France.
Grova, N., Monteau, F., Le Bizec, B., Feidt, C., Andre, F., Rychen, G., 2005. Determination of phenanthrene and hydroxyphenanthrenes in various biological matrices at trace levels using gas chromatography-mass spectrometry. J. Anal. Toxicol. 29, 175–181.
Grova, N., Feidt, C., Monteau, F., Le Bizec, B., Rychen, G., 2008. Transfer of phenanthrene and its hydroxylated metabolites to milk, urine and faeces. Polycycl. Aromat. Comp. 28, 98–111.
Honey, S., O'Keefe, P., Drahushuk, A.T., Olson, J.R., Kumar, S., Sikka, H.C., 2000. Metabolism of benzo(a)pyrene by duck liver microsomes. Comp. Biochem. Phys. C 126, 285–292.
Horsted, K., Hermansen, J.E., 2007. Whole wheat versus mixed layer diet as supplementary feed to layers foraging a sequence of different forage crops. Animal 1, 575–585.
Jacob, J., Seidel, A., 2002. Biomonitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons in human urine. J. Chromatogr. B 778, 31–47.
Kan, C.A., 1978. Accumulation of organochlorine pesticides in poultry: a review. J. Agr. Food Chem. 26, 1051–1055.
Kan, C.A., Meijer, G.A.L., 2007. The risk of contamination of food with toxic substances present in animal feed. Anim. Feed Sci. Technol. 133, 84–108.

Lapole, D., Rychen, G., Grova, N., Monteau, F., Le Bizec, B., Feidt, C., 2007. Milk and urine excretion of polycyclic aromatic hydrocarbons and their hydroxylated metabolites after a single oral administration in ruminants. J. Dairy Sci. 90, 2624–2629.

Laurent, C., Feidt, C., Laurent, F., 2005. Contamination des sols. EDP Sciences/ADEME Edition, Paris, Les Ulis, France.

Lebedev, A.T., Poliakova, O.V., Karakhanova, N.K., Petrosyan, V.S., Renzoni, A., 1998. The contamination of birds with organic pollutants in the Lake Baikal region. Sci. Total Environ. 212, 153–162.

Lioy, P.L., Waldman, J.M., Greenberg, A., Harkov, R., Pietarinen, C., 1988. The total human environmental exposure study (THEES) to benzo(a)pyrene: comparison of the inhalation and food pathways. Arch. Environ. Health 43, 304–312.

MacLachlan, D.J., 2008. Transfer of fat-soluble pesticides from contaminated feed to poultry tissues and eggs. Brit. Poultry Sci. 49, 290–298.

Monteverdi, G.H., Di Giulio, R.T., 2000. In vitro and in vivo association of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and benzo[a]pyrene with the yolk-precursor protein vitellogenin. Environ. Toxicol. Chem. 19, 2502–2511.

Ounnas, F., Jurjanz, S., Dziurla, M.A., Guiavarc'h, Y., Feidt, C., Rychen, G., 2009. Relative bioavailability of soil-bound polycyclic aromatic hydrocarbons in goats. Chemosphere 77, 115–122.

Roudaut, B., 1998. Elimination of oxolinic acid in eggs after oral treatment of laying hens. Brit. Poultry Sci. 39, 47–52.

Sauveur, B., 1988. Reproduction des volailles et production d'œufs. INRA Editions, Paris.

Shore, R.F., Wright, J., Horne, J.A., Sparks, T.H., 1999. Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) residues in the eggs of coastal-nesting birds from Britain. Mar. Pollut. Bull. 38, 509–513.

Sugihara, N., James, M.O., 2003. Binding of 3-hydroxybenzo[a]pyrene to bovine hemoglobin and albumin. J. Biochem. Mol. Toxic. 17, 239–247.

Troisi, G.M., Bexton, S., Robinson, I., 2006. Polyaromatic hydrocarbon and PAH metabolite burdens in oiled common guillemots (Uria aalge) stranded on the East Coast of England (2001–2002). Environ. Sci. Technol. 40, 7938–7943.

UNECE, 1998. Convention on long-range transboundary air pollution. Protocol on Persistent Organic Pollutants. Geneva, Switzerland, 73pp.

Van Eijkeren, J.C.H., Zeilmaker, M.J., Kan, C.A., Traag, W.A., Hoogenboom, L.A.P., 2006. A toxicokinetic model for the carry-over of dioxins and PCBs from feed and soil to eggs. Food Addit. Contam. 23, 509–517.

Viau, C., Carrier, G., 1995. Kinetics of hemoglobin and albumin adducts in rabbits subchronically exposed to benzo[a]pyrene. Fund. Appl. Toxicol. 24, 140–144.

Zabik, M.E., Dugan Jr., LeRoy, 1971. Location of lindane, dieldrin, and DDT compounds in eggs. J. Agr. Food Chem. 19, 904–908.

4. Cinétique de contamination et de décontamination d'un polluant émergent (HBCD) à l'échelle de la poule

La dernière expérimentation *in vivo*, concernant un polluant émergent a donné lieu à une publication acceptée (révision mineure en cours) dans la revue Environmental Science and Pollution Research, dont le titre est : *« Kinetic study of γ-hexabromocyclododecane orally given to laying hens (Gallus domesticus)».* Cette étude apporte les premières données, à notre connaissance, concernant les cinétiques et taux de transfert de cette molécule dans différents tissus de la poule pondeuse : le tissu adipeux, le foie et le jaune d'œuf.

Kinetic study of γ-hexabromocyclododecane orally given to laying hens (Gallus domesticus)

Agnès Fournier[a,b*], Cyril Feidt[a], Philippe Marchand[c], Anaïs Vénisseau[c], Bruno Le Bizec[c], Nadine Sellier[d], Erwan Engel[e], Jérémy Ratel[e], Angélique Travel[b], Catherine Jondreville[a]

[a] Nancy Université, INRA, UR AFPA, 2 avenue de la Forêt de Haye B.P. 172 F-54505 Vandœuvre-lès-Nancy, France

[b] ITAVI, Unité de Recherches Avicoles, Centre de Tours, BP 1, F-37380 Nouzilly, France

[c] ONIRIS, LABERCA, Route de Gachet, 44307 NANTES Cedex 3, France

[d] PEAT, INRA, Centre de Tours, BP 1, F-37380 Nouzilly, France

[e] INRA, QuaPA, 63122 Saint-Genès-Champanelle, France

*Corresponding author. A. Fournier. E-mail: agnes.fournier@ensaia.inpl-nancy.fr

ABSTRACT

High concentrations of hexabromocyclododecane (HBCD) sometimes recorded in free-range hens' eggs are thought to be due to soil ingestion. Of the three stereoisomers of HBCD (α-, β- and γ-HBCD), γ-HBCD is the main component in the commercial mixture, as well as in environmental matrices, whereas the isomer profile is α-dominated in biota. In fish and in mammals, this shift is thought to be due to a rapid elimination of γ-HBCD and to its bioisomerization to the more persistent α-HBCD. The aim of the current controlled study was to better understand the fate of ingested HBCD in laying hens. The isomer profile in soil being γ-dominated, excretion kinetics of γ-HBCD into egg yolk and accumulation in liver and in abdominal fat were investigated. Forty-eight laying hens were individually housed and fed with a spiked diet containing 1.1 ng γ-HBCD.g^{-1} for 21 days, and with a clean diet for the following 18 days. Hens were sequentially slaughtered throughout the 39-day experiment. α-, β- and γ-HBCD were analyzed in egg yolk, in abdominal fat and in liver by LC-MS/MS. α- and γ-HBCD were quantified in the three tissues, while β-HBCD was never quantified. Kinetics of the two isomers suggests that γ-HBCD is rapidly biotransformed and eliminated, and partly isomerized into the more persistent α-HBCD. Carry-over rate of ingested γ-HBCD to egg yolk was estimated at 1.2%. Estimated half-lives of γ-HBCD in egg yolk, in abdominal fat and in liver were 2.9, 13 and 0.41 days, respectively.

Keywords: HBCD, Brominated Flame Retardant, kinetic, transfer, egg, hen

4.1. Introduction

Hexabromocyclododecane (HBCD) is a brominated aliphatic cyclic hydrocarbon used as a flame retardant additive in thermal insulation foams and in textile coatings. This brominated flame retardant (BFR) is reported to be produced in China, Europe, Japan, and the USA, with an annual production of approximately 23,000 tons per year. Approximately half of the market volume is used in Europe. On the world market since the 1960s (Persistent Organic Pollutant Review Committee 2011), this BFR has become of growing concern as a pollutant in recent years, because of its widespread occurrence in the environment and in biota (Covaci et al 2006; Law et al 2006a). As a persistent, bioaccumulative and toxic (PBT) substance, HBCD is under consideration for listing under the Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants (Persistent Organic Pollutant Review Committee 2011), and it has been the subject of an Action Plan under the Toxic Substances Control Act by the US Environmental Protection Agency (US EPA 2010), while it has recently been listed as a substance that is subject to the authorization procedure under the European Union's REACH legislation (Commission Regulation (EU) No 143/2011).

Depending on the manufacturer and the production method used, technical HBCD consists of 70-95% γ-HBCD and 3-30 % of α- and β-HBCD. Like other BFRs, HBCD may enter the environment by emission during the manufacture or leaching from flame retarded products. Although the γ-diasteroisomer is the main component in commercial mixture and in the environment, the α-diastereoisomer predominates in human tissue and wildlife (Law et al 2008). Two factors are thought to be responsible for this shift. First, γ-HBCD undergoes rapid metabolism, elimination and bioisomerization into β-and α-HBCD, as demonstrated in mice (Szabo et al 2010) and in trout (Law et al 2006b). Second, in vitro experiments with rat and harbor seal microsomes have shown that biotransformation of β- and γ-HBCD is more rapid than that of α-HBCD (Zegers et al 2005). Moreover, in mice (Szabo et al 2011) and in trout (Law et al 2006b), α-HBCD was shown to be recalcitrant to bioisomerization.

Beside dust ingestion and inhalation (Roosens et al 2009, Tue et al 2010), the consumption of contaminated animal products may also be a significant route for human exposure to HBCD. The presence of significant amounts of this BFR was reported in animal products for human consumption such as fish, meat and eggs (Covaci et al 2006, DGAL 2009). Although detection frequency of HBCD in commercial hens' eggs is rather low (Hiebl and Vetter 2007, Goscinny et al 2011, Törnkvist et al 2011), concentrations as high as 90 ng HBCD.g^{-1} lipid weight (lw) (Blake 2005) or 2000 ng HBCD/g lw (Hiebl and Vetter 2007) were recorded in

free-range hens' eggs. In France, hens' eggs containing up to 3300 ng HBCD.g^{-1} lw were recently collected during regulatory plans (DGAL 2009). In Belgium, the detection frequency of HBCD in home-produced eggs was 50% with a maximum value of 62 ng.g^{-1} lw (Covaci et al 2009). According to these authors, soil ingestion was the main source of this compound for hens. However, exposure pathway, dose, isomer profile and duration were not characterized.

The aim of the current study was to better understand the fate of ingested HBCD by laying hens reared outdoors, likely to ingest soil. As the isomer profile in soil is dominated by γ-HBCD, a controlled laboratory experiment was conducted, in which hens were orally exposed to a diet spiked with γ-HCBD over 21 days, followed by an 18-day depuration period. Concentrations of HBCD in liver, adipose tissue and egg and their isomeric profile were followed throughout the experiment in order to assess the kinetic parameters of γ-HBCD in laying hens and to test the hypothesis of bioisomerization in this species.

4.2. Materials and methods

4.2.1. Feed

Two diets were prepared from a commercial basal diet. The first one, fed to hens during exposure, was contaminated with spiked oil, whereas the second, fed to hens during depuration, contained clean oil. The level of contamination of the spiked feed was adjusted based on a plausible oral exposure of HBCD via ingestion of contaminated soil by hens reared outdoors. Concentrations of HBCD in soils were reported to range between 111 and 23200 ng.g^{-1} dry soil in the vicinity of industrial areas (Petersen et al 2004, Remberger et al 2004) and between 0.1 and 6.6 ng.g^{-1} dry soil in rural or suburban areas (Covaci et al 2009, Yu et al 2008). A level of 10 ng HBCD.g^{-1} dry soil was chosen as representative of a moderately contaminated soil. Hens reared outdoors were reported to ingest around 10 g of dry soil daily (Stephens et al 1995). Thus, the targeted daily ingestion of HBCD by hens in the current study was 100 ng (10 g soil containing 10 ng HBCD.g^{-1} dw). As hens ingest around 100 g feed daily, the scheduled concentration in spiked feed was 1 ng.g^{-1}.

To prepare the spiked feed, γ-HBCD (1,2,5,6,9,10-Hexabromocyclododecane, Ref. 144762) obtained from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) was dissolved in rapeseed oil at 30°C by magnetic agitation (15 min) followed by sonication for 90 min. Spiked oil was then mixed into the commercial basal feed at a level of 5 g oil.kg^{-1} diet. Thus, the level of γ-HBCD introduced in oil was adjusted so that 5 g of oil delivers 1000 ng γ-HBCD (i.e. 200 ng.g^{-1} oil).

The clean feed was obtained by mixing the same amount of blank rapeseed oil in the commercial feed. Feeds were administered as pellets.

4.2.2. Animals and housing

The experiment was conducted under the guidelines of the French Ministry of Agriculture for Animal Research. Forty-eight laying hens (Isa Brown, 22 weeks old and weighing 1.78±0.09 kg) were placed in individual cages under conventional conditions of lighting (16 h light per day). Prior to the experiment, hens were allowed a 2-week adaptation period, during which they were offered *ad libitum* clean feed and water. Water was continuously available throughout the experiment.

4.2.3. Experimental procedure

After the adaptation period, 40 hens out of 48 were given *ad libitum* the feed spiked with γ-HBCD during the 21-day exposure period and, subsequently, the clean feed during the 18-day depuration period. Hens were sequentially slaughtered after 1, 4, 8, 11, 16, 21, 22, 24, 29 or 39 days of experiment (n=4 for each date of slaughter). The remaining eight hens were used as control. Four of them were slaughtered the day before the experiment started, while the other four were given *ad libitum* clean feed throughout the 39-day experiment and were then slaughtered. Feed intake was recorded individually by weighing feed allowance and refusals daily. Hens were slaughtered by electronarcosis followed by exsanguination. Abdominal fat and liver were removed and weighed. All samples were immersed in liquid nitrogen, wrapped in aluminum foil, vacuum packed and stored at -80°C. They were then ground and homogenized before analysis. The egg laid the date of slaughter was collected. Each egg was removed from its shell, and yolk and albumen were separated. Each yolk was weighed, frozen and stored at -20°C before analysis.

4.2.4. Analyses

Reference substances

Internal and external standards as well as HBCD diastereoisomers were provided by Promochem (Molsheim, France) and BCP Instruments (Lyon, France). All solutions were prepared in toluene (Picograde®, Promochem) and stored below 4°C. Fluorometholone was prepared in methanol (Picograde®, Promochem).

Consumables

Hexane, dichloromethane, toluene, acetone and methanol were Picograde® quality and provided by Promochem (Molsheim, France). Sodium sulfate anhydrous, sulfuric acid (98%) and ammonium acetate were from Merck (Darmstadt, Germany), celite 20/45 µm from Coger, silica gel (70/230 mesh) from Fluka (Buschs, Switzerland), and acetonitrile (HPLC grade) from Solvents Documentation Synthesis (Peypin, France). Ultrapure water was extemporaneously prepared (> 18 mΩ.cm).

Extraction and clean-up

Each sample was freeze-dried, ground and transferred into an Accelerated Solvent Extraction (ASE) cell. Celite and ^{13}C-labelled HBCDs (1 ng of each) were added to the samples. Pressure and temperature were set at 100 bars and 120 °C, respectively. The extraction solvent was a mixture composed of toluene and acetone at 70:30 (v/v), and three successive extraction cycles (5 min each) were performed. The extract was evaporated to dryness for further gravimetric determination of the fat content. Finally, 25 ml hexane was added before purification of the sample. Purification was performed on a column (length 50 cm; ID 2.5 cm) made up of successive layers of sodium sulfate anhydrous (5 g), neutral silica gel (5 g), silica acidified with 22% concentrated sulfuric acid (20 g), silica acidified with 44% concentrated sulfuric acid (25 g) and 5 g sodium sulfate. The stationary phase was washed with 150 mL hexane prior to sample application at the top of the column. Interferences were discarded with 180 mL hexane; target analytes were finally eluted in 60 mL dichloromethane. After evaporation, the residue was reconstituted in hexane and washed twice with sodium hydroxide (1N). Hexane was isolated and fluorometholone, used as a recovery standard, was added (5 ng). After evaporation, the dry residue was reconstituted in 50 µL acetonitrile/water (1:1).

LC-MS/MS measurement

Separation of the HBCD diastereoisomers was achieved using an HPLC pump with binary gradient system and automatic injector (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). HBCD isomers were separated on a Hypersil Gold column (100 mm × 2.1 mm; 1.9µm, Thermo), using a mobile phase composed with acetonitrile (A) and 20 mM ammonium acetate (B); the elution gradient started for 2 min with 20% B, then increased to 100 % in 3.5

min and remained as such for 3 additional min. Flow rate was set at 0.4 mL/min. A sample volume of 10 µL was loaded onto the column using an autosampler. The MS instrument was a triple quadrupole 6410 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) fitted with an electrospray ion source. The electrospray ionization (ESI) interface was operated in the negative ion mode. Mass spectrometric acquisition was performed using the following working parameters: capillary voltage was set at 3000 V, nebulizer at 55 psi, gas flow at 10 L/min, and gas temperature at 220 °C. The triple quadrupole was used on SRM mode with monitoring of the transitions 652.7 to 78.9 for ^{13}C-HBCD, 640.7 to 78.9 and 640.7 to 80.9 for ^{12}C-HBCD, and 435.3 to 255.2 for fluorometholone. The fragmentor voltage and the collision energy were set at 90 V/10 eV for HBCD and 120 V/15 eV for fluorometholone, respectively. Data were collected and analyzed using Mass Hunter B01 software (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

Analytical criteria and specific precautions

A control blank sample was introduced into every batch; this sample followed every step of the analytical procedure. The HBCD concentrations measured in this quality control were subtracted from all samples of the batch. To assign to a peak the HBCD identity, the relative retention time of the analyte in a given sample was checked against the corresponding reference molecule in a quality control standard injected into the same batch of samples. The tolerance used was 2.5% between the two samples. Moreover, two transitions at least had to be detected (S/N > 3). The relative intensities of the two detected transitions, expressed as a percentage of the intensity of the most intense transition, had to correspond to those of the calibration standard (at comparable concentrations) measured under the same conditions, within tolerances as expressed in table 4 of the Commission Decision No 2002/657/EC. Isotope dilution calibration was used for quantification of the three HBCD isomers. A calibration curve encompassing the concentration range was prepared (Table II-4). The relative response (RR) (labeled to native) *vs.* concentration in standard solutions was plotted or computed using a linear regression. The response of each HBCD relative to its labeled analog was determined using the area responses for each calibration standard. For α-, β- and γ-HBCD, limits of quantification (LOQ) were respectively 4, 5 and 7 pg.g^{-1} lw in egg yolk, 10, 5 and 7 pg.g^{-1} lw in abdominal fat, and 20, 10 and 20 pg.g^{-1} lw in liver.

Table II- 4 : Concentration of target analytes and internal standards in calibration solutions (in $pg.L^{-1}$)

	Cal1	Cal2	Cal3	Cal4	Cal5
Fluorométholone	2000	2000	2000	2000	2000
α-HBCD ^{12}C	0.08	4	20	80	400
β-HBCD^{12}C	0.08	4	20	80	400
γ-HBCD ^{12}C	0.08	4	20	80	400
α-HBCD ^{13}C	20	20	20	20	20
β-HBCD^{13}C	20	20	20	20	20
γ-HBCD ^{13}C	20	20	20	20	20

4.2.5. Calculations and statistical analysis

For each isomer, values below the LOQ were replaced with LOQ/2 to avoid missing data. Statistical analyses were performed by means of the Statistical Analysis Systems software package (SAS, version 9.1, SAS Institute, Cary, NC). The hen was considered as the experimental unit. Concentrations of each HBCD isomer in yolk, liver and fat were analyzed as repeated measures using the MIXED procedure. The model included the experimental treatment (n=12) and the tissue (yolk, abdominal fat and liver). The 12 levels of treatment corresponded to the 10 dates of slaughter (days 1, 4, 8, 11, 16, 21, 22, 24, 29 and 39) for hens exposed to γ-HBCD, in addition to the two levels corresponding to the control hens slaughtered the first and last days of experiment (days 0 and 39). To account for the correlation between egg yolk, abdominal fat and liver collected from the same hen, the tissue was introduced in the model using the "repeated" statement. To fit the model, compound symmetry (CS) was used as covariance structure, meaning that measures on the same hen were considered to be similarly correlated. A Tukey-Kramer test was used for comparison of means. Differences were considered significant for P-values < 0.05.

Data obtained during depuration were then submitted to a non-linear regression using the NLIN procedure of SAS, in order to estimate half-life of γ-HBCD in different tissues. Parameters a and k were adjusted using a first order kinetic model of the following form: $Y_t = Y_{39} + a \exp(-k\ t)$, where Y_t is the concentration of γ-HBCD isomer ($ng.g^{-1}$ lw) in yolk, in abdominal fat or in liver at time = t (day). Half-life was calculated as ln (2)/k.

4.3. Results

The clean diet, fed to all hens during the adaptation period, to the control hens throughout the experiment and to all hens during the depuration phase contained 3 pg α-HBCD.g^{-1}, while β- and γ-HBCD concentrations were below the quantification limits. The spiked feed, given to hens during the exposure period, contained 1.1 ng HBCD.g^{-1} made up of 0.1, 0.2 and 99.7%

α-, β- and γ-HBCD, respectively. Hens remained healthy throughout the experiment. Laying performance and daily feed intake (112±10 $g.day^{-1}$) were unaffected by exposure to HBCD (results not shown). The isomer β-HBCD was not quantified in any sample of egg, abdominal fat or liver.

Concentrations of α- and γ-HBCD in egg yolk, in abdominal fat and in liver are presented in Table II-5. These concentrations varied between days ($P < 0.01$) and between tissues ($P < 0.001$). Moreover, concentrations of γ-HBCD evolved differently among tissues (day*tissue, $P < 0.001$).

No γ-HBCD was quantified in egg yolk and in liver collected from the control hens, while concentrations of 17 to 21 $pg.g^{-1}$ lw were recorded in abdominal fat. In contrast, α-HBCD was quantified in control hens at levels of 32 to 33 $pg.g^{-1}$ lw in abdominal fat and of 51 to 69 $pg.g^{-1}$ lw in liver. This latter diasteroisomer was not quantified in egg yolk collected from the control hens slaughtered at the end of the experiment, while eggs laid by the control hens slaughtered prior to the experiment contained 26 pg α-HBCD.g^{-1} lw.

During the exposure period, γ-HBCD concentration in yolk increased slowly to 79 $pg.g^{-1}$ lw on the 8th day and then more rapidly to reach a value of 355 $pg.g^{-1}$ lw three days later, the 11th day. Then it remained steady up to the end of exposure. As soon as exposure ceased, γ-HBCD concentration in egg yolk was rapidly reduced to reach the value of 13 $pg.g^{-1}$ lw eight days later, the 29th day. By the end of the experiment, the 39th day, γ-HBCD was no longer quantified in egg yolk. Although not significantly, α-HBCD concentration in egg yolk tended to increase during exposure, with a maximum value of 77 $pg.g^{-1}$ lw recorded on the 21st day. By the end of the depuration period, this compound was still quantifiable in egg yolk, but at the low level of 3.3 $pg.g^{-1}$ lw (Table II-5 and Figure II-3).

In abdominal fat, γ-HBCD concentration increased at an almost constant rate over time from 23 $pg.g^{-1}$ lw the 1st to 490 $pg.g^{-1}$ lw the 21st day. Unlike in yolk, a steady state was not reached by the end of the exposure period. This concentration decreased during depuration, but at a slower rate than in yolk, so that γ-HBCD concentration in abdominal fat was still 230 $pg.g^{-1}$ lw on the 39th day. Although not significantly, concentration of α-HBCD in abdominal fat of hens given the spiked feed tended to exceed the value recorded in control hens from the 11th day onwards. Moreover, this concentration was not reduced during the depuration period, so that α-HBCD concentration in abdominal fat was still 80 $pg.g^{-1}$ lw by the end of the experiment (Table II-5 and Figure II-4).

In liver, γ-HBCD concentration ranged between 114 to 273 $pg.g^{-1}$ lw throughout the exposure period. This concentration was already reduced to 59 $pg.g^{-1}$ lw on the 22nd day, after 1 day of

depuration, and γ-HCBD was no longer quantifiable in liver from the 24th day onwards. Concentration of α-HBCD in liver also increased very rapidly up to a value of 150 $pg.g^{-1}$ lw after one day of exposure, which remained steady up to the end of exposure. It rapidly decreased during depuration and reached the initial value on the 24th day (Table II-5 and Figure II-5).

Table II- 5 : Concentration ($pg.g^{-1}$ lw) of α- and γ-HBCD in egg yolk, in abdominal fat and in liver

		α-HBCD			γ-HBCD		
Period	Day	Yolk	Abdominal fat	Liver	Yolk	Abdominal fat	Liver
Control	0	26	33	51 a	3.5[1] a	21 a	10[1] a
	39	2.0[1]	32	69 a	3.5[1] a	17 a	10[1] a
Exposure	1	6.2	25	150 bc	3.5[1] a	23 a	114 bc
	4	52	108	206 c	23 a	106 a	191 cd
	8	38	32	143 bc	79 a	248 b	158 c
	11	63	48	218 c	355 c	341 c	144 c
	16	57	76	235 c	380 c	437 d	183 cd
	21	77	69	156 bc	353 c	490 d	273 d
Depuration	22	53	62	212 c	329 c	520 d	59 ab
	24	32	86	69 a	214 b	457 d	10[1] a
	29	7.5	79	90 ab	13 a	309 bc	10[1] a
	39	3.3	80	102 ab	3.5[1] a	230 b	10[1] a
P-values							
Day			**			***	
Tissue			***			***	
Day*Tissue			NS			***	
RMSE			62.1			56.4	

Values are adjusted means (n=4)
Values within a column not followed by the same letter (a, b, c, d) differ ($P < 0.05$)
**, $P < 0.01$, ***, $P < 0.001$, NS, $P > 0.1$
RMSE, Root Means Square Error
[1] The values are below the limit of quantification (LOQ) and set at LOQ/2

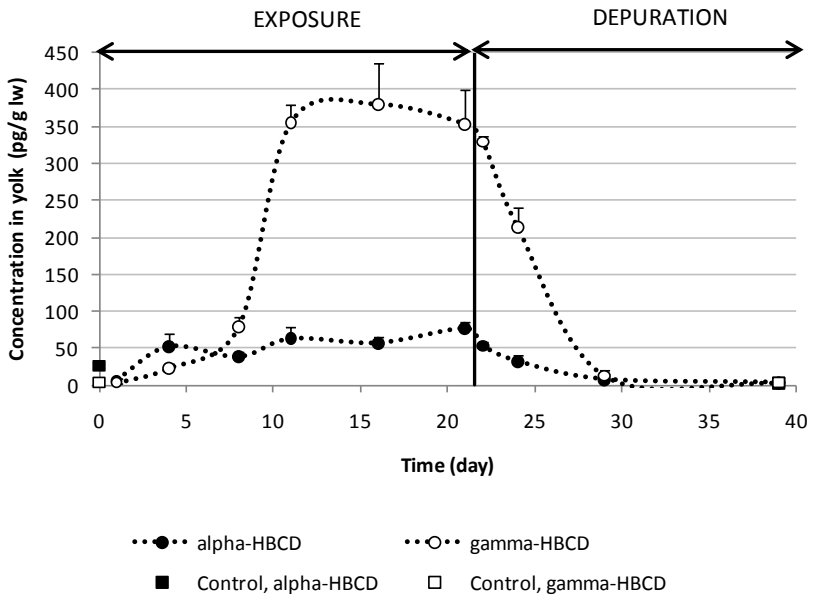
Table II-6: Parameters of the first order kinetics of γ-HBCD in egg yolk, in abdominal fat and in liver during depuration

	Model					$t_{1/2}$
	Y_{39}	a	k	R^2	RMSE	
Yolk	3.5	377	0.236	0.96	30	2.9
Abdominal fat	17	497	0.052	0.95	26	13
Liver	10	263	1.68	1.00	0.76	0.41

The model is $Y_t = Y_{39} + a \exp(-k\,t)$, where Y_t is the concentration of γ-HBCD in yolk, in abdominal fat or in liver (ng/g lw) at time = t (day)
Half-life ($t_{1/2}$, day) was calculated as ln (2)/k
R^2, coefficient of determination calculated as the square of the correlation coefficient between predicted and observed values; RMSE, root mean square error calculated as the root square of the sum of squares of differences between predicted and observed values divided by the number of observations

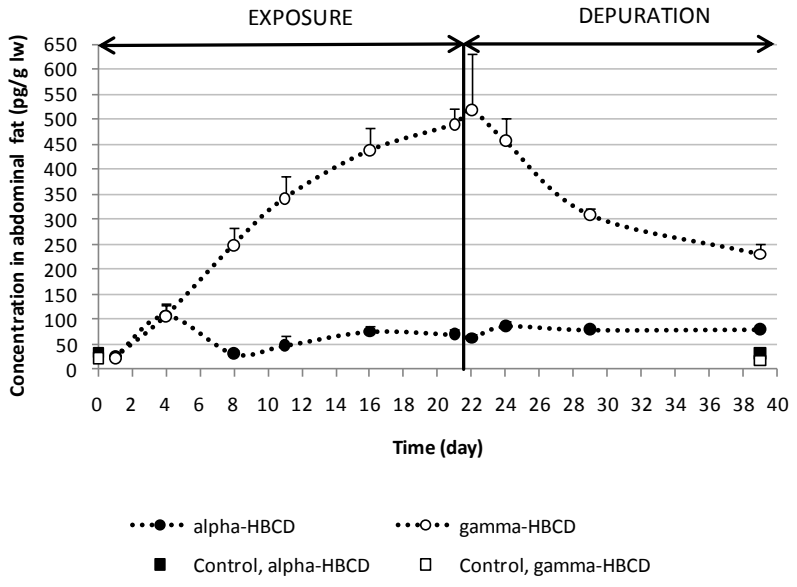
Tissue-specific estimates of the parameters of the first order kinetics of γ-HBCD are presented in table II-6. Equations were fitted with coefficients of determination above 0.95. Estimated half-lives were 2.9, 13 and 0.41 days in egg yolk, in abdominal fat and in liver, respectively.

Figure II- 3 : Kinetics of α- and γ-HBCD in egg yolk during exposure (21 days) and depuration (18 days)



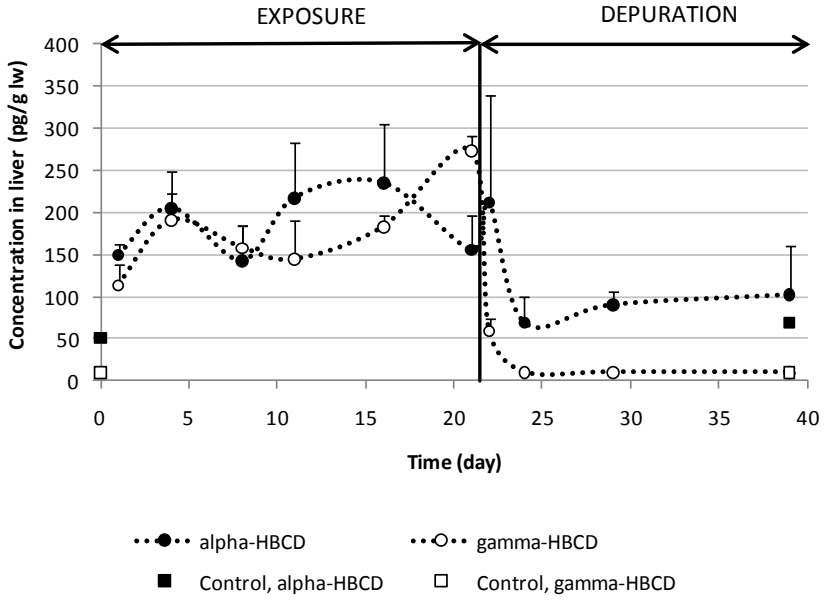
Values are adjusted means (n=4), vertical bars represent standard error

Figure II- 4 : Kinetics of α- and γ-HBCD in abdominal fat during exposure (21 days) and depuration (18 days)



Values are adjusted means (n=4), vertical bars represent standard error

Figure II- 5 : Kinetics of α- and γ-HBCD in liver during exposure (21 days) and depuration (18 days)



Values are adjusted means (n=4), vertical bars represent standard error

4.4. Discussion

Although detection frequency of HBCD in commercial hens' eggs is rather low (Hiebl and Vetter 2007, Goscinny et al 2011, Törnkvist et al 2011), concentrations as high as 90 ng HBCD.g^{-1} lw (Blake 2005) or 2000 ng HBCD.g^{-1} lw (Hiebl and Vetter 2007) were recorded in free-range hens' eggs. In the current study, the sum of α- and γ-HBCD in eggs reached at the most 380 pg.g^{-1} lw, which is by 200 to 5000 times lower than the extreme figures previously mentioned. In Belgium, Covaci et al (2009) detected HBCD in 3 and 8 out of 10 pooled samples of home-produced eggs in autumn and in spring, respectively. Relying on HBCD analysis in matrices likely to be ingested by free-foraging hens, the authors concluded that soil is a major source of HBCD for home-produced eggs. The maximum concentrations recorded by these authors were 62 and 39 ng HBCD.g^{-1} lw, respectively, for soils containing at the most 6.6 ng HBCD.g^{-1} dw. These values are by ten times higher than the maximum concentrations obtained in the current study, in which oral exposure to HBCD was adjusted to mimic the daily ingestion of 10 g of a moderately contaminated soil (10 ng.g^{-1} dw) by hens. This suggests that other sources of HBCD may be involved in free-range hens' egg contamination. Further investigations should be carried out relying on a better characterization of possible exposure sources, dose, isomer profile and duration.

In the current kinetic study, α-HCBD was present in significant amounts in egg yolk, in abdominal fat and in liver, despite the quasi absence of this compound in feed. This strongly suggests bioisomerization of γ- to α-HBCD in laying hens. Bioisomerization of γ- into α-HBCD was previously demonstrated in trout (Law et al 2006b) and in mice (Szabo et al 2010) orally given γ-HBCD. It was also evidenced in rat (Van der Ven et al 2006) and in trout (Haukas et al 2009) orally given a technical mixture of HBCD. However, in the current study, the β-isomer was not quantified in any tissue subsequently to γ-HBCD ingestion, in contrast to the results obtained in mice by Szabo et al (2010) and in trout by Law et al (2006b). The origin of this discrepancy is not clear, but different assumptions can be made. It may originate from specific biotransformation routes in hens compared to mice and fish, in which γ-HBCD may not be isomerized into β-HBCD. Alternatively, it could be related to the low level of γ-HBCD provided to hens in the current study (70 $ng.kg^{-1}$ body weight) compared to the literature references cited above. Indeed, in a 28-day repeated dose oral toxicity study of HBCD in rats, van der Ven et al (2006) reported that the intensity of γ-HBCD biotransformation was dependent on the dose ingested.

Bioaccumulation parameters of γ-HBCD can be estimated from the current results. For these calculations, lipid flows in egg yolk and the size of the lipid compartments recorded in the current study were used: a daily lipid excretion in egg yolk of 4.0 g, and a lipid content in abdominal fat and in liver of 64 and 3.4 $g.hen^{-1}$, respectively. Ingestion of γ-HBCD is of 123 $ng.day^{-1}$ and 2580 ng over the 21-day exposure period. Over the 21-day exposure period, the proportion of ingested γ-HBCD excreted *via* egg yolk and retained in abdominal fat and in liver were 0.74, 1.2 and 0.025 %, respectively. At steady state, carry-over rate (COR) of ingested γ-HBCD to egg yolk was estimated at 1.2%, and its bioconcentration factor (BCF), expressed as pg $\gamma\text{-HBCD}.g^{-1}$ lw in tissue relative to pg $\gamma\text{-HBCD}.g^{-1}$ in diet, at 0.4 and 0.3 in egg yolk and in liver, respectively. The current study thus confirms that the transfer of γ-HBCD to animal tissues is low, as previously demonstrated in mice and in fish (Law et al 2006b; Szabo et al 2010). Furthermore, it evidences its low COR to hen eggs. Part of this low transfer is due to bioisomerization of γ- to α-HBCD. However, it is clearly not the main way of γ-HBCD elimination since, over the 21-day exposure period, only 0.17% of ingested γ-HBCD was excreted as α-HBCD in egg yolk and 0.17 and 0.025% were recovered in abdominal fat and in liver, respectively. According to Szabo et al (2010), more than 80% of ingested γ-HBCD is absorbed in mice. Similarly, HBCD was found to be readily absorbed by trout (Haukas et al 2009). Therefore, as pointed out by Szabo et al (2010), biotransformation

and subsequent excretion of metabolites *via* feces through bile and *via* urine or accumulation in tissue is more likely to explain the low transfer of -HBCD observed in the current experiment. Indeed, in rats exposed to a commercial mixture of HBCD (Brandsma et al 2009) and *in vitro*, with liver microsomes (Zegers et al 2005), mono- and di-hydroxymetabolites of HBCD were identified. In addition, products of HBCD debromination were identified in abdominal fat of rats (Brandsma et al 2006) and in fish and chicken eggs (Hielb and Vetter 2007).

The estimated half-life of γ-HBCD in liver was 0.41 days. Such a very rapid γ-HBCD disposition and depuration in liver was previously reported in mice (Szabo et al 2010) and in trout (Haukas et al 2009). This is consistent with the 10-12 days necessary for γ-HBCD concentration in egg yolk to reach a steady state during exposure and to return to the background level during depuration. Indeed, this duration corresponds to the last growth phase of yolk before it is ovulated and laid. For lipophilic drugs or pollutants with half-life below 1 day in the central compartment, lipids and xenobiotic deposition in egg yolk were demonstrated to be directly proportional (Donoghue et al 1997, Fournier et al 2010). Consequently, a steady state in egg yolk for such compounds is achieved within 10-12 days (MacLachlan 2008). Unlike in egg yolk, a steady state in abdominal fat was still not reached at the end of the exposure period and depuration occurred at a slow rate, with an estimated half-life of 13 days. This slower kinetics of γ-HBCD in abdominal fat is in accordance the results obtained by Haukas et al (2009), who reported a slower elimination of all three HBCD isomers from muscle than from liver in trout given a commercial mixture of HBCD. Similarly, γ-HBCD concentration in muscle of trout was still not stabilized after 56 days of exposure to a diet contaminated with γ-HBCD (Law et al 2006b). These results, as well as the current observations, may be ascribed to a lower perfusion rate in muscle and in abdominal fat compared to liver.

As previously discussed, α-HBCD was quantified in all three tissues in the current experiment. During exposure, the ratio of γ- to α-HBCD in liver was 1 from the 1st day of exposure. However, this ratio was around 6 in egg yolk and in abdominal fat by the end of exposure. This high proportion of α-HBCD in liver suggests that isomerization of γ- to α-HBCD occurs in liver, which is recognized as a common site for biotransformation (Zegers et al 2005). During depuration, γ-HBCD concentration in abdominal fat decreased more rapidly than that of α-HBCD, with a ratio γ- to α-HBCD below 3 by the end of the experiment. Similar changes in the HBCD diastereomer pattern over time were observed in muscle tissue of trout (Haukas et al 2009). This could be a result of redistribution or biotransformation

processes. All these observations suggest that γ-HBCD eliminates more rapidly than α-HBCD. Thus, the current study confirms that γ-HBCD is rapidly biotransformed, while α-HBCD is more persistent, as previously demonstrated *in vitro* by means of a microsomal preparation of harbor seal liver (Zegers et al 2005) and *in vivo* in mice and in trout given γ-HBCD or α-HBCD (Law et al 2006b, Szabo et al 2010, Szabo et al 2011).

To conclude, the current study confirms that γ-HBCD is readily biotransformed and eliminated in laying hens and is partly isomerized into the more persistent α-HBCD.

4.5. Acknowledgements

The authors are grateful to the French Ministry for Food, Agriculture and Fisheries for financial support from the Compte d'Affectation Spéciale Développement Agricole et Rural (CASDAR project n°7106). The authors thank the staff of the Pôle d'Experimentation Avicole de Tours (PEAT) of Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) and of Unité de Recherche Animal et Fonctionnalités des Produits Animaux (URAFPA), for looking after the animals and feed preparation, and the staff of Qualité des Produits Animaux (QuaPA) of INRA for sample preparation.

4.6. References

Blake A (2005) The next generation of POPs: PBDEs and lindanes. IPEN working group http://www.ipen.org/ipenweb/documents/egg/flame_eggs.pdf. Accessed 06/2011

Brandsma SH, Van der Ven LTM, de Boer J, Leonards PEG (2009) Identification of hydroxylated metabolites of hexabromocyclododecane in wildlife and 28-days exposed Wistar rats. Environ Sci Technol 43:6058-6063

Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. OJEU L 221, 17/8/2002, 8-36

Commission Regulation (EU) No 143/2011 of 17 February 2011 amending Annex XIV to Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council on the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals ('REACH'). OJEU L 44, 18/2/2011, 2–6

Covaci A, Gerecke AC, Law RJ, Voorspoels S, Kohler M, Heeb NV, Leslie H, Allchin CR, de Boer J (2006) Hexabromocyclododecanes (HBCDs) in the environment and humans: A review. Environ Sci Technol 40:3679-3688

Covaci A, Roosens L, Dirtu AC, Waegeneers N,Van Overmeire I, Neels H, Goeyens L (2009) Brominated flame retardants in Belgian home-produced eggs: Levels and contamination sources. Sci Tot Environ 407: 4387-4396

DGAL (2009) Bilan des plans de surveillance et de contrôle mis en œuvre par la DGAL en 2008 dans le domaine de la sécurité sanitaire des aliments. http://agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/recueil2008_tt_public-_PSPC.pdf. Accessed 06/ 2011

Donoghue DJ, Schenck FJ, Hairston H, Podhorniak LV (1997) Modeling drug residue uptake by eggs: Evidence of a consistent daily pattern of contaminant transfer into developing preovulatory yolks. J. Food Protect 60:1251-1255

Fournier A, Feidt C, Dziurla MA, Grandclaudon C, Jondreville C (2010) Transfer kinetics to egg yolk and modeling residue recovered in yolk of readily metabolized molecules: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons orally administered to laying hens. Chemosphere 78:1004-1010

Goscinny S, Vandevijvere S, Maleki M, van Overmeire I, Windal I, Hanot V, Blaude M.N, Vleminckx C, Loco JV (2011) Dietary intake of hexabromocyclododecane diastereoisomers (□-, □- and □-HBCD) in the Belgian adult population. Chemosphere 84:279-288

Haukas M, Mariussen E, Ruus A, Tollefsen KE (2009) Accumulation and disposition of hexabromocyclododecane (HBCD) in juvenile rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). Aquat Toxicol 95:144-151

Hiebl J, Vetter W (2007) Detection of hexabromocyclododecane and its metabolite pentabromocyclododecene in chicken egg and fish from the official food control. J Agr Food Chem 55:3319-3324

Law RJ, Allchin CR, de Boer J, Covaci A, Herzke D, Lepom P, Morris S, Tronczynski J, de Wit CA (2006a) Levels and trends of brominated flame retardants in the European environment. Chemosphere 64: 187-208

Law K, Palace VP, Halldorson T, Danell R, Wautier K, Evans B, Alaee M, Marvin C, Tomy GT (2006b) Dietary accumulation of hexabromocyclododecane diastereoisomers in juvenile rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) I: Bioaccumulation parameters and evidence of bioisomerization. Environ Toxicol Chem 25:1757-1761

Law RJ, Herzke D, Harrad S, Morris S, Bersuder P, Allchin CR (2008) Levels and trends of HBCD and BDEs in the European and Asian environments, with some information for other BFRs. Chemosphere 73:223-241

MacLachlan DJ (2008) Transfer of fat-soluble pesticides from contaminated feed to poultry tissues and eggs. Brit Poultry Sci 49:290-298

Persistent Organic Pollutants Review Committee (2011) Hexabromocyclododecane, Draft Risk Management Evaluation. Prepared by the ad hoc working group on hexabromocyclododecane Persistent Organic Pollutants Review Committee, April 2011, 24 p.

http://chm.pops.int/Convention/POPsReviewCommittee/POPRCMeetings/POPRC6/POPRC6Followupcommunications/HBCDInvitationforcommentsonRME/tabid/2222/language/en-US/Default.aspx (accessed 06/2011)

Petersen M, Hamm S, Schäfer A, Esser U (2004) Comparative GC/MS and LC/MS detection of hexabromocyclododecane (HBCD) in soil and water samples. Organohalogen Comp 66:224-231

Remberger M, Sternbeck J, Palm A, Kaj L, Strömberg K, Brorström-Lunden E (2004) The environmental occurrence of hexabromocyclododecane in Sweden. Chemosphere 54:9-21

Roosens L, Abdallah MAE, Harrad S, Neels H, Covaci A (2009) Exposure to hexabromocyclododecanes (HBCDs) via dust ingestion, but not diet, correlates with concentrations in human serum: Preliminary results. Environ Health Persp 117:1707-1712

Stephens RD, Petreas MX, Hayward DG (1995) Biotransfer and accumulation of dioxins and furans from soil: chicken as model for foraging animals. Sci Tot Environ 175:253-273

Szabo DT, Diliberto JJ, Hakk H, Huwe JK, Birnbaum LS (2010) Toxicokinetics of the flame retardant hexabromocyclododecane gamma: effect of dose, timing, route, repeated exposure, and metabolism. Toxicol Sci 117:282-293

Szabo DT, Diliberto JJ, Hakk H, Huwe JK, Birnbaum LS (2011) Toxicokinetics of the flame retardant hexabromocyclododecane alpha: Effect of dose, timing, route, repeated exposure, and metabolism. Toxicol Sci 121:234-244

Törnkvist A, Glynn A, Aune M, Darnerud PO, Ankarberg EH (2011) PCDD/F, PCB, PBDE, HBCD and chlorinated pesticides in a Swedish market basket from 2005 - Levels and dietary intake estimations. Chemosphere 83:193-199

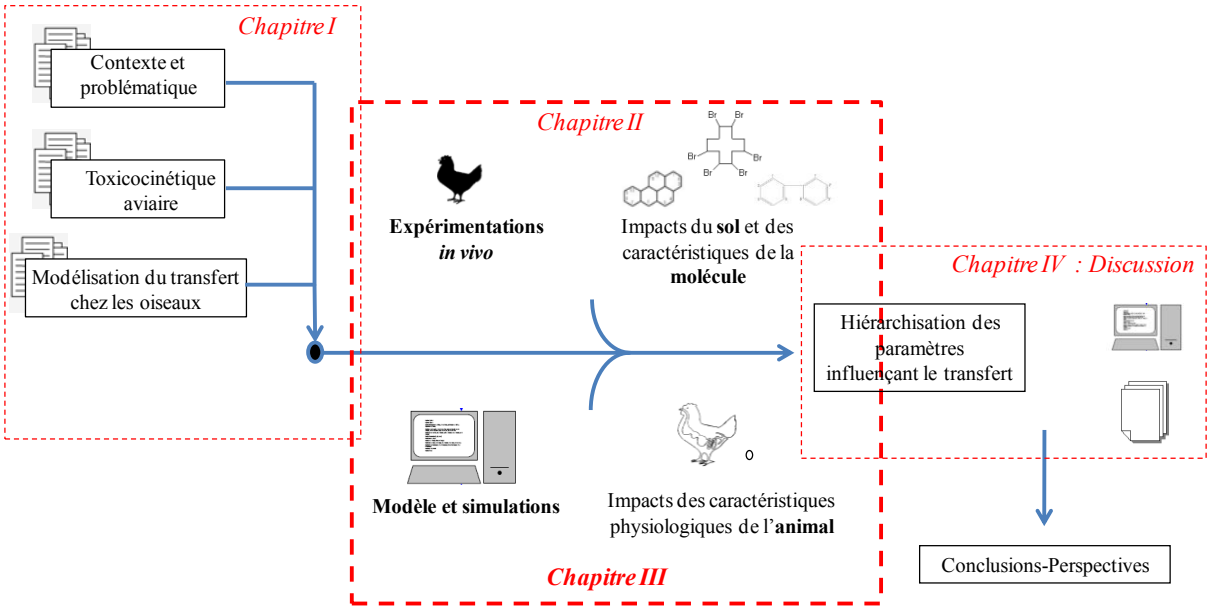
Tue NM, Sudaryanto A, Minh TB, Isobe T, Takahashi S, Viet PH, Tanabe S (2010) Accumulation of polychlorinated biphenyls and brominated flame retardants in breast milk from women living in Vietnamese e-waste recycling sites. Sci Tot Environ 408:2155-2162

US EPA (2010) Hexabromocyclododecane (HBCD) Action plan. U.S. Environmental Protection Agency, 18 August 2010, 12 pp. http://www.epa.gov/oppt/existingchemicals/pubs/actionplans/RIN2070-AZ10_HBCD%20action%20plan_Final_2010-08-09.pdf (accessed 06/2011)

Van der Ven LTM, Verhoef A, Van de Kuil T, Slob W, Leonards PEG, Wisser TJ, Hamers T, Herlin M, Hakansson H, Olausson H, Piersma A H, Vos JG (2006) A 28-day oral dose toxicity study enhanced to detect endocrine effects of hexabromocyclododecane in Wistar rats. Toxicol Sci 94:281-292

Yu Z, Peng P, Sheng G, Fu J (2008) Determination of hexabromocyclododecane diastereoisomers in air and soil by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. J Chromatogr A 1190:74-79

Zegers BN, Mets A, Van Bommel R, Minkenberg C, Hamers T, Kamstra JH, Pierce GJ, Boon JP (2005) Levels of hexabromocyclododecane in harbor porpoises and common dolphins from western European seas, with evidence for stereoisomer-specific biotransformation by cytochrome P450. Environ Sci Technol 39:2095-2100


Chapitre I
Contexte et problématique
Toxicocinétique aviaire
Modélisation du transfert chez les oiseaux
Chapitre II
Expérimentations in vivo
Impacts du sol et des caractéristiques de la molécule
Modèle et simulations
Impacts des caractéristiques physiologiques de l'animal
Chapitre III
Chapitre IV : Discussion
Hiérarchisation des paramètres influençant le transfert
Conclusions-Perspectives

Chapitre III : Impacts des caractéristiques physiologiques de l'animal sur le transfert : la modélisation, un outil de recherche

1. Introduction

La synthèse bibliographique précédente rapporte que plusieurs paramètres physiologiques, notamment liés à la ponte et à l'état d'engraissement, ont une incidence sur le transfert de POP à l'échelle de l'animal (Opdycke et Menzer, 1984 ; Henriksen *et al.*, 1996 ; Guruge et Tanabe, 1997, Luo *et al*., 2009). Aussi, les concentrations de POP dans l'œuf semblent être sensibles aux variations d'état physiologique de l'animal. Face à ce constat, plusieurs auteurs ont cherché à prendre en compte certains de ces paramètres lors des travaux de modélisation du transfert (Drouillard *et al*., 2001, 2007 ; Cortright *et al.*, 2009 ; Nichols *et al.*, 2010 ; MacLachlan, 2010).

Dans le cadre de cette thèse, la modélisation mathématique a été choisie afin d'explorer l'impact des variations de ces paramètres et de les hiérarchiser. Dans ce but, nous avons développé un modèle de transfert à l'échelle de l'animal, calibré sur un jeu de données de transfert d'un mélange de molécules, permettant la représentation des principaux traits physiologiques susceptibles de varier au cours de la vie d'une poule et d'avoir un effet sur le transfert de POP, c'est-à-dire sur les concentrations de POP dans les œufs et dans le tissu gras.

En accord avec la synthèse bibliographique (Chapitre I), nous avons opté pour la construction d'un modèle à compartiments, intégrant d'une part les caractéristiques de ponte, - à l'échelle du jour, en prenant en compte la formation du jaune - et à l'échelle de la vie de la poule, en prenant en compte la succession des saisons de ponte, et d'autre part les variations des caractéristiques corporelles, notamment l'état d'engraissement de la poule au cours de sa vie. La succession des processus physiologiques intervenant au cours de la vie d'une poule n'a pas encore été intégrée à notre connaissance.

2. Description du modèle

2.1. Principe général du modèle

Dans un module représentant les transferts de POP à l'échelle de l'animal, les quantités de POP présentes dans les différentes parties de la poule sont représentées par des compartiments et les échanges de POP entre les compartiments sont représentés par des flux qui dépendent de

la dynamique lipidique de l'animal. La charge lipidique de ces compartiments dépend de l'état physiologique de l'animal.

2.2. Facteurs physiologiques à représenter

2.2.1. Choix des facteurs physiologiques et leurs variations

Selon la bibliographie, les principaux paramètres physiologiques influençant le transfert de POP au sein de la poule pondeuse concernent la ponte et l'état d'engraissement de l'animal. Nous avons donc élaboré un modèle représentant certaines de ces caractéristiques, notamment : la dernière phase de croissance du jaune, le taux de ponte, la durée des périodes de ponte et des périodes de non-ponte, mais aussi le volume du tissu adipeux et la concentration lipidique du plasma.

Le choix de ces traits physiologiques est directement lié au principe retenu en première approche, selon lequel les POP lipophiles suivent les flux de lipides. Ces facteurs peuvent varier au cours de la vie d'une poule ou d'une poule à l'autre selon sa génétique ou son mode d'élevage (Tableau III-1).

Tableau III- 1 : Caractéristiques physiologiques identifiées[a] et représentées[b] dans le modèle

Facteurs	***Variation fonction de :***		
	l'âge	***l'état de ponte*** [c]	***l'individu***
PONTE			
Durée de la phase d'accroissement du jaune	o		X
Taille du jaune d'œuf pondu	o		X
Taux de ponte[d]	X		X
Vitesse de diminution du taux de ponte	X		X
Durée de la période de ponte	X		X
CARACTERISTIQUES CORPORELLES : état d'engraissement			
Taille du tissu adipeux	X	X	X
Teneur en lipides du plasma	X	X	X

[a]variation de la caractéristique physiologique identifiée mais non représentée dans le modèle (o)
[b]variation de la caractéristique physiologique identifiée et représentée dans le modèle (X)
[c]l'état de ponte distingue les périodes de ponte des périodes de mue (non-ponte)
[d]nombre d'œufs pondus par une poule sur une période de 100 jours

Deux périodes de mue sont représentées. Elles délimitent trois cycles (ou saisons) de ponte. La représentation de ces différents cycles permet de modéliser soit le cas de poules élevées durant une seule saison de ponte, soit le cas de poules conservées durant plusieurs cycles de production (comme c'est souvent le cas des élevages familiaux), et d'obtenir une simulation à l'échelle de la vie de la poule. Notons qu'actuellement en Europe, les poules ne subissent en élevage professionnel aucune mue, ou au maximum une seule.

2.2.2. Caractéristiques physiologiques et paramètres d'entrée

Les facteurs physiologiques résultent d'une combinaison de paramètres qui correspondent aux paramètres d'entrée du modèle (tableau III-2).

Tableau III- 2 : Paramètres impliqués dans la modélisation des caractéristiques physiologiques

Acronyme	*Description*	*Unité*
PONTE		
Durée de la phase d'accroissement du jaune		
k_growth_yolk	taux fractionnaire de croissance du jaune	$j^{-1}.g^{-1}$
alpha	constante de proportionnalité intervenant dans l'expression de la vitesse minimale de dépôt de jaune (V_min)	sd
Taille du jaune d'œuf pondu		
k_Y_min	masse du jaune d'œuf en début de dernière phase de croissance	g
k_Y_max	masse vers laquelle tend le jaune d'œuf en fin de croissance	g
k_Y_lip	part de lipides dans le jaune d'œuf	sd
Taux de ponte et période de ponte		
k_cycle[NumCycle,1]	valeur maximale prise par la longueur maximale de la série	j
k_cycle[NumCycle,2]	vitesse à laquelle les séries s'allongent	sd
k_cycle[NumCycle,4]	vitesse à laquelle la longueur de la série maximale diminue	sd
k_cycle[NumCycle,5]	âge auquel la longueur de la série a diminué de 50% par rapport à la longueur maximale	j
k_cycle[NumCycle,3]	âge auquel les séries sont à 50% de la longueur de la série maximale	j
Smin	durée minimale d'une série	
b_molting1 ; b_molting2	marque le début de la 1ère et 2ème mue respectivement	j
m_molting	durée de la chute de poids vif à partir du 1er jour de mue	j
e_molting1, e_molting2	marque la fin respectivement de la 1ère et la 2ème mue	j
CARACTERISTIQUES CORPORELLES : état d'engraissement		
Poids vif		
BW_min	poids vif initial en début de croissance	g
BW_max	poids vif maximal	g
k_BW_lost	part du poids vif maximal perdue lors d'un événement de mue	sd
t_half_BW	âge pour lequel la poule a atteint 50% de son poids vif maximal	j
k_growth_BW	vitesse de prise de poids vif durant la croissance de la poule	sd
Quantité de lipides dans tissu adipeux		
k_fat	part maximale du poids vif représentant les lipides du compartiment tissu adipeux hors mue	sd
k_fat_molting	part minimale du poids vif représentant les lipides du compartiment tissu adipeux durant la mue	sd
Quantité de lipides dans plasma		
k_central	part du poids vif représentant les lipides du compartiment central	sd
k_central_molting	part du poids vif représentant les lipides du compartiment central durant la mue	sd

j=jour ; sd = sans dimension.

Dans le cadre de cette étude exploratoire, seules quelques-unes de ces variations sont rendues possibles. Par exemple, les mécanismes et régulations hormonales impliqués dans ces

variations sont volontairement non modélisés afin de ne pas complexifier le modèle et de rester à l'échelle du jour, c'est-à-dire à l'échelle de la ponte quotidienne de l'œuf.

2.2.2.1. Production d'œufs

En raison des propriétés lipophiles des POP étudiés et de la répartition quasi exclusive des lipides de l'œuf dans le jaune (Sauveur, 1988), seul ce dernier est considéré dans la modélisation de la production d'œuf.

Croissance du jaune (Sauveur, 1988)

Comme cela a été évoqué dans la synthèse bibliographique, la formation du jaune d'œuf par dépôt quotidien entraîne la formation d'une grappe folliculaire. A un moment donné, plusieurs jaunes sont donc en croissance au sein de la poule, à un stade de croissance différent. En résumé, on peut considérer qu'un jaune entre en croissance chaque jour, avec un poids initial (*k_Y_min*). Une fois initialisé, le jaune croît *via* un dépôt concentrique de lipides quotidien jusqu'à atteindre un poids maximal (*k_Y_max*). Cette croissance suit un modèle logistique (Fournier *et al.*, 2010) défini par un taux d'accroissement du jaune *(k_growth_yolk*). En fin de croissance, le jaune est ovulé lorsqu'il est mature. Par soucis de simplification, il est admis dans ce modèle que le jaune est mature, et donc ovulé, lorsque la vitesse de dépôt de jaune devient inférieure à une vitesse de croissance minimale (*v_min*), fonction du taux d'accroissement (Figures III-1 et III-2).

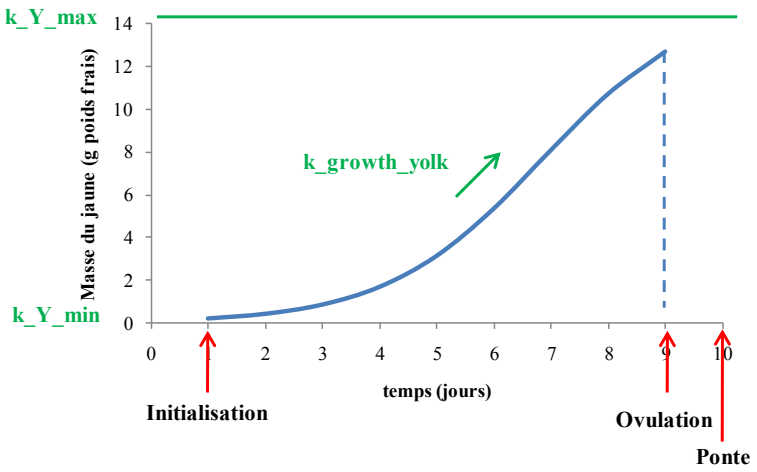


Figure III- 1 : Représentation graphique du principe de modélisation de l'accroissement du jaune d'œuf (en g de poids frais) au cours de sa dernière phase de croissance
Le poids suit une équation logistique définie par les paramètres *k_Y_min, k_Y_max* et *k_growth_yolk*, explicitée dans le Tableau III-6. Les paramètres sont définis dans le tableau III-2. Les conditions de déclenchement et l'enchainement des événements *Initialisation, Ovulation* et *Ponte* sont rappelés en Figure III-5.

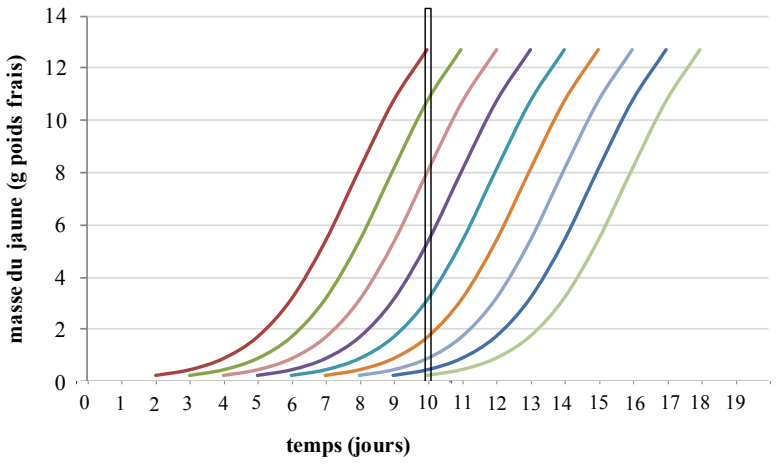


Figure III- 2 : Représentation de l'entrée successive des jaunes en croissance (avec un délai d'un jour)
Chaque ligne de couleur représente un jaune d'œuf en croissance. A t= 10 jours, 9 jaunes sont en dernière phase de croissance, à des stades différents.

Intensité de la ponte

Au cours de sa vie, une poule ne pond pas tous les jours (Sauveur, 1988), c'est pourquoi, nous avons modélisé l'évolution de la fréquence de ponte en fonction de l'âge de la poule. L'intensité de ponte est un indicateur correspondant au nombre d'œufs pondus quotidiennement par un effectif de 100 poules. Elle est la résultante des performances individuelles qui peuvent être exprimées en taux de ponte, c'est-à-dire en nombre d'œufs pondus par une poule sur une période de 100 jours. L'intensité de ponte d'un troupeau est fonction de différents paramètres propres à chaque poule. Ils concernent à la fois l'âge de la poule au démarrage et à la diminution de la ponte, la longueur des séries[29] et la fréquence des jours de pause (Larbier et Leclercq, 1992). La courbe d'intensité de ponte est établie par les sélectionneurs pour renseigner les performances de ponte d'une souche de poule. La courbe d'intensité de ponte présente trois parties :

- une partie ascendante en début de ponte qui correspond à l'entrée en ponte décalée des individus d'un même troupeau : plus le pic de ponte est atteint rapidement, plus le troupeau est homogène,

- un pic de ponte correspondant à la productivité maximale du troupeau,

- une partie descendante, avec une diminution plus ou moins rapide de l'intensité de ponte en fonction de l'âge des poules, due à une diminution de l'activité folliculaire. La phase d'accroissement du jaune dure plus longtemps, les jaunes ovulés sont plus gros mais moins

[29] Une « série » est une période durant laquelle la poule pond un œuf chaque jour. Elle est encadrée par des jours sans ponte, appelés « jours de pause », résultant d'un contrôle hormonal. Le terme « séquence » est parfois utilisé à la place du mot « série ». Les deux termes sont utilisés dans le modèle.

nombreux. Il en résulte une diminution de la quantité totale de lipides déposés par jaune. Cette baisse d'activité se traduit par une diminution de la longueur des séries et un allongement des temps de pause. Dans le modèle, pour des raisons de simplification d'écriture, les pauses sont toutes d'une durée de un jour, mais leur fréquence est augmentée lorsque le taux de ponte diminue.

Les paramètres intervenant dans la représentation du taux de ponte de la poule sont relatifs à la longueur de la série (Figure III-3, Tableau III-2):

-l'acquisition de la maturité : moment à partir duquel la poule débute sa ponte *(*indirectement représenté par *k_cycle[numcycle,3])*

-la vitesse d'acquisition d'un rythme régulier de ponte *(k_cycle[numcycle,2])*

-la longueur maximale des séries *(k_cycle[numcycle,1])* : c'est-à-dire la longueur de la période durant laquelle la poule pond chaque jour sans interruption.

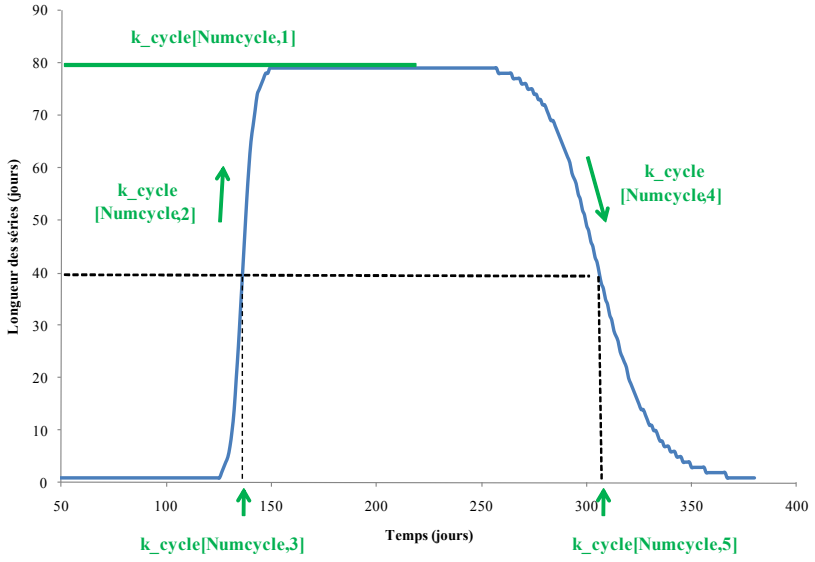


Figure III- 3 : Représentation graphique du principe de modélisation de l'évolution de la longueur de la série (en jours) en fonction de l'âge de la poule

Les paramètres sont définis dans le tableau III-2. La longueur de série est définie par un jeu d'équations décrites dans le Tableau III-6, utilisant les paramètres de la matrice *k_cycle.* L'intervalle de temps durant lequel la longueur de la série est égale à *k_cyle[numcycle, 1]* correspond à la période du cycle de ponte où la fréquence de ponte est maximale et régulière.

Afin de rendre compte de la diminution du taux de ponte après le pic, la longueur de la série diminue lorsque l'âge de la poule augmente. Cette évolution dépend elle-même de différents paramètres :

-l'acquisition de la sénescence : moment à partir duquel la poule voit la régularité de sa ponte quotidienne se détériorer *(k_cycle[numcycle,5])*

-la vitesse de diminution de la longueur des séries *(k_cycle[numcycle,4])*.

L'évolution du taux de ponte est variable d'une saison de ponte à l'autre. La valeur des paramètres décrits précédemment est donc propre à une saison de ponte.

Mues et accidents de ponte dus à un stress

Chez les oiseaux, les périodes de mue alternent avec les saisons de ponte. Les mues peuvent être la résultante d'une régulation hormonale naturelle ou bien être provoquées par un stress (diminution de l'éclairement ou de la nourriture à disposition) ou une maladie (voir partie 2.2.2.2). La perte des plumes s'accompagne alors d'un arrêt de la ponte. Dans le modèle, on considère qu'aucun jaune n'entre en croissance durant cette période (Figure III-4). Lorsque les plumes repoussent, la ponte reprend (Sauveur, 1988).

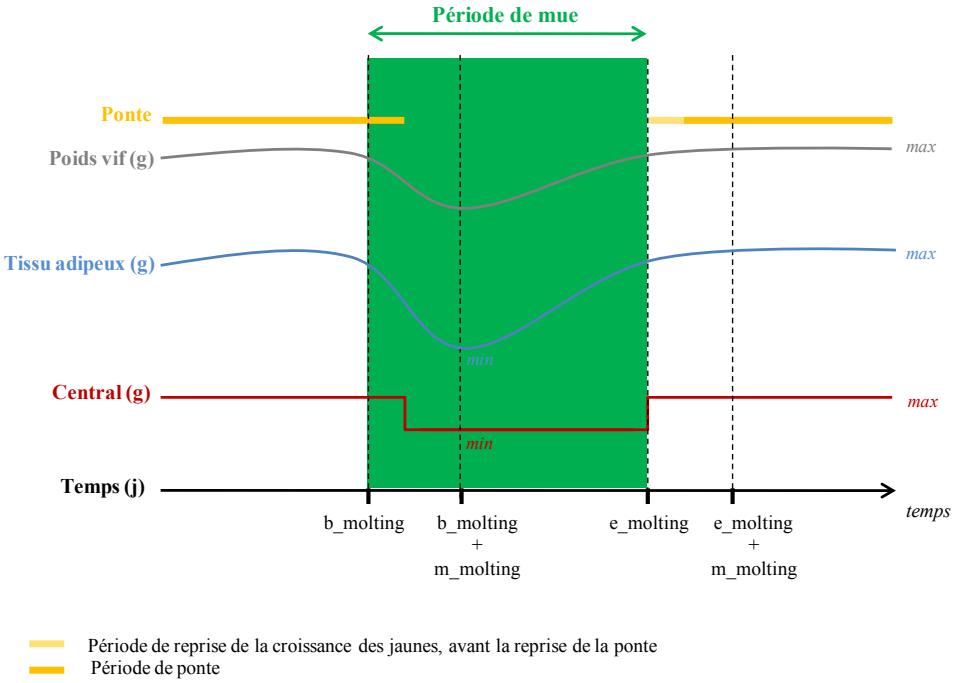


Figure III- 4 : Evolution qualitative schématique des caractéristiques physiologiques modifiées lors d'une période de mue (d'après Sauveur, 1988)
b_molting : marque le début de la mue *; m_molting* : durée de la chute de poids vif à partir du 1er jour de mue ; *e_molting* : marque la fin de la mue, *min* : valeur minimale prise pendant la mue (à t= *b_molting* + *m_molting*) par le caractère considéré ; *max* : valeur maximale prise par le caractère considéré. Les lignes « Tissu adipeux » et « Central » représentent l'évolution des quantités de lipides dans les compartiments du même nom. Le compartiment « central » regroupe le plasma, le foie et les muscles.

Le logigramme présenté en figure III-5 résume l'ensemble des étapes liées à la croissance du jaune menant à la ponte d'un œuf.

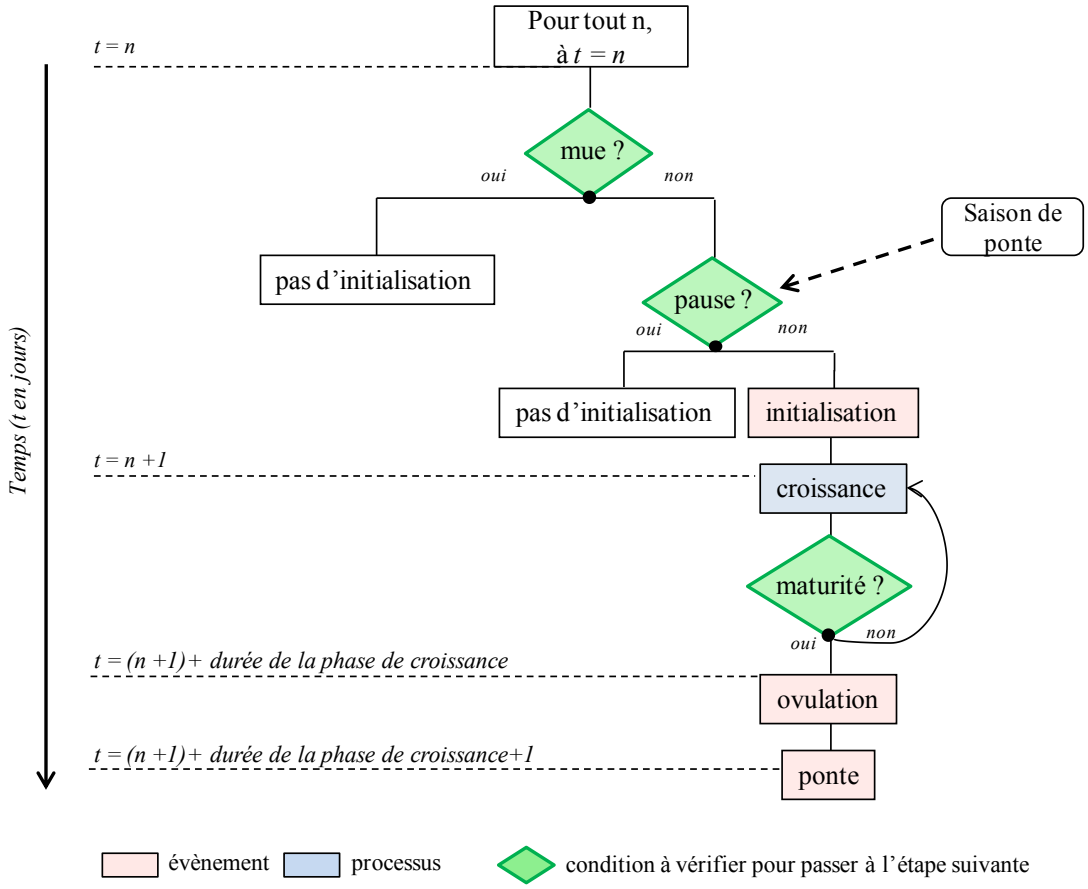


Figure III- 5 : Logigramme présentant les conditions physiologiques et la succession des évènements et processus liées à la croissance du jaune menant à la ponte d'un œuf

A tout temps t (*t=n*), une succession de conditions est testée par le modèle permettant de suivre une des branches du logigramme. Selon si les conditions sont remplies ou non, la progression des événements menant à la ponte d'un œuf s'arrête avant l'initialisation ou se poursuit jusqu'à la ponte.

2.2.2.2. Evolution du tissu adipeux et de la fraction lipidique plasmatique

Le poids vif de la poule évolue au cours de sa croissance et de ses amaigrissements survenant suite aux restrictions alimentaires des programmes de déclenchement de la mue (Figure III-4). La mue est un phénomène physiologique naturel de renouvellement des plumes, pouvant durer 16 semaines et qui s'accompagne d'un arrêt de ponte. En élevage, ce phénomène peut être provoqué en fin de cycle de production pour restaurer, lors du cycle suivant, les performances de ponte dégradées en fin de saison. Les poules sont alors conservées pour leur production lors de la saison suivante (Sauveur, 1988). Différentes méthodes de déclenchement de la mue peuvent être pratiquées et la durée des mues provoquées varie de 3 à 10 semaines

selon les pratiques (Sauveur, 1988; Mansoori *et al.*, 2007). Le principal facteur déclencheur étant une modification alimentaire (carence volontaire, rationnement…), le début de la mue, d'une durée de 10 à 15 jours (*m_molting*), s'accompagne d'une chute de poids. En deuxième partie de mue (de *b_molting*+*m_molting* à *e_molting*), la poule tend à retrouver son poids de production, conduisant à une restauration de ses performances après la mue (Sauveur, 1988 ; Mansoori *et al.*, 2007).

En première approche, le poids du tissu adipeux est exprimé comme étant une fraction (*k_fat*) du poids vif de l'animal (Thuy *et al.*, 2007). La chute de poids pendant la mue étant majoritairement due à une perte de tissu adipeux (Sauveur, 1988 ; Aksit *et al.,* 2003), la fraction du poids vif représentant la taille du tissu adipeux varie durant la mue (*k_fat_var*).

La fraction lipidique du plasma est prise en compte dans le compartiment dit « central » dont la taille est aussi arbitrairement exprimée en fonction du poids vif. Le niveau de lipides dans le plasma, et plus particulièrement de VLDL, est lié à la formation du jaune d'œuf et donc aux performances de ponte (Balnave *et al.,* 1971 ; Bacon *et al.,* 1978 ; Akiba *et al.*, 1982 ; Burnham *et al.*, 2003 in MacLachlan, 2010). Dans notre modèle, la taille du pool lipidique dans le compartiment central est proportionnelle au poids vif maximal en période de ponte et est fixée à une valeur minimale en l'absence de jaune en croissance au sein de la poule. La figure III-4 schématise les évolutions de ces paramètres physiologiques au cours de la mue.

2.3. Représentation des étapes ADME lors du transfert de POP au sein de la poule

Les étapes du transfert de contaminants au sein de la poule pondeuse ont été décrites dans la synthèse bibliographique. La présente partie précise les mécanismes ou hypothèses retenues pour modéliser les flux de contaminants mis en jeu.

2.3.1. Absorption

La représentation des mécanismes intervenant au niveau digestif n'est pas détaillée faute de données. Aussi l'accessibilité et l'absorption sont-elles caractérisées uniquement par des paramètres de proportionnalité qui permettent de moduler la quantité de POP absorbés, atteignant le compartiment central.

2.3.2. Distribution

L'hypothèse de base retenue pour la représentation des flux de contaminants est l'application du principe de diffusion passive de la molécule, du compartiment le plus concentré vers le compartiment le moins concentré (en concentration normée lipides). Ce principe est appliqué pour assurer les échanges entre le compartiment central et le tissu adipeux. Cela traduit l'hypothèse d'une dynamique des POP en lien avec celle des lipides. Les différents mécanismes et transporteurs mis en jeu ne sont pas distingués en première approche, en dépit d'une prise en charge des POP modulée par la nature de la fraction lipidique considérée et les caractéristiques de la molécule (Borlakoglu *et al.*, 1989 ; Poulin et Krishnan, 1995 ; Poulin *et al.*, 2001). Ce choix est fait en raison du manque de données chez la poule. Les différences de distribution liées à la molécule et à la nature des différents flux seront donc agrégées dans le paramètre *k* pilotant le flux.

2.3.3. Voies d'élimination : métabolisme et ponte

Dans le modèle, les flux de sortie du compartiment central (métabolisme, ponte) sont indépendants de la concentration de POP dans le compartiment central. En effet, nous considérons que ces voies ne sont pas saturables et que les flux ne sont donc fonction que de la quantité de POP présente dans le compartiment central.

Selon Donoghue *et al.* (1997) le dépôt d'un contaminant lipophile dans le jaune se produit en même temps que le dépôt de jaune *via* un transport avec les lipoprotéines (Borlakoglu *et al.*, 1989). De ce fait, les dépôts de contaminant et de jaune sont supposés être strictement proportionnels lors des jours d'exposition. Par conséquent, le dépôt de contaminant suit également un modèle logistique.

Ainsi, notre modèle n'est pas mécaniste en ce qui concerne la représentation des étapes ADME, même si chaque phénomène est représenté par un flux bien individualisé.

2.4. Structure du modèle

2.4.1. Compartimentation

Le modèle consiste en un ensemble de flux de POP entre des compartiments, dont la taille est gérée par des sous-modules physiologiques. Pour des raisons déjà évoquées par Van Eijkeren *et al.* (2006), en particulier en raison de la restriction à quelques tissus des données de

contamination de POP, le nombre de compartiments du modèle est limité, afin de minimiser le nombre de paramètres inconnus à déterminer de façon empirique. Ainsi sont construits : un compartiment de distribution (le compartiment central, correspondant à la quantité de lipides présente dans le plasma et les principaux tissus très irrigués), et un compartiment de stockage (le tissu adipeux, correspondant au gras abdominal, le gras sous-cutané, la graisse présente dans les organes peu vascularisés, les plumes, la moelle…), mais aussi un compartiment transitoire de sortie, qui est démultiplié et qui représente les jaunes préovulatoires en dernière phase de croissance. Tous les compartiments sont caractérisés à un instant t, par une quantité de POP et une quantité de lipides. Les concentrations des compartiments (en ng POP.g^{-1} lipides) correspondent au rapport de ces quantités.

2.4.2. Flux d'échange

Au pas de temps du jour, le modèle contrôle si la poule est en période d'exposition ou non. En cas d'exposition, une quantité de POP (*POP_amount_ingested*) est ingérée quotidiennement puis en partie absorbée (*POP_absorption*) pour rejoindre le compartiment central (*POP_central*). Celui-ci peut établir des échanges avec le compartiment de stockage (*POP_fat*), jusqu'à l'atteinte d'un équilibre des concentrations entre les deux compartiments. Deux voies d'élimination sont considérées : un transfert des contaminants dans les jaunes d'œuf en formation (*POP_Y_growth*), en lien avec le dépôt du jaune, et une élimination regroupant sans distinction les phénomènes de métabolisme, de retour biliaire et d'excrétion urinaire (*POP_clearance*).

Les sous-modules physiologiques représentent principalement l'état d'engraissement et la ponte. Ces caractéristiques physiologiques ont été décrites dans la partie 2.2. de ce chapitre. Le système représenté en figure III-6 est rendu dynamique par un ensemble de compartiments et de variables qui sont décrits par un jeu d'équations (Tableaux III-3, III-4 et III-6, III-7). Les événements permettant de contrôler les étapes de la formation de l'œuf, de la ponte et de la mue sont rappelés dans le tableau III-5 et l'ensemble des paramètres est présenté dans le tableau III-8.

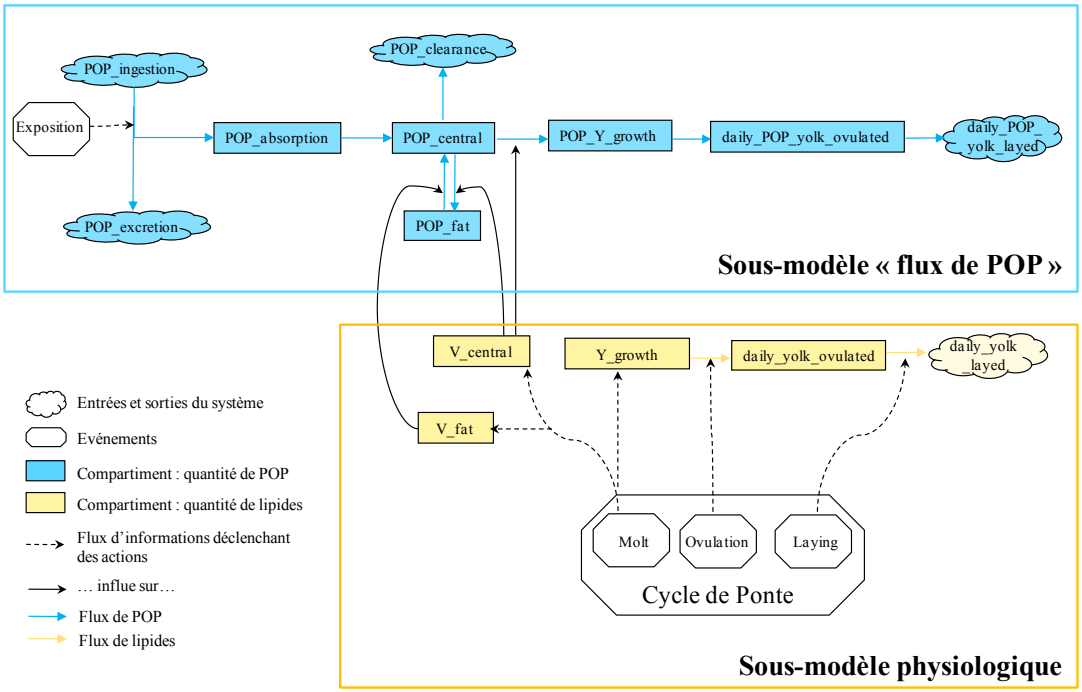


Figure III- 6 : Diagramme du modèle
Les acronymes sont définis dans les tableaux III-3, III-4 et III-5.

Tableau III- 3 : Description des variables et compartiments relatifs à la physiologie de la poule

Acronyme	*Description*	*Unité*	*Valeur initiale*
NumCycle	indique le numéro de la saison de ponte	sd	1
Molting	indicateur de la mue	{0,1}	0
Variables impliquées dans la ponte			
MaxEgg	nombre maximal de jaunes entrant en croissance quotidiennement	j	1
V_min	vitesse minimale de formation du jaune en-dessous de laquelle le jaune est considéré mûr pour être ovulé	$g.j^{-1}$	
day_pause	absence de ponte ce jour	{0,1}	0
sequence_length	longueur de la série	j	
Smax_length	longueur de la série maximale	j	
Expression du poids vif			
BW	poids vif de la poule au temps t	g	
BW_min_molting	poids vif minimal atteint pendant la mue	g	
Quantité de lipides dans les différents tissus			
k_fat_var	part du poids vif représentant les lipides du compartiment tissu adipeux	sd	
V_fat	quantité de lipides dans le tissu adipeux	g	
V_central	quantité de lipides dans le compartiment central	g	
Y_growth [1..20]	dépôt cumulé de constituants du jaune pour un jaune i donné	g	0
Growth_in_yolk[1..20]	dépôt cumulé de constituants du jaune pour un jaune i donné (=Y_growth[1..20])	g	0
daily_yolk_ovulated	quantité de jaune ovulé au temps t	g	0
daily_yolk_layed	quantité de jaune pondu au temps t	g	0
Box_yolk	dépôt cumulé de constituants du jaune pour l'ensemble des jaunes pondus par la poule (de t = 0 à t)	g	0

j=jour ; sd = sans dimension.

Tableau III- 4 : Description des variables et compartiments relatifs aux flux de polluants

Acronyme	*Description*	*Unité*	*Valeur initiale*
Contamination	indique s'il y a contamination ou non	{0,1}	0
Quantités de POP dans les différents compartiments			
POP_ingestion	quantité de POP ingérée	ng	0
POP_absorption	quantité de POP absorbée	ng	0
POP_excretion	quantité de POP non absorbée, directement excrétée *via* les fèces	ng	0
POP_central	quantité de POP présente dans le compartiment central	ng	0
POP_fat	quantité de POP présente dans le compartiment tissu adipeux	ng	0
POP_clearance	quantité cumulée de POP éliminée du compartiment central (par métabolisme, retour biliaire…)	ng	0
POP_Y_growth[i]	quantité de POP présente dans le jaune d'œuf i en formation	ng	0
daily_POP_yolk_ovulated	quantité de POP excrétée dans le jaune ovulé au temps t	ng	0
daily_POP_yolk_layed	quantité de POP excrétée dans le jaune pondu au temps t	ng	0
Box_POP_yolk	quantité cumulée de POP éliminée *via* les jaunes d'œuf pondus par la poule (de t=0 à t)	ng	0
Concentrations de POP dans différents tissus			
concentration_POP_fat	concentration de POP dans le compartiment gras	$ng.g^{-1}$	0
concentration_POP_central	concentration de POP dans le compartiment central	$ng.g^{-1}$	0
concentration_POP_yolk[i]	concentration de POP dans le jaune i en formation	$ng.g^{-1}$	0
daily_concentration_POP_yolk	concentration de POP dans le jaune pondu au jour t	$ng.g^{-1}$	0

Tableau III- 5 : Description des événements pilotant l'exposition de la poule aux POP et les variations physiologiques de la poule

Acronyme	*Description*	*Paramètres d'entrée / conditions à réaliser*
Exposition	détermine la période durant laquelle la poule ingère une dose quotidienne de POP	si ti_contamine≤ t <ti_contamine+d_contamine, Contamination=1. sinon Contamination=0.
Molt	déclenche la mue	si b_molting ≤ t ≤ e_molting, Molting=1. sinon Molting=0.
Cycle	détermine le numéro du cycle de ponte, ce qui indique quel jeu de paramètres caractérise la fréquence de ponte	
Initialization	déclenche l'entrée en croissance d'un jaune, au maximum, par jour	si t ≠ daypause et si Molting=0
Ovulation	stoppe la croissance du jaune lorsqu'il est considéré comme mûr	si Growth_in_yolk < V_min

Les acronymes sont définis dans les tableaux III-3 et III-8.

Tableau III- 6 : Equations des variables et compartiments impliqués dans la représentation de la physiologie de la poule

	Ponte	*Aucun jaune n'entre en croissance*		*Ponte*
Acronyme	b	b+m	e	e+m
Expression du poids vif				
BW	BW_min+(BW_max-BW_min)*t^k_growth_BW/(t_half_BW^k_growth_BW+t^k_growth_BW)	BW_max+(b_molting*(BW_max-BW_min_molting)/m_molting)-((BW_max-BW_min_molting)/m_molting)*t	((BW_max-BW_min_molting)/((e_molting+m_molting)-(b_molting+m_molting)))*t+BW_max-(e_molting+m_molting)*(BW_max-BW_min_molting)/(e_molting+m_molting-(b_molting+m_molting))	BW_min+(BW_max-BW_min)*t^k_growth_BW/(t_half_BW^k_growth_BW+t^k_growth_BW)
BW_min_molting	-	BW_max-(k_BW_lost*BW_max)		-
Quantité de lipides dans les différents tissus				
k_fat_var	k_fat	k_fat+((k_fat-k_fat_molting)/(m_molting))*b_molting-(k_fat-k_fat_molting)/(m_molting)*t	k_fat-((k_fat-k_fat_molting)/((e_molting+m_molting)-(b_molting+m_molting)))*(e_molting+m_molting)+((k_fat-k_fat_molting)/((e_molting+m_molting)-(b_molting+m_molting)))*t	k_fat
V_fat	k_fat_var*BW			
V_central	k_central*BW_max	k_central_molting*BW_min_molting		k_central*BW_max
Y_growth [1..20]	k_growth_yolk*Y_growth[i]*(k_Y_max-Y_growth[i])			k_growth_yolk*Y_growth[i]*(k_Y_max-Y_growth[i])
Growth_in_yolk[1..20]	k_growth_yolk*Y_growth[i]*(k_Y_max-Y_growth[i])			
daily_yolk_ovulated	Y_growth[i]			
daily_yolk_layed	daily_yolk_ovulated			
Box_yolk	Box_yolk+daily_yolk_ovulated			
Croissance et ponte du jaune				
day_pause	t+sequence_length			
sequence_length	trunc(Smin+(Smax_temp-Smin)*(t^k_cycle[numCycle,2]/(k_cycle[numCycle,3]^k_cycle[numCycle,2]+t^k_cycle[numCycle,2])))			
Smax_length	k_cycle[numCycle,1]+(Smin-k_cycle[numCycle,1])*((t^k_cycle[numCycle,4])/(k_cycle[numCycle,5]^k_cycle[numCycle,4]+t^k_cycle[numCycle,4]))			
V_min	alpha*k_growth			

Les acronymes sont définis dans les tableaux III-3 et III-8 ; b: *b_molting*; m: *m_molting; e: e_molting.*

Tableau III- 7 : Expressions des quantités et concentrations de POP dans les différents compartiments

Acronyme	*Equation*
Quantités de POP dans les différents compartiments	
POP_ingestion	k_matrix_concentration*k_matrix_amount_ingested*contamination
POP_absorption	k_absorption*POP_ingestion*k_matrix_bioavailability
POP_excretion	(1-k_absorption)*POP_ingestion*k_matrix_bioavailability
POP_central	POP_absorption+k_mobilization*(POP_fat/V_fat)-k_storage*(POP_central/V_central)-k_elimination_clearance*POP_central-k_elimination_yolk*k_Y_lip * (POP_central/V_central)*(Growth_in_yolk[i])
POP_fat	k_storage*(POP_central/V_central)-k_mobilization*(POP_fat/V_fat)
POP_clearance	k_elimination_clearance * POP_central
POP_Y_growth[i]	k_elimination_yolk*k_Y_lip * (POP_central/V_central)*(Growth_in_yolk[i])
daily_POP_yolk_ovulated	POP_Y_growth[i]
daily_POP_yolk_layed	POP_yolk_delay
Box_POP_yolk	Box_POP_Yolk+daily_POP_yolk_ovulated
Concentrations de POP dans différents tissus	
Concentration_POP_fat	POP_fat/V_fat
Concentration_POP_yolk[i]	POP_Y_growth[i]/(daily_yolk_ovulated*k_Y_lip)
daily_concentration_POP_yolk	daily_POP_yolk_layed/(daily_yolk_layed*k_Y_lip)

Les acronymes sont définis dans les tableaux III-3, III-4 et III-8.

Tableau III- 8 : Description de l'ensemble des paramètres d'entrée du modèle

Acronyme	*Description*	*Unité*
PONTE		
Durée de la phase d'accroissement du jaune		
alpha	constante de proportionnalité intervenant dans l'expression de la vitesse minimale de dépôt de jaune	sd
k_growth_yolk	taux fractionnaire de croissance du jaune	$j^{-1}.g^{-1}$
Taille du jaune d'œuf pondu		
k_Y_min	taille du jaune d'œuf en début de dernière phase de croissance	g
k_Y_max	taille vers laquelle tend le jaune d'œuf en fin de croissance	g
Taux de ponte et période de ponte		
k_cycle[NumCycle,1]	valeur maximale prise par la longueur maximale de la série	j
k_cycle[NumCycle,2]	vitesse à laquelle les séries s'allongent	sd
k_cycle[NumCycle,4]	vitesse à laquelle la longueur de la série maximale diminue	sd
k_cycle[NumCycle,5]	âge auquel la longueur de la série a diminué de 50% par rapport à la longueur maximale	j
k_cycle[NumCycle,3]	âge auquel les séries sont à 50% de la longueur de la série maximale	j
Smin	durée minimale d'une série	
b_molting1 ; b_molting2	marque le début respectivement de la 1ère et la 2ème mue	j
m_molting	durée de la chute de poids vif à partir du 1er jour de mue	j
e_molting1 ; e_molting2	marque la fin respectivement de la 1ère et la 2ème mue	j
CARACTERISTIQUES CORPORELLES : poids vif et teneurs en lipides		
Poids vif		
BW_min	poids vif initial en début de croissance	g
BW_max	poids vif maximal	g
k_BW_lost	part du poids vif maximal perdue entre la période de ponte et la période de mue	sd
t_half_BW	âge auquel la poule a atteint 50% de son poids vif maximal	j
k_growth_BW	vitesse de prise de poids vif durant la croissance de la poule	sd
Quantité de lipides du tissu adipeux		
k_fat	part du poids vif représentant les lipides du compartiment tissu adipeux	sd
k_fat_molting	part minimale du poids vif représentant les lipides du compartiment tissu adipeux durant la mue	sd
Teneur en lipides du jaune d'œuf		
k_Y_lip	part de lipides dans le jaune d'œuf	sd
Quantité de lipides du plasma		
k_central	part du poids vif représentant les lipides du compartiment central	sd
k_central_molting	part minimale du poids vif représentant les lipides du compartiment central durant la mue	sd
EXPOSITION		
d_contamine	durée de la période de contamination	j
ti_contamine	premier jour de contamination	j
k_matrix_amount_ingested	quantité de matrice ingérée	g
k_matrix_bioavailability	fraction de POP biodisponible dans la matrice ingérée	j^{-1}
k_matrix_concentration	concentration de POP dans la matrice ingérée	$ng.g^{-1}$
FLUX de POP		
k_absorption	coefficient d'absorption	j^{-1}
k_elimination_clearance	coefficient d'élimination du compartiment central (métabolisme, retour biliaire…)	j^{-1}
k_elimination_yolk	coefficient d'élimination du compartiment central vers les jaunes d'œufs	j^{-1}
k_mobilization	coefficient de transfert du compartiment gras vers le compartiment central	j^{-1}
k_storage	coefficient de transfert du compartiment central vers le compartiment gras	j^{-1}

j=jour ; sd = sans dimension.

2.5. Développement du modèle

Le modèle est développé sous le logiciel ModelMaker 4.0 (Modelkinetix, Oxford, UK). La méthode d'intégration numérique Runge-Kutta 4 a été utilisée avec un pas de temps fixe d'un jour, de t = 0 à t = 500 jours d'une part et de t = 0 à t = 1000 jours d'autre part. La formation du jaune d'œuf (qui a lieu en dernière phase de croissance) et la ponte d'un œuf unique par jour implique un pas de temps de un jour. Les plages de temps utilisées correspondent à la durée d'élevage d'une poule, comprenant le temps de sa croissance additionné d'une ou trois saisons de ponte : simulations sur respectivement 500 et 1000 jours.

2.5.1. Calibration du modèle physiologique

La quantité de lipides attribuée à chacun des compartiments (« central » et « tissu adipeux ») a été évaluée selon les tissus représentés par chacun d'eux. Le compartiment central regroupe le plasma sanguin, le foie et le muscle, en accord avec les options prises par MacLachlan (2010) dans son modèle de transfert de xénobiotiques chez les volailles. Le contenu de lipides du compartiment central est déterminé à partir des teneurs en lipides de chacun des tissus rapportées dans la bibliographie (Tableau III-9).

D'après Renema *et al.* (1999), le gras corporel représente 16 à 18% du poids vif chez la poule pondeuse. Or, la part de lipides comptée dans le compartiment central n'est que de 0,6 à 2,21%. Le contenu lipidique du compartiment adipeux est déterminé comme étant la différence entre le gras corporel total et le contenu lipidique du compartiment central. Il représente alors en moyenne entre 15 et 17% du poids vif, soit pour une poule de 1840 g : entre 276 et 312 g. Ces valeurs correspondent à celles utilisées par Van Eijkeren *et al.* (2006) dans leur modèle.

Tableau III- 9 : Descriptif du contenu du compartiment « central »

	Masse du tissu g/poule		***Lipides g/poule***		***Lipides % du poids vif[a]***		
Tissus	*moyenne*	***Références***	*min*	*max*	*min*	*max*	***Références***
Plasma	50	Uijttenboorgaard, 1985*; MacLachlan, 2010	0,08	5,4	0,004	0,30	Akiba *et al.*, 1982; Burnham *et al.*, 2003
Foie	43	Akiba *et al.*, 1982	2,2	6,3	0,12	0,35	Akiba *et al.*, 1982
Muscle	720	MacLachlan, 2010	9,4	28,1	0,52	1,56	Brunel *et al.*, 2006
Total Central	*813*		*11,7*	*39,8*	*0,65*	*2,21*	

[a]calcul effectué pour un poids vif de 1840g ; *cité par Traag *et al.*, 2004.

Le modèle a pour objectif de représenter les principaux critères physiologiques décrits précédemment (partie 2.2.). Dans un premier temps, le modèle est calibré de façon à représenter les performances d'une poule pondeuse d'élevage conventionnel (dit aussi standard). La calibration du modèle repose sur des données issues de fiches de sélectionneurs de poules pondeuses Isa Brown, en première saison de ponte et dans des conditions optimales d'élevage (alimentation, photopériode et température), ainsi que sur des données issues de publications traitant de la physiologie de la poule pondeuse et notamment de la ponte et du niveau d'engraissement. Les paramètres relatifs à la mue et aux cycles de ponte proviennent de publications rapportant des tests effectués sur deux saisons de ponte ou plus (Snow *et al.*, 2004) ou des études concernant la mue et ses conséquences sur certains paramètres physiologiques (Bell, 2003). La durée séparant le premier jour de mue du temps où le poids vif est minimal (*m_molting*) est évaluée à partir de données rapportées par Sauveur (1988). Cette durée est également utilisée pour représenter le laps de temps nécessaire à la poule, à la fin de la mue, pour retrouver son poids vif et son poids de tissu adipeux d'avant mue.

Les paramètres ne sont pas tous disponibles de façon directe. Ils ont parfois été obtenus par ajustement des sorties du modèle sur des données expérimentales de performance relevées dans la littérature ou, en particulier pour le taux de ponte, dans des bases de données issues d'expérimentations menées à l'INRA (Mallet et Lescoat, communication personnelle) (Tableau III-10 et III-11). Le taux de ponte simulé moyen d'une période entre deux mues est calculé comme étant le quotient du nombre d'œufs pondus par le nombre de jours de la période de ponte. La bibliographie indique des taux de ponte décroissants entre deux cycles successifs (Bell, 2003). La structure du modèle permet de moduler le nombre d'œufs pondus sur une période en faisant varier chacun des paramètres de la matrice *k_cycle* dont les fonctions sont détaillées dans le tableau III-8.

Tableau III- 10 : Valeurs des paramètres physiologiques issues de la calibration du modèle

Acronyme	*Unité*	*Valeur*	*Base de l'évaluation*		*Références*
			Entrée	*Ajustement*	
PONTE					
Durée de la phase d'accroissement du jaune					
alpha	sd	24.49		x	Fournier *et al.*, 2010
k_Y_min	g	0.206		x	Fournier *et al.*, 2010
k_growth_yolk	$j^{-1}.g^{-1}$	0.048		x	Fournier *et al.*, 2010
Taille du jaune d'œuf pondu					
k_Y_max	g	15.3		x	Fournier *et al.*, 2010
Taux de ponte et vitesse de diminution du taux de ponte					
k_cycle[NumCycle,1]	j	75	x		Johnston et Gous, 2007ab
k_cycle[NumCycle,2]	sd	35		x	Johnston et Gous, 2007ab
k_cycle[NumCycle,4]	sd	35		x	Johnston et Gous, 2007ab
k_cycle[NumCycle,5]	j	330		x	Johnston et Gous, 2007ab; ITAVI 2009
k_cycle[NumCycle,3]	j	145		x	Lewis *et al.*, 2002 ; Johnston et Gous, 2007ab
Smin	j	1		x	Johnston et Gous, 2007ab; ITAVI 2009
CARACTERISTIQUES CORPORELLES : poids vif et teneurs en lipides					
BW_min	g	52	x		fiche sélectionneur terrain
BW_max	g	2000	x		fiche sélectionneur terrain
BW_max_molting	g	1560		x	Aksit *et al.*, 2003; Snow *et al.*, 2004 ; Mansoori *et al.*, 2007
t_half_BW	j	80		x	arbitraire
k_growth_BW	sd	2.5		x	arbitraire
Taille du tissu adipeux					
k_fat	sd	0.18	x		Renema *et al.*, 1999
k_fat_molting	sd	0.12		x	Snow *et al.*, 2004; Boichard (com.pers. 2010)
Teneur en lipides du jaune d'œuf					
k_Y_lip	sd	0.33	x		Sauveur, 1988; Kan, 2002
Teneur en lipides du plasma					
k_central	sd	0.02		x	Akiba *et al.*, 1982; MacLachlan, 2010
k_central_molting	sd	0.007		x	Akiba *et al.*, 1982; MacLachlan, 2010

Les acronymes sont définis dans le tableau III-8.
j=jour ; sd = sans dimension.

Tableau III- 11 : Valeurs des paramètres de ponte au cours de trois cycles successifs

			Base de l'évaluation		
Acronyme	***Unité***	***Valeur***	***Entrée***	***Ajustement***	***Références***
PONTE					
Taux de ponte					
NumCycle=1					
k_cycle[NumCycle,1]	j	75	x		Johnston et Gous, 2007ab
k_cycle[NumCycle,2]		20		x	Johnston et Gous, 2007 ab
k_cycle[NumCycle,4]		20		x	Johnston et Gous, 2007 ab
k_cycle[NumCycle,5]	j	420		x	Johnston et Gous, 2007 ab; ITAVI, 2009
k_cycle[NumCycle,3]	j	160		x	Bell, 2003 ; Johnston et Gous, 2007 ab
NumCycle=2					
k_cycle[NumCycle,1]	j	50		x	Bell, 2003
k_cycle[NumCycle,2]		20		x	Bell, 2003; Travel *et al.*, 2010
k_cycle[NumCycle,4]		50		x	Bell, 2003; Travel *et al.*, 2010
k_cycle[NumCycle,5]	j	720		x	Bell, 2003
k_cycle[NumCycle,3]	j	542		x	Bell, 2003
NumCycle=3					
k_cycle[NumCycle,1]	j	25		x	Bell, 2003
k_cycle[NumCycle,2]		20		x	Bell, 2003 ; Travel *et al.*, 2010
k_cycle[NumCycle,4]		60		x	Bell, 2003 ; Travel *et al.*, 2010
k_cycle[NumCycle,5]	j	857		x	Bell, 2003
k_cycle[NumCycle,3]	j	950		x	Bell, 2003
Durée de la période de ponte et étape de la mue					
b_molting1	j	480	x		Bell, 2003
e_molting1	j	522		x	Bell, 2003
b_molting2	j	795	x		Bell, 2003
e_molting2	j	837		x	Bell, 2003
m_molting	j	12		x	Sauveur, 1988 ; Mansoori *et al.*, 2007

Les acronymes sont définis dans le tableau III-8.
j=jour ; sd = sans dimension.

2.5.2. Ajustement des paramètres de flux de POP

Les paramètres définissant l'exposition sont des paramètres d'entrée (période d'exposition, niveau de contamination, bioaccessibilité) et ne donnent donc pas lieu à un ajustement. Seuls les paramètres décrivant les processus ADME, intervenant au niveau des flux de POP, ont été ajustés. Une approche pas à pas a été mise en œuvre pour ajuster les paramètres, afin d'obtenir des réponses du modèle au plus proche des concentrations de I-PCB (somme des sept congénères) dans les œufs et le gras abdominal (considéré comme représentatif du tissu adipeux) issus du rapport de Traag *et al.* (2004). Ce jeu de données est à notre connaissance le

plus fourni concernant le transfert de POP en milieu contrôlé chez la poule pondeuse. Notons que les poules de cette étude sont des Bovans Gold, âgées de 45 semaines en début de contamination, d'un poids moyen de 1840 g et avec un taux de ponte de 84 à 90 %. Le protocole expérimental met en œuvre une période de 56 jours d'exposition orale suivie d'une période de décontamination de 56 jours également, et ce pour sept niveaux de contamination différents. Le profil de congénères du mélange de PCB-I présent dans l'aliment est caractérisé par les pourcentages suivants : 7, 9, 20, 10, 21, 20 et 13% pour respectivement les PCB 28, 52, 101, 118, 138, 153 et 180. Des analyses dans des échantillons prélevés au cours de l'expérimentation ont permis d'obtenir des valeurs de concentration de POP à des temps différents dans les œufs (n=13) et dans le gras abdominal (n=3), et ce pour chacun des niveaux de contamination.

Les valeurs des paramètres du module physiologique restent inchangées par rapport à celles du tableau III-10, mis à part le poids vif maximal (*BW_max*) et la masse de jaune maximale (*k_Y_max*) vers lesquels tendent respectivement le poids vif et le jaune d'œuf. Le poids vif maximal est amené à 1900 g pour représenter l'exposition d'une poule d'un poids de 1840 g à l'âge de 315 jours (45 semaines) et la masse maximale du jaune prend la valeur de 17 g pour tenir compte du fait que les poules de l'étude de Traag *et al.* (2004) sont plus âgées[30] au moment de la contamination, que celles de l'étude de Fournier *et al.* (2010) dont les œufs ont servi à la calibration du sous-modèle physiologique.

Les valeurs des paramètres ajustées pour la somme PCB-I sont rapportées dans le tableau III-12.

Tableau III- 12 : Valeurs ajustées des paramètres décrivant les flux de POP au sein de l'animal

Acronyme	***Valeur***
Flux de POP	
k_absorption	0,68[a]
k_elimination_clearance	0,02
k_elimination_yolk	0,8
k_mobilization	13,8
k_storage	8,4

[a] d'après Van Eijkeren *et al.*, 2006

Les acronymes sont définis dans le tableau III-8. L'unité des constantes est j^{-1}.

[30] La masse du jaune d'œuf évolue avec l'âge de la poule.

2.5.3. Analyse de sensibilité

Les sorties d'intérêt pour l'étude sont les concentrations de POP dans le jaune d'œuf et le tissu adipeux. Les paramètres d'entrée testés (Tableau III-8) appartiennent à deux groupes : ceux qui régissent les performances de ponte et l'état d'engraissement et ceux qui régissent les flux de POP (Figure III-7). Le premier groupe est étudié en détail tandis que le second sera précisé en discussion. Cette analyse de sensibilité est restreinte au premier cycle de ponte. L'impact de la mue sera étudié dans le paragraphe suivant qui examine différents scenarii (cf. III-2.5.4.2).

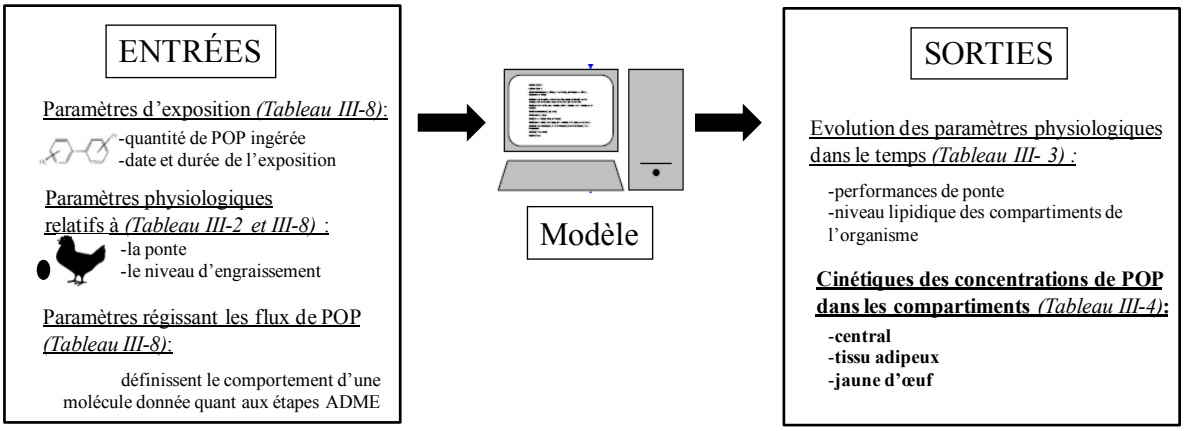


Figure III- 7 : Récapitulatif des différentes catégories d'entrées et de sorties du modèle
(en gras sont précisées les sorties d'intérêt pour la présente étude)

2.5.3.1. Impact des paramètres physiologiques

Seuls les paramètres physiologiques sont testés pour des paramètres d'exposition et de flux de POP fixés. L'étendue des variations des paramètres d'entrée testés a été soit déterminée par les valeurs rapportées dans la bibliographie (pour différents types de souches ou de pratiques d'élevage), soit définie comme égale à ± 25 % lorsque l'information manquait. Les paramètres sont testés indépendamment les uns des autres dans un premier temps, même si les conditions testées s'éloignent de la réalité. La liste des paramètres testés ainsi que les intervalles sur lesquels est effectuée l'analyse de sensibilité sont reportés dans le tableau III-13. Les réponses du modèle aux extrêmes de l'intervalle caractérisant un paramètre (niveau H : Haut et B : Bas) sont comparées à la réponse obtenue avec la valeur moyenne de l'intervalle, valeur considérée comme référence. Les paramètres d'exposition sont fixes mais

permettent la simulation d'une période de contamination suivie d'une période de décontamination avec les paramètres indiqués dans le Tableau III-14.

Tableau III- 13 : Liste des intervalles de variations des paramètres testés lors de l'analyse de sensibilité

Acronyme	*Unité*	*B*	*Moyenne (référence)*	*H*	*Variation [a] (%)*	*Références*
PONTE						
Durée de la phase d'accroissement du jaune						
k_growth_yolk	$j^{-1}.g^{-1}$	0,03	0,05	0,07	40	Bacon et Cherms, 1968
Taille du jaune d'œuf pondu						
k_Y_max	g	10	17	24	41	Sauveur, 1988 ; Travel *et al.*, 2010
Taux de ponte et vitesse de diminution du taux de ponte						
k_cycle[NumCycle,1]	j	20	75	130	73	Johnston et Gous, 2007ab
k_cycle[NumCycle,2]		10	35	60	71	Johnston et Gous, 2007ab
k_cycle[NumCycle,4]		10	35	60	71	Johnston et Gous, 2007ab
k_cycle[NumCycle,5]	j	280	330	380	15	Johnston et Gous 2007ab; ITAVI, 2009
k_cycle[NumCycle,3]	j	120	145	170	17	Lewis *et al.*, 2002 ; Johnston et Gous, 2007ab
CARACTERISTIQUES CORPORELLES : poids vif et teneurs en lipides						
BW_max	g	1300	1900	2500	32	fiche sélectionneur, terrain
t_half_BW	j	60	80	100	25	arbitraire
k_growth_BW		2	2,6	3,2	25	arbitraire
Taille du tissu adipeux						
k_fat	sd	0,1	0,175	0,25	43	Leclercq, 1975 ; Snow *et al.*, 2004; Boichard (com.pers. 2010)
Teneur en lipides du plasma						
k_central	sd	0,008	0,024	0,04	67	Akiba *et al.*, 1982; MacLachlan, 2010

[a] pourcentage représentant l'étendue de la variation par rapport à la moyenne des valeurs minimale et maximale.
Les acronymes sont définis dans le tableau III-8.
j= jour ; sd = sans dimension ; H = niveau Haut et B = niveau Bas

Tableau III- 14 : Valeurs des paramètres de contamination utilisés pour effectuer l'analyse de sensibilité des paramètres intervenant dans les mécanismes physiologiques (et dans les flux de POP chez la poule)

Acronyme	*Unité*	*Valeur*
d_contamine	j	300
ti_contamine	j	0
k_matrix_amount_ingested	g	121
k_matrix_bioavailability	j^{-1}	1
k_matrix_concentration	$ng.g^{-1}$	14,2

Les acronymes sont définis dans le tableau III-8.

2.5.3.2. Impact des paramètres des flux de POP

Une analyse de sensibilité des concentrations de POP dans les tissus aux paramètres gérant les flux de POP au sein de la poule a également été conduite. Chez l'oiseau, peu d'auteurs ont calculé des valeurs de paramètres de flux propres à chaque molécule. Les études sont souvent effectuées en considérant le mélange de POP (ex : PCB) sans distinguer chacun des congénères. Or, les familles et congénères de POP se comportent très différemment. Par exemple, le paramètre de clairance varie de façon importante selon la susceptibilité à la métabolisation (cf. Chapitre I et II). L'étendue des variations des paramètres d'entrée testés est arbitrairement fixée à ± 25 % à partir des valeurs du tableau III-12 prises comme référence. Les variations de ces paramètres, ainsi que leurs impacts, seront abordés de façon plus précise dans la discussion générale de cette thèse. Les résultats sont obtenus selon la même méthode que celle développée pour les paramètres physiologiques. Les paramètres physiologiques sont fixés et prennent les valeurs de référence indiquées dans le tableau III-13.

2.5.4. Simulations : effet du taux d'engraissement et du taux de ponte sur les cinétiques de concentration de PCB-I dans le tissu adipeux et le jaune d'œuf

La mise en œuvre de simulations faisant varier les caractéristiques corporelles de l'animal et le taux de ponte a pour objectif de tester l'impact de ces deux paramètres physiologiques sur le risque de contamination des œufs au cours de l'élevage de la poule. Le caractère dynamique de notre modèle permet de tester cet effet à différents stades de l'élevage des animaux. La conduite de ces simulations a nécessité d'attribuer des valeurs aux paramètres d'entrée du modèle permettant de caractériser la contamination, l'état d'engraissement et le niveau de ponte des animaux. Les simulations ont ensuite été menées en deux temps : tout d'abord en faisant varier l'état d'engraissement et le taux de ponte indépendamment, puis en testant quatre scenarii faisant varier les deux paramètres simultanément.

2.5.4.1. Valeur des paramètres d'entrée du modèle

Les paramètres d'entrée, à l'exception des paramètres cités ci-dessous, sont fixés aux valeurs de référence utilisées lors de l'analyse de sensibilité (Tableau III-13 et Tableau III-14).

Modulation de l'exposition

Les animaux subissent soit une contamination chronique (C), dès leur naissance et pour l'entière durée de la période, soit une contamination accidentelle (A) d'une durée de 80 jours, qui débute à 250 jours de vie (de J250 à J330). Les paramètres utilisés pour moduler l'exposition sont la durée de la période d'exposition (*d_contamine*) et la date marquant le début de l'exposition (*ti_contamine*). Les valeurs de ces paramètres sont présentées dans le tableau III-15. Le niveau d'exposition est le même que celui décrit pour l'analyse de sensibilité. Il est de 1,72 µg I-PCB / j (Traag *et al*., 2004). Les paramètres liés aux flux de POP (absorption et distribution entre les différents compartiments) sont fixés aux valeurs présentées dans le tableau III-12.

Tableau III- 15 : Valeurs des paramètres représentant une exposition chronique et une exposition accidentelle

Acronyme	***Unité***	***Valeur***	
		Chronique (C)	***Accidentelle (A)***
d_contamine	j	1000	80
ti_contamine	j	0	250

Modulation des caractéristiques corporelles

L'état d'engraissement de la poule est modulé au moyen de la constante de proportionnalité entre le volume de lipides corporels et le poids de l'animal (*k_var_fat*) et du poids vif maximum (*BW_max*). Dans le modèle, la quantité de lipides présente dans le tissu adipeux est proportionnelle au poids vif ($V_fat = k_var_fat * BW$). Faire varier la constante de proportionnalité indépendamment du poids vif posait un problème de cohérence, notamment dans les cas extrêmes de poules maigres ou grasses (une poule maigre ne peut pas être lourde). C'est pourquoi, nous avons légèrement modifié cette variable en la reliant au poids vif maximal (*BW_max).* Les relations établies, linéaires, sont issues de valeurs obtenues suite à la calibration du modèle :

$k_fat = 9{,}4.10^{-5} * BW_max$

$k_fat_molting = 6{,}3.10^{-5} * BW_max$

Les simulations sont conduites sur des poules présentant un poids vif maximum compris entre 1550 et 2250 g pour lesquelles le tissu adipeux représente 15 à 21% du poids corporel hors mue, soit 227 à 467 g (Tableau III-16).

Tableau III- 16 : Valeurs des paramètres représentant la gamme de niveaux d'engraissement

Niveau d'engraissement	***E1***	***E2***	***E3***	***E4***	***E5***	***E6***	***E7***
Variable d'entrée							
BW_max (g)	1550	1670	1780	1900	2020	2130	2250
Variables calculées							
k_fat	0,15	0,16	0,17	0,18	0,19	0,20	0,21
k_fat_molting	0,10	0,11	0,11	0,12	0,13	0,13	0,14
Poids maximal du tissu adipeux (g)	227	263	299	341	385	428	467

BW_max = poids vif maximal de la poule en période de ponte ; k_fat = part du poids vif représentant les lipides du compartiment tissu adipeux hors mue ; k_fat_molting = part du poids vif représentant les lipides du compartiment tissu adipeux durant la mue ; E1 à E7 = sept niveaux d'engraissement croissants.

Modulation du niveau de ponte

Bien que le taux de ponte soit la résultante de la combinaison des paramètres de la matrice *k_cycle*, le seul paramètre utilisé pour moduler le niveau de ponte est la longueur de la série maximale (*k_cycle[NumCycle,1]).* Nous avons été contraints à cette simplification en raison du manque de données sur les autres paramètres de la matrice. La longueur maximale est de 130 jours (Johnston et Gous, 2007ab) pour le niveau P7 et de 5 jours pour le niveau P1. Cette dernière valeur est inférieure à 20 jours (durée considérée comme minimale par Johnston et Gous, (2007ab), mais est choisie pour représenter de façon simple la diminution du flux total de lipides quittant la poule *via* les œufs, sur une période donnée. La faible valeur prise par ce paramètre dans notre étude par rapport à la littérature est due à la contrainte d'une durée maximale de un jour prise par les périodes de pause et à la constance des autres paramètres de la matrice. Les sept valeurs attribuées à la longueur maximale de la série sont présentées dans le tableau III-17. Les taux de ponte correspondants ont été calculés sur la même période de ponte commune de 115 jours, durant laquelle une ponte régulière est observée pour les sept niveaux de ponte (Figure III-8). Les taux de ponte calculés sont compris entre 73 et 99%. La masse lipidique éliminée *via* l'œuf en 100 jours varie de 410 à 555 g.

Tableau III- 17 : Valeurs des paramètres représentant la gamme de niveaux de ponte

Niveaux de ponte	***P1***	***P2***	***P3***	***P4***	***P5***	***P6***	***P7***
Variable d'entrée							
k_cycle[NumCycle,1] (j)	5	6	7	9	12	25	130
Variables calculées							
Taux de ponte (%)	73	78	81	86	90	95	99
Masse lipidique éliminée *via* la ponte en 100 jours (g)	410	438	454	482	505	533	555

k_cycle[NumCycle,1] = longueur de la série maximale durant la période de ponte ; P1 à P7 = sept niveaux de performance de ponte croissants

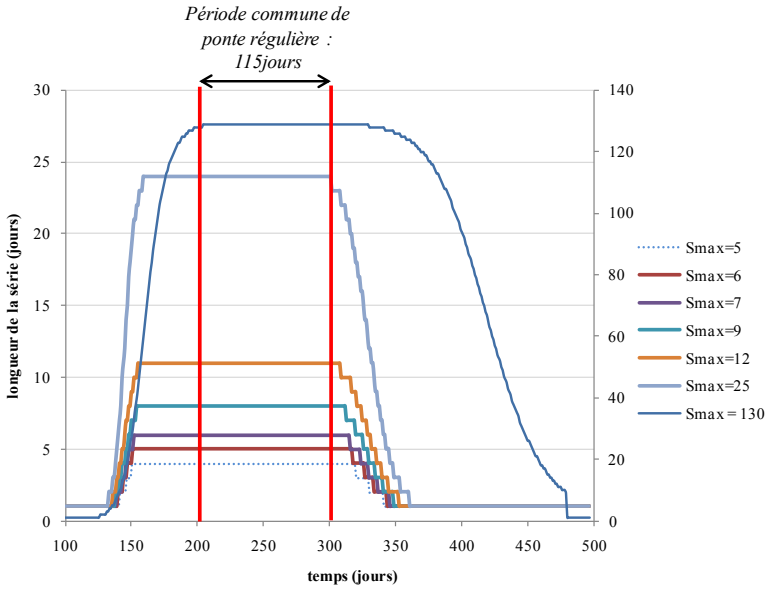


Figure III- 8 : Détermination de la période de ponte régulière commune à chacun des niveaux de ponte étudiés

La période de ponte régulière commune est délimitée par les barres rouges.

2.5.4.2. Mise en œuvre des simulations

Toutes les simulations sont conduites pour les deux types de contamination : chronique (C) et accidentelle (A). Les sorties du modèle sont les cinétiques de concentrations de PCB-I dans le gras abdominal et dans le jaune d'œuf.

Etat d'engraissement et taux de ponte

Pour ces premières simulations, l'impact de ces caractéristiques n'est testé que sur 500 jours, correspondant à la croissance de la poule suivie d'un premier cycle de ponte. L'impact des caractéristiques corporelles est testé en fixant les paramètres de ponte aux valeurs de référence présentées dans le tableau III-13. De même, l'impact du taux de ponte est testé en fixant les paramètres d'état corporel aux valeurs de référence présentées dans le tableau III-13.

Choix des niveaux de paramètres pour l'étude intégrée de l'effet des états d'engraissement et du taux de ponte

Les simulations sont conduites en croisant les niveaux d'état corporel et de ponte extrêmes définis précédemment (Tableau III-18). Les niveaux **E**$^-$ et **E**$^+$ correspondent respectivement aux niveaux E1 et E7, présentés dans le tableau III-16, et les niveaux **P**$^-$ et **P**$^+$ aux niveaux

respectifs P1 et P7, présentés dans le tableau III-17. Par rapport aux simulations précédentes, ces scenarii sont mis en œuvre sur une durée plus longue, de 1000 jours dans le cas de la contamination chronique et de 800 jours dans le cas de la contamination accidentelle. L'allongement de la durée permet en particulier de travailler sur plusieurs cycles de ponte et donc d'évaluer l'effet d'une mue sur les cinétiques de concentration de PCB-I dans le gras abdominal et dans l'œuf.

Tableau III- 18 : Quatre scenarii résultant de la combinaison des niveaux de ponte et d'engraissement extrêmes

		Taux de ponte	
		P^+	**P^-**
Niveau d'engraissement	**E^+**	**E^+P^+**	**E^+P^-**
	E^-	**E^-P^+**	**E^-P^-**

E^+: état d'engraissement élevé ; **E^-**: état d'engraissement faible ;
P^+: taux de ponte élevé ; **P^-**: taux de ponte faible.
La valeur des paramètres d'entrée est présentée dans les tableaux III-16 et III-17,
avec **E^+** = E7, **E^-**: = E1, **P^+**= P7 et **P^-** = P1

Tableau III- 19 : Récapitulatif des huit scenarii étudiés

		Contamination			
		C	**A**		
Niveau d'engraissement : E	**E^+**	C_ **E^+P^+**	A_ **E^+P^+**	**P^+**	***Taux de ponte : P***
		C_ **E^+P^-**	A_ **E^+P^-**	**P^-**	
	E^-	C_ **E^-P^+**	A_ **E^-P^+**	**P^+**	
		C_ **E^-P^-**	A_ **E^-P^-**	**P^-**	

C : contamination chronique sur toute la période d'élevage ; A : contamination accidentelle sur une période de 250 à 330 jours d'âge (soit 80 jours d'exposition) ; **E^+**: état d'engraissement élevé ; **E^-**: état d'engraissement faible ; **P^+**: taux de ponte élevé ; **P^-**: taux de ponte faible.

3. Résultats

3.1. Calibration

La structure du modèle permet d'obtenir des simulations cohérentes avec les données expérimentales disponibles dans la littérature. Ce constat peut être établi tant pour les caractéristiques physiologiques que pour le transfert de POP.

3.1.1. Modèle physiologique

Une simulation sur trois cycles de ponte permet de suivre les caractéristiques physiologiques d'intérêt d'une poule. L'évolution des quantités de lipides présentes dans les compartiments est représentée sur la Figure III-9.

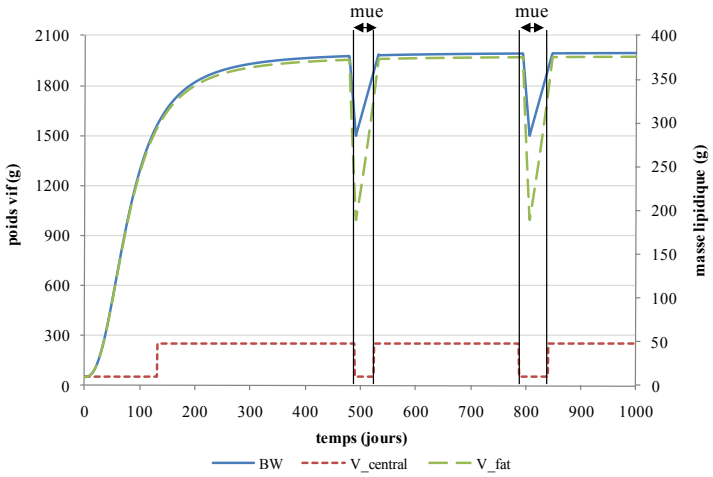


Figure III- 9 : Schéma récapitulatif de l'évolution des paramètres physiologiques simulés en fonction du temps
(BW = Body Weight = poids vif ; V_central = masse lipidique du compartiment central ; V_fat = masse lipidique du compartiment tissu adipeux ; la valeur des paramètres d'entrée est indiquée dans les tableaux III-10, III-11 et III-12)

La combinaison des paramètres de la matrice *k_cycle,* relatifs à chacun de ces trois cycles de ponte successifs, permet d'obtenir les taux de ponte moyens de ces trois périodes de ponte. La valeur des taux de ponte est de 97, 88 et 86% respectivement pour chacun des cycles 1, 2 et 3 (Figure III-10). La chute du taux de ponte moyen d'un cycle à l'autre (Bell *et al.,* 2003) est donc bien retrouvée. Les paramètres de croissance du jaune et les paramètres pilotant l'alternance des jours de pause et des jours de ponte (Tableau III-10) permettent de représenter les entrées successives des ovocytes en phase de grand accroissement, ainsi que les jours de pause (Figure III-11).

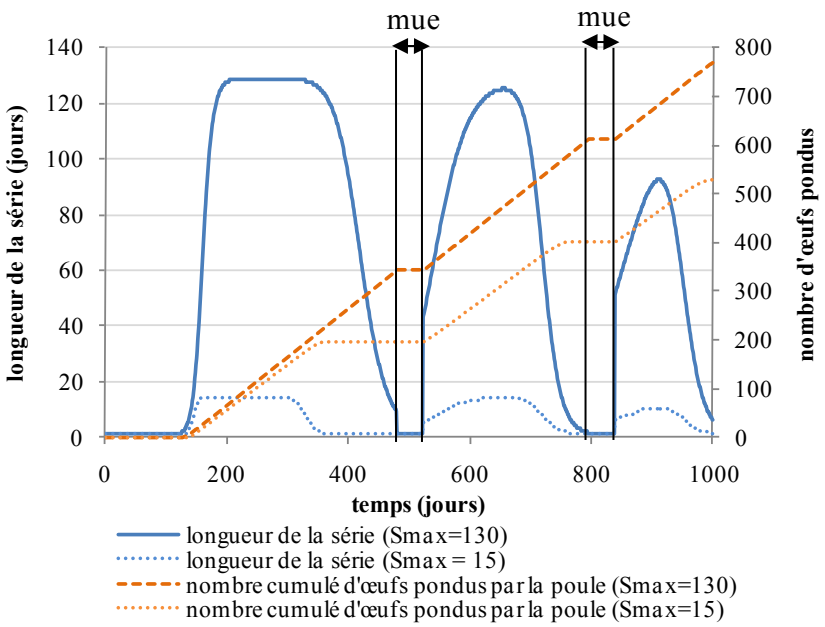


Figure III- 10 : Représentation des cycles de ponte *via* le suivi de la longueur des séries et de la ponte des jaunes d'œuf

Les paramètres d'entrée prennent pour valeurs celles indiquées dans les tableaux III-10 et III-11. Les courbes orange illustrent le cumul des œufs pondus au cours de la vie d'une poule dans le cas de deux niveaux de ponte différents, modélisé *via* une longueur de série de 15 ou 130 jours.

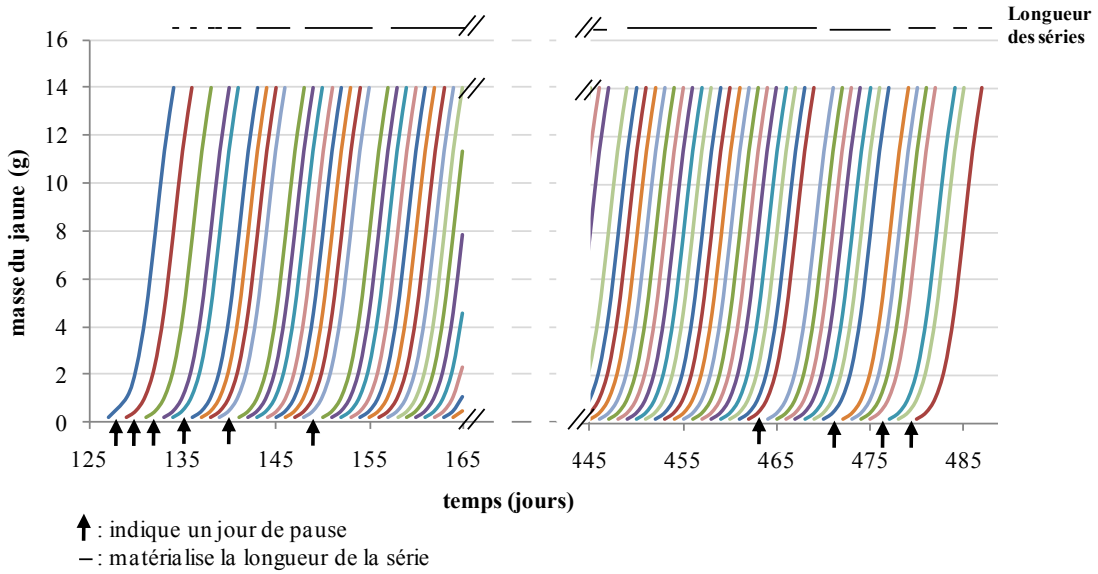


Figure III- 11 : Représentation de l'entrée successive en dernière phase de croissance des jaunes d'œuf en début et fin de la première période de ponte.

Les longueurs de séries sont matérialisées par un trait noir continu (__) et les jaunes préovulatoires en croissance sont représentés par des lignes de couleurs ; les paramètres d'entrée prennent les valeurs exposées dans les tableaux III-10 et III-11, avec *k_Y_max*=17g .

Plus particulièrement, pour illustrer le résultat de la calibration, les valeurs simulées de l'évolution du poids vif et la croissance du jaune d'œuf sont confrontées respectivement aux données fournies par les sélectionneurs et aux données observées lors de l'expérimentation décrite par Fournier *et al*. (2010) (Figure III-12 et III-13). Ces graphiques montrent que les réponses du modèle peuvent être considérées comme une représentation acceptable des données observées.

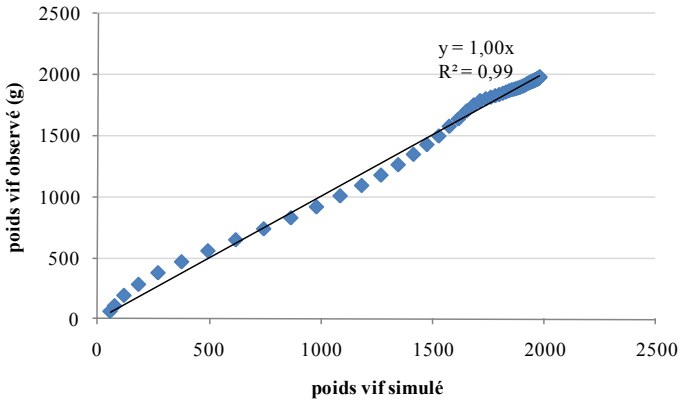


Figure III- 12 : Relation entre la croissance moyenne du poids vif mesuré (ISA Brown) et la croissance simulée par le modèle
La ligne pleine correspond au modèle (croissance moyenne mesurée = 1,00 x croissance simulée, R^2 = 0,99 ; ETR = 40,9).

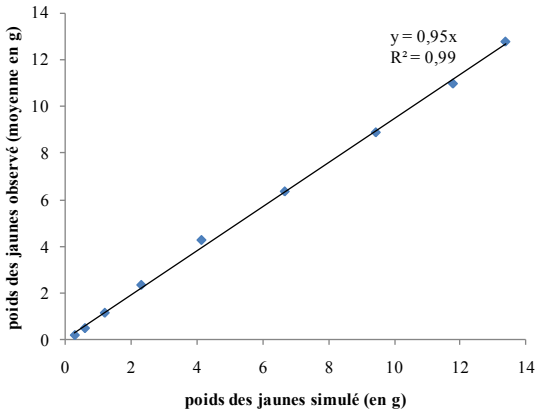


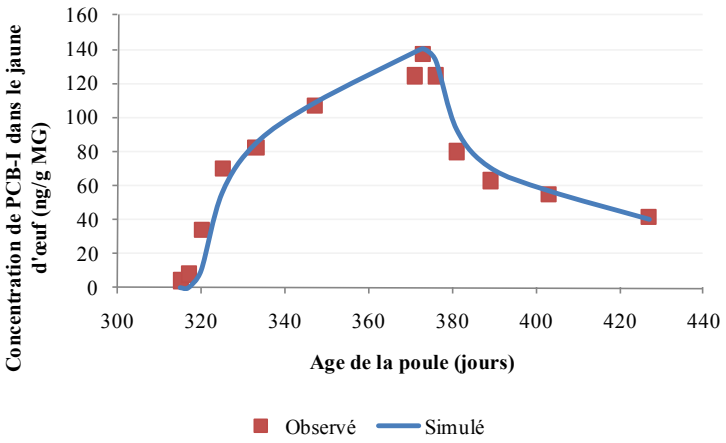
Figure III- 13 : Relation entre le poids moyen mesuré des jaunes de la grappe (Fournier *et al.*, 2010) et leur poids simulée par le modèle.
La ligne pleine correspond au modèle (croissance moyenne mesurée = 0,95 x croissance simulée, R^2 = 0,99 ; ETR = 0,41).

3.1.2. Flux de POP

Le même type de confrontation de données simulées *vs* observées est effectué au niveau des concentrations de POP dans les tissus (Figure III-14 et III-15). L'évolution de la concentration simulée est plus fidèle à celle observée dans le cas de l'œuf que dans celui du tissu adipeux.

Cela est également le cas pour le modèle de Van Eijkeren *et al.* (2006) qui s'appuie sur les mêmes données expérimentales (Traag *et al.*, 2004). Cela peut s'expliquer premièrement par le fait que seuls trois points de la cinétique de concentration sont disponibles pour ajuster le modèle pour le tissu adipeux contre 13 points pour la cinétique de l'œuf. D'autre part, les données observées proviennent uniquement d'analyses sur des échantillons de gras abdominal, qui ne représentent qu'une partie du tissu adipeux total définissant le compartiment de stockage du modèle. L'ajustement des concentrations de POP dans le tissu adipeux sur les données expérimentales se base donc sur l'hypothèse que la contamination du gras abdominal est représentative de celle du tissu adipeux. Cette hypothèse reste à valider, d'autant que le modèle PBPK de Cortright *et al.* (2009) présente une prédiction des concentrations de contaminants dans le tissu adipeux également moins fiable que pour les autres tissus chez la caille et la dinde. Les simulations de concentrations dans ce dernier tissu doivent donc être considérées avec précautions.

(A)



(B)

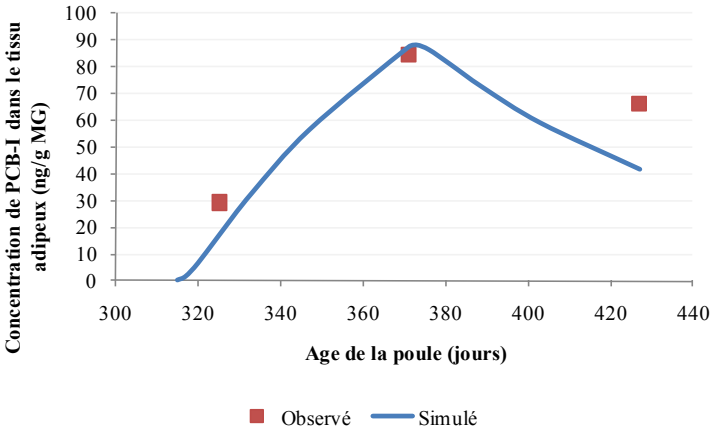


Figure III- 14 : Cinétique des concentrations de PCB-I dans l'œuf (A) et dans le tissu adipeux (B) ajustée pour une ingestion quotidienne de 121g d'aliment contenant 14,2 ng PCB-I $.g^{-1}$ (Traag *et al.*, 2004)

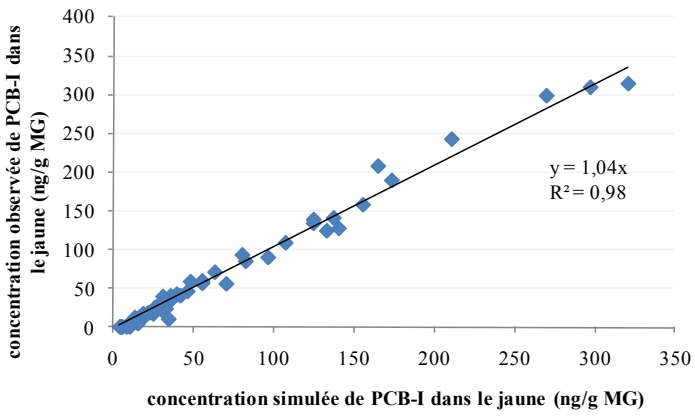


Figure III- 15 : Confrontation des données de concentrations de PCB-I dans les jaunes d'œuf prédites par le modèle et des concentrations observées dans l'étude de Traag *et al.* (2004)
(données correspondant à des doses croissantes d'exposition : 2,09 ; 4,26 ; 5,99 ; 14,2 et 31,7 ng PCB-I .g^{-1} d'aliment ingéré par les poules). Concentration mesurée = 1,04 x concentration simulée, R^2 = 0,98, ETR=10,3)

3.2. Analyse de sensibilité

Les résultats de l'analyse de sensibilité sont rapportés dans les tableaux III-20 et III-21. Ils sont exprimés sous forme de variations (ΔR) calculées de la façon suivante:

$$\Delta R = \frac{P}{R}$$

où P correspond à la réponse du modèle suite à la variation d'un paramètre donné et R correspond à la réponse du modèle avec les valeurs de référence des paramètres. Les portions de cinétiques des concentrations correspondantes aux temps d'étude pour l'analyse de sensibilité sont illustrées en figure III-16.

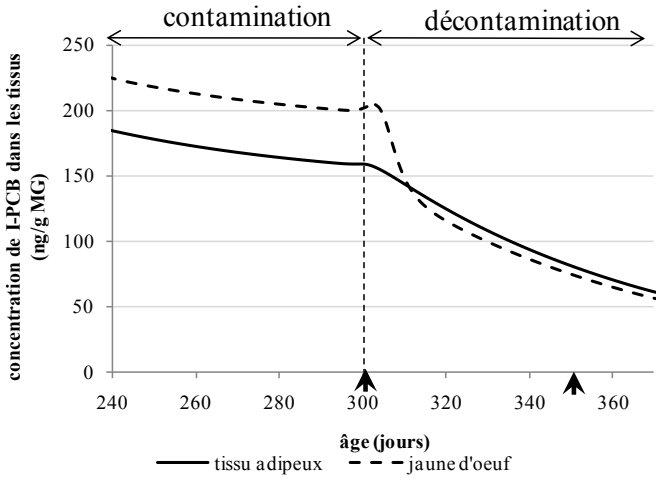


Figure III- 16 : Evolution des concentrations dans le tissu adipeux et le jaune d'œuf pour une poule dont les caractéristiques sont définies par les paramètres de référence et qui subit une période de contamination (de t=0 à 300 jours) suivie d'une période de décontamination (à partir de t=300 jours). Les flèches noires indiquent les temps t= 300 et t=350 jours, temps d'étude utilisés pour l'analyse de sensibilité.

Tableau III- 20 : Résultats de l'analyse de sensibilité : impact des paramètres physiologiques sur les concentrations de POP dans les tissus.

				Contamination			***Décontamination***		
				t=300			***t=350***		
	paramètres			***F*** ***(ng.g^{-1})***	***Y*** ***(ng.g^{-1})***	***Y/F***	***F*** ***(ng.g^{-1})***	***Y*** ***(ng.g^{-1})***	***Y/F***
Types de paramètres	***référence***	***niveau***		*159*	*202*	*1,27*	*79,8*	*73,7*	*0,924*
PONTE									
Durée de la phase d'accroissement du jaune									
k_growth_yolk	0,05	H	0,07	0	0	0	0	0	0
		B	0,03	0	0	0	0	0	0
Taille du jaune d'œuf pondu									
k_Y_max	17	H	24	- - -	- - -	0	- - -	- - -	- -
		B	10	++	++	0	+++	+++	++
Taux de ponte et vitesse de diminution du taux de ponte									
k_cycle[NumCycle,1]	75	H	130	0	0	0	0	0	0
		B	20	0	0	0	+	++	0
k_cycle[NumCycle,4]	35	H	60	0	0	0	0	0	0
		B	10	0	0	0	0	0	0
k_cycle[NumCycle,2]	35	H	60	0	0	0	0	0	0
		B	10	-	0	0	-	-	0
k_cycle[NumCycle,5]	330	H	380	0	0	0	0	0	0
		B	280	0	0	0	+++[a]	[a]	[a]
k_cycle[NumCycle,3]	145	H	170	+	+	0	+	+	0
		B	120	-	-	0	-	-	0
CARACTERISTIQUES CORPORELLES : poids vif et état d'engraissement									
Taille du tissu adipeux									
BW_max	1900	H	2500	0	0	0	++	+	0
		B	1300	0	0	0	- - -	- -	0
t_half_BW	80	H	100	0	0	0	0	0	0
		B	60	0	0	0	0	0	0
k_growth_BW	2,5	H	3	0	0	0	0	0	0
		B	2	0	0	0	0	0	0
k_fat	0,175	H	0,25	0	0	0	+++	++	0
		B	0,10	-	0	0	- - -	- - -	+
Teneur en lipides du compartiment central									
k_central	0,024	H	0,04	- -	- -	0	-	- -	0
		B	0,01	++	++	0	++	++	0

- - - = déviation supérieure à -20% ; - - = déviation comprise entre -20 et -10% ; - = déviation comprise entre -10 et -5%; 0 = déviation comprise entre -5 et +5% ; + = déviation comprise entre +5 et +10% ; ++ = déviation comprise entre +10 et +20% ; +++ = déviation supérieure à +20% ; F= concentration dans le tissu adipeux ; Y= concentration dans le jaune d'œuf ; Y/F = ratio des concentrations dans le jaune d'œuf et dans le tissu adipeux. Les acronymes sont définis dans le tableau III-8.

[a] à t= 350 jours, la ponte est interrompue pour cette valeur de k_cycle[NumCycle,5].

Tableau III- 21 : Résultats de l'analyse de sensibilité : impact des paramètres caractérisant les flux de POP sur les concentrations de POP dans les tissus.

				Contamination			***Décontamination***		
				t=300			***t=350***		
	paramètres			***F*** *(ng.g^{-1})*	***Y*** *(ng.g^{-1})*	***Y/F***	***F*** *(ng.g^{-1})*	***Y*** *(ng.g^{-1})*	***Y/F***
Types de paramètres	***référence***	***niveau***		*159*	*202*	*1,27*	*79,8*	*73,6*	*0,924*
FLUX de POP									
k_absorption	0,68	H	0,85	+++	+++	0	+++	+++	0
		B	0,51	- - -	- - -	0	- - -	- - -	0
k_elimination_clearance	0,02	H	0,03	0	0	0	-	-	0
		B	0,02	+	+	0	+	+	0
k_elimination_yolk	0,8	H	1,0	-	0	+++	- - -	-	++
		B	0,6	+++	-	- - -	+++	++	-
k_mobilization	13,8	H	17,3	- - -	0	+++	- - -	-	+++
		B	10,4	+++	0	- - -	+++	++	- - -
k_storage	8,4	H	10,5	+++	0	-	+++	++	-
		B	6,3	- - -	0	+++	- - -	-	+++

- - - = déviation supérieure à -20% ; - - = déviation comprise entre -20 et -10% ; - = déviation comprise entre -10 et -5%; 0 = déviation comprise entre -5 et +5% ; + = déviation comprise entre +5 et +10% ; ++ = déviation comprise entre +10 et +20% ; +++ = déviation supérieure à +20% ; F= concentration dans le tissu adipeux ; Y= concentration dans le jaune d'œuf ; Y/F = ratio des concentrations dans le jaune d'œuf et dans le tissu adipeux. Les acronymes sont définis dans le tableau III-8.

3.2.1. Paramètres physiologiques

Les paramètres les plus influents en périodes de contamination et de décontamination concernent la quantité de lipides présente dans les tissus, notamment les quantités représentant la taille du jaune et la taille du compartiment central. Une augmentation du poids du jaune entraîne une diminution de la concentration de POP dans le jaune et dans le tissu adipeux, mais ne modifie pas le rapport Y/F. Cette diminution par rapport à la valeur de référence est due à une quantité de POP éliminée plus élevée depuis le début de l'exposition. Cela est à relier avec la proportionnalité entre les flux de POP et de jaune : plus la quantité de lipides excrétée *via* l'œuf est élevée, plus la quantité de POP éliminée est élevée et plus la teneur corporelle en POP diminue. La même tendance est observée pour la taille du compartiment central. Une petite quantité de lipides dans le compartiment central augmente le flux de stockage et par suite le flux de mobilisation. Au final, la concentration de POP dans le compartiment central est donc augmentée, ce qui a des retombées sur les concentrations dans le jaune.

Les variations de poids vif et donc de taille du tissu adipeux (qui est proportionnelle au poids vif) n'entraînent aucune variation de concentrations dans le jaune et le tissu adipeux à la fin

de l'exposition (t=300 jours). Cela suggère que pour ce type d'exposition, les concentrations sont indépendantes du niveau d'engraissement, ce qui peut être dû à l'approche d'un niveau d'équilibre, qui serait commun aux différents états corporels. En revanche, les variations de taille du tissu adipeux influencent les concentrations de POP en période de décroissance. Cela est à relier avec l'expression des flux de stockage et de mobilisation. En effet, seul le flux de mobilisation s'exprime en fonction de la taille du compartiment « tissu adipeux ». Lors de la décontamination, il n'y a plus d'apport quotidien de POP : la mobilisation devient prépondérante sur le stockage (Figure III-16). Pour la valeur minimale de *k_fat*, le ratio Y/F présente une déviation entre +5 et +10% en période de décontamination, ce qui signifie que plus *k_fat* diminue, plus la concentration dans le tissu adipeux diminue vite par rapport à celle présente dans l'œuf. En effet, un *k_fat* faible induit un compartiment de stockage de petite taille. Le flux de mobilisation est donc augmenté par rapport à la référence, et par suite il en est de même pour la quantité de POP dans le compartiment central. Cela entraîne une augmentation des flux d'élimination par clairance et par la ponte du jaune d'œuf. Parallèlement, le flux de stockage diminue et est jusqu'à 1,4 à 1,5 fois inférieur au flux de mobilisation durant cette période (Figure III-17), ce qui explique la différence de cinétique des concentrations entre le jaune et le gras. Le ratio ne présente pas de déviation pour les variations des autres paramètres : la concentration dans le jaune peut, dans ces cas-là, être un témoin de l'état de contamination corporelle.

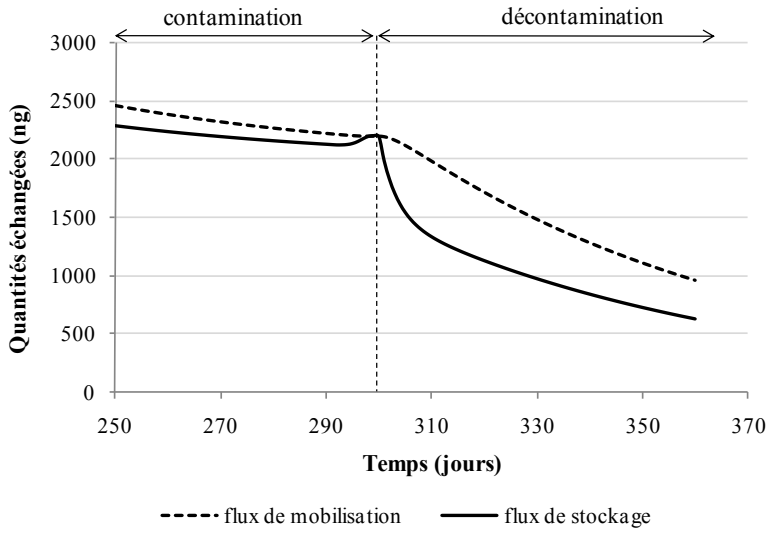


Figure III- 17 : Evolution des flux de stockage et de mobilisation (en ng/j) intervenant entre les compartiments « central » et « tissu adipeux » en période de contamination suivie d'une période de décontamination, pour un taux d'engraissement de 17,5% du poids vif (k_fat = 0,175)

Pour les temps étudiés (300ième jour de contamination, 50ième jour de décontamination) et parmi les paramètres pilotant le taux de ponte, seule la vitesse de diminution de la longueur de la série maximale (*k_cycle[NumCycle,4*]) est sans influence sur les concentrations de POP dans le tissu adipeux et dans l'œuf. Les autres paramètres conduisent à de petites variations inférieures à ±10%. Un seul paramètre, l'âge au bout duquel la série a diminué de 50% de sa longueur maximale (*k_cycle[NumCycle,5*]), a un impact notable. Cet impact est cependant très dépendant des temps testés car la borne basse de l'intervalle implique un arrêt de ponte avant t=350 jours. Il n'y a donc plus de sortie de POP *via* l'œuf à cette période.

L'analyse de sensibilité présentée pour les temps t=300 et t=350 jours, donne un premier aperçu des paramètres ayant une influence sur les concentrations de POP dans les œufs et le tissu adipeux. A partir de cette première analyse, les cinétiques de contamination et d'épuration de ces deux compartiments sont étudiées afin de mieux apprécier l'effet de l'âge de la poule lors de la chute de ponte. La figure III-18 illustre l'impact de l'arrêt de ponte sur la vitesse de décontamination du tissu adipeux. Plus le phénomène de ponte perdure, plus la quantité de POP éliminée par les jaunes d'œuf pondus est importante et donc plus la vitesse de décontamination du tissu adipeux est rapide.

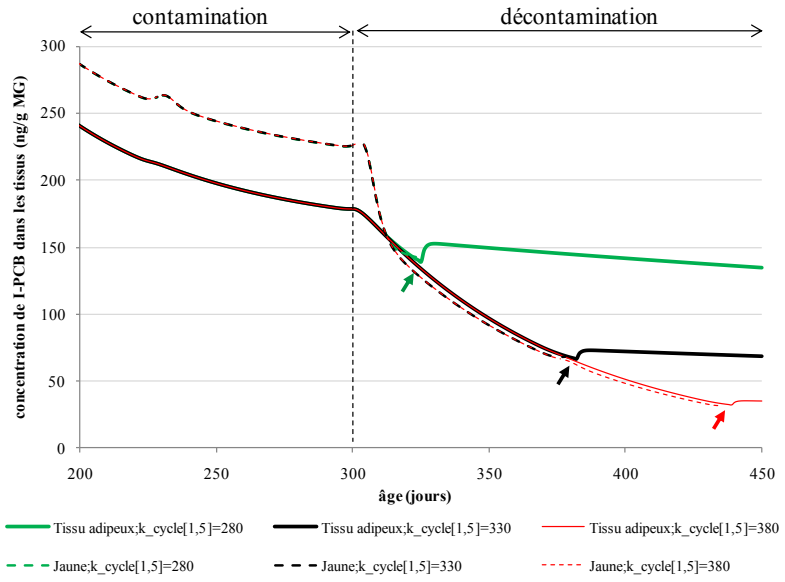


Figure III- 18 : Cinétiques des concentrations de PCB-I dans le jaune d'œuf et dans le tissu adipeux pour des poules pondeuses présentant une diminution du taux de ponte plus ou moins précoce, caractérisée par un k_cycle[1,5] variant de 280 à 380 jours

k_cycle[1,5] : âge auquel la longueur maximale de la série a diminué de 50%. Les flèches de couleurs marquent la fin de la ponte pour chacune des poules dont la durée de ponte est caractérisée par une valeur de *k_cycle[1,5]*.

3.2.2. Paramètres des flux de POP

L'impact des paramètres pilotant les flux de POP sera discuté plus en détail par la suite (cf. IV-Discussion), cependant quelques tendances peuvent être pointées sur l'intervalle de variation testé (±25%). Sur cet intervalle, sans doute de faible amplitude par rapport à la réalité de la diversité des contaminants, le paramètre de clairance a un effet moins marqué que les autres paramètres de flux. Le paramètre *k_absorption*, qui pilote directement l'entrée du contaminant dans le système, a un effet marqué sur les concentrations de POP dans le tissu adipeux et dans le jaune d'œuf, sans impact sur les rapports de concentration entre ces deux tissus. Une diminution du coefficient d'élimination du compartiment central vers l'œuf (*k_elimination_yolk*), en limitant l'un des flux de sortie du système, favorise la concentration du contaminant dans le tissu adipeux en période d'exposition. Par conséquent, en période de décontamination de ce système concentré, œuf et tissu adipeux sont également affectés. Des variations de *k_mobilization* et de *k_storage*, qui représentent les coefficients de transfert respectivement du tissu adipeux vers le compartiment central et du compartiment central vers le tissu adipeux, ont des impacts symétriques sur les concentrations de contaminant dans le tissu adipeux et le jaune. Le sens de la variation peut s'interpréter comme celui de l'augmentation ou de la diminution de la taille du tissu gras, explicitées dans le paragraphe précédent (III-3.2.1.) : par exemple, une augmentation de *k_mobilization* a le même effet qu'une diminution de *V_fat*.

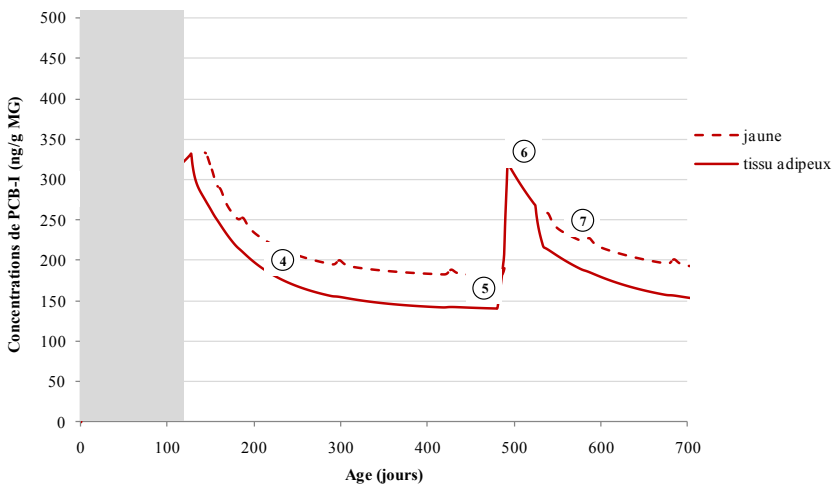
L'analyse de sensibilité a mis en exergue l'influence de l'état d'engraissement et du niveau de ponte sur les concentrations de PCB-I dans les œufs et le tissu adipeux à des temps donnés de contamination et de décontamination. L'étude des simulations qui suit va permettre d'évaluer plus précisément l'impact de ces deux caractéristiques physiologiques sur les concentrations de POP dans l'œuf, à l'échelle de la vie de la poule et pour différents types d'exposition.

3.3. Simulations

3.3.1. Allure générale des cinétiques de concentration de PCB-I dans le tissu adipeux et dans l'œuf

La figure III-19 présente l'allure générale de la réponse du modèle. L'exemple pris correspond à des poules présentant des niveaux d'engraissement (E^+) et de ponte (P^+) élevées et soumises à une exposition chronique (C) de PCB-I. En période de ponte, les cinétiques des concentrations de PCB-I dans le tissu adipeux et dans le jaune d'œuf évoluent parallèlement, avec une teneur dans le jaune d'œuf de l'ordre de 15 à 30% supérieure à celle rencontrée dans le tissu adipeux. Sept phases successives peuvent être identifiées. Les trois premières, grisées sur la figure, correspondent à la période de croissance de la poule, aux stades poussin puis poulette. Cette phase initiale de l'élevage n'entre pas dans le champ de notre travail, qui s'intéresse à la période de production des poules. Les résultats ne sont commentés qu'à titre indicatif et sont dépendants des hypothèses prises lors de la modélisation de cette phase initiale (exposition chronique débutant à la naissance, croissance du tissu adipeux proportionnelle à celle du poids vif).

L'entrée en ponte (4), tout comme la reprise de ponte après la mue (7), permettent une diminution de la charge corporelle de PCB-I, grâce à leur sortie du système *via* l'œuf. Au contraire, l'interruption de la ponte au moment de la mue, en annulant cette voie d'élimination, favorise l'augmentation de la charge corporelle de I-PCB. L'augmentation brutale des concentrations de PCB-I dans le tissu adipeux à ce moment est accentuée par la perte de charge lipidique corporelle associée à l'entrée en mue (5). La reprise progressive de poids de la poule pendant la mue avant le rétablissement de la ponte permet une diminution de la concentration corporelle de PCB-I, par dilution (6). La mue est donc clairement un évènement qui entraîne une augmentation des teneurs en PCB-I du tissu adipeux et du jaune d'œuf lors de la reprise de ponte. Dans notre exemple, l'augmentation est de l'ordre de 40%.



1- Accumulation de PCB-I en début de croissance.
2- Dilution des PCB-I en fonction de la vitesse d'engraissement de la poule : l'augmentation de la charge lipidique est plus rapide que celle des I-PCB.
3- Accumulation des PCB-I lorsque l'augmentation de la charge lipidique est moins rapide que celle des PCB-I.
4- Diminution des concentrations de PCB-I dans le gras suite au déclenchement du phénomène de ponte qui est une des voies d'élimination des PCB-I. Les concentrations dans le gras et le jaune décroissent et tendent à s'équilibrer.
5- Déclenchement de la mue : la diminution de la masse de tissu adipeux occasionnée par la mue tandis que les derniers jaunes en formation sont pondus, entraîne une augmentation des concentrations dans le gras et dans les derniers jaunes pondus.
6- Pendant la mue, les variations massiques du tissu adipeux et l'arrêt de la ponte entraînent une variation de la concentration de PCB-I dans le tissu adipeux. La reprise progressive de poids de la poule pendant la mue avant le rétablissement de la ponte permet une diminution de la concentration corporelle de PCB-I, par dilution.
7- Reprise de la ponte après la mue : les concentrations de POP dans le tissu adipeux et dans le jaune sont plus élevées qu'avant la mue : conséquence de l'accumulation de POP résultant de l'arrêt de ponte.

Figure III- 19 : Succession des phases des cinétiques des concentrations de PCB-I dans le tissu adipeux et dans le jaune, simulées au cours de la vie d'une poule (de la naissance à la fin de son deuxième cycle de ponte), présentant des niveaux d'engraissement (**E**$^+$) et de ponte (**P**$^+$) élevés et soumise à une exposition chronique (C) de PCB-I

3.3.2. Effet des niveaux d'engraissement sur les cinétiques des concentrations de PCB-I dans le tissu adipeux et dans l'œuf

Ces effets sont testés pour le premier cycle de production, sans intervention de la mue, pour une exposition chronique ou accidentelle (de 80 jours).

Exposition chronique

Les cinétiques des concentrations de PCB-I dans le tissu adipeux et dans le jaune d'œuf sont présentées figure III-20.

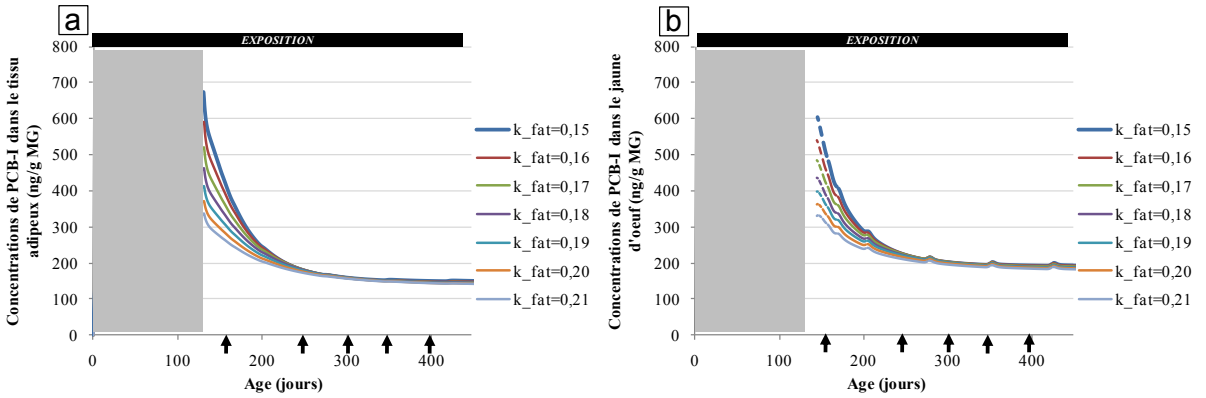


Figure III- 20 : Cinétiques des concentrations de PCB-I dans le tissu adipeux (a) et dans le jaune d'œuf (b) selon différents niveaux d'engraissement chez des poules soumises à une contamination chronique
Les flèches noires marquent les jours 160, 250, 300, 350 et 400.

Avant la ponte, la concentration de PCB-I dans le gras abdominal est directement proportionnelle à la charge lipidique corporelle puisque, selon notre modèle, toutes les poules ont été soumises à la même exposition. De plus, nous travaillons sur des molécules peu métabolisées et pour lesquelles l'œuf est la principale voie de sortie du système. Lorsque la ponte débute, les concentrations de PCB-I dans l'œuf et le gras abdominal, initialement proportionnelles à la charge lipidique corporelle, diminuent à une vitesse d'autant plus élevée que la poule est maigre.

En effet, pour un même taux de ponte, le flux de lipides véhiculé par l'œuf représente une proportion de la charge lipidique corporelle d'autant plus importante que la poule est maigre. Son efficacité d'épuration du système est donc d'autant plus élevée que la poule est maigre.

A 160 jours, soit 20 jours après le début de la ponte, le tissu adipeux et le jaune d'œuf sont respectivement 1,6 et 1,5 fois plus concentrés en PCB-I chez les poules les plus maigres (E1) que chez les poules les plus grasses (E7). Pendant la période de ponte, la concentration de contaminant dans le tissu adipeux continue de diminuer progressivement pour tendre vers un état d'équilibre indépendant de l'état d'engraissement. Dès 250 jours d'âge, les différences de concentrations de PCB-I dans le tissu adipeux et le jaune d'œuf entre les niveaux d'engraissement (E1 et E7) sont très atténuées, avec des rapports respectivement de 1,1 et 1,0. Les concentrations dans chacun des tissus tendent respectivement vers une même valeur d'équilibre pour l'ensemble des niveaux d'engraissement.

Exposition accidentelle

Les cinétiques des concentrations de PCB-I dans le tissu adipeux et dans le jaune d'œuf sont présentées figure III-21.

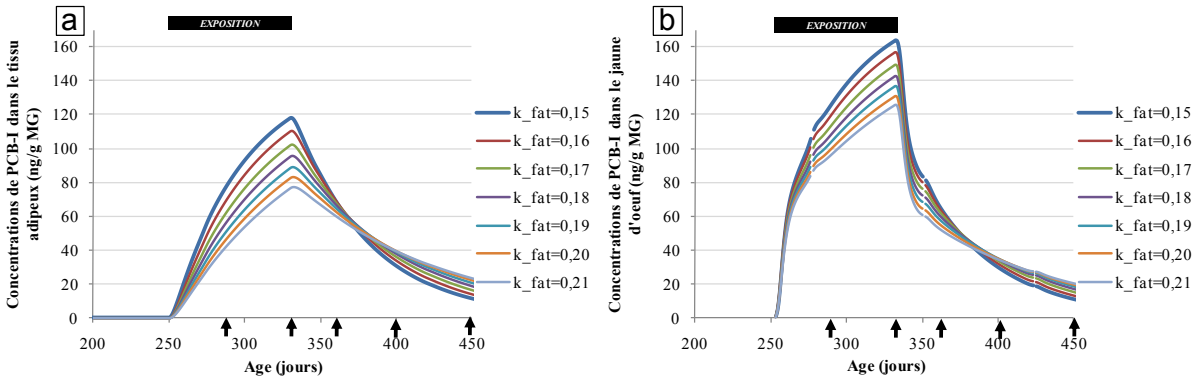


Figure III- 21 : Cinétiques de concentration de PCB-I dans le tissu adipeux (a) et dans le jaune d'œuf (b) selon les niveaux d'engraissement chez des poules soumises à une contamination accidentelle : zoom de t=200 à 450 jours

Les flèches noires marquent les jours 290, 330, 360, 400 et 450.

Dans ce cas, le début de l'exposition intervient alors que la poule est déjà en ponte. Lors de l'exposition, les concentrations de PCB-I dans le tissu adipeux et dans le jaune d'œuf augmentent progressivement, pour atteindre des valeurs à J330 (fin de l'exposition) d'autant plus élevées que l'animal est maigre. Toutefois, la différence entre poules maigres et grasses n'est pas inversement proportionnelle à celle de leur pool lipidique corporel, puisque, pour un pool lipidique augmentant d'un facteur 2,1 (E1 à E7), les concentrations de PCB-I dans le gras abdominal et dans l'œuf sont diminuées d'un facteur de respectivement 1,8 et 1,3. Lorsque la décontamination débute, la sortie *via* l'œuf permet, comme dans le cas de l'exposition chronique, une diminution de la concentration de PCB-I des tissus d'autant plus rapide que la poule est maigre. Toutefois, le phénomène, encore accentué, conduit à l'inversion de la hiérarchie des poules, avec des poules maigres qui présentent une concentration de PCB-I plus faible que les poules grasses dans les 35-40 jours qui suivent l'arrêt de l'exposition.

En début de période d'épuration, la cinétique de formation du jaune est à l'origine de sa décontamination rapide par rapport au tissu adipeux : en 30 jours (J 330 à J 360), la teneur en PCB-I de l'œuf est diminuée de 59 et 57% respectivement chez les poules maigres et grasses, alors que la teneur en PCB-I du gras abdominal est diminuée de respectivement 42 et 22%.

Dans notre exemple de simulation, la durée de la phase de ponte n'est pas suffisante pour ramener les poules à l'état initial (Figure III-22).

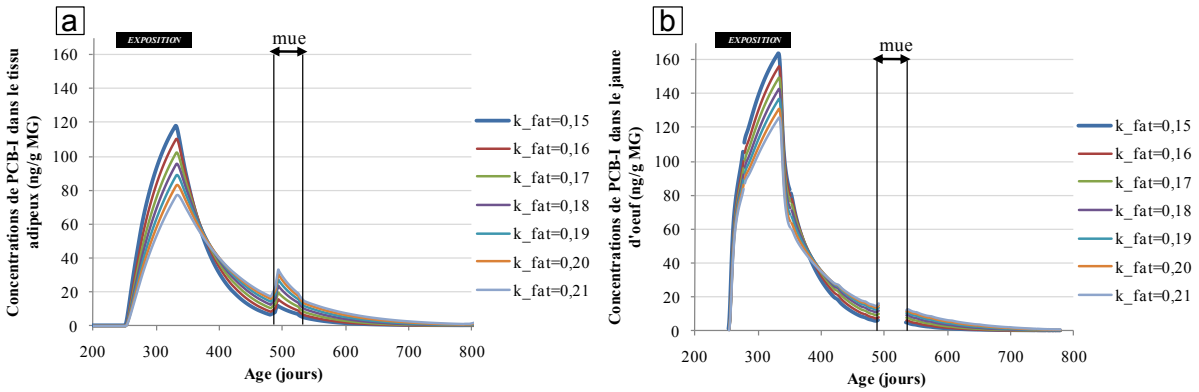


Figure III- 22 : Cinétiques des concentrations de PCB-I dans le tissu adipeux (a) et dans le jaune d'œuf (b) selon les niveaux d'engraissement chez des poules soumises à une contamination accidentelle de t=250 à 330 jours.

En l'absence de ponte, la charge lipidique corporelle dilue la charge de POP et par suite pilote la teneur en PCB-I du tissu adipeux et celle des premiers œufs pondus.

Chez des animaux en ponte, l'état d'engraissement :

1. a un effet important sur les cinétiques de contamination et de décontamination des matrices : l'augmentation et la diminution des concentrations de PCB-I dans les tissus est d'autant plus rapide que la charge lipidique corporelle est faible,

2. n'influe ni sur les concentrations de PCB-I dans l'œuf et dans le gras abdominal à l'équilibre, ni sur le temps nécessaire pour atteindre cet équilibre, en période d'exposition.

3.3.3. Effet des caractéristiques de ponte sur les cinétiques des concentrations de PCB-I dans le tissu adipeux et dans l'œuf

Pour cette simulation, seules les caractéristiques de ponte varient alors que les caractéristiques corporelles sont fixées aux valeurs de référence (présentée dans le tableau III-13).

Exposition chronique

Les cinétiques des concentrations de PCB-I dans le tissu adipeux et dans le jaune d'œuf sont présentées figure III-23.

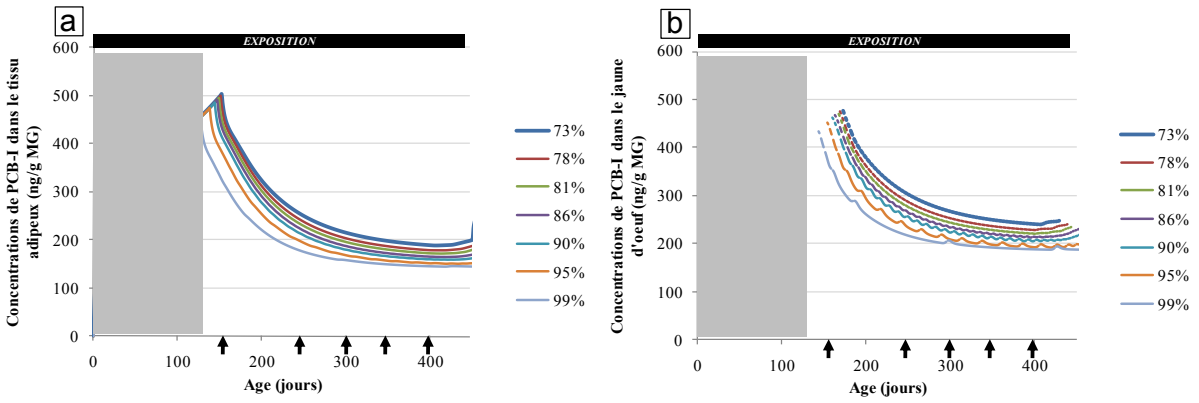


Figure III- 23 : Cinétiques des concentrations de PCB-I dans le tissu adipeux (a) et dans le jaune d'œuf (b) selon le niveau de ponte chez des poules soumises à une contamination chronique
Les flèches noires marquent les jours 160, 250, 300, 350 et 400.

Dans notre modèle, la dégradation du taux de ponte est représentée par une diminution de la longueur de la série maximale qui se traduit par une augmentation de la fréquence des pauses, mais également un raccourcissement de la période de ponte avec une date d'entrée en ponte avancée et une date d'entrée en mue reculée. Cette représentation explique le décalage de 25 jours pour la ponte du premier œuf entre les taux de ponte de 99% (P7) et de 73% (P1). Ainsi, selon notre représentation, les poules ayant les taux de ponte les plus faibles présentent également les concentrations corporelles de PCB-I les plus élevées au moment de la ponte du premier œuf. Les teneurs en PCB-I du gras abdominal et de l'œuf diminuent en suivant des cinétiques quasiment parallèles, d'un taux de ponte à l'autre, ce qui révèle des vitesses de décontamination proches. Cela correspond au fait qu'un flux de lipides plus faible est compensé par une teneur en PCB plus élevée. Cette compensation a pour origine l'indépendance des concentrations de PCB-I dans le compartiment central et dans l'œuf. Le flux de PCB du compartiment central vers l'œuf ne dépend que du pool de PCB-I présent dans le compartiment central et non de la concentration de PCB dans l'œuf. A l'équilibre, aux environs de 400 jours, les concentrations de PCB-I dans les deux tissus dépendent du taux de ponte. De la détérioration du taux de ponte de 99 à 73% (-26%) résulte une augmentation des concentrations de PCB-I de 23% dans le tissu adipeux et de 22% dans le jaune d'œuf.

Calculé sur 20 jours (de t= 400 à t=420 jours), le flux de lipides exportés sur la période *via* l'œuf est pour ces deux taux de ponte, de respectivement 82 g et 111 g. Le flux exporté de PCB-I résultant de la ponte atteint environ 20 000 ng sur la période, ce qui correspond bien à l'état d'équilibre, à la quantité absorbée de laquelle est soustraite la quantité métabolisée.

Exposition accidentelle

Les cinétiques des concentrations de PCB-I dans le tissu adipeux et dans le jaune d'œuf sont présentés figure III-24.

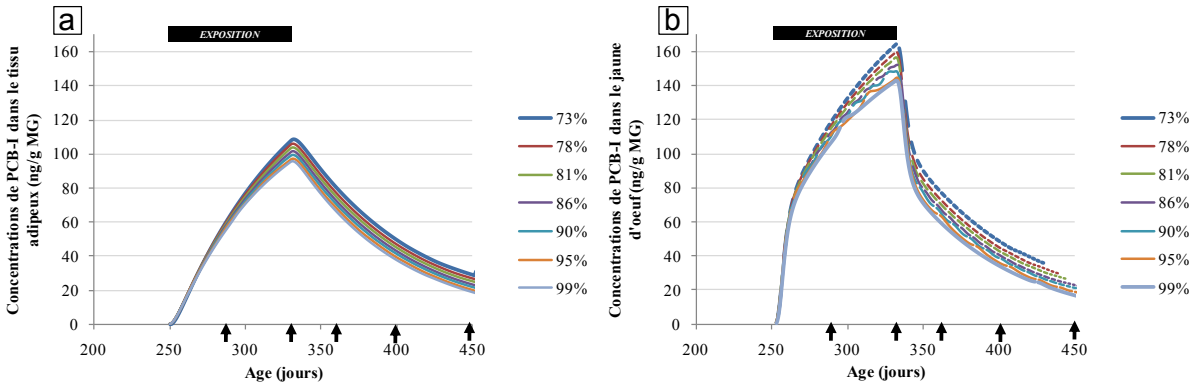


Figure III- 24 : Cinétiques des concentrations de PCB-I dans le tissu adipeux (a) et dans le jaune d'œuf (b) selon le niveau de ponte chez des poules soumises à une contamination accidentelle
Les flèches noires marquent les jours 290, 330, 360, 400 et 450.

Comme précisé lors de l'étude de l'influence du niveau d'engraissement, le début de l'exposition intervient alors que la poule est déjà en ponte. Lors de l'exposition les concentrations de PCB-I dans le tissu adipeux et dans le jaune d'œuf augmentent progressivement, pour atteindre des valeurs à t=330 jours (fin de l'exposition) d'autant plus élevées que le taux de ponte est faible.

La différence entre les poules présentant des niveaux de ponte faible ou élevé est presque inversement proportionnelle à celle de leur pool lipidique excrété *via* le jaune. En effet, à t=330 jours, pour un pool lipidique excrété augmentant d'un facteur 1,3 (P1 à P7), les concentrations de PCB-I dans le gras abdominal et dans l'œuf sont diminuées d'un facteur de respectivement 1,1 et 1,2.

Le taux de ponte :

1. pilote les teneurs en PCB-I du gras abdominal et de l'œuf à l'équilibre. La variation des teneurs en PCB-I des tissus à l'équilibre est proportionnelle à celle du flux de lipides véhiculé par l'œuf,
2. n'influe pas sur le temps nécessaire pour atteindre l'équilibre,
3. est de faible influence sur la vitesse de décontamination du gras abdominal et de l'œuf.

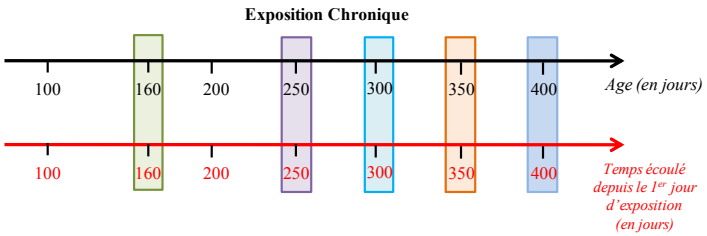
3.3.4. Etude des « amplitudes[31] » de contamination et de décontamination en fonction des caractéristiques physiologiques

3.3.4.1. Comparaison des effets de l'engraissement et des performances de ponte

Les tableaux III-22 et III-24 permettent de récapituler et de comparer numériquement les impacts des caractéristiques physiologiques au cours du temps. Nous nous sommes focalisés sur les conséquences induites par une variation de 26% de masse lipidique stockée (pour un niveau de ponte constant : niveau de référence) ou par une variation de 26% de masse lipidique éliminée *via* l'œuf lors d'une ponte sur 100 jours (pour un niveau d'engraissement constant : niveau de référence). Ces marges de variation reviennent à comparer les différences d'effet sur les concentrations entre les états E1 à E4 d'une part et P1 à P7 d'autre part. Nous avons effectué ces comparaisons entre les concentrations dans chacun des tissus à différents points de la cinétique.

Les résultats rapportés dans le tableau III-23 mettent en évidence qu'une fois que les concentrations ont atteint l'équilibre, seule la variation du taux de ponte influence le niveau des concentrations. La variation de concentrations engendrée à tout temps de l'équilibre est environs égale à la variation du taux de ponte.

Tableau III- 22 : Variations des concentrations de PCB-I (en %) dans le tissu adipeux et dans le jaune d'œuf lors d'une variation de 26% de lipides stockés (au niveau du tissu adipeux) ou de 26% de lipides exportés *via* la ponte, pour les différents temps d'étude de l'exposition chronique (t= 160, 250, 300, 350 et 400 jours)



	J160		J250		J300		J350		J400	
	Δ [PCB-I]$_{TA}$	Δ [PCB-I]$_{J}$	Δ [PCB-I]$_{TA}$	Δ [PCB-I]$_{J}$	Δ [PCB-I]$_{TA}$	Δ [PCB-I]$_{J}$	Δ [PCB-I]$_{TA}$	Δ [PCB-I]$_{J}$	Δ [PCB-I]$_{TA}$	Δ [PCB-I]$_{J}$
Δ E = 26%	20	20	-1	1	-1	0	1	2	2	2
Δ P = 26%	31	28	30	29	26	23	24	24	23	22

TA : tissu adipeux ; J : Jaune d'œuf ; ΔE : variation de lipides stockés (*i.e.* : variation du poids du tissu adipeux) ; ΔP : variation de lipides exportés (*i.e.* : des lipides exportés par les jaunes d'œufs sur 100 jours)
Chaque couleur fait référence aux dates marquées d'un bandeau de couleur sur la frise chronologique.

[31] L'amplitude des concentrations est calculée comme le rapport des concentrations de PCB-I dans un tissu donné (d'une poule dont les caractéristiques physiologiques sont fixes) à un temps t=x et à un temps t=x+y.

Exprimés au cours du temps, et non plus à des temps fixés, les mêmes effets sont observables. A savoir, chez les poules maigres (E1), les concentrations de PCB-I dans le tissu adipeux et dans le jaune d'œuf sont divisées par respectivement 2,7 et 2,4 entre le début de la ponte et l'état d'équilibre (Tableau III-22). Ces facteurs sont réduits à respectivement 2,2 et 2,0 pour les poules E4. Pour une variation d'un état E1 à un état E4, cela correspond à appliquer un facteur de 1,2 entre les amplitudes des concentrations, calculées entre J160 et J400, et cela pour les deux tissus considérés. Le même calcul effectué pour le passage d'un état P1 à P7 donne un facteur de 0,9 et 1,1 pour les variations des amplitudes respectivement dans le tissu adipeux et dans le jaune d'œuf.

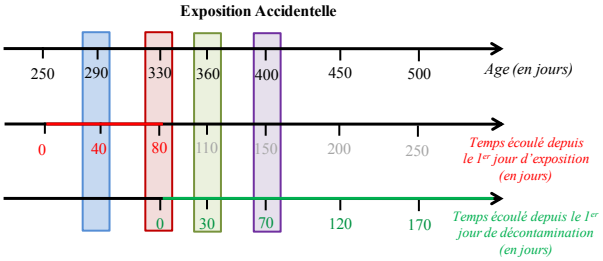
Tableau III- 23 : Calcul des amplitudes des concentrations dans le tissu adipeux et le jaune d'œuf entre les jours J160 et J400 lors d'une exposition chronique

	TA	J		TA	J
E1	2,7	2,4	**P1**	2,3	2,0
E4	2,2	2,0	**P7**	2.4	1,9
Δ E = 26%	*1,2*	*1,2*	***Δ P = 26%***	*0,9*	*1,1*

TA : tissu adipeux ; J : Jaune d'œuf ; ΔE : variation de lipides stockés (*i.e.* : variation du poids du tissu adipeux) ; ΔP : variation de lipides exportés (*i.e.* : des lipides exportés par les jaunes d'œufs sur 100 jours)

Le tableau III-24 rapporte le phénomène d'inversion des concentrations en fonction de l'état d'engraissement qui a lieu entre le jour J360 et J400 pour cette simulation. En revanche l'effet de la ponte est beaucoup moins marqué, entrainant une variation quasi-proportionnelle à la variation du taux de ponte.

Tableau III- 24 : Variations des concentrations de PCB-I (en %) dans le tissu adipeux et dans le jaune d'œuf lors d'une variation de 26% de lipides stockés (au niveau du tissu adipeux) ou de 26% de lipides exportés *via* la ponte, pour les différents temps d'étude de l'exposition accidentelle (t= 290, 330, 360, 400 jours)



	J290		J330		J360		J400	
	Δ [PCB-I]$_{TA}$	Δ [PCB-I]$_{J}$	Δ [PCB-I]$_{TA}$	Δ [PCB-I]$_{J}$	Δ [PCB-I]$_{TA}$	Δ [PCB-I]$_{J}$	Δ [PCB-I]$_{TA}$	Δ [PCB-I]$_{J}$
Δ E = 26%	26	14	19	13	3	8	-24	-18
Δ P = 26%	9	10	12	13	17	22	24	29

TA : tissu adipeux ; J : Jaune d'œuf ; ΔE : variation de lipides stockés (*i.e.* : variation du poids du tissu adipeux) ; ΔP : variation de lipides exportés (*i.e.* : des lipides exportés par les jaunes d'œufs sur 100 jours).
Chaque couleur fait référence aux dates marquées d'un bandeau de couleur sur la frise chronologique.

De même que les rapports d'amplitude effectués en contamination chronique, un facteur proche de 1 (0,8 et 0,9) permet le passage d'un état P1 à P7 lors de la décontamination de J330 à J400, pour les deux tissus (Tableau III-25). Le passage de E1 à E4 implique une division de l'amplitude des concentrations par 1,5 et 1,4 respectivement pour le tissu adipeux et le jaune. Les variations d'engraissement ont donc un impact plus élevé sur la vitesse de décontamination que les variations de performance de ponte.

Tableau III- 25 : Calcul des amplitudes des concentrations dans le tissu adipeux et le jaune d'œuf entre les jours J330 et J400, suite à une exposition accidentelle

	TA	**J**		**TA**	**J**
E1	3,9	5,5	**P1**	2,2	3,4
E4	2,5	4,1	**P7**	2,5	4,1
Δ E = 26%	*1,5*	*1,4*	***Δ P = 26%***	*0,9*	*0,8*

TA : tissu adipeux ; J : Jaune d'œuf ; ΔE : variation de lipides stockés (*i.e.* : variation du poids du tissu adipeux) ; ΔP : variation de lipides exportés (*i.e.* : des lipides exportés par les jaunes d'œufs sur 100 jours)

L'impact des caractéristiques physiologiques sur les teneurs en PCB dans les œufs dépend de la date de prélèvement par rapport à la période d'exposition.

En contamination chronique,

1. à l'état d'équilibre (ici, à partir d'environ 300 jours), seul le taux de ponte influe de façon proportionnelle sur les concentrations de POP dans les tissus.
2. l'état d'engraissement influe plus que les performances de ponte sur la vitesse de décontamination.

Lors d'une exposition de 80 jours suivie d'une période d'épuration,

1. l'engraissement et la ponte influent sur les concentrations au cours de la contamination et de la décontamination. Les impacts de ces caractéristiques physiologiques sont variables au cours du temps, et sont croissants au cours du temps (en valeur absolue) lors de la décontamination,
2. l'état d'engraissement influe plus que les performances de ponte sur la vitesse de décontamination.

3.3.4.2. Intégration des variations conjointes de l'état d'engraissement et des performances de ponte

Afin d'intégrer les variations de l'état d'engraissement et celles des performances de ponte, nous avons suivi les amplitudes de concentration lors de la période de décontamination de l'exposition accidentelle, en fonction du rapport $I_{p/e}$ définit par :

$$I_{p/e} = \frac{Q_p}{Q_e} \times 100$$

avec Q_p : la quantité de lipides exportés *via* la ponte (en g sur 100 jours) et Q_e : la quantité de lipides stockés dans le tissu adipeux (en g), témoin d'un certain état d'engraissement.

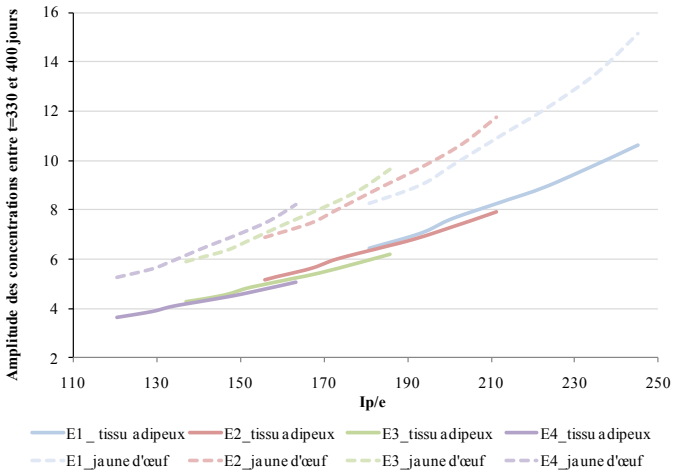


Figure III- 25 : Amplitude des concentrations entre t= 330 jours et t=400 jours en fonction de l'indice $I_{p/e}$ (en %)1

[1] Pour chaque état d'engraissement, la variation de $I_{p/e}$ est obtenue en faisant varier le flux de lipides *via* l'œuf.

De façon générale, la Figure III-25 met en évidence une augmentation de l'amplitude des concentrations sur un même intervalle de temps de la période de décontamination (donc une augmentation de vitesse de décontamination), lorsque $I_{p/e}$ augmente.

Globalement, plus le flux de lipides éliminé *via* la ponte augmente par rapport à la quantité de lipides stockés, plus la vitesse de décontamination augmente.

3.3.5. Effet combiné des caractéristiques corporelles et de ponte sur les cinétiques des concentrations de PCB-I dans le tissu adipeux et dans l'œuf : illustration à l'échelle de la vie d'une poule

Dans ce paragraphe, quatre situations croisant les caractéristiques extrêmes présentées précédemment sont testées. De plus, la période de simulation a été allongée de façon à décrire

l'impact de la mue sur les cinétiques de concentration de PCB-I dans le tissu adipeux et dans l'œuf.

Exposition chronique

Les cinétiques de concentrations de PCB-I dans le tissu adipeux et dans le jaune d'œuf lors d'une exposition chronique sont présentées figure III-26.

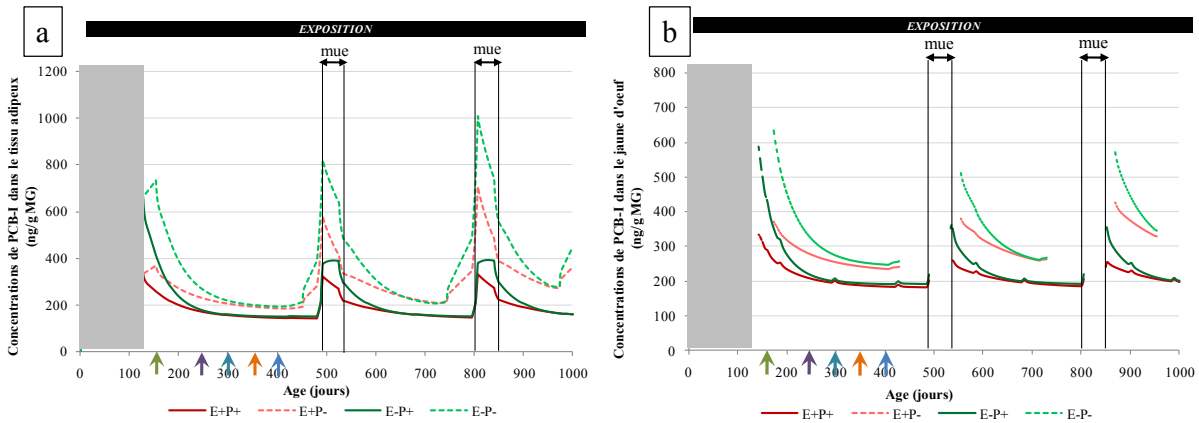


Figure III- 26 : Cinétiques des concentrations de PCB-I dans le tissu adipeux (a) et dans le jaune d'œuf (b) simulées au cours de la vie de poules présentant deux niveaux d'engraissement et de ponte différents, soumises à une exposition chronique (C)

Les lignes rouges correspondent à une poule présentant un niveau d'engraissement élevé (E^+), tandis que les lignes vertes correspondent à un niveau d'engraissement bas (E^-). Les lignes foncées continues représentent les réponses à un taux de ponte élevé (P^+), tandis que les lignes claires en pointillés représentent les réponses à un taux de ponte faible (P^-). Les flèches de couleur marquent les jours 160, 250, 300, 350 et 400.

Les phases décrites en figure III-19 sont retrouvées en figure III-26 où les cinétiques des concentrations de PCB-I dans le gras abdominal et le jaune, résultant des scenarii en contamination chronique (C), sont représentées sur trois cycles de ponte successifs.

De nouveau, les poules les plus grasses sont les moins contaminées au début et les taux de ponte les plus faibles aboutissent à l'état d'équilibre le plus élevé. Lors de la reprise de ponte après la mue, la concentration dans les tissus est conditionnée par le taux de ponte et le tissu adipeux. En effet, l'interruption de la ponte a entraîné une augmentation de la charge corporelle de PCB d'autant plus élevée que la poule est maigre. Lors de la reprise de ponte, la diminution des concentrations est d'autant plus rapide que la poule est maigre. La poule retourne vers l'état d'équilibre initial, qui dépend du taux de ponte.

Exposition accidentelle

Les cinétiques des concentrations de PCB-I dans le tissu adipeux et dans le jaune d'œuf lors d'une exposition accidentelle sont présentées figure III-27.

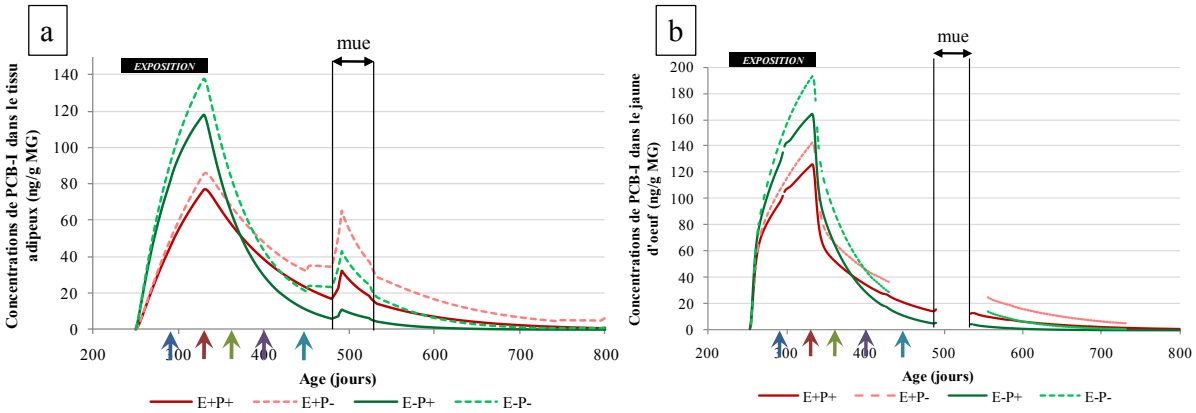


Figure III- 27 : Cinétiques des concentrations de PCB-I dans le tissu adipeux (a) et dans le jaune (b), simulées au cours de la vie de poules présentant deux niveaux d'engraissement et de ponte différents, soumises à une exposition accidentelle de 80 jours (A)

Les lignes rouges correspondent aux poules présentant un niveau d'engraissement élevé (E^+), tandis que les lignes vertes correspondent à celles ayant un niveau d'engraissement bas (E^-). Les lignes foncées continues représentent les réponses à un taux de ponte élevé (P^+), tandis que les lignes claires en pointillées représentent les réponses à un taux de ponte faible (P^-). Les flèches de couleur marquent les jours 290, 330, 360, 400 et 450.

De même que lors d'une exposition chronique, les conséquences de l'arrêt de ponte et de la mue sont observables sur les cinétiques des concentrations décroissantes de PCB-I lors de la décontamination dans les scenarii d'exposition accidentelle (Figure III-27). Cette fois, la poule est en période de décontamination depuis 150 jours lors de son entrée en mue. Les concentrations lors de la reprise de ponte restent inchangées par rapport à l' « avant mue », ce qui est cohérent avec le fait que le pool de POP au sein de l'animal n'ait été ni augmenté (puisque la poule n'est plus exposée), ni significativement diminué (dans le cas d'une élimination globale due dans sa majorité à l'élimination *via* les œufs, c'est-à-dire dans le cas où l'effet du métabolisme sur la diminution de la charge corporelle est négligeable).

La ponte correspond à une voie d'élimination des POP. Le niveau de ponte et la présence de périodes de non ponte se répercutent sur les teneurs corporelles de POP. La variation du niveau d'engraissement entraîne des différences élevées de concentrations dans les tissus, notamment, lors des périodes de non-ponte et des périodes de non-équilibre. Le niveau d'engraissement intervient également dans la vitesse de décontamination des tissus. Parallèlement, le taux de ponte pilote le niveau de contamination des tissus à l'équilibre.

4. Discussion

Le modèle de transfert de POP à l'échelle de la poule pondeuse simule les flux de POP au sein de l'animal en intégrant les caractéristiques physiologiques liées à l'état d'engraissement et à la ponte. La modélisation des flux de POP repose sur le principe de l'équilibre des concentrations entre les compartiments. Il en résulte un effet marqué de l'état d'engraissement sur la vitesse de décontamination de l'organisme, qui est en accord avec les résultats expérimentaux obtenus avec des poules pondeuses de souches différentes (Opdycke et Menzer, 1984) et modélisés par MacLachlan (2008). Notre modèle permet de modéliser l'évolution des concentrations de POP dans les tissus en fonction des variations du niveau de lipides stockés et éliminés *via* la ponte.

Cependant, il est important de souligner que l'élaboration de ce modèle a impliqué de faire plusieurs hypothèses et simplifications notamment au niveau :

1. *de l'état d'engraissement* :

- l'évolution du tissu adipeux est proportionnelle au poids vif au cours du temps. Nous avons fait varier le poids vif assez schématiquement au cours de la mue, par souci de simplicité et par manque de données précises pour calibrer l'évolution de ces paramètres.

- la charge lipidique du compartiment central ne peut prendre que deux valeurs : une valeur haute en période de ponte et une valeur basse en période de non ponte. Bien que schématique, cette représentation permet de rendre compte des variations rapides observées chez la poule. Une modélisation plus fine de ces deux points n'aurait probablement pas d'impact sur l'allure de la cinétique des concentrations ni sur le niveau de ces dernières, excepté à l'échelle du jour au niveau de la mue.

2. *de la production d'œufs :*

- le poids du jaune d'œuf pondu est considéré constant tout au long de la vie d'une poule, ce qui ne correspond pas à la réalité puisque le poids du jaune augmente avec l'âge de la poule. Ce phénomène, qui a été modélisé par Johnston et Gous (2007ab), n'a pas été intégré dans le modèle par souci de simplification.

- les différents taux de ponte sont caractérisés par la longueur de la série maximale donnée. Le taux de ponte est en réalité le résultat d'un ensemble de paramètres, dont certains n'ont pas été représentés dans le modèle. En effet, la longueur des pauses est fixée à un jour et n'est pas

modulable dans le modèle. Cependant le pilotage du taux de ponte *via* la longueur des séries permet d'obtenir, en première approche, l'effet d'une variation du flux de matières lipidiques quittant le système sur la charge de POP de l'organisme.

3. *de l'exposition :*

Dans les scenarii développés précédemment, l'exposition débute dès le premier jour de vie de l'animal, avec une dose de POP ingérée constante. Ce choix est discutable car, d'une part, on peut supposer une proportionnalité entre les doses de PCB ingérés et celles de sol ou d'aliment, et d'autre part, les poules n'ont en général pas accès au parcours avant 18 semaines. Toutefois, la Figure III-28 montre que l'interprétation des cinétiques que nous avons faite dans les paragraphes précédents reste valable si la contamination débute à 18 semaines plutôt qu'à la naissance. En particulier, quelle que soit la date de début de l'exposition, les concentrations dans le jaune d'œuf tendent vers le même équilibre.

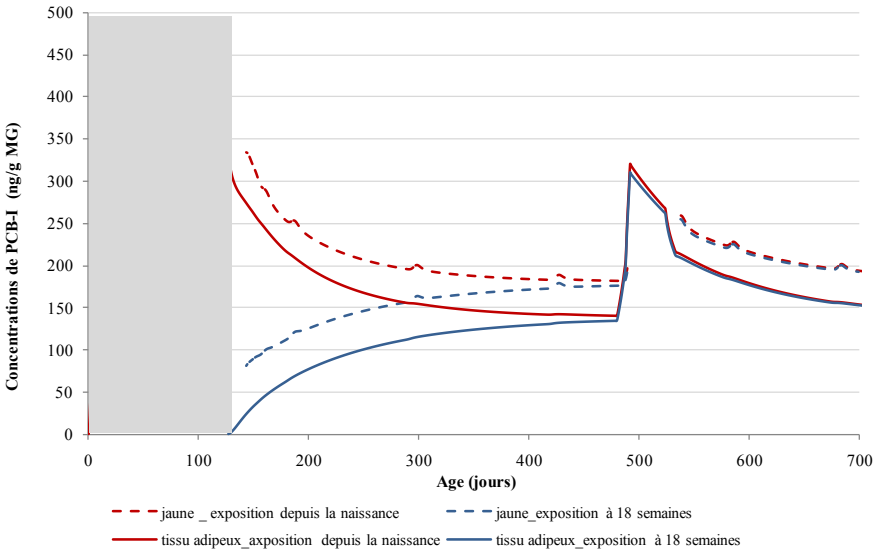


Figure III- 28 : Comparaison des cinétiques des concentrations de PCB-I dans le tissu adipeux et dans le jaune, simulées au cours de la vie (de la naissance à la fin de son deuxième cycle de ponte) d'une poule exposée dès son premier jour de vie et d'une poule exposée à partir de 18 semaines

La dose d'exposition est celle des scenarii détaillés dans le chapitre III. L'état physiologique dans les deux cas correspond à un niveau d'engraissement faible (**E**$^{-}$) et à un taux de ponte élevé (**P**$^{+}$).

Le modèle reste cependant à valider, les données existantes en milieu contrôlé ne concernent que des poules en pleine période de ponte. Il reste donc difficile d'évaluer plus en avant la qualité des simulations lorsque les performances de ponte varient. Les mêmes difficultés sont rencontrées pour les simulations concernant les états d'engraissement d'autant que ces derniers ne sont que peu renseignés lors des expérimentations.

Malgré ces limites et compte tenu des hypothèses et simplifications considérées, ce modèle a permis de représenter l'évolution des concentrations à l'échelle de la vie de l'animal, en simulant des périodes de ponte et de mue. A notre connaissance, ce modèle est le premier chez la poule pondeuse à intégrer ce niveau de variations physiologiques à l'échelle du temps.

Dans le modèle proposé par Van Eijkeren *et al.* (2006), les flux de POP chez des animaux présentant des caractéristiques physiologiques différentes ne peuvent être modulés qu'en modifiant les coefficients k. Au contraire, dans notre modèle, ces coefficients sont caractéristiques de la molécule uniquement. Notre modèle permet d'une part de faire varier les charges lipidiques au cours de la vie de la poule, mais aussi de tester différents niveaux d'engraissement, tout en ne modifiant pas les coefficients *k* propre à chaque POP.

Pour conclure, ce modèle dynamique montre clairement que :

- pour une même contamination et un même scénario, la concentration de POP varie de façon importante dans le temps,

- l'impact de la physiologie de la poule (état d'engraissement et taux de ponte) sur le niveau de contamination des œufs dépend nettement de la date à laquelle les œufs sont prélevés.

En pratique, cela signifie que pour l'évaluation du risque en élevage, de nombreux paramètres doivent être pris en compte, au-delà de la concentration de POP dans la matrice ingérée, la durée d'exposition et la biodisponibilité des POP ingérés. Schématiquement, si la collecte des œufs intervient en début de ponte ou après une mue, l'état d'engraissement de la poule est un facteur important de détermination du niveau de contamination de l'œuf. Si la collecte intervient lorsque la période de ponte est établie, le niveau de ponte est le principal pilote du niveau de contamination de l'œuf. En pratique, et pour proposer des mesures de corrections en élevage, il serait important de connaître les caractéristiques du troupeau au moment du prélèvement, surtout l'âge des poules et leurs performances.

5. Références

Aksit, M.; Yalçin, S.; Karul, A. B., Physiological stress parameters during food withdrawal period in force moulted hens. Archiv fur Geflugelkunde 2003, 67, (5), 212-216.

Akiba, Y.; Jensen, L. S.; Barb, C. R.; Kraeling, R. R., Plasma estradiol, thyroid hormones, and liver lipid content in laying hens fed different isocaloric diets. Journal of Nutrition 1982, 112, (2), 299-308.

Balnave, D., Relationship between blood linoleic acid and laying activity in the laying hen. Journal of the Science of Food and Agriculture 1971, 22, (9), 467–469.

Bacon, W. L.; Leclercq, B.; Blum, J. C., Difference in metabolism of very low density lipoprotein from laying chicken hens in comparison to immature chicken hens. Poultry science 1978, 57, (6), 1675-1686.

Bell, D. D., Historical and current molting practices in the U.S. table egg industry. Poultry Science 2003, 82, (6), 965-970.

Borlakoglu, J. T.; Walker, C. H., Comparative aspects of congener specific PCB metabolism. European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics 1989, 14, (2), 127-131.

Brunel, V.; Jehl, N.; Drouet, L. ; Portheau, M.C., Viande de volailles : Sa valeur nutritionnelle présente bien des atouts. Viandes et Produits Carnés, 2006, 25, (1), 18-22.

Burnham, M.R.; Peebles, E.D.; Branton, S.L.; Jones, M.S.; Gerard, P.D., Effects of F-strain Mycoplasma gallisepticum inoculation at twelve weeks of age on the blood characteristics of commercial egg laying hens. Poultry Science 2003, 82, (9), 1397-1402.

Cortright, K. A.; Wetzlich, S. E.; Craigmill, A. L., A PBPK model for midazolam in four avian species. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics 2009, 32, (6), 552-565.

Donoghue, D. J.; Schenck, F. J.; Hairston, H.; Podhorniak, L. V., Modeling drug residue uptake by eggs: Evidence of a consistent daily pattern of contaminant transfer into developing preovulatory yolks. Journal of Food Protection 1997, 60, (10), 1251-1255.

Drouillard, K. G.; Fernie, K. J.; Letcher, R. J.; Shutt, L. J.; Whitehead, M.; Gebink, W.; Bird, D. M., Bioaccumulation and biotransformation of 61 polychlorinated biphenyl and four polybrominated diphenyl ether congeners in juvenile American kestrels (Falco sparverius). Environmental Toxicology and Chemistry 2007, 26, (2), 313-324.

Drouillard, K. G.; Fernie, K. J.; Smits, J. E.; Bortolotti, G. R.; Bird, D. M.; Norstrom, R. J., Bioaccumulation and toxicokinetics of 42 polychlorinated biphenyl congeners in American kestrels (Falco sparverius). Environmental Toxicology and Chemistry 2001, 20, (11), 2514-2522.

Fournier, A.; Feidt, C.; Dziurla, M. A.; Grandclaudon, C.; Jondreville, C., Transfer kinetics to egg yolk and modeling residue recovered in yolk of readily metabolized molecules: Polycyclic aromatic hydrocarbons orally administered to laying hens. Chemosphere 78, (8), 1004-1010.

Guruge, K. S.; Tanabe, S., Congener specific accumulation and toxic assessment of polychlorinated biphenyls in common cormorants, phalacrocorax carbo, from Lake Biwa, Japan. Environmental Pollution 1997, 96, (3), 425-433.

Henriksen, E. O.; Gabrielsen, G. W.; Skaare, J. U., Levels and congener pattern of polychlorinated biphenyls in kittiwakes (Rissa tridactyla), in relation to mobilization of body-lipids associated with reproduction. Environmental Pollution 1996, 92, (1), 27-37.

ITAVI, Document de synthèse : résultats 2008 des enquêtes poulettes et pondeuses, 2009 [consulté le 12/04/11].<http://www.itavi.asso.fr/economie/references/synthesepondeuses2008.pdf >

Johnston, S. A.; Gous, R. M., A mechanistic, stochastic, population model of egg production. British Poultry Science 2007a, 48, (2), 224-232.

Johnston, S. A.; Gous, R. M., Extent of variation within a laying flock: Attainment of sexual maturity, double-yolked and soft-shelled eggs, sequence lengths and consistency of lay. British Poultry Science 2007b, 48, (5), 609-616.

Kan, C. A., Prevention and control of contaminants of industrial processes and pesticides in the poultry production chain. World's Poultry Science Journal 2002, 58, (2), 159-167.

Larbier, M. ; Leclercq, B., Nutrition et alimentation des volailles, INRA Editions, Paris, 1992, pp.349.

Leclercq, B., Détermination simultanée et *in vivo* des intensités de dépôt et de mobilisation des acides gras du tissu adipeux de la poule pondeuse. Influence du rationnement. Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique 1975, 15, (1), 63-71.

Lewis, P.D. ; Morris, T.R. ; Perry, G.C., A model for a predicting the age at sexual maturity for growing pullets of layer strains given a single change in photoperiod. Journal of Agricultural Science 2002, 138, 441-458.

Luo, X. J.; Liu, J.; Luo, Y.; Zhang, X. L.; Wu, J. P.; Lin, Z.; Chen, S. J.; Mai, B. X.; Yang, Z. Y., Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in free-range domestic fowl from an e-waste recycling site in South China: Levels, profile and human dietary exposure. Environment International 2009, 35, (2), 253-258.

MacLachlan, D. J., Physiologically based pharmacokinetic (PBPK) model for residues of lipophilic pesticides in poultry. Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment 2010, 27, (3), 302-314.

Mansoori, B.; Modirsanei, M.; Farkhoy, M.; Kiaei, M. M.; Honarzad, J., The influence of different single dietary sources on moult induction in laying hens. Journal of the Science of Food and Agriculture 2007, 87, (14), 2555-2559.

Nichols, J. W.; Bennett, R. S.; Rossmann, R.; French, J. B.; Sappington, K. G., A physiologically based toxicokinetic model for methylmercury in female American kestrels. Environmental Toxicology and Chemistry 2010, 29, (8), 1854-1867.

Opdycke, J. C.; Menzer, R. E., Pharmacokinetics of diflubenzuron in two types of chickens. Journal of Toxicology and Environmental Health 1984, 13, (4-6), 721-733.

Poulin, P.; Krishnan, K., An algorithm for predicting tissue: Blood partition coefficients of organic chemicals from n-octanol: Water partition coefficient data. Journal of Toxicology and Environmental Health 1995, 46, (1), 117-129.

Poulin, P.; Schoenlein, K.; Theil, F. P., Prediction of adipose tissue: Plasma partition coefficients for structurally unrelated drugs. Journal of Pharmaceutical Sciences 2001, 90, (4), 436-447.

Renema, R. A.; Robinson, F. E.; Newcombe, M.; McKay, R. I., Effects of body weight and feed allocation during sexual maturation in broiler breeder hens. 1. Growth and carcass characteristics. Poultry Science 1999, 78, (5), 619-628.

Sauveur, B., Reproduction des volailles et production d'œufs. INRA Editions, Paris, 1988, pp.449.

Snow, J. L.; Douglas, M. W.; Koelkebeck, K. W.; Batal, A. B.; Persia, M. E.; Biggs, P. E.; Parsons, C. M., Minimum phosphorus requirement of one-cycle and two-cycle (molted) hens. Poultry Science 2004, 83, (6), 917-924.

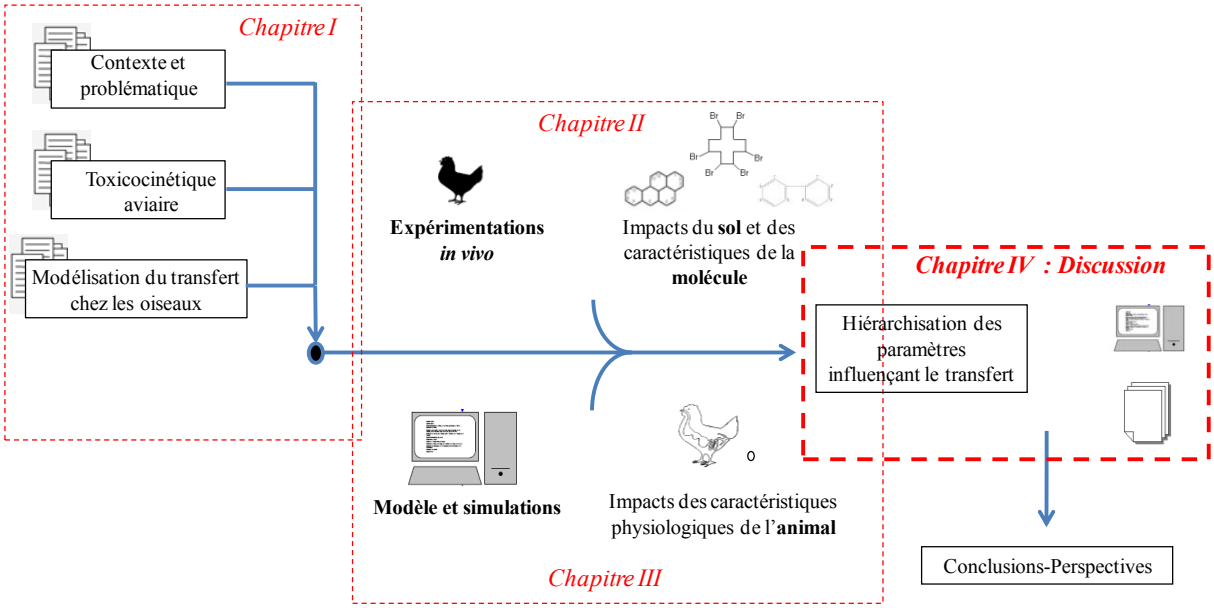
Thuy, N. T.; Ogle, B., Effect of supplementation on the growth and laying performance of confined and scavenging local chickens. Livestock Research for Rural Development 2007, 19, (2).

Traag, W. ; Kan, K.; Zeilmaker, M.; Hoogerbrugge, R.; van Eijkeren, J.; Hoogenboom, R., Carry-over of dioxins and PCBs from feed and soil to eggs at low contamination levels: Influence of binders on the carry-over from feed to eggs. RIVM 2004, Report 2004.016.

Travel, A.; Nys, Y.; Lopez, E., Facteurs physiologiques et environnementaux influençant la production et la qualité de l'œuf. INRA Productions Animales 2010, 23, (2), 155-166.

Uijttenboorgaard, T., Gewichtssamenstelling van soepkippen, Vleesdistributie en vleestechnologie 1985, 10, 30-31.

Van Eijkeren, J. C. H.; Zeilmaker, M. J.; Kan, C. A.; Traag, W. A.; Hoogenboom, L. A. P., A toxicokinetic model for the carry-over of dioxins and PCBs from feed and soil to eggs. Food Additives and Contaminants 2006, 23, (5), 509-517.


Chapitre I
Contexte et problématique
Toxicocinétique aviaire
Modélisation du transfert chez les oiseaux
Chapitre II
Expérimentations in vivo
Impacts du sol et des caractéristiques de la molécule
Modèle et simulations
Impacts des caractéristiques physiologiques de l'animal
Chapitre III
Chapitre IV : Discussion
Hiérarchisation des paramètres influençant le transfert
Conclusions-Perspectives

Chapitre IV : Discussion générale

1. Physiologie : un modèle de recherche

1.1. Le modèle : un outil d'exploration

L'étude du transfert *via* la modélisation nous a permis d'explorer l'impact de certaines caractéristiques physiologiques de la poule pondeuse sur le transfert d'un mélange de PCB-I à l'échelle de l'animal. En effet, en nous donnant l'opportunité d'envisager une multitude d'états physiologiques, le modèle s'est révélé être un outil pertinent pour percevoir l'influence des caractéristiques physiologiques sur le transfert des POP. Le travail de modélisation a également mis en évidence le manque de données expérimentales portant sur le transfert de contaminants à l'échelle de l'animal et la nécessité d'enrichir la base de données de façon à pouvoir valider le modèle et, le cas échéant, l'affiner en représentant plus précisément certains mécanismes.

1.2. Vers une validation

La validation du modèle nécessiterait un certain nombre de données supplémentaires, en particulier pour ce qui concerne les cinétiques de concentrations de POP dans le tissu adipeux et dans le compartiment central. Les concentrations de POP simulées dans les différents compartiments lors d'une interruption de ponte ou durant les jours qui la suivent, demandent également à être validées par des données expérimentales. Les expérimentations conduites au cours de la thèse ont mis en exergue, selon la molécule considérée, des différences de cinétique de distribution vers les différents compartiments (chapitre III).

1.3. Vers une meilleure représentation des mécanismes

Le modèle décrit dans cette thèse présente certaines limites quant à la représentation mécaniste des processus ADME. Notamment, le modèle actuel considère, pour chaque compartiment ou tissu, un pool lipidique et non les différentes fractions lipidiques. De même les flux de lipides entre les compartiments, que ce soient sous formes de pool ou de fractions lipidiques, ne sont pas représentés. Le modèle ne distingue donc pas le métabolisme et le devenir propre de chacune de ces fractions. Pourtant l'affinité des POP pour les différentes fractions lipidiques varie selon la molécule. Par exemple, Borlakoglu *et al.* (1990) ont montré

chez le pigeon que la proportion de liaisons de chacune des fractions lipidiques avec chacun des congénères de PCB était variable.

La représentation de ces fractions permettrait une approche plus mécaniste, au-delà de l'ajustement des paramètres *k* auquel nous devons nous limiter actuellement (voir la comparaison des valeurs ajustées de *k* pour les PCB et l'HBCD, paragraphe IV-2.2 et IV-2.3). En effet, l'état physiologique affecte l'équilibre des différentes fractions lipidiques sanguines. Parallèlement, les propriétés de liaison des molécules avec ces fractions lipidiques, - et par conséquent les mécanismes de distribution associés -, mais aussi l'absorption et le métabolisme, diffèrent selon les caractéristiques physico-chimiques des molécules. Ces phénomènes impliquent donc une variation des processus ADME.

Ainsi, la prise en compte de ces aspects (fraction lipidiques, caractéristiques de la molécule) apporterait plus de généricité au modèle et permettrait d'envisager son application à des molécules dont on ne connaît que quelques caractéristiques (et pas forcément un jeu de données de contamination et décontamination dans différents tissus).

Cependant, bien que non mécaniste pour le moment, le modèle que nous avons développé rend possible l'intégration de ces différences de comportement selon la molécule, en ajustant de façon empirique des paramètres pilotant les flux de POP.

2. Intégration du comportement de la molécule dans le modèle

2.1. Intégration du comportement de la molécule et structure du modèle

Comme nous l'avons précisé dans la présentation du modèle au chapitre III, les coefficients *k* régissant les flux entre les compartiments du modèle sont uniquement liés au comportement de la molécule étudiée (affinité pour chaque compartiment, susceptibilité à être métabolisée…). Cette caractéristique de notre travail, par comparaison à celui produit par d'autres auteurs chez la poule pondeuse (Van Eijkeren *et al.*, 2006), permet de dissocier le paramétrage de l'état physiologique de la poule de celui des flux de POP. Sous réserve de disposer de jeux de données adéquats, il est envisageable d'obtenir avec ce modèle des valeurs de *k* propres à chaque molécule tout comme l'ont fait d'autres auteurs chez des oiseaux sauvages (Clark *et al.,* 1987 ; Drouillard *et al.,* 2001 ; Drouillard et Norstrom, 2003). Par exemple, Drouillard *et al.* (2001, 2007) chez le faucon *(Falco sparverius)* ont ainsi ajusté des valeurs de paramètres de transfert (au niveau de la distribution et de l'élimination) propres à chaque congénère de PCB.

2.2. Cas du métabolisme des PCB-I : Ajustement du paramètre relatif au métabolisme *(k_elimination_clearance)*

S'intéressant aux effets des caractéristiques physiologiques, la calibration du modèle dans le chapitre III s'est focalisée sur le transfert d'un mélange de PCB-I. Cependant nous disposons également des cinétiques des concentrations dans l'œuf de chacun des congénères de ce mélange (Traag *et al.*, 2004). Or, comme nous l'avons mentionné dans la synthèse bibliographique, ces congénères ont une propension variable à être métabolisés.

Nous avons donc ajusté ce modèle pour deux congénères réputés pour avoir des comportements contrastés : les PCB 52 et 153. Dans le but de mettre en évidence l'effet du métabolisme sur la cinétique de ces congénères, nous avons conservé les valeurs de l'ensemble des paramètres régissant les flux de POP pour la somme des PCB-I, excepté le coefficient relatif au flux de POP éliminé du compartiment central par le métabolisme (*k_elimination_clearance*). Ce dernier a été fixé à 0,001 pour le PCB 153 et à 1,2 pour le PCB 52. Les simulations obtenues suite à l'ajustement du modèle pour ces deux congénères sont présentées sur la figure IV-1.

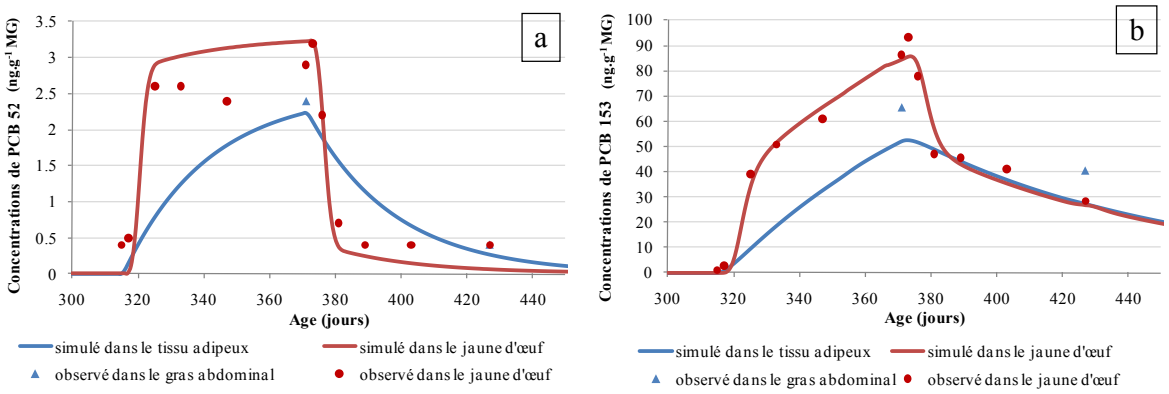


Figure IV- 1 : Simulations ajustées sur les cinétiques observées de contamination et de décontamination de deux congénères de PCB (a : PCB 52 ; b : PCB 153)

Cette application montre que le modèle donne la possibilité de rendre compte de l'effet de la susceptibilité métabolique sur la cinétique d'un congénère. La comparaison des valeurs de *k_elimination_clearance* attribuées au PCB 153 et au PCB52 corrobore le fait que, chez l'oiseau, le PCB 52 est fortement métabolisé contrairement au PCB 153 (Borlakoglu *et al.*,

1989 ; Braune et Norstrom, 1989 ; Rozenmeijer *et al.*, 1995 ; Drouillard *et al.*, 2001, Borga *et al.*, 2005).

2.3. Autres types de molécules

De la même façon que pour la somme des PCB-I dans le chapitre III, nous avons ajusté les paramètres pilotant les flux de HBCD sur le jeu de données issu de l'expérimentation décrite au chapitre II. Les valeurs des paramètres de contamination sont rappelées dans le tableau IV-1. Les cinétiques simulées sont confrontées aux points expérimentaux sur la figure IV-2 et les paramètres résultants de l'ajustement sont présentés dans le tableau IV-2. Cet ajustement met en évidence, là encore, l'impact du paramètre *k_elimination_clearance* sur l'allure de la cinétique des concentrations dans le jaune d'œuf. Nous pouvons aussi constater une valeur de ratio *k_storage* sur *k_mobilization* plus faible que pour les PCB (0,4 *vs* 0,6), ce qui traduit une propension à la bioaccumulation inférieure. Cependant, il est important de considérer avec précaution l'ajustement sur les concentrations dans le tissu adipeux car, dans notre expérimentation, la durée de l'exposition n'était pas suffisamment longue pour que l'équilibre soit atteint dans ce compartiment. L'ajustement n'est donc effectué que sur une portion de la cinétique.

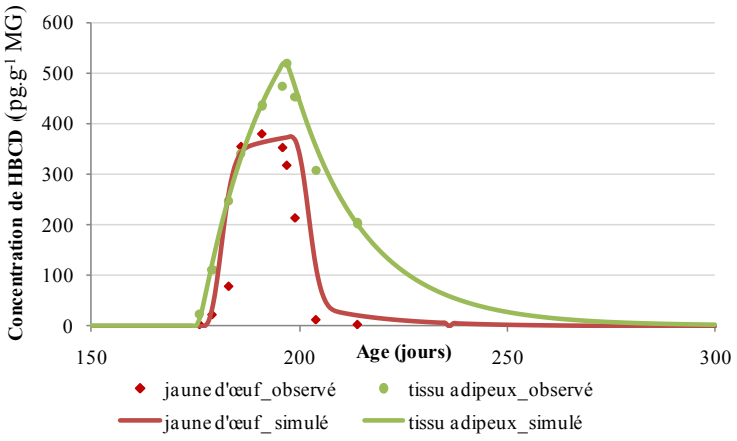


Figure IV- 2 : Confrontation des concentrations simulées aux observées (données issues de l'expérimentation décrite au chapitre II)

Tableau IV- 1 : Valeurs des paramètres de contamination de HBCD fixées par le protocole

en vert : paramètres fixés par hypothèse

Acronyme	*Unité*	*Valeur*
d_contamine	j	21
ti_contamine	j	175
k_matrix_amount_ingested	g	112
k_matrix_bioavailability	j^{-1}	1
k_matrix_concentration	$pg.g^{-1}$	1100

Tableau IV- 2 : Valeurs des paramètres ajustées sur la cinétique des concentrations de HBCD

Acronyme	**Valeur**
k_absorption	0,68
k_elimination_clearance	1
k_elimination_yolk	0,21
k_mobilization	18
k_storage	7,2

Unité des coefficients : j^{-1}

2.4. Conclusion en lien avec l'étude de cinétique d'une molécule

Ces exemples d'ajustements des paramètres du modèle à des molécules ayant des niveaux de biotransformation différents corroborent le fait que les concentrations de POP fortement métabolisés atteignent rapidement un plateau dans le jaune d'œuf. Le temps d'atteinte de l'équilibre est bien en relation avec la formation du jaune d'œuf en une dizaine de jours. La situation de dépôt de POP concomitant au dépôt de lipides du jaune est la même que celle décrite et modélisée mathématiquement suite à l'étude du transfert de HAP (chapitre II).

3. Sécurisation sanitaire des systèmes d'élevage avicole

3.1. Hiérarchisation des facteurs de risques au cours de l'ingestion et des étapes de l'ADME

3.1.1. Quantité absorbée

La quantité absorbée est pilotée par une succession de paramètres *k* intervenant dans la détermination de la quantité ingérée (*k_matrix_amount_ingested, k_matrix_concentration*), de la quantité bioaccessible (*k_matrix_bioavailability*) et de la quantité absorbée (*k_absorption*).

Chacun de ces paramètres influence les concentrations de POP dans les compartiments de l'animal de façon proportionnelle.

Dans le cas de poules élevées en plein air, la quantité de sol ingérée a été estimée entre 2 et 30 g, soit une variation de un pour quinze, selon les pratiques d'élevage. Notons que l'ingestion de 30 g de sol a été démontrée dans des situations de déséquilibre alimentaire marqué (Waegeneers et *al.,* 2009 ; Jondreville *et al.,* 2011). Le peu d'études existantes rapporte une biodisponibilité relative de 40 à 100% pour des composés de type PCDD/F, PCB-DL et PCB-NDL (Van Eijkeren *et al.,* 2006 ; Fournier *et al.,* soumis) selon le type de sol. Pour une concentration de polluants donnée dans un sol, la quantité ingérée de polluants accessibles au niveau de l'intestin de l'animal peut donc varier dans un rapport d'environ un à quarante (rapport de 2*0,4 à 30*1), avec pour principal facteur de variation la quantité de sol ingérée. En plus de ces paramètres, le coefficient d'absorption peut varier selon la molécule, ce qui amène une modulation potentielle supplémentaire de l'exposition interne de l'animal.

Les caractéristiques physiologiques de l'animal sont considérées comme n'ayant pas d'influence sur cette étape.

3.1.2. Quantités distribuées, métabolisées, éliminées

Les facteurs susceptibles de moduler les quantités distribuées, métabolisées, éliminées sont dépendants de la molécule et des caractéristiques physiologiques de l'animal. Les variations de concentration dans les œufs, dues au niveau d'engraissement et au taux de ponte, fluctuent selon le temps de prélèvement (par rapport à la période de contamination ou de décontamination).

Comme nous l'avons vu au paragraphe IV-2, le métabolisme de la molécule a un impact élevé sur les concentrations de POP dans les différents compartiments. Les autres paramètres *k* pilotant les flux de POP sont également liés à la molécule mais nous disposons de trop peu de données concernant leurs valeurs pour effectuer une comparaison pertinente de leurs impacts avec ceux entraînés par la variation des paramètres relatifs au métabolisme et à la physiologie.

3.1.3. Synthèse

En guise de synthèse, nous avons simulé différentes situations pour comparer les impacts des différents paramètres (Tableau IV-3 et Figure IV-3). Les simulations ont été effectuées sur le

premier cycle de ponte. Les paramètres du modèle prennent les valeurs utilisées pour les scenarii du chapitre III. L'exposition se caractérise par une concentration du sol à 14,2 $ng.g^{-1}$ MS (par souci de simplification, nous avons gardé la concentration utilisée dans le chapitre III), une durée de 150 jours à partir de 18 semaines d'âge (les poules sont donc déjà exposées lors de la formation de leur premier œuf), et aussi par une ingestion de 2 ou 30 g de sol (*k_matrix_amount_ingested*) et une disponibilité relative de 0,4 ou 1 (*k_matrix_bioavailability).* Le comportement de la molécule est défini par une valeur de *k_elimination_clearance* égale à 1 pour les molécules fortement métabolisées et à 0,001 pour les plus persistantes.

Tableau IV- 3 : Descriptif des combinaisons de paramètres utilisées pour les estimations des concentrations au cours du temps

		k_matrix_amount_ingested			
		2 g	30 g		
k_elimination_clearance	1	1-2-0,4	1-30-0,4	0,4	***k_matrix_bioavailability***
		1-2-1	1-30-1	1	
	0,001	0,001-2-0,4	0,001-30-0,4	0,4	
		0,001-2-1	0,001-30-1	1	

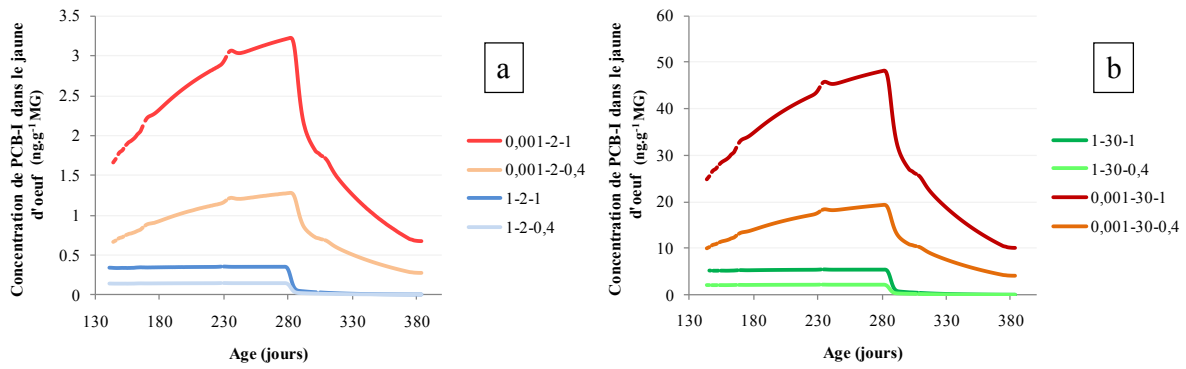


Figure IV- 3 : Cinétiques simulées des concentrations de POP dans l'œuf suivant la propension à être métabolisée de la molécule (caractérisée par un paramètre 0,001 ou1), la consommation quotidienne de sol par la poule (2 ou 30 g) et la disponibilité relative des polluants du sol (0,4 ou 1)

a- Simulations correspondant à une ingestion de 2 g de sol b- Simulations correspondant à une ingestion de 30 g de sol

Ces simulations mettent en évidence que le premier paramètre à déterminer est la quantité de sol ingéré (facteur 15) puis la valeur de la biodisponibilité des polluants du sol (facteur 2,5). Nous retrouvons l'impact élevé du niveau de métabolisme de la molécule sur l'allure de la cinétique et, en particulier, sur le niveau d'accumulation des POP dans les œufs et sur la

vitesse de décontamination des œufs. Une variation des concentrations de un pour dix est obtenue pour l'intervalle de valeur de *k_elimination_clearance* étudié.

Parallèlement, pour une molécule donnée, une variation de la quantité de lipides stockés ou éliminés *via* la ponte, s'élevant par exemple à 26% et caractérisant des états physiologiques différents, entraîne des variations de vitesse de contamination et de décontamination. Il en résulte des différences de concentration (de 10 à 30% pour cet exemple) entre les états physiologiques, à chaque temps de la cinétique. A l'état d'équilibre, une variation de lipides éliminés implique une différence quasiment proportionnelle du niveau des concentrations dans l'œuf.

Pour une molécule donnée, les pratiques d'élevage mises en œuvre peuvent donc affecter significativement la sensibilité sanitaire du système d'élevage, notamment en modulant la quantité de sol ingéré et/ou le statut physiologique de l'animal.

3.2. Sensibilité de la filière volaille vis-à-vis des POP

Différents éléments contribuent à faire de la filière avicole, une filière sensible à la contamination par les POP. D'une part, les poules sont potentiellement exposées aux POP, notamment *via* l'ingestion de sol lorsqu'elles ont accès à un parcours. D'autre part, les œufs sont consommés en France à hauteur de 248 œufs par habitants et 29% de la contribution des œufs en coquille sont issus d'élevages alternatifs (Magdelaine et Braine, 2010). Une diminution de plus de 10 % des effectifs de poules élevées en cages, au bénéfice principal des élevages de type plein air, est attendue d'ici 2012 (Magdelaine *et al.*, 2011). La contribution des ovoproduits est estimée à 3% de l'exposition de la population française aux PCDD/F et PCB-DL (AFSSA, 2005) et à 4 à 7% de l'exposition aux PCB-NDL (AFSSA, 2007).

Ces éléments rappellent la sensibilité de la filière avicole, notamment « poules pondeuses en plein air » vis-à-vis des POP et souligne l'importance d'élaborer des outils d'aide à la décision en cas de crise sanitaire.

4. Application à des situations de terrain : vers une meilleure gestion de crise

4.1. Le modèle : un outil pour la gestion de crise

Des contaminations des produits avicoles par les POP peuvent être détectées suite à une contamination environnementale avérée dont la source est connue ou inconnue. En première

approche, le modèle élaboré dans la thèse pour explorer l'impact des paramètres physiologiques peut donc être calibré pour différentes molécules en ajustant les coefficients pilotant les flux sur un (ou plusieurs) jeu de données expérimentales concernant le transfert de la molécule étudiée. Bien que non validé pour l'ensemble des molécules mises en jeu dans les crises sanitaires, ce modèle permet d'ores et déjà d'apporter de l'information en dynamique, contrairement à ce qui était fait jusqu'à présent en statique lors de gestion de crise (saisine AFSSA 2009-SA-0249). Les experts estiment le transfert vers l'œuf uniquement sous l'hypothèse que les concentrations dans les œufs ont atteint l'état d'équilibre, en considérant que la quantité entrante égale la quantité sortante du système. Nous avons appliqué notre modèle à trois situations de terrains afin d'illustrer l'intérêt de cet outil pour aider la gestion de crise.

4.2. Etudes de cas

4.2.1. Crise de Saint Cyprien : PCB-NDL dans l'œuf

4.2.1.1. Contexte

En août 2008, un incendie au sein d'une entreprise de recyclage de palettes de bois à Saint Cyprien (42) a dégagé des fumées pendant plusieurs mois. Des analyses ont mis en évidence une contamination en HAP, PCDD/F, PCB-DL et PCB-NDL des différents compartiments de l'environnement à proximité du site. Aucun élevage professionnel de poules en plein air n'était situé dans la zone de contamination, mais des basses-cours de particuliers, dont les produits sont autoconsommés, y étaient présentes (saisine AFSSA 2009-SA-0249). Différents niveaux de contamination ont été relevés dans les sols de la zone selon leur localisation par rapport à la source et aux vents dominants. Pour notre étude, nous ne nous intéresserons qu'au sol utilisé dans l'étude de l'impact du sol sur la biodisponibilité des PCB-I développée dans le chapitre II, c'est-à-dire à un sol sableux contaminé à 709 ng PCB-I.g^{-1} MS.

L'AFSSA a rendu un avis établissant des limites de contamination des sols pour lesquelles l'élevage de volailles en plein air présente un risque de contamination des produits au delà des limites réglementaires (Avis AFSSA, 2009). Nous nous proposons ici d'évaluer la quantité de sol maximale ingérée par jour pour ne pas dépasser dans les œufs, la limite de 50 ng.g^{-1} MG qui est à présent en discussion pour les PCB-NDL au niveau européen. Nous nous limiterons donc au transfert de la somme des PCB-NDL du sol de Saint Cyprien.

4.2.1.2. Simulations

Les simulations sont effectuées pour des poules pondeuses ayant accès à un parcours dont le sol est contaminé à 652 ng PCB-NDL.g^{-1} MS (correspondant à 709 ng PCB-I.g^{-1} MS auquel les 8% de PCB 118 du profil de PCB-I ont été soustraits) à partir de 18 semaines d'âge (soit 126 jours). Suite aux résultats de l'expérimentation conduite durant la thèse (Fournier *et al., soumis*), nous considérons une biodisponibilité relative de 100%. Les valeurs de l'ensemble des autres paramètres du modèle sont celles utilisées comme référence dans le chapitre modèle. Les valeurs des coefficients pilotant les flux de POP ont été conservées, en admettant que l'équilibre entre les congénères fortement métabolisés et peu métabolisés était suffisamment similaire dans les deux cas de contamination pour faire cette approximation.

Compte-tenu de la concentration élevée des PCB-NDL dans le sol et de leur biodisponibilité élevée, les simulations correspondant à l'ingestion de 0,5 ; 1,0 ; 1,5 et 2,0 g de sol par jour mettent en évidence qu'un dépassement rapide de la limite des 50 ng.g^{-1} MG est possible pour une faible ingestion de sol (dès 17 jours d'ingestion de 1,5 g de sol) (Figure IV-4). Ces simulations mettent en évidence que des poules (ingérant de 2 à 30 g de sol par jour) élevées sur des parcours contaminés à un tel niveau produisent des œufs qui peuvent être considérés comme impropres à la consommation dès la deuxième semaine d'exposition.

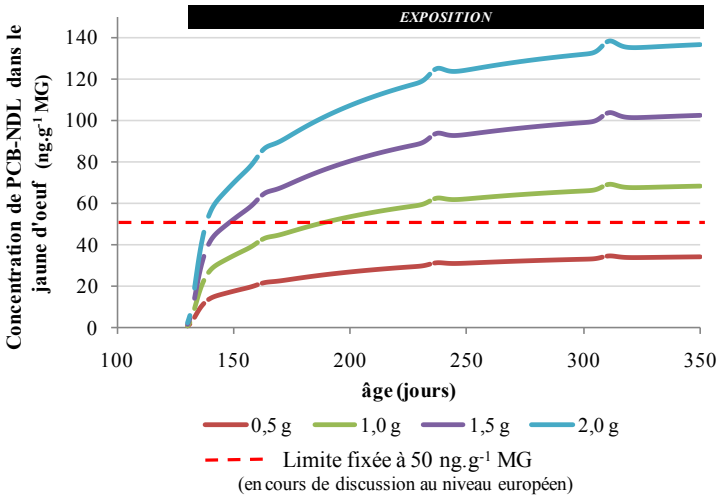


Figure IV- 4 : Cinétiques des concentrations de PCB-NDL simulées dans le jaune d'œuf, suite à l'ingestion quotidienne de 0,5 ; 1,0 ; 1,5 et 2,0 g de sol contaminé à 652 ng PCB-NDL.g-1 MS

Pour un sol très contaminé, comme c'est le cas dans notre exemple, une durée d'exposition très courte suffit pour dépasser la limite des 50 ng PCB-NDL.g^{-1} MG (Figure IV-4). Toutefois cette valeur limite, de même que la règlementation PCB-DL, est basée sur des seuils fixés

selon le principe ALARA[32] (« *as low as reasonably achievable* »), calculé à partir de teneurs basses collectées dans des produits issus d'élevage en claustration. La valeur seuil de 50 ng PCB-NDL.g^{-1} MG en résultant est donc faible, comparée à des valeurs fixées pour des produits tels que l'anguille (200 ng PCB-NDL.g^{-1} MG), qui proviennent d'un milieu non contrôlé dans lequel il existe une contamination de base. Ce constat interroge sur l'adéquation de la règlementation face à des produits issus d'élevage en plein air, et d'autant plus pour ceux provenant d'élevage familiaux où les paramètres sont généralement très peu maîtrisés.

4.2.2. Application à des données de décontamination de PCB-NDL

4.2.2.1. Contexte

Suite à un plan de contrôle, des œufs de poules élevées en plein air, présentant des contaminations anormalement élevées en dioxines et PCB ont été détectés. L'élevage était localisé dans le nord de la France, dans une région connue pour son passé industriel et pour laquelle des problèmes de contamination à la dioxine ont été recensés par le passé (Defour *et al.,* 1998). Trente poules pondeuses issues de cet élevage ont été isolées et placées en milieu contrôlé pour étudier la cinétique de décontamination dans les œufs produits. Cette étude a été menée par le LABERCA (Marchand *et al*., 2005). Nous avons choisis de nous focaliser sur les PCB-NDL. L'objectif est de retrouver la cinétique complète des concentrations de PCB-NDL dans l'œuf, afin d'estimer le temps de décontamination nécessaire pour que les œufs présentent des teneurs inférieures à 50 ng.g^{-1} MG. Cette simulation permet également d'estimer la quantité moyenne de PCB-NDL ingérée quotidiennement par les poules durant la période d'exposition.

4.2.2.2. Simulation

L'âge des poules lors de leur isolement a été estimé à environ 300 jours. Nous avons considéré que l'exposition des poules avait commencé dès le premier jour d'accès au parcours en plein air à l'âge de 18 semaines (soit 126 jours). La durée de l'exposition est donc estimée à 170 jours. Les caractéristiques physiologiques des poules sont celles décrites par les

[32] ALARA (« *as low as reasonably achievable », traduit en français par « aussi bas que raisonnablement possible»*) : Il s'agit d'une démarche de gestion du risque. Ce principe s'applique lorsque la distribution des contaminations des denrées alimentaires entraîne une exposition supérieure à la VTR (Valeur Toxicologique de Référence). Le seuil règlementaire dans ces matrices est fixé afin de ne retirer du marché que la portion la plus contaminée. Ce seuil peut être fixé au 90ième percentile, entraînant le retrait du marché des 10% les plus contaminés.

paramètres issus de la calibration des paramètres (chapitre III). De façon arbitraire, nous avons fixé à 10 g la quantité de matrice contaminée ingérée (Tableau IV-4). Après avoir vérifié que les congénères fortement métabolisés et persistants étaient dans des proportions proches de celles du profil de l'étude de Traag *et al.* (2004) ayant servi à calibrer le modèle, nous avons appliqué les paramètres de référence utilisés dans le chapitre III.

Tableau IV- 4 : Valeurs des paramètres de contamination de PCB-NDL

Acronyme	Unité	Valeur
d_contamine	j	170
ti_contamine	j	126
k_matrix_amount_ingested	g	10
k_matrix_bioavailability	j-1	1
k_matrix_concentration	ng.g-1	48

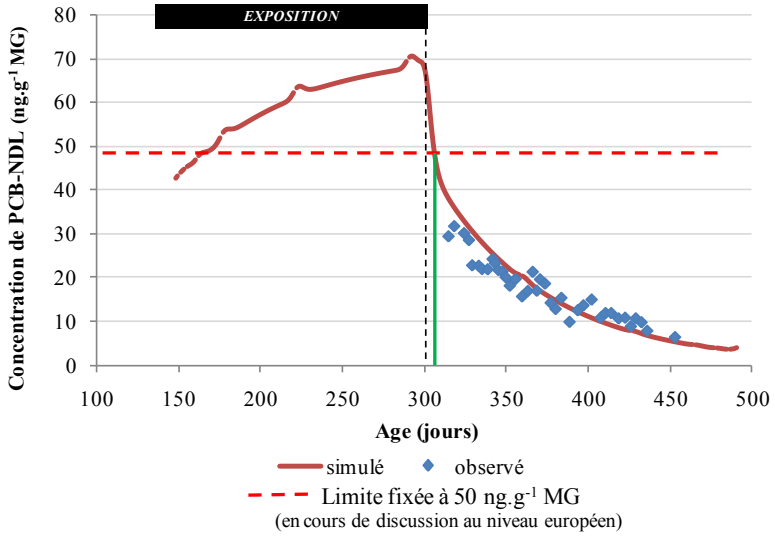


Figure IV- 5 : Confrontation des cinétiques de décontamination de PCB-NDL simulée vs observée

Cette simulation met en évidence un niveau d'ingestion d'environ 480 ng par jour et par poule (10 g * 48 $ng.g^{-1}$= 480 ng). La quantité de matrice ingérée n'étant en réalité pas connue, c'est bien la quantité ingérée et non la concentration de la matrice qu'il convient de considérer.

Enfin, pour les niveaux d'exposition étudiés, d'après la courbe de décontamination simulée, la durée nécessaire pour que la teneur de PCB-NDL dans les œufs soit inférieure à 50 $ng.g^{-1}$ MG est d'une dizaine de jours (Figure IV-5). Ce temps dépend des paramètres propres à la situation étudiée, notamment : le niveau de contamination initiale et les caractéristiques physiologiques des poules pendant cette période.

4.2.3. Cas de contamination en HBCD

4.2.3.1. Contexte

Dans un plan de surveillance (DGAL, 2009), des échantillons d'œufs ont été prélevés dans différents élevages. Les concentrations de HBCD dans les œufs s'élèvent pour leur maximum à 3389 $ng.g^{-1}$ MG avec une médiane de 0,157 $ng.g^{-1}$ MG.

4.2.3.2. Outils à disposition

La bibliographie concernant le transfert de HBCD vers les produits avicoles est peu fournie. Nous n'avons à disposition qu'un seul jeu de données chez la poule pondeuse concernant cette molécule, présenté au chapitre II. Nous ne pouvons pas, de ce fait, valider le modèle sur cette molécule. Cependant, en l'absence d'autre outil à disposition, nous l'avons utilisé afin d'estimer, par « rétro-calcul », la dose de HBCD ingérée par les poules présentant les concentrations relevées dans les œufs sur le terrain.

4.2.3.3. Application des paramètres obtenus suite à la calibration

Les paramètres prennent les valeurs issues de leur ajustement sur les données expérimentales (cf. IV-2.3.). Pour une concentration de HBCD dans le jaune de 3400 $ng.g^{-1}$ MG, notre modèle permet d'estimer que l'ingestion quotidienne est de 1 mg par jour. La courbe des concentrations issue de la simulation est représentée en figure IV-6. Cela peut correspondre à une ingestion d'aliment contaminé, ou de poussière contaminée, ou encore être les conséquences d'un picage de matériau ignifugé. Une combinaison de ces différentes sources d'exposition peut également être envisagée.

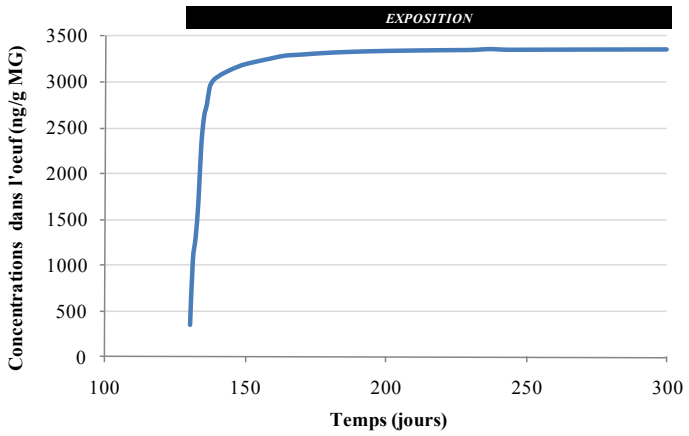


Figure IV- 6 : Concentrations de HBCD simulées dans le jaune d'œuf suite à une exposition de 1mg par jour et par poule

4.2.4. Intérêts du modèle

Le modèle développé ajoute une notion de temps d'exposition avant l'atteinte d'une valeur seuil. Par ailleurs les simulations mettent en évidence que pour les molécules les plus persistantes (exemple de certains PCB), l'équilibre n'est véritablement établi qu'après plusieurs centaines de jours. Aussi, lors d'évaluation des risques, le transfert évalué à l'état d'équilibre, ne correspond pas à la réalité d'une période proche d'un évènement de contamination.

5. Références

AFSSA, 2005 Dioxines, furanes et PCB de type dioxine: Evaluation de l'exposition de la population française, 34609-34610.

AFSSA-Saisine n°2006-SA-0305 Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments, relatif à l'établissement de teneurs maximales pertinentes en polychlorobiphényles qui ne sont pas de type dioxine (PCB « non dioxin-like », PCB-NDL) dans divers aliments, 27 octobre 2007, 28p.

AFSSA-Saisine, n°2009-SA-0249 Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments, relatif à un dossier de contamination de sols en dioxines et PCB de type dioxine et à l'utilisation possible de ces sols en lien avec d'éventuelles répercussions sur la qualité sanitaire de certains produits agricoles (avis complémentaire), 20 avril 2009, 14p.

Borgå, K.; Wolkers, H.; Skaare, J. U.; Hop, H.; Muir, D. C. G.; Gabrielsen, G. W., Bioaccumulation of PCBs in Arctic seabirds: Influence of dietary exposure and congener biotransformation. Environmental Pollution 2005, 134, (3), 397-409.

Borlakoglu, J. T.; Walker, C. H., Comparative aspects of congener specific PCB metabolism. European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics 1989, 14, (2), 127-131.

Borlakoglu, J. T.; Welch, V. A.; Wilkins, J. P. G.; Dils, R. R., Transport and cellular uptake of polychlorinated biphenyls (PCBs) - I. Association of individual PCB isomers and congeners with plasma lipoproteins and proteins in the pigeon. Biochemical Pharmacology 1990, 40, (2), 265-272.

Braune, B. M.; Norstrom, R. J., Dynamics of organochlorine compounds in herring gulls: III. Tissue distribution and bioaccumulation in Lake Ontario gulls. Environmental Toxicology and Chemistry 1989, 8, (10), 957-968.

Clark, T. P.; Norstrom, R. J.; Fox, G. A.; Won, H. T., Dynamics of organochlorine compounds in herring gulls (Larus argentatus): II. A two-compartment model and data for ten compounds. Environmental Toxicology and Chemistry 1987, 6, (7), 547-559.

Defour, S., Fraisse, D., Scherrer, M.C., Schnepp, B., Le Querrec, F., 1998. Analysis of polychlorodibenzo-dioxins (PCDDs) and polychlorodibenzo-furans (PCDFs) in milk around industrial sites in France. Organohalogen Compounds, 38, 85-88.

Drouillard, K. G.; Fernie, K. ;, Smits, J.E. ; Bortolotti, G.R. ; Bird, D.M. ; Norstrom, R.J., Bioaccumulation and toxicokinetics of 42 polychlorinated biphenyl congeners in American Kestrels (*Falco sparverius*). Environmental Toxicology and Chemistry 2001, 20, (11), 2514-2522.

Drouillard, K. G.; Norstrom, R. J., The influence of diet properties and feeding rates on PCB toxicokinetics in the ring dove. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 2003, 44, (1), 97-106.

Drouillard, K. G.; Fernie, K. J.; Letcher, R. J.; Shutt, L. J.; Whitehead, M.; Gebink, W.; Bird, D. M., Bioaccumulation and biotransformation of 61 polychlorinated biphenyl and four polybrominated diphenyl ether congeners in juvenile American kestrels (Falco sparverius). Environmental Toxicology and Chemistry 2007, 26, (2), 313-324.

Fournier, A. ; Feidt, C., ; Travel, A. ; Le Bizec, B. ; Marchand, P. ; Jondreville C., 2011. Relative bioavailability to laying hens of indicator polychlorobiphenyls present in soil, Chemosphere, *soumis.*

Jondreville, C. ; Travel, E. ; Besnard, J. ; Feidt, C., 2011. Ingestion de sol et de végétaux par des poules élevées en plein air nourries avec un aliment complet ou à base de blé et de coquilles marines. Neuvièmes journées de la recherche avicole, Tours, 29 et 30 mars 2011, 5 pp.

Magdelaine, P.; Braine, A., Panorama mondial et européen de la production et de la consommation d'œufs. INRA Productions Animales 2010, 23, (2), 111-122.

Magdelaine , P. ; Gonnier, V. ; Jez, C., Situation, perspectives et enjeux pour les filières œufs européennes à la veille de la mise en œuvre de la directive bien-être, Neuvièmes journées de la recherche avicole, Tours, 29 et 30 mars 2011, 9 pp.

Marchand, P.; Vénisseau, A.; Brosseaud, A.; Gade-Hildevert, C.; Matayron, G.; André, F.; Le Bizec, B., Decrease of the PCDD/F and PCB concentrations in eggs after a natural contamination. Proceedings of the 25th International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs, Dioxin 2005, Toronto, Ontario, Canada, August 21-26, 2005.

Rozemeijer, M. J. C.; Boon, J. P.; Swennen, C.; Brouwer, A.; Murk, A. J., Dioxin type and mixed type induction of the cytochrome P-450 system of common elder ducklings (Somateria Mollissima) by PCBs: With indications for biotransformation. Aquatic Toxicology 1995, 32, (2-3), 93-113.

Traag, W.; Kan, K.; Zeilmaker, M.; Hoogerbrugge, R.; van Eijkeren, J.; Hoogenboom, R., Carry-over of dioxins and PCBs from feed and soil to eggs at low contamination levels - Influence of binders on the carry-over from feed to eggs, Report 2004.016, 2004.

Van Eijkeren, J. C. H.; Zeilmaker, M. J.; Kan, C. A.; Traag, W. A.; Hoogenboom, L. A. P., A toxicokinetic model for the carry-over of dioxins and PCBs from feed and soil to eggs. Food Additives and Contaminants 2006, 23, (5), 509-517.

Waegeneers, N.; De Steur, H.; De Temmerman, L.; Van Steenwinkel, S.; Gellynck, X.; Viaene, J., Transfer of soil contaminants to home-produced eggs and preventive measures to reduce contamination. Science of the Total Environment 2009, 407, (15), 4438-4446.

Conclusions – Perspectives

Des plans de surveillance et des enquêtes relèvent la présence de POP dans les œufs de poules d'élevage conventionnel ou de particulier. Les modalités de transfert étant renseignées de façon incomplète, nous avons orienté nos travaux vers certains facteurs susceptibles de moduler le transfert de POP vers l'œuf. Ainsi, par une approche alliant expérimentations *in vivo* et modélisation, cette thèse a permis de progresser dans la compréhension du transfert de POP vers l'œuf de poule et l'évaluation de l'impact des caractéristiques de la molécule et de l'animal sur ce transfert.

La synthèse bibliographique complétée par les études *in vivo* ont permis de mieux comprendre et d'évaluer les différentes étapes du transfert (ADME) pour certaines molécules. Les molécules que nous avons sélectionnées lors de nos expérimentations *in vivo* (HAP, HBCD, lindane) ont montré que, pour ces molécules lipophiles, le dépôt du xénobiotique dans le jaune est intimement lié à la formation de ce dernier. L'importance du stockage du xénobiotique dans le tissu adipeux puis sa libération ultérieure sont principalement liées à sa susceptibilité à être métabolisé au sein de l'animal. Dans notre modèle, le seul ajustement du paramètre représentant le niveau d'élimination de la molécule par métabolisation rend compte d'une grande partie des variations de cinétique entre molécules. De plus, les expérimentations *in vivo* conduites concernent des molécules étudiées pour la première fois chez la poule pondeuse.

L'approche de modélisation que nous avons mise en œuvre comportait, outre son caractère dynamique, l'originalité de représenter les caractéristiques physiologiques de l'animal afin d'en évaluer l'impact sur le transfert des POP vers l'œuf. La ponte et l'état d'engraissement sont apparus comme deux éléments pertinents pour caractériser l'état physiologique de la poule pondeuse. En effet, représentant une voie d'élimination des POP, la ponte entraîne une diminution des teneurs corporelles de POP. Le niveau de ponte influence donc directement le niveau de contamination des tissus de la poule à l'état d'équilibre. Le niveau d'engraissement a un rôle de dilution en cas de période de non-ponte et influence de façon marquée la vitesse de décontamination des tissus lors d'une période d'épuration suivant une exposition.

Nous avons également cherché à mieux caractériser l'exposition des animaux. Dans notre expérimentation, le sol ne permettait pas de moduler la disponibilité des PCB qui s'y trouvaient. Bien que ce type d'étude soit très rare dans la littérature, ce résultat plaide pour l'utilisation d'une biodisponibilité relative égale à 1 lors de l'évaluation du risque en élevage.

Toutefois, il semble important de poursuivre les travaux de recherche afin de caractériser le rôle du sol sur la biodisponibilité des polluants qui s'y trouvent.

En utilisant notre modèle, nous avons pu montrer que, pour une molécule donnée, les composantes de l'exposition que sont la quantité de POP ingérée et son niveau d'absorption, que nous avons modulé au moyen du concept de biodisponibilité relative, sont déterminantes sur les niveaux de concentration de POP détectés dans l'œuf. Toutefois, les niveaux d'ingestion de sol que nous avons testés sont sans doute extrêmes et l'impact de cette matrice sur la biodisponibilité relative des POP qu'elle contient reste un domaine à explorer. Quant aux caractéristiques physiologiques, pour une même molécule, un taux de ponte variant de 73 à 99% peut entraîner une variation d'environ 25% de la concentration de POP dans les œufs à l'équilibre.

L'outil de modélisation utilisé pour explorer les effets des caractéristiques physiologiques sur les concentrations de POP dans l'œuf, est encore insuffisant pour prédire finement les concentrations de POP dans les œufs destinés à la consommation. Cependant, il permet d'ores et déjà d'aider à la gestion de crise et d'évaluer l'impact de certains facteurs, tels que l'ingestion, la biodisponibilité ou le métabolisme.

De plus, le développement de ce modèle a structuré la réflexion et ouvert différentes voies de recherche qui ont pour objectif d'approfondir la compréhension du transfert de POP à l'échelle de l'animal.

En effet, dans l'objectif d'appliquer le modèle à différentes molécules et donc de le rendre générique, certaines pistes sont à travailler, notamment au niveau du comportement des molécules et de leur mode de transport au sein de l'animal. Nous avons vu que le comportement de la molécule au sein de l'animal pouvait être relié à des propriétés physico-chimiques et/ou à la structure de la molécule. Il serait donc intéressant, à partir de la bibliographie existante et éventuellement d'études complémentaires, d'essayer d'exprimer les paramètres pilotant les flux de POP en fonctions des caractéristiques physico-chimiques et/ou structurelles de la molécule. La nature du transporteur (selon l'affinité de la molécule pour telle ou telle fraction du sang) aura aussi une incidence sur la distribution de la molécule, selon le tissu auquel se destine le transporteur. A terme, il est envisageable de construire un modèle bioénergétique prenant en compte les flux de ces transporteurs à l'échelle de l'animal. Ces flux couplés à des niveaux d'affinité de la molécule pour telle ou telle fraction devraient améliorer la prédiction des contaminations.

Ces évolutions du modèle permettraient ainsi de nous amener petit à petit vers un outil d'aide à la décision tant d'un point de vue recherche, qu'opérationnel.

Nancy-Université
INPL

AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :
Monsieur Yves NYS, Directeur de Recherche, INRA, Unité de Recherches Avicoles, Nouzilly
Monsieur Pascal SANDERS, Directeur de Recherche, LERMVD, Fougères

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Madame FOURNIER Agnès

à soutenir devant un jury de l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE, une thèse intitulée :

"Transfert de polluants organiques persistants (POP) vers l'œuf de poule:Influence des caractéristiques des polluants et du statut physiologique de l'animal. "

en vue de l'obtention du titre de :

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : **« Sciences Agronomiques »**

Fait à Vandoeuvre, le 16 mai 2011
Le Président de l'I.N.P.L.,
F. LAURENT

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE - NANCY

Institut National Polytechnique de Lorraine
inpl@inpl-nancy.fr « www.inpl-nancy.fr

2 av. de la Forêt de Haye « BP 3
54501 Vandoeuvre-les-Nancy Cedex
FRANCE
Tél. : +33(0)3 83 59 59 59
Fax : +33(0)3 83 59 59 55

Transfert de Polluants Organiques Persistants (POP) vers l'œuf de poule : *influence des caracteristiques des polluants et du statut physiologique de l'animal*

Les poules pondeuses sont susceptibles d'être exposées à une grande diversité de polluants organiques persistants (POP) potentiellement présents dans leur environnement. La principale voie d'exposition est la voie orale, avec l'ingestion soit d'aliment soit de matrices environnementales (sol, végétaux…) contaminés. Dans un contexte de sécurisation des systèmes d'élevage avicole vis-à-vis des POP, nos travaux de recherche ont porté sur l'identification et la hiérarchisation des facteurs influençant le transfert des POP ingérés vers l'œuf. Ces facteurs sont liés à la nature de la matrice ingérée (sol ou aliment), aux caractéristiques de l'animal (taux de ponte, état d'engraissement) et aux caractéristiques de la molécule (lipophilicité, susceptibilité à la métabolisation). Pour cette étude, différentes approches scientifiques ont été mobilisées : l'expérimentation *in vivo* et la modélisation mathématique. Les expérimentations *in vivo* ont permis d'étudier la biodisponibilité relative des PCB d'un sol naturellement contaminé, et de renseigner les paramètres de la cinétique de transfert vers l'œuf de molécules non encore étudiées chez la poule pondeuse telles que des molécules émergentes (exemple d'un retardateur de flammes bromé, HBCD) ou les HAP. Nos résultats montrent en particulier l'importance de l'impact du degré de métabolisation de la molécule sur l'allure de la cinétique et le niveau du transfert.

L'élaboration d'un modèle mathématique pouvant faire varier de façon dynamique la taille des compartiments lipidiques de l'animal, ainsi que la fréquence de ponte, a permis d'explorer l'influence des caractéristiques de l'animal sur le transfert de POP vers l'œuf. Le niveau de ponte influence directement, et de façon proportionnelle, le niveau de contamination des tissus de la poule à l'état d'équilibre. Le niveau d'engraissement a un rôle de dilution en cas de période de non ponte et influence de façon marquée la vitesse de décontamination des tissus lors d'une période d'épuration suivant une exposition. Pour une molécule caractérisée par un degré de biotransformation et un mode de distribution donné, les variations de concentration dans les œufs à un temps donné, sont donc dépendantes de la quantité de molécule absorbée (pilotée par la quantité ingérée et par la biodisponibilité relative liée à la matrice ingérée) et des caractéristiques physiologiques.

L'application de ce modèle à des cas concrets met en évidence l'intérêt d'un tel outil dans le cadre de l'évaluation et de la gestion des risques en système d'élevage.

Mots clés : POP, ADME, transfert, œuf, poule pondeuse, modèle

Transfer of Persistent Organic Pollutants (POPs) to hen's egg: *influence of characteristics of pollutants and the physiological status of the animal*

Laying hens are likely to be exposed to a wide range of persistent organic pollutants (POPs) potentially present in their environment. The major route of exposure is oral, with ingestion of contaminated feed or environmental matrices (soil, plants ...). In the context of securing poultry farming systems regarding POPs, our research has focused on identifying and grading factors likely to influence the transfer of ingested POPs to eggs. These factors are related to the nature of the ingested matrix (soil or feed), to the characteristics of the animal (laying rate, fatness) and to the properties of the molecule (lipophilicity, sensitivity to metabolism). Different scientific approaches have been implemented: *in vivo* experimentation and mathematical modeling. In the frame of *in vivo* experiments we have assessed the relative bioavailability of PCBs from one naturally contaminated soil. In addition, we have calculated parameters of the kinetics of transfer to eggs of molecules that had never been studied in laying hens, such as emerging molecules (for example a brominated flame retardant, HBCD), or PAHs. Our results point out the dominant impact of the molecule metabolism on the shape of its kinetics and on its rate of transfer to eggs.

The developed dynamic mathematical model makes it possible to pilot variations with time of the size of the lipid compartments in the animal and of the frequency of laying. It was used to assess the influence of these animal characteristics on the transfer of POPs to eggs. Laying rate proportionally influences the contamination level of eggs and of animal tissues at steady state. Body fat dilutes absorbed POPs in absence of laying and significantly influences the rate of decontamination of tissues during depuration subsequent to an exposure period. For a given molecule, characterized by proper sensitivity to biotransformation and mode of transport, concentration in eggs and its variation with time depend of the amount absorbed (driven by the amount ingested and the bioavailability related to the ingested matrix) and of the physiological status of the animal. The implementation of this model in actual cases highlights its performance as a tool for risk assessment and management in farming systems.

Key words: POP, ADME, transfer, egg, laying hen, modeling