



HAL
open science

Influence de la matrice sol sur la biodisponibilité orale des Polluants Organiques Persistants chez les ruminants laitiers

Fayçal Ounnas

► **To cite this version:**

Fayçal Ounnas. Influence de la matrice sol sur la biodisponibilité orale des Polluants Organiques Persistants chez les ruminants laitiers. Science des sols. Institut National Polytechnique de Lorraine, 2011. Français. NNT : 2011INPL042N . tel-01749529

HAL Id: tel-01749529

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01749529>

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.



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>

Institut National Polytechnique de Lorraine
Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires
Unité de Recherche Animal et Fonctionnalités des Produits Animaux (UR AFPA)
Ecole Doctorale
Sciences et Ingénieries des Ressources, Procédés, Produits et Environnement
(RP2E)

Thèse

présentée en vue de l'obtention du grade de
Doctorat de l'Institut National Polytechnique de Lorraine
Spécialité : Sciences Agronomiques

par Ounnas Fayçal

Influence de la matrice sol sur la biodisponibilité orale des
Polluants Organiques Persistants chez les ruminants laitiers

Soutenue publiquement le 30 Juin 2011

Membres du jury

Phillippe Chemineau, Directeur de Recherche	INRA, Paris	Président
Sébastien Denys, Chargé de Recherche INERIS, HDR	INERIS, Paris	Rapporteur
Tom Van de Wiele, Professeur	Université de Ghent, Belgique	Rapporteur
Stephanie Ouvrard, Chargé de Recherche INRA	ENSAIA-INPL, Nancy	Examinatrice
Guido Rychen, Professeur	ENSAIA-INPL, Nancy	Examineur (Directeur de thèse)
Cyril Feidt, Professeur	ENSAIA-INPL, Nancy	Examineur (Co-directeur de thèse)

Table des matières

Table des matières

Table des matières	2
Remerciements	6
Résumé	7
Valorisation scientifique des travaux de thèse	9
Liste des sigles et abréviations	10
Liste des Tableaux	12
Liste des Figures	13
Liste des Annexes	15
Introduction générale	17
Chapitre I : Caractérisation du transfert des Polluants Organiques Persistants du sol vers le ruminant laitier	
1 Propriétés des PoP, devenir dans l'environnement	19
1.1 Structure et caractéristiques des PoP	19
1.1.1 Structure et caractéristiques des PCB	19
1.1.1 Structure et caractéristiques des HAP	21
1.1.1 Structure et caractéristiques des PBDE	23
1.2 Evaluation du potentiel toxique	25
1.2.1 Le facteur d'équivalence toxique (TEF)	25
1.2.2 La quantité d'équivalence toxique (TEQ)	25
1.3 Importance des produits animaux dans l'exposition humaine aux PoP	27
1.4 Origines de la contamination de l'environnement	29
1.5 Distribution des PoP dans l'environnement terrestre	31
1.6 Accumulation des PoP dans les différents compartiments environnementaux terrestres	34
1.7 Pouvoir de stockage des sols et rétention des polluants organiques	37
1.8 Teneurs en PoP de la matrice sol et réglementation en vigueur	38
2 Devenir des PoP dans le sol et interactions avec ses constituants	42
2.1 Revolatilisation des PoP du sol vers l'air (déplacement de la pollution)	42
2.2 Dégradation chimique (abiotique) des PoP	42
2.3 Dégradation biotique des PoP	42
2.4 Mise en place d'une liaison chimique entre les PoP et le sol	44

Table des matières

2.4.1	Processus de rétention des PoP dans le sol _____	46
a)	Sorption des PoP dans la porosité de la phase minérale _____	48
b)	Sorption des PoP dans la Matière Organique (MO) _____	48
2.4.2	Rôle du « vieillissement » du sol dans la rétention des PoP _____	51
3	Mise en évidence du rôle de la biodisponibilité dans l'évaluation de l'exposition des ruminants laitiers _____	53
3.1	Exposition des ruminants laitiers aux PoP du sol _____	53
3.2	Concept de biodisponibilité orale des PoP du sol _____	57
3.2.1	Ingestion _____	57
3.2.2	Bioaccessibilité _____	57
3.2.3	Absorption _____	60
3.2.4	First pass effect (effet du premier passage) _____	62
3.3	Acheminement des PoP biodisponibles vers le lait _____	63
3.4	Méthodes de mesure de la biodisponibilité _____	70
3.5	Biodisponibilité orale des PoP liés au sol _____	73
4.	Conclusion de l'approche bibliographique _____	78
5.	Organisation générale des travaux de thèse _____	80

Chapitre II : Etude du transfert des PolyChloroBiphényles et des PolyBromoDiphénylEthers du sol vers le lait de chèvre _____			83
1	Introduction _____	83	
2	Matériels et Méthodes _____	84	
2.1	Préparation du sol expérimental _____	84	
2.2	Préparation de l'aliment contaminé _____	85	
2.3	Conditions expérimentales d'élevage des chèvres en lactation _____	85	
2.4	Exposition des animaux aux PCB et PBDE _____	85	
2.5	Analyse des PCB et des PBDE dans le lait et les tissus de chèvres en lactation _____	87	
2.5.1	Assurance qualité et contrôle qualité _____	87	
2.5.2	Réactifs et produits chimiques. _____	87	
2.5.3	Etapas successives de traitement des échantillons _____	87	
a)	Première étape l'extraction _____	87	
b)	Deuxième étape la purification _____	88	
c)	Troisième étape la quantification _____	90	
2.6	Mesure des paramètres du biotransfert _____	91	

Table des matières

2.7	Analyse statistique	92
3	Résultats	93
3.1	Contribution des matrices ingérées à l'exposition des chèvres en lactation aux PCB et aux PBDE	93
3.2	Transfert des PCB et des PBDE de l'aliment contaminé vers le lait	93
3.3	Processus de biodégradation et de bioaccumulation	96
4	Discussion	98
4.1	Transfert des PCB et des PBDE liés au sol, de l'aliment contaminé vers le lait	98
4.2	Biodisponibilité des PCB liés au sol	101
4.3	Processus de biodégradation et de bioaccumulation	101
5	Conclusion	104

Chapitre III : Biodisponibilité relative des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques

	liés au sol chez les chèvres en lactation	107
1	Introduction	107
2	Matériel et Méthodes	108
2.1	Précautions particulières pour éviter d'éventuelles contaminations	108
2.2	Production d'un sol contaminé	108
2.3	Préparation de la matrice de référence	111
2.4	Préparation de l'aliment contaminé	111
2.5	Conditions expérimentales d'élevage des chèvres en lactation	111
2.6	Exposition des animaux aux HAP	113
2.7	Prélèvements et enregistrement	113
2.8	Analyse et dosage des échantillons	113
2.8.1	Réactifs et produits chimiques	114
2.8.2	Détermination des HAP dans l'aliment contaminé	114
2.8.3	Détermination des métabolites majoritaires de HAP dans le lait	116
2.8.4	Détermination des métabolites majoritaires de HAP dans les urines	117
2.9	Analyse statistique	117
3	Résultats	121
3.1	Homogénéité de la contamination artificielle du sol en HAP	121
3.2	Contamination de l'aliment expérimental	121
3.3	Taux de transfert des métabolites majoritaires dans le lait et l'urine	121
3.4	Biodisponibilité relative (BR) des HAP liés au sol	123

Table des matières

4	Discussion	128
4.1	Taux de transfert des métabolites de HAP dans l'urine et le lait	128
4.2	Biodisponibilité relative (BR) des HAP liés au sol	129
5	Conclusion	131

Chapitre IV : Influence de la matière organique (carbone organique) du sol sur la bioaccessibilité des HAP mesurée *in vitro* : analyse quantitative des données

	de la littérature	133
1	Introduction	133
2	Matériel et méthodes	134
2.1	Collecte des données	134
2.2	Variables sélectionnées et calculs	136
2.3	Méta-dispositif	138
3	Analyse statistique	143
4	Résultats	143
5	Discussion	150
6	Conclusion	152

Chapitre V : Discussion générale

1	Bilan du transfert des PoP du sol vers les ruminants laitiers	154
2	Estimation de la biodisponibilité avec l'exemple des HAP du sol	155
3	Limites et perspectives des expérimentations menées	158
3.1	Le choix des sols contaminés dans les études menées	158
3.2	Méthode <i>in vivo</i> d'investigation de la biodisponibilité orale des PoP liés au sol.	159
3.3	De l'utilité de préciser l'influence des autres paramètres du sol sur la bioaccessibilité des PoP.	159
3.4	Approche quantitative des données de la littérature	160

Conclusion générale 162

Références bibliographiques 163

Annexes 181

Remerciements

Remerciements

Mes remerciements vont à l'ensemble des personnes qui ont participé à la construction de ce projet en particulier à toute l'équipe MRCA-URAFPA qui m'a beaucoup donné et appris.

Je te remercie Guido pour ta confiance et ton soutien. Je remercie également le sacré Cyril, pour les moments inoubliables partagés au laboratoire et à l'extérieur. Bien sûr je n'oublie pas Stefan qui m'a aidé à mettre le pied à l'étrier de la recherche avec une année de démarrage qui a été dure. Enfin, un gros remerciement à Catherine J. qui a apporté une pierre à l'avancée de ce travail.

Un grand merci à Catherine L., Hervé, Helena, François, Claire, Christine, Abir, Nicolas, Paméla, Diane, Yann, pour leur aide précieuse dans l'organisation et la réalisation de mes expérimentations. Je remercie également le personnel du LSE d'avoir répondu positivement à mes nombreuses sollicitations.

Je remercie également Pascaline et Carine pour leur soutien et accompagnement dans les enseignements que j'ai réalisés avec un matériel qui n'a pas été des plus simples.

Il va de soit de parler également du cher bureau A14 et de nos échanges chaleureux et amicaux avec Anaël, Angélique, Agnès, Bilal, Cécile, Guillemette, Julien, Julie, Olivier, Stéphanie, Balbine, Adrian, Aude. Merci pour tous ces souvenirs impérissables et à jamais gravés dans ma tête.

Bien sûr je ne vous oublie pas ma chère famille, vous êtes un maillon indéfectible de ma vie et je vous remercie pour votre soutien. Merci de m'avoir épaulé durant ces années, Tanegmart, Adel, Ferial et Maman mes chéris.

Je remercie également les membres du jury d'avoir accepté de juger le fruit de ce travail de recherche.

Résumé

Résumé

Dans son rôle « géo-accumulateur », le sol peut constituer un réservoir de Polluants Organiques Persistants (PoP). Les animaux élevés en plein air comme les ruminants laitiers peuvent alors être exposés aux PoP *via* l'ingestion involontaire de sol, un bovin adulte pouvant ingérer jusqu'à 800 g de sol par jour. Cependant, le mécanisme de sorption des PoP sur les particules du sol se caractérise par la formation de liaisons fortes susceptibles d'atténuer leur biodisponibilité. Afin de préciser le transfert des PoP du sol vers le ruminant, nous avons développé différentes approches permettant d'évaluer la biodisponibilité de ces contaminants. La chèvre en lactation a été choisie comme modèle de ruminant laitier.

Les travaux se sont focalisés sur deux familles de composés : les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) qui sont des molécules sensibles au métabolisme, et les PolyChloroBiphenyles (PCB), peu sensibles au métabolisme. Pour les PCB, la biodisponibilité relative a été obtenue en comparant les coefficients de transfert ou « Carry-Over Rate » obtenus à la suite de l'ingestion de sol avec ceux trouvés dans la littérature impliquant des matrices alimentaires telles que le foin. Cette valeur, obtenue à l'équilibre, désigne la part fixe du contaminant atteignant le lait. La seconde expérience a été élaborée afin de calculer la biodisponibilité relative des HAP liés au sol. Cette démarche s'est basée sur la comparaison des pentes des courbes doses-réponses obtenues entre l'ingestion de la matrice sol ou de la matrice de référence (l'huile) et l'excrétion des métabolites de HAP hydroxylés majoritaires dans les urines. La dernière étude a consisté en une collecte de données de la littérature, dans le but de déterminer globalement le rôle de la matière organique (carbone organique) du sol sur la bioaccessibilité des HAP dans le tractus gastro-intestinal.

Les résultats des études que nous avons menées démontrent que le sol a un impact limité sur la biodisponibilité orale de l'ensemble des PoP chez le ruminant. Cependant, la lipophilicité des PoP semble jouer un rôle dans la régulation de leur biodisponibilité. En effet, l'impact du sol sur la biodisponibilité du Phénanthrène est limité (molécule à trois cycles), tandis que la réduction de la biodisponibilité du Pyrène a été estimée à 50 % (molécule à quatre cycles).

Du plus, la bioaccessibilité dans le tractus digestif (une des composantes de la biodisponibilité) a été estimée pour les HAP : elle varierait entre 0,2 et 46%, et serait guidée par la concentration des HAP et la teneur en carbone organique du sol. L'effet géosorbant du sol, qui explique son rôle de réservoir environnemental de PoP, paraît insuffisant dans les conditions du tractus digestif du ruminant laitier, pour éviter une contamination des produits animaux. Une attention particulière doit être portée au sol dans les scénarios d'évaluation du risque.

Mots clés : Biodisponibilité – Bioaccessibilité - ruminant – sol - PoP

Résumé

Abstract

Persistent Organic Pollutants (PoP) can be accumulated through the “memory effect of soil”. Ruminants can therefore be exposed to the PoP through involuntary ingestion of the contaminated soil. On pasture, soil ingested by ruminants can reach 800 g of soil per day. But PoP interact with the soil particles, leading to the formation of strong bonds which can decrease their bioavailability. Therefore, we developed several approaches in order to determine the bioavailability of soil-bound PoP. Indeed, more precision on the impact of soil on the bioavailability of the contaminants is essential to assess the transfer to the animal products.

The investigations focused on two PoP families: the Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH) which are readily cleared and the PolyChloroBiphenyls (PCB) which are poorly metabolized. For the PCB, the relative bioavailability was estimated by comparing the values of the transfer coefficients or « Carry-Over Rates » obtained after soil ingestion, with that those obtained in the literature with other food matrices such as hay. The second study was conducted in order to calculate the bioavailability of soil-bound PAH. This experimental approach lay in comparing soil matrix with the reference matrix (oil) through the urinary excretion of the major hydroxylated PAH metabolites. The last investigation focused on the statistical combination of the results of several studies that address a set of related research on the role of organic matter (organic carbon) on the bioaccessibility of the PAH in the gastro-intestinal tract.

The results of the studies performed show that soil has limited impact on the PoP bioavailability in ruminants. However, the lipophilicity of PoP seems to play a role in regulating their bioavailability. Indeed, soil impact is not significant for Phenanthrene (three-ring molecule), whereas the bioavailability of Pyrene is estimated at 50 % (four-ring molecule).

The bioaccessibility in the gastro-intestinal tract is a component of the bioavailability; it was estimated for PAH at between 0.2 and 46%, and seems to be led by the concentration of PAH and the organic carbon content in soil. These results suggest that soil matrix deserves some special focus because its properties of geoaccumulation may increase the risk of transfer of PoP to the ruminant. The geosorbant property of soil, which explains its role as environmental reservoir of PoP, does not appear enough to avoid contamination of animal products, in the conditions of the lactating ruminant digestif tract. Particular attention should be paid to soil in the scenarios of risk assessment.

Key words: Bioavailability – Bioaccessibility - ruminant - soil - PoP

Valorisation scientifique des travaux de thèse

- **Publications**

Relative bioavailability of soil-bound Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in lactating goats. Ounnas F., Jurjanz S., Feidt C., Rychen G. (2009). *Chemosphere*, 77 (1), pp. 115-122.

Polybrominated diphenyl ether transfer to milk in lactating goats chronically exposed to contaminated soil. Ounnas F., Jurjanz S., Feidt C., Marchand P., Le Bizec B., Rychen G. (2010). *Environ. Sci. Technol.*, 44 (7), pp. 2682-2688.

- **Communications internationales avec actes et comité de lecture**

Présentations orales

Recent developments in assessing the relative bioavailability of soil-bound persistent organic pollutants in dairy ruminants. Ounnas F., Feidt C., Rychen G., Jurjanz S. Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC) - Sevilla, Spain (2010).

Relative Bioavailability of Soil-Bound Persistent organic Pollutants in Ruminants. Ounnas F., Feidt C., Jurjanz S., Jondreville C., Rychen G. International Conference, Belvaux, Luxembourg (2009).

Présentations posters

Bioavailability of soil-bound persistent organic pollutants in dairy ruminants: a review. Ounnas F., Rychen G., Jurjanz S. XI^{ème} Symposium International sur la Physiologie des Ruminants (ISRP) - Clermont-Ferrand, France (2009).

Relative bioavailability of soil-bound polycyclic aromatic hydrocarbons in goats. Ounnas F., Jurjanz S., Chahin A., Feidt C., Rychen G. Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC) - Göteborg, Sweden (2009).

- **Communications nationales (posters)**

Excrétion des HAP dans le lait et l'urine suite à un apport chronique de sol contaminé. Ounnas F., Jurjanz S., Feidt C., Toussaint H., Rychen G. Séminaire de l'école doctorale RP2E, Nancy, France (2008).

Etude de la biodisponibilité relative des hydrocarbures aromatiques polycycliques liés au sol chez les chèvres en lactation. Ounnas F., Jurjanz S., Jondreville C., Rychen G., Feidt C. 2^{èmes} Rencontres Nationales de la Recherche sur les Sites et Sols Pollués, Paris, France (2009).

Liste des sigles et abréviations

Liste des sigles et abréviations

^{13}C : Carbone 13

ACN : Acénaphène

ADEME : Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie

Afssa ou Afsset : Agence nationale de sécurité sanitaire

ANL : Acénaphylène

ANT : Anthracène

ASE : Fractionnement par solvants accélérés

B[a]P : Benzo[a]pyrène

BA : Biodisponibilité Absolue

BCF : Facteur de BioConcentration

BR : Biodisponibilité Relative

CEE-NU : Commission Economique pour l'Europe des Nations Unies

CG : Chromatographie Gazeuse

CO : Carbone Organique

COOH : groupe carboxyle

COR : « Carry-Over Rate »

CYP, CYP450 : Cytochrome P450

DDT : Dichlorodiphényltrichloroéthane

DIN : Deutsche Industrie Norm-Medizinische Mikrobiologie

ENSAIA : Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires

EROD/MEROD : Ethoxyrésufurine-*o*-dééthylase /Methoxyrésufurine-*o*-dééthylase

ETR/RMSE : Moyenne des carrés des résidus

FT : Facteur de Transfert

GC-MS : Chromatographie Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse

GC-HR-MS : Chromatographie Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse à Haute
Résolution

GST : Glutathion-*S*-Transférase

HAP : Hydrocarbure Aromatique Polycyclique

HDL : High Density Lipoprotein

HPLC : Chromatographie Liquide à Haute Pression

Log K_{ow} : Coefficient de partage octanol-eau

LABERCA : LABORatoire d'Etude des Résidus et des Contaminants dans les Aliments,

Liste des sigles et abréviations

ONIRIS Nantes

LDL : Low Density Lipoprotein

MG : Matière Grasse

MO : Matière Organique

MS : Matière Sèche

NAPL : Polluants en phase liquide non-aqueuse adhérente ou piégée

NA : Non Analysé

ND : Non Déterminé

NS : Non Significatif

NQ : Non Quantifié

OH : groupe hydroxyle

OMS ou WHO : Organisation Mondiale de la Santé

PBET : Physiologically Based Extraction Test

PCB : PolyChloroBiphényles

PCB-DL : Polychlorobiphényles Dioxin-Like

PCB-NDL : Polychlorobiphényles Non-Dioxin-Like

PCDD : PolyChloroDibenzo-*p*-Dioxines

PCDF : PolyChloroDibenzoFuranes

Phe : Phénanthrène

PoP : Polluant Organique Persistant

Pyr : Pyrène

PV : Poids Vif

RIVM : Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu

SD : Ecart-type

SHIME : Simulator of Human Intestinal Microbila Ecology

TCDD : Tétrachlorodibenzo-*p*-dioxine

TCDF : Tétrachlorodibenzofurane

TEF : Facteur d'Equivalence Toxique

TEQ : Quantité d'Equivalence Toxique

US EPA : Agence Américaine de protection de l'environnement

VLDL : Very Low Density Lipoprotein

Liste des Tableaux

Tableau I- 1 : Propriétés physico-chimiques des PCB indicateurs (Manz <i>et al.</i> , 2001).....	20
Tableau I- 2 : Propriétés physico-chimiques des HAP (Juhasz et Naidu, 2000).....	22
Tableau I- 3 : Propriétés physico-chimiques des groupes de PBDE (INERIS, 2005)	24
Tableau I- 4 : Composition des mélanges commerciaux de PBDE (INERIS, 2005)	24
Tableau I- 5 : Facteurs d'équivalent toxique appliqués aux mammifères (US EPA, 2005)	26
Tableau I- 6 : Risques d'exposition aux PoP <i>via</i> l'ingestion de différents groupes d'aliments	27
Tableau I- 7 : Synthèse des concentrations en PoP dans différents types de sols.....	41
Tableau I- 8 : Recommandation pour la qualité des sols concernant les PoP (Lijzen <i>et al.</i> , 2001)	43
Tableau I- 9 : Classification granulométrique des constituants d'un sol	47
Tableau I- 10 : Impact du vieillissement sur la disponibilité du Phénanthrène dans le sol (White <i>et al.</i> , 1997)	52
Tableau I- 11 : Evaluation des quantités de sol ingérées par espèces animales en fonction de la saison (Laurent <i>et al.</i> , 2005 ; Jurjanz et Delagarde, 2010).....	56
Tableau I- 12 : Récapitulatif des Carry-Over Rates (%) des PCB et des PCDD/F vers le lait	66
Tableau I- 13 : Principales études <i>in vivo</i> déterminant la biodisponibilité orale des PoP liés au sol	77
Tableau II- 1 : Niveaux de PCB et de PBDE dans la ration alimentaire journalière et dans le lait, déterminés par GC-MS-HR après 45j d'exposition	94
Tableau II- 2 : Comparaison des Carry-Over Rates (%) obtenus pour les PCB	103
Tableau III- 1 : Caractéristiques physico-chimiques des trois HAP utilisés (adapté de Juhanz et Naidu, 2000 ; WHO, 2003).....	109
Tableau III- 2 : Concentrations des HAP solubilisés dans l'huile	112
Tableau III- 3 : Formulation des différents lots d'aliments.....	112
Tableau III- 4 : Récapitulatif des aliments contaminés distribués aux chèvres en lactation..	112
Tableau III- 5 : Limites de détection et de quantification (HPLC-FD) des métabolites de HAP dans le lait (ng/mL)	120
Tableau III- 6 : Limites de détection et quantification (HPLC-FD) des HAP dans les urines (ng/mL).....	120
Tableau III- 7 : Radioactivité relative mesurée dans le sol contaminé au ¹⁴ C Benzo[a]Pyrène (% , n=3).....	122
Tableau III- 8 : Concentrations des différents congénères de HAP dans l'aliment	122
Tableau III- 9 : Excrétion cumulée dans le lait et l'urine des métabolites majoritaires après les traitements oraux des chèvres	124
Tableau III- 10 : Biodisponibilité Relative du Phénanthrène et du Pyrène chez les chèvres en lactation	126

Liste des Figures

Figure I- 1 : Structure générale des PCB (1), position des atomes de chlore sur la structure (2), structure la moins toxique (3) et structure la plus toxique (4).....	20
Figure I- 2 : Structure des HAP (A : Naphtalène ; B : Benzo[a]Pyrène ; C : Dibenzo[a,l]Pyrène)	22
Figure I- 3 : Structure des PBDE (exemple de l'octabromodiphényléther).....	24
Figure I- 4 : Evolution dans le temps des concentrations en PCDD/F et en PBDE dans le lait maternel (adapté de WHO, 1998 ; Bocio <i>et al.</i> , 2003).....	28
Figure I- 5 : Sources d'émissions anthropiques des PCB et des HAP en France et des PBDE en Europe (OSPAR, 2004 ; CITEPA, 2007).....	30
Figure I- 6 : Phénomènes agissant sur les flux de distribution des PoP dans l'environnement terrestre.....	33
Figure I- 7 : Concentrations en PCB dans des sols et des plantes (ng/g MS) de régions industrielles nordiques (d'après, AMAP, 1998).....	36
Figure I- 8 : Niveaux de contamination de l'herbe et du sol en HAP à proximité d'une autoroute (Crépineau <i>et al.</i> , 2004).....	36
Figure I- 9 : Exemple de la modification des capacités de rétention de l'atrazine (polluant organique) par les sols suite à une addition de compost, et conséquences sur sa mobilité (d'après Barriuso <i>et al.</i> , 1996).....	39
Figure I- 10 : Modèle conceptuel de géosorbant (Luthy <i>et al.</i> , 1997 ; Danielsson, 2000).....	47
Figure I- 11 : Répartition de la Matière Organique en fonction de leur degré de condensation	50
Figure I- 12 : Modèle d'absorption des PCB et des PBDE chez les ruminants (d'après Kierkegaard <i>et al.</i> , 2009).....	62
Figure I- 13 : Les voies métaboliques impliquées dans la débromation des BDE 209 et 206 (Kierkegaard <i>et al.</i> , 2007).....	69
Figure I- 14 : Evolution de la production laitière et de la matière grasse au cours de la lactation (Sweetman <i>et al.</i> , 1999).....	71
Figure I- 15 : Evolution des COR de PCB dans le lait en fonction des différentes saisons (Sweetman <i>et al.</i> , 1999).....	71
Figure I- 16 : Organisation structurelle des travaux de la thèse	81
Figure II- 1 : Cinétique d'excrétion de quelques composés (PCB-DL, PCB-NDL et PBDE) dans le lait.....	95
Figure II- 2 : Facteurs de BioConcentration des PCB (n=9) et des PBDE (n=2) dans le foie (a) et le tissu gras (b) obtenus à l'état d'équilibre.	97
Figure II- 3 : Relation entre le ratio des concentrations des PCB et BDE 47, BDE 99 dans la MG du lait et dans le tissu gras et le log Kow.	100
Figure III- 1 : Relation dose-réponse entre la quantité de Phénanthrène ingérée et l'excrétion du 3-OH Phe dans l'urine ($R^2=0,96$).....	125
Figure III- 2 : Relation dose-réponse entre la quantité de Pyrène ingérée et l'excrétion du 1-OH Pyr dans l'urine ($R^2=0,96$).	125

Liste des Figures

Figure III- 3 : Relation dose-réponse entre la quantité de Pyrène ingérée et l'excrétion du 1-OH Pyr dans le lait ($R^2=0,97$).....	126
---	-----

Liste des Schémas

Liste des Schémas

Schéma I- 1 : Estimation de la quantité de PoP ingérée ou inhalée (daily intake) par une vache laitière lors d'une contamination diffuse.	54
Schéma I- 2 : Biodisponibilité orale des PoP du sol et leur transfert vers les matrices alimentaires (adaptée de Dean, 2004).....	58
Schéma II- 1 : Récapitulatif des traitements appliqués aux chèvres (n=3) au cours de l'expérience.....	86
Schéma II- 2 : Méthode de mesure des PCB et des PBDE dans les matrices biologiques contaminées.	88
Schéma III- 1 : Méthode d'extraction des HAP de granulés contaminés.	118

Liste des Annexes

Liste des Annexes

Annexe I- 1: Persistence et bioaccumulation des PCB (US EPA, 1999).....	182
Annexe I- 2 : Persistence et bioaccumulation des HAP (US EPA, 1999).....	183
Annexe I- 3 : Concentration et profil en PCB de différents types de sols	184
Annexe I- 4 : Concentrations et profil en PBDE de différents types de sols	185
Annexe I- 5 : Concentrations et profil en HAP de différents types de sols	186
Annexe I- 6 : Récapitulatif des teneurs en PCB, PCDD/F et HAP retrouvées dans les différents organes et compartiments biologiques	187
Annexe IV- 1: Récapitulatif des principales études <i>in vitro</i> de bioaccessibilité des HAP du sol	188
Annexe IV- 2 : Description des principaux modèles <i>in vitro</i> développés pour étudier la bioaccessibilité des polluants organiques présents dans un sol.....	191
Annexe IV- 3 : Détails des données intégrées dans la base de données	192

Introduction générale

Les polluants de l'environnement peuvent migrer dans la chaîne alimentaire et présenter ainsi un risque pour l'Homme. La matrice sol, dans son rôle de « géosorbant » des polluants organiques, joue un rôle « clé » comme accumulateur de ces molécules (Luthy *et al.*, 1997 ; Nam *et al.*, 2003a). De ce fait, elle constitue un vecteur non négligeable de polluants. Ainsi, l'ingestion involontaire de sol contaminé par les animaux d'élevage peut contribuer largement à l'entrée des polluants dans la chaîne trophique (McLachlan, 1993) : les animaux élevés en plein air sont alors en première ligne de ce risque d'exposition.

Néanmoins, certaines informations issues de tests *in vivo* et *in vitro* suggèrent une atténuation de ce risque de contamination, par des phénomènes de sorption des molécules organiques sur les particules du sol (Gevao *et al.*, 2000). La mesure de la biodisponibilité des polluants permettra d'évaluer la part du polluant transférable dans l'animal.

Dans cette étude, nous avons tenté d'estimer la biodisponibilité des **Polluants Organiques Persistants (PoP)** du sol afin de déterminer le transfert chez les animaux d'élevage et plus précisément chez le ruminant laitier. En effet, le lait constitue l'une des matrices alimentaires qui contribuent majoritairement à l'exposition de l'Homme aux PoP (Focant *et al.*, 2002). Cette démarche permet de caractériser et de préciser le transfert des polluants organiques du sol vers les ruminants. Son but est de générer des données descriptives et explicatives relatives à l'évaluation du risque associé à l'ingestion de sols contaminés.

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés exclusivement à trois familles différentes de PoP : la famille des **Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP)**, polluants organiques non halogénés et fortement métabolisés, et deux familles de polluants organiques halogénés et bioaccumulables, à savoir les **PolyChloroBiphényles (PCB)** et les **PolyBromoDiphénylEthers (PBDE)**. **La biodisponibilité des PoP (PCB, PBDE et HAP) liés au sol**, est en effet encore mal connue. Ces familles ont été choisies en premier lieu en raison de leur toxicité potentielle, de leur pouvoir de bioaccumulation, de leur persistance et de leur aptitude à être transportées sur de longues distances (Convention de Stockholm, 2001). Ces contaminants ont également été choisis car leur dispersion dans l'environnement est difficile à maîtriser ; en effet, il s'agit de produits industriels ubiquistes ou de sous-produits involontaires des processus industriels et de combustion.

Ce document de thèse comporte dans une première partie une synthèse bibliographique qui dressera un bilan des connaissances et des lacunes actuelles, ce qui a permis de définir les objectifs de ce travail et de proposer les approches méthodologiques appropriées. Les résultats

Introduction générale

feront l'objet de la deuxième partie du mémoire, organisée en trois chapitres. Des études *in vivo* ont été menées sur le modèle chèvre en lactation afin d'estimer l'effet du sol sur la biodisponibilité des HAP, PCB et PBDE. Ces études ont permis la mise au point de protocoles de mesure de la biodisponibilité relative des PoP liés au sol chez le ruminant laitier. Enfin, une approche de méta-analyse a été suivie pour déterminer l'impact de la matière organique sur la bioaccessibilité des HAP dans le tractus digestif.

Chapitre I : Caractérisation du transfert des Polluants Organiques Persistants du sol vers le ruminant laitier

1 Propriétés des PoP, devenir dans l'environnement

Cette partie aborde les caractéristiques générales des PoP : leur identité, leur distribution dans l'environnement et les niveaux de contamination des compartiments terrestres. Les PoP sont des molécules complexes qui, contrairement aux autres polluants atmosphériques, ne sont pas caractérisés par leur seule nature chimique mais à travers également quatre propriétés définies dans le cadre de la Convention de Stockholm (2001) :

Leur persistance dans l'environnement : les molécules résistent aux dégradations biologiques naturelles. Par exemple, dans les sols, leur demi-vie peut atteindre plus de 10 ans pour certains composés. **Leur bioaccumulation** : les molécules peuvent s'accumuler progressivement dans les organismes. **Leur transport longue distance** : les PoP peuvent se déplacer sur de très longues distances et se déposer loin des lieux d'émission (ils sont détectés par exemple dans les zones polaires). **Leur toxicité** : les PoP présentent des effets négatifs sur la biosphère et *à fortiori* sur la santé humaine.

1.1 Structure et caractéristiques des PoP

1.1.1 Structure et caractéristiques des PCB

Le terme de PCB désigne une famille de composés de synthèse organochlorés, de haut poids moléculaire et de formule chimique $C_{10}H_{10-n}Cl_n$ (**Figure I- 1**). Produits industriellement depuis 1930, ces mélanges ont fait l'objet de multiples utilisations comme additifs dans les peintures, les encres et les apprêts destinés aux revêtements muraux, puis ont été progressivement interdits à partir des années 80. Les émissions de PCB dans l'environnement proviennent également de procédés industriels divers faisant intervenir la combustion incomplète de dérivés aromatiques chlorés ou impliquant la synthèse de dérivés chlorés (incinération des déchets, fonderie, métallurgie, sidérurgie, brûlage de câbles, fabrication d'herbicides et de pesticides, etc.).

Le groupe des PCB comprend 209 congénères, qui se distinguent par le nombre d'atomes de chlore fixés sur la molécule et par leur position sur le noyau biphényle. Il s'agit de composés semi-volatils, hydrophobes et persistants. La toxicité aigüe et la stabilité des PCB augmentent avec le nombre d'atomes de chlore présents sur la molécule. Deux groupes, l'un de douze

Rapport bibliographique

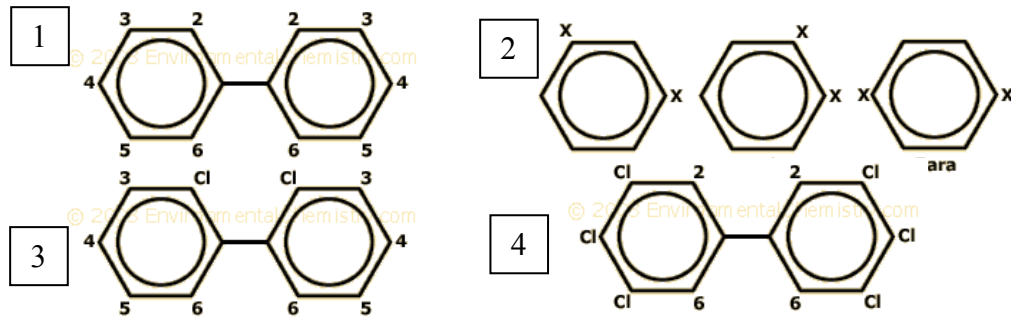


Figure I- 1 : Structure générale des PCB (1), position des atomes de chlore sur la structure (2), structure la moins toxique (3) et structure la plus toxique (4).

Tableau I- 1 : Propriétés physico-chimiques des PCB indicateurs (Manz *et al.*, 2001)

Nom chimique (IUPAC)	Numéro du congénère	Masse moléculaire (g/mol)	Solubilité dans l'eau (g/l, à 25°C)	Constante d'Henry (Pa m ³ /mol)	Log du coefficient de partage octanol - eau (log K _{ow})	Pression de vapeur (Pa) à 25°C
2,4,4'-trichlorobiphenyle	PCB 28	256	$1,5 \cdot 10^{-2}$	$0,9-4,0 \cdot 10^{-4}$	5,7	24
2,2',5,5'-tétrachlorobiphenyle	PCB 52	289,9	$0,5-1,9 \cdot 10^{-2}$	$0,3-1,2 \cdot 10^{-4}$	6,1-6,3	33
2,2',4,5,5'-pentachlorobiphenyle	PCB 101	323,9	$1,2-3,5 \cdot 10^{-3}$	$0,1-4,0 \cdot 10^{-5}$	5,9-7,1	19
2,3',4,4',5-pentachlorobiphenyle	PCB 118	323,9	$1-2-8 \cdot 10^{-3}$	$0,1-5,0 \cdot 10^{-5}$	6-7,5	15
2,2',3,4,4',5'-hexachlorobiphenyle	PCB 138	357,8	$0,5-5,0 \cdot 10^{-3}$	$1,6 \cdot 10^{-5}$	7,4	8
2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyle	PCB 153	357,8	$0,7 \cdot 10^{-3}$	$1,0-9,0 \cdot 10^{-6}$	6,7-7,8	10
2,2',3,4,4',5,5'-heptachlorobiphenyle	PCB 180	391,8	$1,3-5,0 \cdot 10^{-4}$	$6,6 \cdot 10^{-6}$	7,2	3

PCB dioxin-like (PCB-DL) et l'autre de six PCB non dioxin-like (PCB-NDL), sont identifiés par l'Union Européenne. Les propriétés physico-chimiques des PCB-NDL majoritaires dans l'environnement sont résumées dans le **Tableau I- 1**. Les PCB-DL constituent un groupe de molécules chimiques proche de la famille des PCDD (PolyChloroDibenzo-*p*-Dioxines). Les congénères non substitués en position *ortho* se caractérisent par une conformation coplanaire. Les congénères 3,4,4',5-tétra, 3,3',4,4' -tétra, 3,3',4,4',5-penta et 3,3',4,4',5,5'-hexa chlorobiphenyles, lesquels sont aussi substitués en position *para* et au moins en une position *mé*ta, sont des stéréo-isomères de la dioxine la plus toxique à savoir le 2,3,7,8 tétrachlorodibenzo-*p*-dioxine (TCDD).

Les PCB peuvent être répartis dans l'atmosphère en phase gazeuse et particulaire. Ils sont omniprésents dans l'environnement, et n'épargnent pas les régions arctiques, où ils ont été détectés dans l'air, l'eau, le sol, ainsi que dans des organismes vivants (Schreitmuller et Ballschmiter, 1994). La pression de vapeur diminue généralement avec la masse moléculaire et augmente avec le degré croissant de chloration en position *ortho*. En phase gazeuse dans l'atmosphère, les principales réactions de dégradation sont des réactions d'interactions entre les radicaux hydroxylés et les PCB. Les demi-vies sous ce type de réactions sont estimées à 10 jours pour les mono-chlorobiphenyles et à 1,5 année pour les hepta-chlorobiphenyles. De manière générale, la persistance de congénères de PCB augmente avec le degré de chloration (**Annexe I- 1**).

1.1.1 Structure et caractéristiques des HAP

Les HAP sont une famille de composés chimiques constitués d'atomes de carbone et d'hydrogène dont la structure moléculaire comprend au moins deux cycles aromatiques condensés (**Figure I- 2**). Ces molécules sont planes, rigides, non polaires et non halogénées. Les noyaux aromatiques rendent les HAP très hydrophobes. Dans les années 80, l'EPA, l'agence de protection de l'environnement des États-Unis, a classé 16 HAP dans sa liste des polluants prioritaires (**Tableau I- 2**). La persistance et l'hydrophobie des HAP augmentent avec le nombre de cycles aromatiques, tandis que leur solubilité et leur volatilité diminuent (**Tableaux I- 2 et Annexe 1- 2**). Leur génotoxicité augmente considérablement avec leur poids moléculaire. Par ailleurs, les HAP portant une structure « Bay » ou « Fjord » sont les plus toxiques (Lijinsky, 1991 ; Mersch-Sundermann *et al.*, 1992 ; Nylund *et al.*, 1992.).

Les HAP, qui sont naturellement présents dans les combustibles fossiles, se retrouvent dans tous les compartiments de l'écosystème terrestre. Les origines naturelles de ces composés

Rapport bibliographique

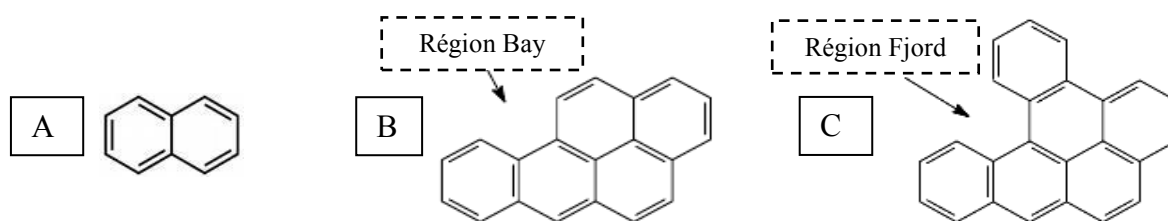


Figure I- 2 : Structure des HAP (A : Naphtalène ; B : Benzo[a]Pyrène ; C : Dibenzo[a,l]Pyrène).

Tableau I- 2: Propriétés physico-chimiques des HAP (Juhasz et Naidu, 2000)

Molécules d'HAP prioritaires (US EPA)	Masse moléculaire (g/mol)	Solubilité dans l'eau (mg/L) à 25°C	Constante d'Henry (Pa m ³ /mol à 20°C)	Log du coefficient de partage octanol - eau (log K _{ow})	Pression de vapeur (Pa à 20°C)
(1) Naphtalène	128,2	32	10 10 ⁻³	3,37	nd
(2) Acénaphène	154,2	3,4	2,5 10 ⁻³	4,33	nd
(3) Acénaphthylène	152,2	3,93	2,1 10 ⁻³	4,07	nd
(4) Fluorène	166,2	1,9	4 10 ⁻⁴	4,18	nd
(5) Phénanthrène	178,2	1-1,3	4,5 10 ⁻³	4,46	6,8.10 ⁻⁴
(6) Anthracène	178,2	0,05-0,07	4,3 10 ⁻²	4,45	2.10 ⁻⁴
(7) Fluoranthène	202,3	0,26	4 10 ⁻⁴	5,33	6.10 ⁻⁶
(8) Pyrène	202,3	0,14	5 10 ⁻⁴	5,32	6,8.10 ⁻⁷
(9) Benz[a]anthracène	228,3	0,01	0	5,61	5.10 ⁻⁹
(10) Chrysène	228,3	0,002	6 10 ⁻⁴	5,61	6,3.10 ⁻⁷
(11) Benzo[b]fluoranthène	252,3	0,0015	nd	6,57	nd
(12) Benzo[k]fluoranthène	252,3	0,00081	nd	6,84	nd
(13) Benzo[a]pyrène	252,3	0,0038	0	6,04	5.10 ⁻⁷
(14) Indéno[1,2,3-cd]pyrène	276,3	0,00026	nd	7,66	1.10 ⁻¹⁰
(15) Benzo[g,h,i]pérylène	276,3	0,00026	0	7,23	1.10 ⁻¹⁰
(16) Dibenzo[a,h]anthracène	276,3	0,0006	0	5,97	1.10 ⁻¹⁰

nd : non déterminé

sont extrêmement variées : feux de forêt, activité volcanique, processus géochimiques, etc. Cependant, une quantité importante de ces composés est d'origine anthropique et résulte notamment des procédés de pyrolyse ou de combustion utilisés dans l'industrie, les transports ou le chauffage (ADEME, 2004).

En général, les HAP à deux ou trois cycles (Naphthalène, Acénaphthène, Anthracène, Fluorène, Phénanthrène) sont présents dans l'atmosphère en phase gazeuse. Les HAP à quatre cycles (Fluoranthène, Pyrène, Chrysène) se répartissent entre les phases gazeuse et particulaire, et les HAP à cinq cycles et plus (Benzo[a]Pyrène, Benzo[g,h,i]perylène) se trouvent principalement dans la phase particulaire. La durée de séjour de ces HAP dans l'atmosphère et leur transport à longue distance dépendent de la dimension des particules sur lesquelles ils sont adsorbés, ainsi que des conditions climatiques (Masclat *et al.*, 1995 ; Offenbergh et Reyes *et al.*, 2002).

1.1.1 Structure et caractéristiques des PBDE

Les PBDE sont des éthers aromatiques bicycliques très lipophiles dont la formule chimique est la suivante : $C_{12}H_{10-n}Br_nO$ (**Figure I- 3**) ; ils sont persistants (**Tableau I- 3**), et possèdent une forte capacité d'adsorption sur les particules.

Il en existe 209 congénères différents. La classification des PBDE selon l'International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) s'appuie sur le nombre et la position des atomes de brome sur le cycle. Les PBDE constituent un groupe d'ignifugeants chimiques. Ils entrent dans la fabrication de pièces automobiles, des sous-tapis, de la mousse d'ameublement et de l'équipement électronique comme retardateurs de flammes.

La production industrielle et l'utilisation de mélanges de PBDE (**Tableau I- 4**) ont débuté en Europe au début des années 1970, mais ont diminué ces dernières années. Le groupe des Penta-BDE malgré leur interdiction ces dernières années (Directive 2003/11/CE) représente le groupe le plus toxique et le plus persistant dans l'environnement (Thron *et al.*, 2004 ; Thomas *et al.*, 2005). A l'heure actuelle seul le mélange du Déca-BDE est autorisé.

Le Penta-BDE est constitué de mélanges de congénères du diphenyléther bromé dont les composants principaux en terme massique sont le 2,2', 4,4'- tétrabromodiphényléther (BDE-47) et le 2, 2', 4, 4', 5-pentabromodiphényléther (BDE-99).

Le Penta-BDE est émis dans l'air, l'eau et le sol, mais la plus grande partie aboutit dans le sol. Les composés du mélange Penta-BDE sont liés dans l'environnement à la phase particulaire ; une faible quantité seulement est transportée en phase gazeuse (PNUE, 2006).

Rapport bibliographique

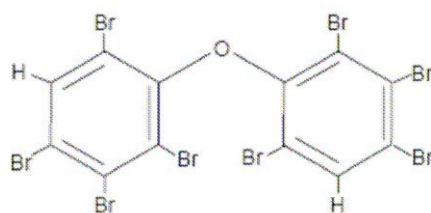


Figure I- 3 : Structure des PBDE (exemple de l'octabromodiphényléther).

Tableau I- 3 : Propriétés physico-chimiques des groupes de PBDE (INERIS, 2005)

Mélange commercial	Masse Molaire (g/mol)	Constante d'Henry (Pa m ³ /mol à 20°C)	Solubilité dans l'eau (µg/L)	Log du coefficient de partage Octanol-eau (log Kow)	Pression de vapeur (Pa à 21°C)	Persistance dans l'environnement (demi-vie)	
						Air (jours)	Sol (jours)
Penta-BDE	564,7	1,97 10 ⁻⁵	13,3	6,58	4,69.10 ⁻⁵		
Octa-BDE	801,9	1,05 10 ⁻⁴	<1	6,29	6,59.10 ⁻⁶	13-94	66-180
Déca-BDE	952,2	>4,43 10 ⁻⁴	<0,1	6,27	4,3.10 ⁻⁶		

Tableau I- 4 : Composition des mélanges commerciaux de PBDE (INERIS, 2005). Les valeurs représentent les pourcentages massiques des molécules dans chacun des trois mélanges.

Mélange commercial	Tétra-BDE (BDE 47)	Penta-BDE (BDE 99)	Hexa-BDE (BDE 138 et 153)	Hepta-BDE (BDE 183)	Octa-BDE (BDE 205)	Octa-BDE (BDE 207)	Déca-BDE (BDE 209)
Penta-BDE	33,7	54,6	11,7				
Octa-BDE			5,5	74,9	3,6	13,9	2,1
Déca-BDE						3	97

1.2 Evaluation du potentiel toxique

1.2.1 Le facteur d'équivalence toxique (TEF)

Le TEF (Toxic Equivalent Factor) est l'indice global de toxicité ; il a été développé en 1977 pour donner une valeur toxicologique à un mélange de composés de structure chimique proche, et ayant le même mécanisme d'action, c'est-à-dire actifs sur le même récepteur cellulaire Aryl Hydrocarbon (Ah). Cependant, il subsiste de nombreuses incertitudes quant à la précision de cet indice : en effet, les valeurs de TEF varient significativement selon l'espèce animale ou le tissu considérés (Vidy et Bard, 2003).

Le TEF est créé en comparant les courbes qui représentent la relation dose-effet d'un congénère et celle de la molécule de référence de sa famille. Cette dernière est considérée comme la plus toxique, avec un TEF fixé à 1. Ce concept a d'abord été appliqué aux PCDD/F puis étendu à d'autres membres de la famille des PoP, dont les PCB-DL et les HAP (**Tableau I- 5**). Pour les PBDE, il n'existe actuellement aucun TEF.

1.2.2 La quantité d'équivalence toxique (TEQ)

La quantité d'équivalence toxique (TEQ) est un outil simplificateur de l'évaluation du risque lié aux mélanges complexes comme ceux des PCB et des HAP (Vidy et Bard, 2003). Cet indicateur permet de mesurer la toxicité d'un mélange de composés (Van der Berg *et al.*, 1998). Le TEQ est calculé en faisant la somme du produit du couple concentration et TEF de chacun des congénères présents dans le mélange, chaque TEF étant pondéré par la concentration de la molécule dans la matrice étudiée :

$$C \text{ (ng TEQ/kg)} = C_1 \text{ (ng/kg)} \times \text{TEF}_1 + \dots + C_n \times \text{TEF}_n.$$

La toxicologie des PoP est extrêmement complexe, spécifique à chaque composé, et peut provoquer diverses réponses toxiques des tissus, des organes ou des espèces.

L'expression des concentrations en TEQ permet une évaluation rapide de la toxicité d'un produit alimentaire. Ainsi a été publiée une réglementation européenne portant sur les teneurs maximales de certains contaminants dans les aliments. Par exemple, la teneur maximale en PCDD/F dans le lait cru, les produits laitiers et toute matière grasse, a été fixée à 3 pg/g de graisse, et cette valeur maximale s'élève à 6 pg/g de graisse lorsqu'on considère la somme des PCDD/F et des PCB de type dioxine (règlement (CE) No 1881/2006). De même, des seuils réglementaires dans les aliments pour animaux sont aussi disponibles : 0,75 pg TEQ/g pour

Rapport bibliographique

Tableau I- 5 : Facteurs d'équivalent toxique appliqués aux mammifères (US EPA, 2005)

Nom chimique (IUPAC)	TEF (WHO, 1998)	TEF (WHO, 2005)	Molécule d'HAP prioritaire (US EPA)	EPA Californie, 2004	Nisbet et LaGoy, 1992
non ortho-PCB			Naphtalène		0,001
3,3',4,4'-TCB (77)	0,0001	0,0001	Acénaphène		0,001
3,3',4',5-TCB (81)	0,0001	0,0003	Acénaphylène		0,001
3,3',4,4',5-PeCB (126)	0,1	0,1	Fluorène		0,001
3,3',4,4',5,5'-HxCB (169)	0,01	0,03	Phénanthrène		0,001
mono-orthoPCB			Anthracène	0,0005	0,01
2,3,3',4,4'-PeCB (105)	0,0001	0,00003	Fluoranthène	0,05	0,001
2,3,4,4',5-PeCB (114)	0,0005	0,00003	Pyrène	0,001	0,001
2,3',4,4',5-PeCB (118)	0,0001	0,00003	Benzo[a]anthracène	0,005	0,1
2',3,4,4',5-PeCB (123)	0,0001	0,00003	Chrysène	0,03	0,1
2,3,3',4,4',5-HxCB (156)	0,0005	0,00003	Benzo[b]fluoranthène	0,1	0,1
2,3,3',4,4',5'-HxCB (157)	0,0005	0,00003	Benzo[k]fluoranthène	0,05	0,1
2,3',4,4',5,5'-HxCB (167)	0,00001	0,00003	Benzo[a]pyrène	1	1
2,3,3',4,4',5,5'-HpCB (189)	0,0001	0,00003	Benzo[g,h,i]perylène	0,02	0,01
			Dibenzo[a,h]anthracène		1
			Indeno[1,2,3-cd]pyrène	0,1	0,1

les PCDD/F et 0,5 pg TEQ/g pour les PCB-DL (Directive 2002/32/CE).

1.3 Importance des produits animaux dans l'exposition humaine aux PoP

Les PoP sont persistants et accumulables dans les réserves lipidiques des animaux, d'où leur transfert le long de la chaîne alimentaire ; leur concentration dans les organismes augmente donc avec leur niveau trophique (bioamplification). Pour les polluants les plus persistants et faiblement métabolisés tels que les PCB et PCDD/F, cette voie d'accumulation est prédominante. Notre alimentation (y compris le lait maternel) représente la principale source d'exposition aux PoP chez l'homme. A l'exception de l'exposition professionnelle ou accidentelle (Masuda *et al.*, 1998), les produits animaux contribuent largement à l'exposition humaine aux PoP. Les poissons gras, la viande et les produits laitiers, sont les sources majeures de l'exposition humaine aux PoP (**Tableau I-6 et Figure I- 4**). Ce sont les produits riches en matière grasse qui sont particulièrement enclins à concerner ces composés (hydrophobes).

Liem *et al.* (2000) ont estimé à 90% la contribution de notre alimentation à l'exposition totale de l'homme aux PCDD/F. La part estimée des PBDE et HAP a été de 73 et de 96% respectivement (Menzie *et al.*, 1992 ; Sjödin *et al.*, 2003). La prise journalière en PCDD/F dans les pays industrialisés est de l'ordre de 1-3 pg I-TEQ/kg PV par jour chez les adultes. Si à cette prise journalière nous rajoutons les PCB-DL, l'exposition peut être multipliée par un facteur de 2 à 3. La prise totale de PCB est estimée à environ 50 ng/kg PV/jour chez les adultes dans les pays développés (WHO, 1998). La prise alimentaire moyenne en HAP varie entre 83 et 283 ng/kg PV/jour. Une étude suédoise estime la prise alimentaire en PBDE à 0,85 ng/kg PV/jour (Darnerud *et al.*, 2001).

Le lait maternel est considéré comme l'un des principaux indicateurs biologiques susceptibles de mettre en évidence une exposition aux PoP. La surveillance du lait maternel permet par conséquent de générer des informations sur le type et la quantité de PoP présents dans l'environnement ainsi que chez l'homme (Leeuwen *et al.*, 2002). Des études sur le lait maternel montrent une réduction de l'exposition de l'homme aux PCDD/F et aux PCB durant ces deux dernières décennies. Par contre, les niveaux croissants de PBDE retrouvés dans le lait maternel reflètent une augmentation de l'exposition de l'homme à cette famille de polluants halogénés (**Figure I- 4**) (WHO, 1998 ; Bocio *et al.*, 2003).

L'exposition de l'homme aux PoP à travers la chaîne alimentaire, constitue un risque potentiel. Une bonne compréhension des différentes voies de passage des contaminants vers

Rapport bibliographique

Tableau I- 6 : Risques d'exposition aux PoP *via* l'ingestion de différents groupes d'aliments

Pays	Famille de molécules	Groupes d'aliments évalués	principaux groupes d'aliments contribuant à l'ingestion des PoPs	Prise	Référence
USA	PCDD/F	Poisson, viandes et dérivés, oeufs, végétaux, lait et produits laitiers	Viandes, 32,1-36,1%; Lait, 28,7-30,5%; végétaux, 21,3-23,6%	123 pg/jour (WHO - TEQ)	Schecter <i>et al.</i> , 2001
Belgique	PCDD/F	Viandes, oeufs, poissons, lait et produits laitiers	Poisson, 40%; Lait et produits laitiers, 30%; Viandes, 21%	65,3 pg/jour (WHO-TEQ)	Focant <i>et al.</i> , 2002
Chine	PCDD/F	Viandes, oeufs, poissons, lait, céréales, végétaux et fruits, sucres, boissons	Viandes et dérivés, 34,8%; Poisson, 28,6%; Oeufs, 20,7%	72,5 pg/jour (TEQ non spécifié)	Wu <i>et al.</i> , 2002
France	PCB-NDL	Poissons, viandes, produits laitiers, oeufs, graisses et huiles, céréales	Poisson, 32-36% ; Viandes 16-31% ; Produits laitiers, 14-27%	539 ng/jour	Afssa, 2006
Suède	PBDE	Poissons, viandes, produits laitiers, oeufs, graisses et huiles, céréales	Poisson, 45% ; Produits laitiers, 16% ; Huiles et graisses, 15%	50 ng/jour	Darnerud <i>et al.</i> , 2001
Espagne	PBDE	Poissons, végétaux et fruits, lait et produits laitiers, céréales, viandes et dérivés, oeufs, huiles et graisses	Graisses et huiles, 26% ; Viandes et dérivés 22% ; Poisson 33% ; Lait et dérivés 5%, œufs 2%	97,3 ng/jour	Domingo, 2006
Azerbaïdjan	HAP	Pain et dérivés, végétaux, poissons, végétaux et fruits, lait et produits laitiers, céréales, viandes et dérivés, oeufs, huiles et graisses, sucres et confiseries.	pain et dérivés, 37% ; lait et produits laitiers, 26 % ; œufs, 12%	9,3 ng/jour (WHO-TEQ)	Nwaneshiudu <i>et al.</i> , 2007

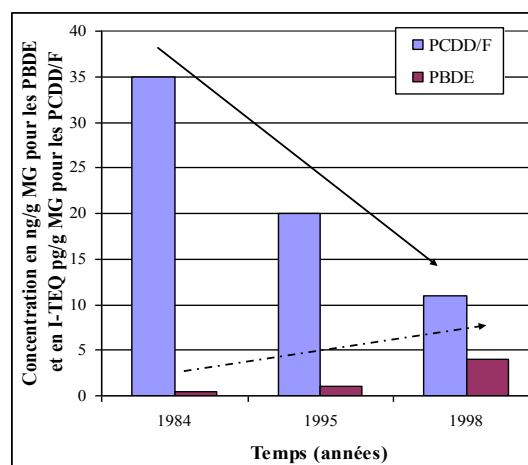


Figure I- 4 : Evolution dans le temps des concentrations en PCDD/F et en PBDE dans le lait maternel (adapté de WHO, 1998 ; Bocio *et al.*, 2003).

les produits alimentaires, s'avère essentielle afin de mieux gérer et prévoir les risques encourus. Actuellement, les connaissances des modalités de transfert des PoP du sol vers les produits animaux restent limitées, alors même que la consommation en France de lait et de ses dérivés, par exemple, avoisine 406 kg/habitant/an.

Pour résumer. Le système TEQ concerne uniquement les effets toxiques découlant des interactions des PoP avec les récepteurs cellulaires Ah. De ce fait, les autres effets potentiellement toxiques de ces composés ne sont pas quantifiés par cette méthode.

L'alimentation contribue majoritairement à l'exposition de l'homme aux PoP. Le lait et les produits laitiers, de par leur position centrale dans notre régime alimentaire, sont considérés comme des vecteurs majeurs de polluants organiques vers l'homme.

1.4 Origines de la contamination de l'environnement

L'état des lieux du Centre Interprofessionnel Technique d'Etude de la Pollution Atmosphérique (CITEPA) présente les sources d'émissions anthropiques de PoP en France (**Figure I- 5**). L'inventaire du CITEPA indique les valeurs d'émission suivantes pour 2007 : HAP : 22 t/an, PCB : 69 kg/an, PCDD/F : 117 g I-TEQ/an.

Pour les PBDE, aucune donnée n'existe pour la France mais dans le cadre d'un projet néerlandais, une estimation des émissions des penta-BDE dans la région européenne a été réalisée : il a été établi que 0,3 t/an sont émises lors de la combustion et des procédés industriels, 9 t/an lors de l'utilisation de solvants et de produits ménagers, et 0,05 t/an lors de l'incinération des déchets (van der Gon *et al.*, 2005). Une autre étude européenne a estimé l'émission des PBDE totaux à 78 t/an dans l'atmosphère, 251 t/an dans les eaux usées et 10703 t/an dans les décharges (OSPAR, 2004).

Bien que les sources d'émission des PoP soient multiples, l'activité anthropique est l'origine principale de leur émission vers l'atmosphère. Elle engendre des risques de dépôt sur l'ensemble de la surface terrestre. Ces dépôts affectent les zones de culture et de pâturage, qu'elles soient situées à proximité ou à distance des zones émettrices (Rychen *et al.*, 2005).

Par la suite, ces dépôts peuvent contaminer la chaîne alimentaire et peuvent affecter aussi bien la santé des animaux que celle des hommes.

Sur les sols agricoles, l'apport de boues a été signalé comme une source certaine de PoP. Par exemple, la France recycle environ 60% des boues de stations d'épuration en fertilisation agricole, ce qui représente plus de 1.300.000 t/an (ADEME, 2004).

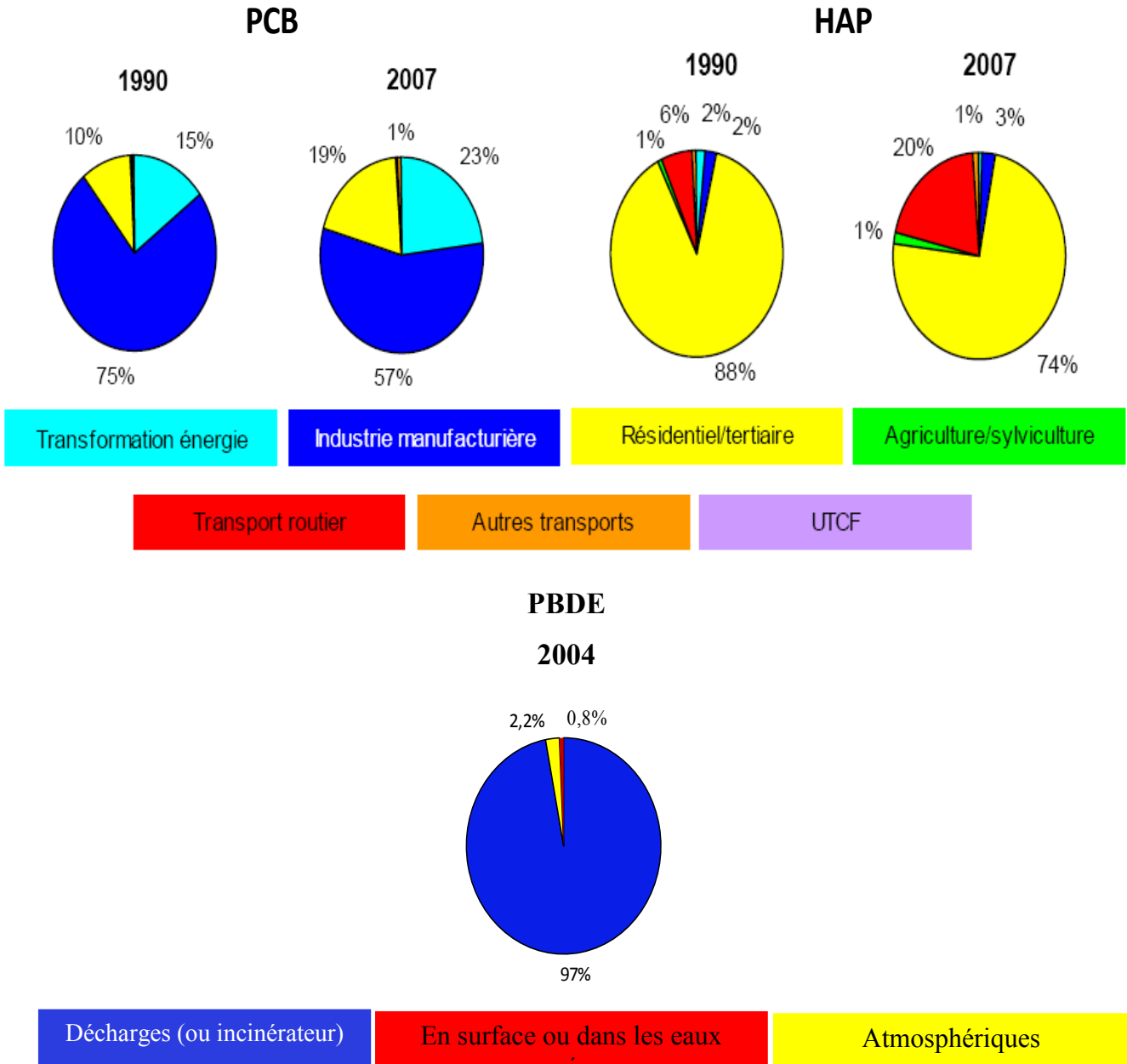


Figure I- 5 : Sources d'émissions anthropiques des PCB et des HAP en France et des PBDE en Europe (OSPAR, 2004 ; CITEPA, 2007).

Néanmoins, des études comparatives entre les apports en PoP des boues de stations d'épuration et ceux des flux atmosphériques ont montré que la contribution générale des épandages est moindre, car leurs charges en PoP sont ponctuelles contrairement aux charges diffuses apportées par voie atmosphérique. Toutefois, la contamination des sols agricoles par les boues n'est pas négligeable. Par exemple, cette pratique pourrait constituer 27% des apports en PoP dans les sols agricoles français (Blanchard *et al.*, 2007).

Différentes dénominations des sources d'émission ont été rapportées (Barriuso *et al.*, 1996) :

Les sources primaires sont les sources d'émission directe des PoP dans l'environnement. Parmi les sources primaires, nous distinguons les sources ponctuelles (incinérateurs de déchets ménagers, industriels, etc.) et les sources diffuses (trafic routier, chauffage domestique, etc.).

Les sources secondaires sont ces matrices où les molécules sont toujours présentes, soit dans l'environnement (sol, boue, etc.) soit comme produits (transformateurs contenant des PCB, engrais liquides).

1.5 Distribution des PoP dans l'environnement terrestre

De nombreux modèles ont été développés afin de prévoir le comportement et le devenir des PoP dans l'environnement terrestre (TaPL3-2.10, ELPOS-1.1.1, EPI v. 3.10) (Fernández et Grimalt, 2003 ; Dalla Valle *et al.*, 2007). Il s'agit de modèles de transport longue distance ou de fugacité. On peut donc modéliser le comportement d'une molécule dans l'environnement en connaissant ses propriétés environnementales comme sa solubilité dans l'eau, sa volatilité et sa capacité à s'associer aux particules minérales ou organiques qui forment les sols.

L'environnement global peut être décrit comme un modèle chromatographique complexe dans lequel les produits chimiques organiques, hydrophobes, sont répartis entre deux phases, mobile et stationnaire. Cette répartition est soumise à des processus d'adsorption et de désorption. Dans ce système, la surface terrestre, en particulier le sol et secondairement la végétation, constituent la phase stationnaire avec une forte capacité de rétention des polluants, alors que l'atmosphère constitue la phase mobile. Les océans, quant à eux, constituent simultanément deux phases : une phase stationnaire, avec une capacité de rétention intermédiaire, et une phase mobile lente.

Une fois libérés dans l'environnement, les PoP par leurs propriétés semi-volatiles (P_v à 25 °C entre 10^{-8} et 1 Pa), peuvent se répartir dans l'atmosphère entre les phases gazeuse et particulaire (Aceves et Grimalt, 1993 ; Kaupp *et al.*, 1999). Durant leur transfert

Rapport bibliographique

atmosphérique, les PoP subissent un certain nombre de processus tels que la dégradation, le dépôt sur les sols et les végétaux, la revolatilisation et la bioaccumulation (**Figure I- 6**). Ces phénomènes détermineront l'évolution des PoP dans l'environnement. Les facteurs majeurs qui gouvernent la dispersion globale des PoP sont les suivants (Wania et Mackay, 1995) :

- 1- La température, le flux d'air,
- 2- La dégradation et la persistance (demi-vie),
- 3- Les propriétés physico-chimiques des molécules (pression de vapeur, constante de la loi d'Henry, nombre de cycles, degré de chloration, etc.),
- 4- La teneur en matière organique du sol (support hydrophobe du milieu environnemental),
- 5- La localisation de la source d'émission.

Ces facteurs seront à l'origine des différents comportements des PoP dans l'environnement, comme leur condensation et leur accumulation sur les surfaces des particules atmosphériques, les sols et les végétaux (Global Distillation Effect), mais aussi leur condensation/revolatilisation des basses aux hautes latitudes (effet sauterelle) (AMAP, 1998 ; Fernández et Grimalt, 2003). Étant donné leur faible pression de vapeur, leur très faible solubilité dans l'eau et leur coefficient de partage $\log K_{ow}$ élevé, les PoP qui pénètrent dans l'environnement auront tendance à se lier à la fraction organique des matières particulaires du sol. Ainsi, si des quantités égales de PoP étaient rejetées dans l'air, l'eau et le sol, un modèle de fugacité (EPI v. 3.10, Syracuse Research Corporation) montre qu'à terme la plus grande partie de la substance se retrouverait dans le sol et très peu dans l'eau et l'air (US EPA, 2007).

Pour résumer. Les dépôts atmosphériques sont les premières sources de pollution de l'environnement par les PoP. Toutefois pour certaines familles de polluants comme les PCB et les PBDE, les contaminations accidentelles, souvent ponctuelles, telles que l'épandage des boues d'épuration, les fuites et les écoulements accidentels provenant par exemple d'appareils électriques ou de circuits hydrauliques usagés, y contribuent significativement.

La répartition environnementale des PoP dépend des propriétés intrinsèques des molécules mais également des propriétés du milieu dans lequel elles se trouvent. La dispersion dans l'environnement terrestre de ces polluants est complexe et difficile à comprendre. Cependant, dans tous les modèles développés pour prédire le comportement des PoP dans le

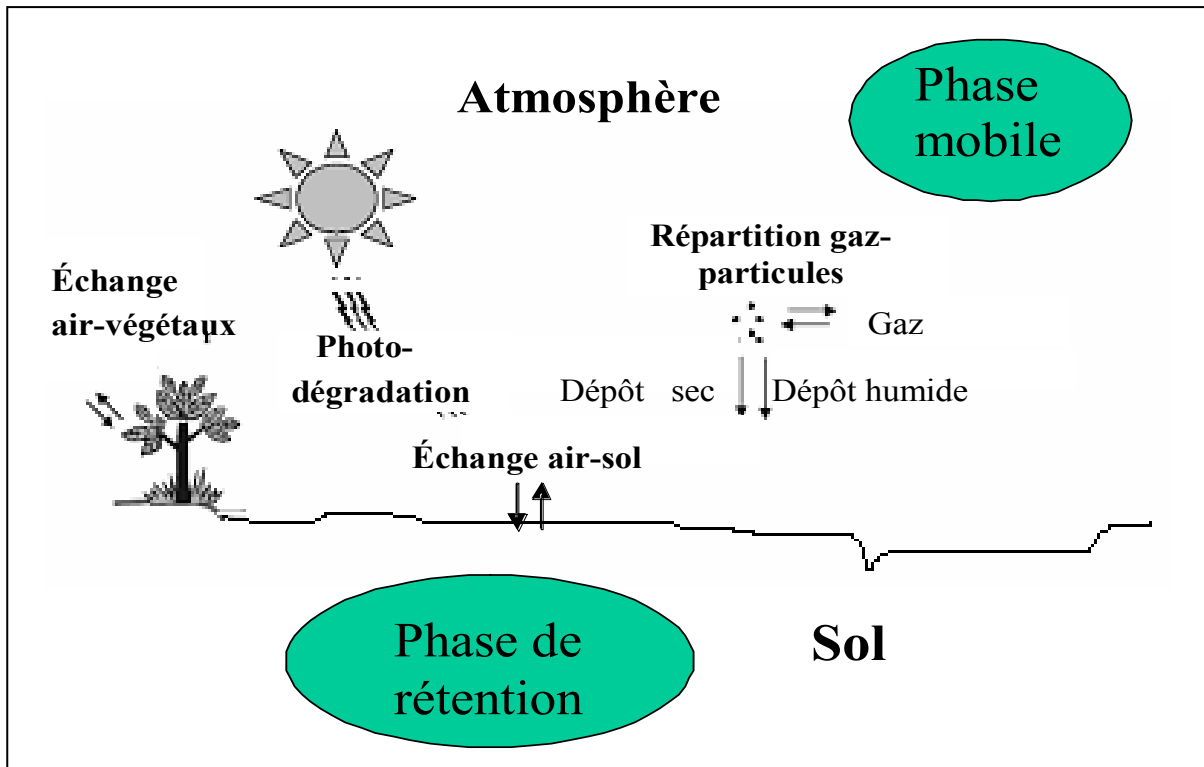


Figure I- 6 : Phénomènes agissant sur les flux de distribution des PoP dans l'environnement terrestre.

milieu terrestre, le sol est considéré comme une composante « clé », car considéré comme le récepteur majeur des PoP dans l'environnement.

1.6 Accumulation des PoP dans les différents compartiments environnementaux terrestres

La contamination de l'environnement terrestre s'évalue par l'état de contamination des sols et des végétaux. Les dépôts atmosphériques (dépôts gazeux, dépôts de particules sèches ou humides) et l'épandage des boues d'épuration restent les voies majeures de cette pollution dans les zones agricoles (Wild et Jones, 1995 ; Bakker *et al.*, 2001).

Chez les végétaux, un effet « splash » suite à une forte pluie peut contribuer également à leur contamination (projection de particules de sol contaminé sur les parties aériennes des plantes). Après leur dépôt sur le feuillage, les PoP peuvent se fixer sur la cuticule (couverture de cire très lipophile) ou diffuser à l'intérieur de la plante ; les moins hydrophobes d'entre eux peuvent aussi être absorbés par voie racinaire ou stomatique (Ryan *et al.*, 1988 ; Franzaring *et al.*, 1992 ; McLachlan, 1997).

Concernant les sols, les PoP sont particulièrement adsorbés sur des particules du sol et notamment sur la matière organique. La désorption et la migration sont *a priori* faibles ; les HAP par exemple ont été localisés principalement dans les 10 centimètres supérieurs du sol, à savoir l'horizon de surface H0 (Park *et al.*, 1990). Pour les PCB, la même tendance (0-12 cm) a été révélée par l'étude d'Armitage *et al.*, (2006). La tendance des sols à accumuler les PoP a été associée à la teneur en matière organique. En effet, la présence de sites hydrophobes procure aux PoP des sites spécifiques réduisant leur biodégradation et leur volatilisation (ATSDR, 2000).

L'évolution des concentrations des PoP dans les sols et les végétaux est étroitement liée à la production industrielle. Alcock *et al.* (1993) ont procédé à l'analyse d'échantillons de sols archivés, provenant d'essais agronomiques de longue durée. Ils ont pu montrer que, dans différentes localités d'Angleterre, la concentration en PCB a augmenté à partir de 1940, pour atteindre des valeurs maximales dans les années 60. Depuis, avec les limitations de production et d'utilisation de ces produits dans les années 70, les concentrations dans les sols ont diminué pour atteindre actuellement des niveaux comparables à ceux des années 40. Actuellement, 85% des sols anglais analysés présentent des concentrations en PCB entre 14 et 53 µg/kg, avec une moyenne de 28 µg/kg. Néanmoins, ces auteurs trouvent des concentrations supérieures à 200 µg/kg près des centres industriels. Une démarche similaire a

Rapport bibliographique

été menée pour analyser les concentrations en PCDD/F et en HAP dans des échantillons de sols stockés depuis 1846 et provenant du dispositif agronomique expérimental de Rothamsted (U.K.). Les concentrations y ont augmenté continuellement depuis le début du siècle. Les teneurs en PCDD/F des sols sont passées par exemple de 31 à 92 ng/kg entre 1893 et 1986. Jones *et al.* (1989) et Kjeller *et al.* (1991) ont calculé une vitesse d'accumulation dans les sols de 2 mg PCDD/F/ha/an et de 42 mg HAP/ha/an.

De même, Wyrzykowska *et al.* (2007) ont mesuré les concentrations en PCB retrouvées dans les végétaux dans différentes régions en Pologne ; les concentrations les plus élevées ont été retrouvées dans les zones à forte activité industrielle et très urbanisées. Les composés les plus chlorés (Nona et Deca-chloré biphényles) ont été retrouvés dans tous les échantillons récoltés. Les concentrations en PCB des végétaux variaient de 2,7 à 50 ng/g MS. Crépineau et Rychen, (2003) ont également évalué la charge en HAP de végétaux dans les parcelles agricoles situées à proximité d'un aéroport et d'une autoroute ; la contamination observée était de 69 et de 188 ng/g MS respectivement.

En considérant les niveaux de PoP retrouvés dans le sol et les végétaux sur un même site, les différentes études montrent que les concentrations retrouvées dans les deux matrices sont proches (**Figure I- 7**, AMAP, 1998 ; **Figure I- 8** Crépineau *et al.*, 2004). La **Figure I- 7** résume les résultats obtenus par une étude canadienne menée sur différents sites ayant été exposés à une activité humaine intense en PCB (fabrication de condensateurs). Les concentrations en PCB retrouvées dans les végétaux sont significativement corrélées ($R^2=0,98$, $P<0,001$) aux niveaux mesurés dans le sol (AMAP, 1998). Les mêmes concentrations en HAP ont été retrouvées dans les sols et les végétaux (Crépineau *et al.* (2004) obtenues sur un même site à des distances différentes (0-150 m) de la source de contamination (trafic routier de 70 000 véhicules par jour) (**Figure I- 8**).

La concentration en PoP dans les végétaux est plus faible que dans les sols sur les sites pollués : cela s'explique non seulement par l'absence de sites spécifiques d'adsorption sur la matière organique fraîche, mais également par la sénescence des feuilles âgées ou de la plante entière (AMAP, 1998). D'autre part, l'écart entre le stockage dans le sol et les végétaux est plus élevé à fortes concentrations (**Figure I- 7b**), ce qui illustre le pouvoir accumulateur supérieur du sol. En effet, l'étude de Domingo *et al.* (2002) au voisinage d'un incinérateur en Espagne (12 sites) montre que lors d'une réduction de la source d'émission en PCDD/F, la pollution des végétaux (prédominante) diminue plus rapidement que celle des sols. Le constat final est que le sol possède un pouvoir de stockage des PoP plus important que les végétaux, ce qui confirme le rôle dominant du sol dans la contamination de la chaîne trophique terrestre.

Rapport bibliographique

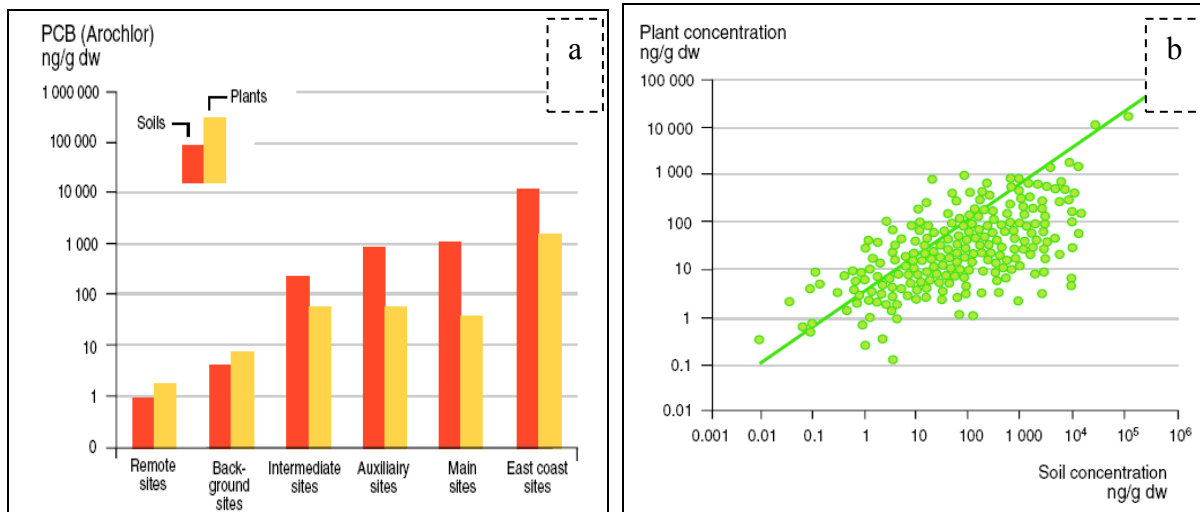


Figure I- 7 : Concentrations en PCB dans des sols et des plantes (ng/g MS) de régions industrielles nordiques (d'après, AMAP, 1998).

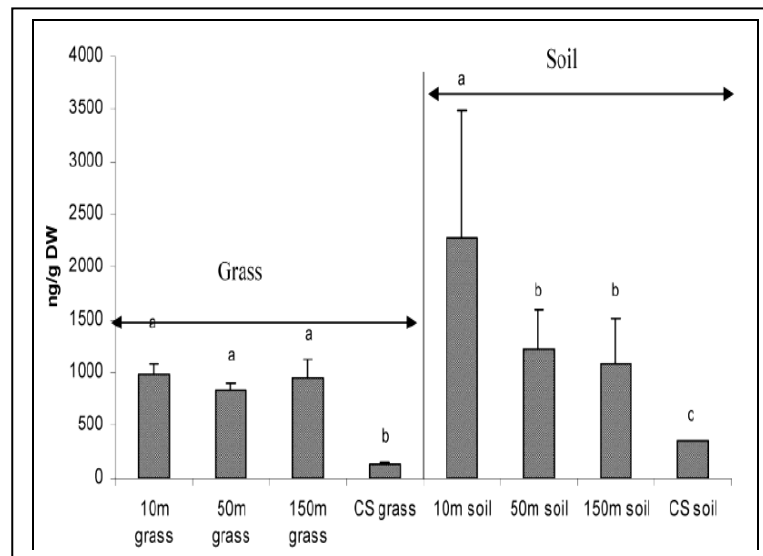


Figure I- 8 : Niveaux de contamination de l'herbe et du sol en HAP à proximité d'une autoroute (Crépineau *et al.*, 2004).

CS = site témoin

Les écarts entre les concentrations dans le sol et les végétaux sont d'autant plus prononcés aux fortes concentrations (**Figure I- 7a**). Le pouvoir de stockage (accumulation) des sols vis à vis des PoP est défini par leurs propriétés physico-chimiques et plus particulièrement la teneur en matière organique.

Pour résumer. Les végétaux et les sols constituent les principaux réceptacles des polluants. Dans le temps, les sols de par leurs propriétés vont présenter un pouvoir « accumulateur » naturel, ce qui se traduit par une pérennisation de la contamination avec un risque accru de transfert vers la chaîne alimentaire.

1.7 Pouvoir de stockage des sols et rétention des polluants organiques

La rétention des polluants organiques par les sols est classiquement caractérisée à l'aide du coefficient de partage ou de distribution (K_d) (1) du polluant entre les phases solide et liquide. La teneur en matière organique des sols est le paramètre le mieux corrélé au coefficient d'adsorption (Barriuso et Calvet, 1992). Une normalisation des coefficients de partage en fonction de la teneur en matière organique du sol est alors justifiée, c'est le coefficient de partage carbone organique - eau (K_{oc}) (2).

La **Figure I- 9** présente des courbes d'élution pour l'atrazine (pesticide) en fonction de différents coefficients d'adsorption (K_d) (Barriuso *et al.*, 1996). Dans cet exemple, l'augmentation de la teneur en matière organique entraîne un accroissement du coefficient d'adsorption de 0,6 à 1,7.

Il est évident que les processus impliqués dans la rétention des PoP par les sols sont évolutifs et dépendent d'un certain nombre de paramètres tels que le temps de séjour ou « maturation » et la concentration du polluant dans le sol. Parmi ces processus on retrouve les phénomènes d'hystérésis, très souvent observés lors des expériences de désorption, avec l'apparition rapide de résidus non désorbables (résidus liés). Les interactions avec les fractions du sol évoluent de telle sorte que la capacité de désorption des polluants et les rendements d'extraction par les solvants organiques diminuent avec le temps de résidence du polluant dans le sol (Barriuso *et al.*, 1992).

La plupart des molécules organiques sont susceptibles de former des résidus non désorbables avec les particules du sol. Les parts de molécules fortement liées sont variables, mais peuvent représenter jusqu'à 90% des quantités initialement appliquées (Khan, 1982 ; Calderbank, 1989). Différentes hypothèses ont été avancées pour expliquer la formation de ce type de

(1) $K_d = (x/m)/C_e$; (x/m) est la quantité de polluant adsorbée sur le sol ; C_e est la concentration du polluant dans la solution, en équilibre avec la phase adsorbée.

(2) $K_{oc} = K_d \times 100/\%$ carbone organique.

résidus : formation de liaisons covalentes avec d'autres constituants organiques des sols, incorporation dans des polycondensats phénoliques au cours de leur polycondensation, blocage dans la microporosité des structures colloïdales organiques (Bollag *et al.*, 1992). Toutes ces hypothèses convergent vers l'importance de la matière organique dans l'attribution du pouvoir de stockage et de rétention du sol. Le devenir de ces résidus fortement adsorbés, en termes de mobilité et de dégradabilité, est conditionné par la nature de la matière organique impliquée dans leur formation (Barriuso *et al.*, 1996). La rétention des PoP par le sol est considérée comme un des processus de dissipation du contaminant. Cependant, l'existence de résidus soulève la question de leur devenir, et en particulier, celui de leur disponibilité.

1.8 Teneurs en PoP de la matrice sol et réglementation en vigueur

De nombreux paramètres agissent sur les concentrations de PoP retrouvées dans l'environnement. Les quantités de PoP rejetées par la source d'émission restent le principal facteur de variation de leurs concentrations dans l'environnement. D'autres facteurs sont susceptibles d'intervenir sur les concentrations des contaminants dans le sol : la saison, la distance à la source d'émission, le relief, l'altitude, le vent, les propriétés physico-chimiques des molécules ou le type de sol (Wilcke *et al.*, 1996 ; Bakker *et al.*, 2001 ; Smith *et al.*, 2001 ; Tuhackova *et al.*, 2001 ; Kouimtzis *et al.*, 2002 ; Crepineau *et al.*, 2004 ; Blanchard *et al.*, 2007 ; Tankari Dan-Badjo *et al.*, 2007).

Les concentrations totales en PoP dans le sol renseignent sur l'impact et l'étendue d'une source de pollution. D'une manière générale, les concentrations dans les sols suivent cet ordre : sol agricole < sol de forêt < prairie permanente < sol urbain < sol d'un site d'émission ponctuelle (Wilcke, 2000 dans Tankari Dan-Badjo *et al.*, 2007).

Le profil en PoP des échantillons prélevés est cependant une donnée complémentaire et essentielle. Les profils des PCB dans le sol sont caractérisés par la prépondérance des molécules les plus chlorées, les composés à faible degré de chloration étant plus volatils (Manz *et al.*, 2001 ; Domingo *et al.*, 2002) (**Annexe I- 3**). Concernant les HAP, la contribution des molécules de deux à quatre cycles reste majoritaire dans les sols. Les molécules à fort poids moléculaire se déposent à proximité de la source d'émission (Bakker *et al.*, 2000) (**Annexe I- 4**). Pour les PBDE, les congénères Tétra-BDE 47, Penta-BDE 99, Hexa-BDE 153, qui forment les principaux constituants du mélange commercial penta-BDE, dominant le profil moyen des congénères de PBDE dans les sols (Hassanin *et al.*, 2004) (**Annexe I- 5**).

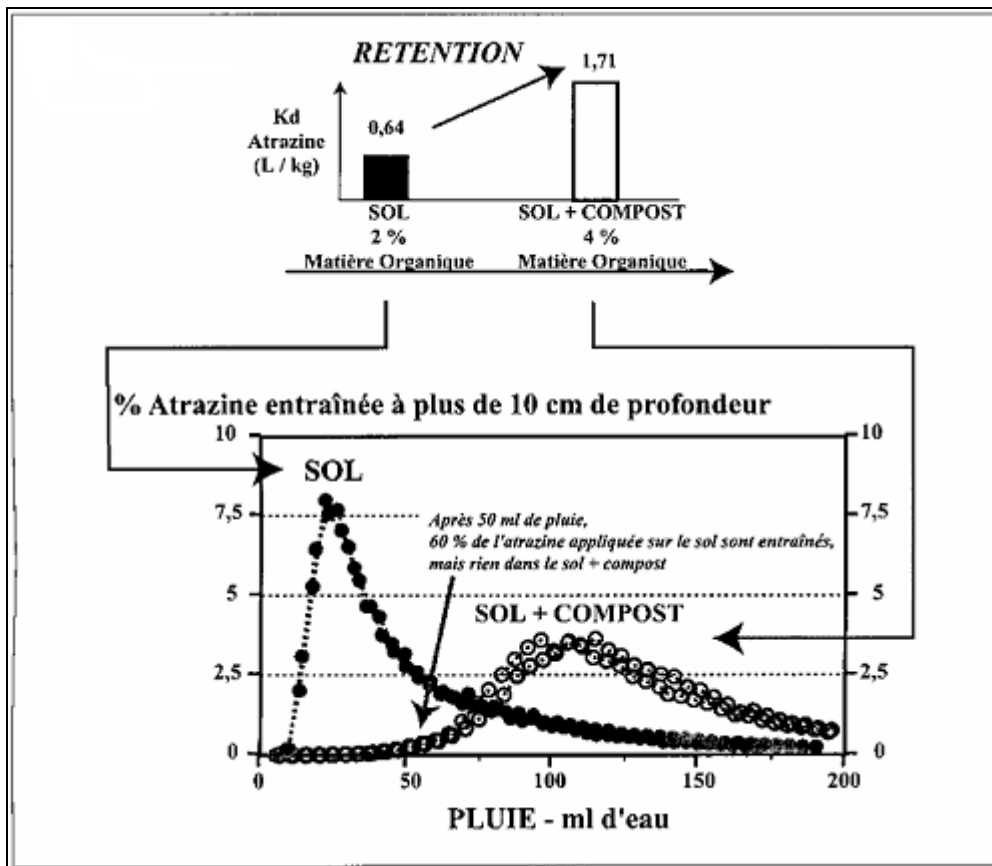


Figure I- 9 : Exemple de modification des capacités de rétention de l'atrazine (polluant organique) par les sols suite à une addition de compost, et conséquences sur sa mobilité (d'après Barriuso *et al.*, 1996).

Rapport bibliographique

Une synthèse des concentrations de PoP dans le sol est donnée dans le **Tableau I- 7** (détails voir **annexes-I 3, 4 et 5**).

Afin d'éviter des répercussions éventuelles sur les productions agricoles à vocation alimentaire, il est impératif de connaître les concentrations en PoP d'un sol. En effet, le sol occupe une place centrale dans la chaîne trophique terrestre, puisqu'il s'agit du milieu où les plantes et les animaux croissent et vivent. Les concentrations dans le sol sont utilisées comme moyen d'évaluation du risque d'exposition. Notons qu'en France, il n'existe toujours pas de valeurs guides pour la pollution aux PoP. Au Canada, il existe des valeurs génériques servant à évaluer l'ampleur de la contamination d'un sol, elles servent de valeurs guides pour les programmes de réhabilitation. Ainsi, des niveaux classés de A (concentration minimale) à C (limite acceptable) sont déterminés pour chaque composé, de manière à orienter la vocation des sols associés (résidentiel, commercial, etc.) (DEPQ, 2002). Lijzen *et al.* (2001) proposent de déterminer les seuils à risques d'un sol de pH 6 et contenant 10% de matière organique et 25% d'argile, à partir de deux standards génériques d'évaluation du risque : la valeur cible et la valeur d'intervention. La valeur cible est fixée dans le but d'éviter à long terme des effets nocifs sur la santé humaine et/ou sur l'environnement dans son ensemble. La valeur d'intervention détermine la limite au-delà de laquelle le sol est une menace à court terme pour la santé humaine et pour l'environnement (**Tableau I- 8**).

Pour résumer. Le pouvoir de stockage et de rétention des sols semble être gouverné par la matière organique. Les concentrations de PoP dans le sol peuvent varier, en fonction de la famille de polluants et de l'origine du sol, du ng/g au mg/g. Les profils de contamination sont conditionnés par les caractéristiques intrinsèques des molécules et des caractéristiques de la source d'émission.

Actuellement, il n'existe pas en France de réglementation sur les teneurs en HAP ou en PCB dans les sols. Les seules données disponibles sont les VCI (Valeurs de Constat d'Impact), au-delà desquelles une étude de la nature de la pollution et de ses impacts est nécessaire. Cependant, ces valeurs ne sont plus en vigueur et leur utilisation est limitée.

Tableau I- 7 : Synthèse des gammes de concentrations en PoP dans différents types de sols
(détails voir annexes I-3, 4 et 5)

Famille de polluants	Sol agricole	Sol urbain	Sol industriel
PCB ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	0,05-8	3-20	20-100
PBDE ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	0,2-12	/	29
HAP (mg/kg)	0,19-11	0,5-23	0,9-68

2 Devenir des PoP dans le sol et interactions avec ses constituants

La définition et la caractérisation des sols pollués sont basées exclusivement sur l'identification des polluants. Les effets et la toxicité des PoP sont également reconnus, mais leur devenir dans le sol l'est bien moins. Pour cela, cette partie discutera des paramètres régissant le devenir des PoP du sol afin de mieux comprendre l'évolution des teneurs et des interactions des polluants dans le sol.

2.1 Revolatilisation des PoP du sol vers l'air (déplacement de la pollution)

L'émission dans l'atmosphère des PoP contenus dans les sols sous forme gazeuse ou particulaire peut constituer une source d'émission secondaire (la forme émise prédominante varie entre gazeuse ou particulaire, selon les propriétés physico-chimiques des PoP). Le facteur de ré-émission, bien qu'important pour certaines molécules, reste difficile à estimer à partir des bilans de matière émission/dépôt (Eisenberg *et al.*, 1998).

2.2 Dégradation chimique (abiotique) des PoP

Dans les sols, la photolyse est le processus abiotique principal de dégradation, même s'il reste limité par la profondeur de pénétration des rayons. Ce phénomène n'a donc lieu que dans les premiers centimètres à la surface du sol (Jayr *et al.*, 2001). Par exemple, Zhong *et al.* (1993) ont modélisé une zone unique de 2 mm en surface d'une colonne de sol, et ont constaté que 90% de la photodégradation d'un mélange de solvants organiques avait lieu dans cette zone-là. La photolyse est un processus extrêmement rapide (demi-vie de quelques heures), ce qui peut d'ailleurs poser des difficultés expérimentales. L'effet de la photolyse est d'autant plus marqué que les molécules sont chlorées (Liu *et al.*, 2002). Concernant les dérivés bromés, la liaison covalente des atomes de brome est moins forte que celle des atomes de chlore, d'où leur plus forte sensibilité à la photolyse.

2.3 Dégradation biotique des PoP

D'une manière générale, les études menées sur les activités de biodégradation montrent que :

- Plus une molécule possède d'atomes de chlore (PCB et PCDD/F), moins elle est dégradable par les microorganismes et plus elle est persistante dans l'environnement. Les molécules les

Tableau I- 8 : Recommandation pour la qualité des sols concernant les PoP (Lijzen *et al.*, 2001)

Contaminant	Valeur cible (mg/kg)	Valeur éco-toxicologique (mg/kg)
Naphtalène	nd	nd
Anthracène	nd	nd
Benzo[a]anthracène	nd	nd
Benzo[a]pyrène	nd	nd
Benzo[g,h,i]perylène	nd	nd
Benzo[k]fluoranthène	nd	nd
Chrysène	nd	nd
Fluoranthène	nd	nd
Phénanthrène	nd	nd
Indéno[1,2,3-cd]pyrène	nd	nd
Total 16 US EPA	1	40
Trichlorobiphényles	nd	nd
Hexachlorobiphényles	nd	nd
Total PCB	0,02	1
PCDD	nd	nd

nd : non déterminé.

Total 16 US EPA : L'EPA américaine a classé 16 des HAP en tant que molécules prioritaires sur la base de la toxicité, de l'exposition humaine, de la persistance dans l'environnement, et de l'étendue des informations disponibles. Parmi ces 16 HAP on retrouve le benzo(a)anthracène, le chrysène, le benzo(a)pyrène, le benzo(b)fluoranthène, le benzo(k)fluoranthène, le dibenz(a,h)anthracène, et le indeno(1,2,3-cd)pyrène

Rapport bibliographique

plus aisément biodégradées parmi les contaminants chlorés sont les mono, les di- et les tri-chlorés.

-Pour les HAP, les molécules à faible poids moléculaire (composés contenant au plus trois cycles) comme le Naphtalène ou le Phénanthrène, sont les plus soumises à la biodégradation bactérienne. Au contraire, les composés à poids moléculaire plus élevé (composés ayant au moins quatre cycles) tels que le Benzo[a]Pyrène, sont peu ou pas du tout dégradés (Wilson et Jones, 1993 ; Juhasz et Naidu, 2000). En effet, l'oxydation des noyaux aromatiques est difficile et l'attaque initiale constitue généralement l'étape limitante de la dégradation (Juhasz et Naidu, 2000).

Un certain nombre de travaux réalisés sur des sols contaminés par les PoP ont conduit à l'isolement et à l'identification de microorganismes capables de transformer les PoP. Très peu d'études décrivent les mécanismes réactionnels impliqués dans la dégradation des HAP à fort poids moléculaire (quatre cycles et plus) ainsi que des PCDD/F et des PCB possédant plus de trois substitutions chlorées. A noter que des études montrent que les molécules de TCDD et de Benzo[a]Pyrène (les plus toxiques de leurs familles respectives) sont très résistantes à l'attaque microbienne. Dans le sol, la dégradation de ces molécules est faible ; cela s'explique essentiellement par leur faible disponibilité en solution puisque ce sont des molécules qui s'adsorbent facilement sur les surfaces hydrophobes et qui ont un coefficient de solubilisation dans l'eau faible (Rugge et Ahlert, 1993 ; Wilson et Jones, 1993). L'aptitude des microorganismes du sol à dégrader les PoP solubles conduit à s'interroger sur les facultés des microorganismes présents dans le rumen des animaux polygastriques ou dans le côlon pour les animaux monogastriques, sur le rôle qu'ils pourraient jouer après l'ingestion de ces polluants.

Pour résumer. Les polluants organiques du sol sont soumis à de nombreux phénomènes biotiques et abiotiques qui peuvent modifier leur concentration. Cependant, il semblerait que les molécules les plus sensibles à ces phénomènes soient les molécules les plus légères. Les molécules les plus lourdes telles que la TCDD et le Benzo[a]Pyrène sont moins affectées et présentent des demi-vies de plusieurs années.

2.4 Mise en place d'une liaison chimique entre les PoP et le sol

Les sols sont des milieux hétérogènes avec des textures qui varient en fonction de la taille des particules de leurs constituants (argile, limon, sable, gravier) (**Tableau I- 9**). Dans le cadre de

la compréhension des processus mécanistiques ayant lieu dans la matrice, celle-ci est désignée sous le terme générique de "géosorbant" (Luthy *et al.*, 1997). La géosorption (**Figure I- 10**) tient compte de l'éventuelle présence de résidus de combustion (comme la suie ou les cendres) et de Phases Liquides Non-Aqueuses adhérentes ou piégées (NAPL, comme la houille ou le goudron). Ces matériaux peuvent en effet fonctionner comme des sorbants vis-à-vis des composés organiques. Ainsi, les PoP d'origine pyrogénique se retrouvent en grande quantité dans la houille, tandis que les PoP d'origine pyrolytique sont transportés par de la suie.

Les constituants d'un géosorbant diffèrent en terme de structure ou de nature et vont interagir différemment avec les composés organiques, avec des énergies et des vitesses de sorption variables. Ainsi, par exemple, des phénomènes d'hystérésis ont été décrits dans de nombreuses expériences mettant en jeu des géosorbants (Pignatello et Xing, 1995 ; Nam *et al.*, 2003a). Ces phénomènes sont déterminants pour caractériser le devenir des PoP dans le sol (biodisponibilité, migration, etc.). Globalement, les PoP peuvent se retrouver dans le sol, soit associés à la fraction minérale issue de l'altération des roches, soit associés à la matière organique résultant de la dégradation des végétaux.

- **La phase minérale**

Les oxy-hydroxydes métalliques, principalement de fer, de manganèse et d'aluminium du fait de leur faible taille et donc leur surface spécifique élevée, joueraient un rôle important dans le processus de rétention de polluants dans les sols. Ils sont présents dans la fraction argileuse du sol. Cependant ces minéraux présentent également une charge spécifique non négligeable en raison de la présence de groupements hydroxyles à leur surface. Cette caractéristique limite leur affinité pour les composés apolaires comme les PoP et rend une éventuelle sorption sur ces composés très dépendante du pH.

- **La Matière Organique (MO) ou humus**

Dans le contexte qui nous intéresse, la matière organique peut être classée en deux types : naturelle et/ou anthropique. Le cas le plus répandu de matière organique anthropique est le charbon qui est considéré comme un élément naturel mais qui a été apporté artificiellement par l'Homme sur un site. Cette fraction organique anthropique peut comprendre également des éléments produits artificiellement lors de la transformation de la matière première naturelle, et en particulier les sous-produits de la cokéfaction comme les goudrons. Afin de mieux

comprendre les phénomènes de sorption des PoP sur la fraction organique du sol, seule l'interaction avec la matière organique naturelle a été abordée.

La matière organique naturelle du sol ou humus est composée principalement de substances humiques (Huang *et al.*, 2003). Elles comptent les acides fulviques (solubles dans l'eau), les acides humiques (solubles dans l'eau uniquement à pH basique) et l'humine (insoluble quel que soit le pH).

La structure hypothétique d'une macromolécule humique correspond à un réseau très ramifié de segments aliphatiques et aromatiques contenant en abondance des fonctions hydroxyles, carbonyles, éthers, esters et acides carboxyliques (Pignatello, 1998).

Dans la gamme de pH habituelle des sols, les molécules humiques sont polyanioniques en raison de la dissociation des acides carboxyliques et des groupes phénoliques. En solution, elles s'enroulent aléatoirement et s'agrègent pour former des colloïdes. Cette structure leur permet de présenter en surface des fonctions polaires hydrophiles, tout en formant un cœur hydrophobe (Weber et Huang, 1996).

Les trois catégories de substances humiques (SH) diffèrent par leur poids moléculaire, leur degré de condensation ou polymérisation et leur hydrophobicité, ces trois caractéristiques augmentant des acides fulviques (AF) aux acides humiques (AH) et à l'humine. Cette augmentation de la complexité de la structure est liée aux conditions d'humification et à la nature de la matière organique fraîche initiale qui fait l'objet de l'humification.

2.4.1 Processus de rétention des PoP dans le sol

La compréhension des processus de rétention des PoP dans les différentes fractions du sol est essentielle : cela nous permettra de mieux comprendre le potentiel accumulateur du sol. La rétention correspond de manière générale au maintien des polluants dans le sol et hors des phases aqueuse ou gazeuse, par opposition au transfert hydrique ou à la volatilisation (Barriuso *et al.*, 1996). Elle peut être due à plusieurs phénomènes. Les plus fréquemment cités sont (Barriuso *et al.*, 1996) :

- l'**absorption** par les végétaux ou par la microflore du sol (**ou bioconcentration**),
- la **sorption** sur ou dans les phases solides (non mobiles) du sol (**ou effet mémoire du sol**).

Nous présenterons dans cette partie les hypothèses de mécanismes de sorption dans la porosité minérale puis dans la matière organique. Nous rappellerons que le sol est un milieu vivant, en constante évolution, et que des paramètres autres que le compartiment "sol"

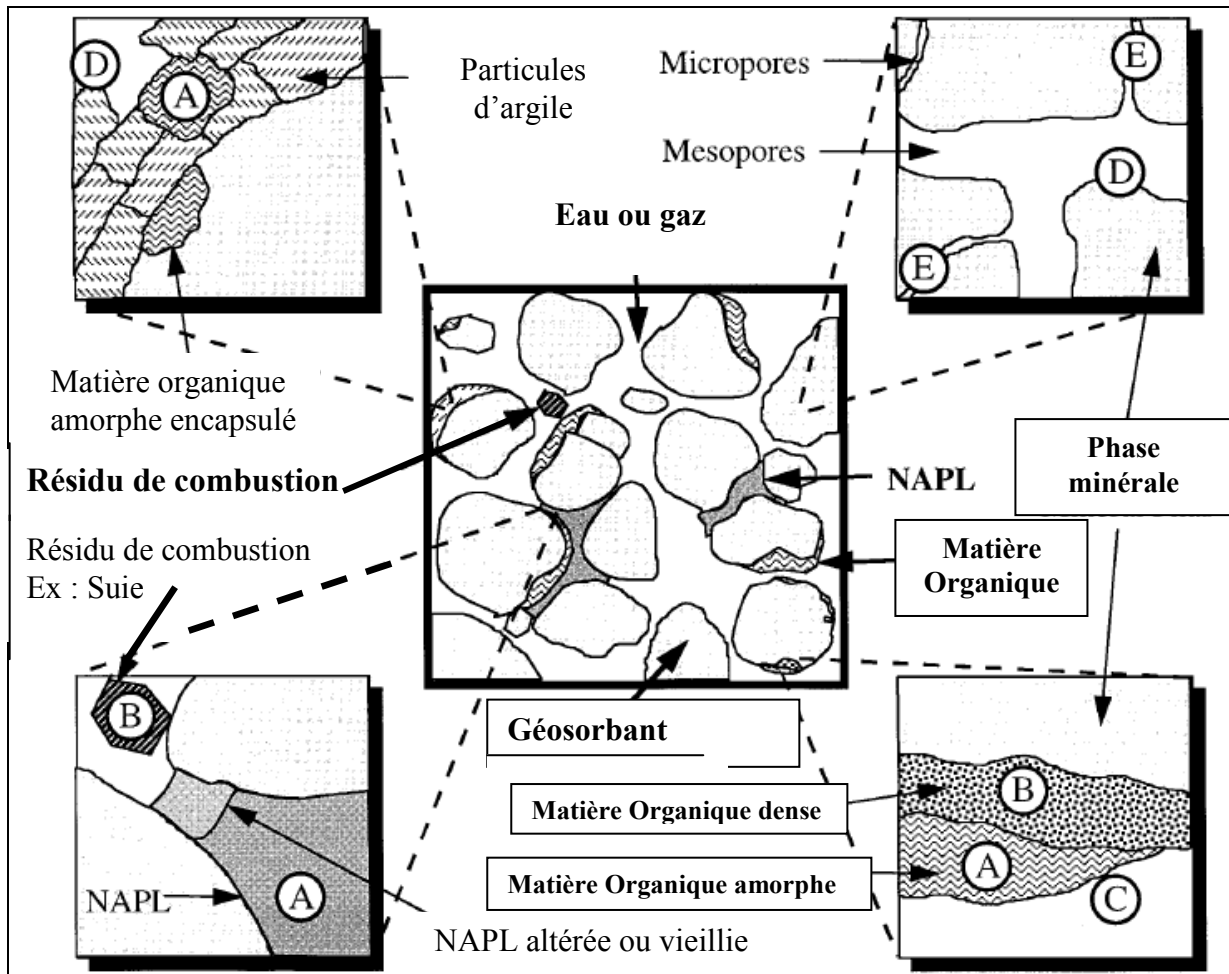


Figure I- 10 : Modèle conceptuel de géosorbant (Luthy *et al.*, 1997 ; Danielsson, 2000).

Les lettres correspondent aux différents mécanismes de sorption proposés par Luthy *et al.* (1997) :

A, B : Absorption dans la matière organique

C : Adsorption sur surfaces organiques (exemple : suie) ; D : Adsorption sur surfaces minérales (exemple : quartz) ; E : Adsorption dans les micropores (exemple : zéolite)

NAPL : Polluants en phase liquide non aqueuse

Tableau I- 9 : Classification granulométrique des constituants d'un sol

Classe	Dimension (µm)
Argile	<2
Limon	2 à 50
Sable	50 à 2000
Graviers	>2000

peuvent influencer fortement sur les mécanismes de sorption des PoP dans les sols (biodégradation et « vieillissement »).

a) Sorption des PoP dans la porosité de la phase minérale

Les phases minérales pouvant jouer un rôle dans la sorption des PoP sont les argiles gonflantes et les éléments présentant une forte microporosité, dans l'hypothèse où la teneur en eau est suffisamment faible pour que les molécules d'eau ne gênent pas l'interaction des PoP avec ces surfaces.

La sorption des composés organiques peut se faire à trois niveaux différents dans la fraction minérale :

-La **microporosité** (pores de diamètre inférieur à 20 nm) est fréquemment supposée être responsable de la sorption lente (Farrell et Reinhard, 1994 ; Luthy *et al.*, 1997 ; Nam et Alexander, 1998).

-L'**espace inter-feuillets des argiles** (de 1,4 à 4 nm) peut être augmenté en présence d'un solvant adéquat (Cornelissen *et al.*, 1998a) pour former les argiles gonflantes. En effet, Huang *et al.* (1996) ont démontré que la sorption de Phénanthrène (HAP) sur une argile bentonitique (90% de montmorillonite) était supérieure à celle de plusieurs solides inorganiques amorphes et à celle de gels de silice mésoporeux.

-Les **pores hydrophobes** (couche de MO) ont été associés également à la sorption lente des composés organiques lors du phénomène de diffusion des PoP.

b) Sorption des PoP dans la Matière Organique (MO)

La matière organique est très largement considérée comme étant le principal sorbant des composés organiques dans le sol (Weber *et al.*, 2001 ; Bogan et Sullivan, 2003), surtout en présence d'eau (Chiou et Kile, 1998). Concernant les composés hydrophobes tels que les PoP, la matière organique leur fournit un milieu organophile leur permettant de diminuer leur contact avec les molécules d'eau et donc leur énergie entropique (Pignatello, 1998). De nombreux auteurs citent une valeur seuil de teneur en matière organique du sol, comprise entre 0,1 et 0,5% et à partir de laquelle celle-ci joue un rôle prédominant dans la sorption des PoP (Cornelissen *et al.*, 1998b ; Johnson *et al.*, 2001). Ce seuil descend même parfois jusqu'à 0,02% (Pignatello, 1998).

Rapport bibliographique

Cette rétention peut se faire selon deux mécanismes : **la dissolution** dans la région de la matière organique la plus expansée et amorphe telle que l'AH ou l'AF et **le remplissage des cavités** dans le domaine de la matière organique condensée physiquement et plus réduite chimiquement telles que l'humine.

Dans la matière organique amorphe, la sorption des PoP est linéaire, rapide, complètement réversible ; elle peut être décrite par le modèle de partition linéaire. Dans cette région de la matière organique, il n'y a pas de sites de sorption spécifiques, et les PoP peuvent diffuser librement au sein de ce réseau expansé de macromolécules organiques.

A l'inverse, la sorption dans la matière organique condensée est non-linéaire, lente et montre une hystérèse. Cette région présente des sites de sorption spécifiques et les PoP peuvent être piégés dans les cavités de taille moléculaire formées au sein du réseau macromoléculaire rigide. La sorption sur ces sites bien définis est plus favorable énergétiquement que la sorption/dissolution dans le réseau amorphe. Les résidus de combustion, sources de carbone anthropogénique, sont associés à ce type de matière organique condensée.

Ainsi, à faible concentration de PoP, la sorption se fait essentiellement dans les cavités du réseau condensé, sur les sites de sorption les plus favorables, qui sont les premiers occupés (Haws *et al.*, 2006). Au fur et à mesure que la concentration en PoP augmente, les sites de sorption moins favorables sont occupés et le phénomène de dissolution peut alors devenir majoritaire (Haws *et al.*, 2006).

Une question pourrait survenir sur le rôle des amendements en boues sur la capacité de rétention des sols. Une étude menée par Saison *et al.* (2004) a révélé que l'apport de boues ne modifie pas sensiblement la capacité de rétention du sol. En revanche, la présence d'ETM (éléments traces métalliques) dans les boues favorise l'adsorption notamment du Phénanthrène. Ces métaux présents dans le sol vont favoriser la formation de complexes métallo-organiques à travers la mise en place de ponts ioniques ou de liaisons de coordination (Schulten et Schnitzer, 1997 ; Varadachari *et al.*, 1997). Cette complexation associée à la présence de métaux a été avancée pour expliquer la réduction de biodisponibilité des HAP du sol.

Lors de la description des phénomènes de sorption des PoP sur la matière organique, seul l'humus (MO naturelle) a été considéré. La **Figure I- 11** ci-dessous adaptée des travaux de Mesa et Spokas (2010), présente le spectre de dispersion de la MO (naturelle et anthropique) en fonction du degré de condensation. La disponibilité des PoP augmente d'autant plus que le degré de condensation diminue.

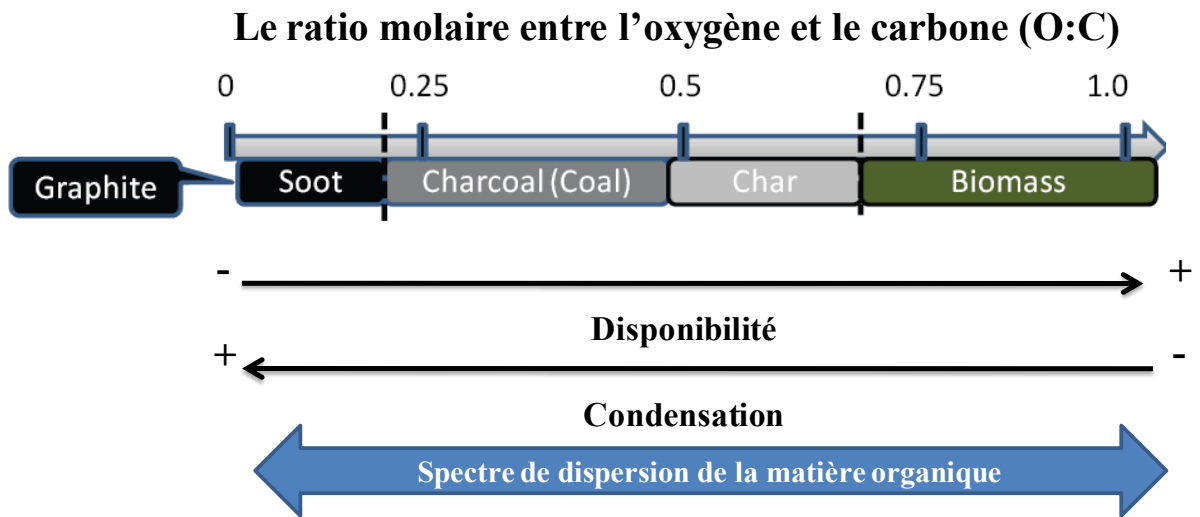


Figure I- 11 : Répartition de la Matière Organique en fonction de leur degré de condensation.

2.4.2 Rôle du « vieillissement » du sol dans la rétention des PoP

L'augmentation de la rétention (ou la diminution de la désorbabilité) des polluants avec le temps de résidence peut être une conséquence des mêmes phénomènes de diffusion qui expliqueraient la rétention à long terme. Ainsi, lorsque la durée de contact d'un PoP avec le sol augmente, la probabilité de rencontrer un site de sorption d'énergie élevée, et donc d'être fortement sorbé, s'accroît elle aussi. Le temps joue donc un rôle clé dans la rétention des PoP (White *et al.*, 1997 ; Luthy *et al.*, 1997 ; Macleod et Semple, 2003). L'ensemble de ces modifications liées au temps est appelé " vieillissement " ou "maturation". La majorité des études concluent que la fraction de PoP se désorbant lentement augmente avec le temps de contact. L'effet du temps de contact est fréquemment assimilé à la désorption lente, et on parle souvent de vieillissement pour désigner une diminution de l'extractibilité des PoP avec le temps de contact. Ainsi, White *et al.* (1997), Kelsey et Alexander (1997) et Kelsey *et al.* (1997) ont étudié son effet sur la biodisponibilité des PoP dans le sol en exposant des microorganismes (*Pseudomonas sp.*) et également des vers de terre (*Eisenia foetida*) à du sol contenant du Phénanthrène et vieilli plus ou moins longtemps (**Tableau I -10**). Les résultats obtenus montrent une diminution de la disponibilité du Phénanthrène avec l'augmentation du temps de contact du polluant avec le sol. La disponibilité des PoP désigne la fraction mise en solution et qui peut ainsi subir des processus biologiques (biodégradation, absorption végétale), chimique (oxydation) ou physique (lixiviation) (Barnier, 2009).

Les mécanismes d'origine physico-chimique invoqués pour expliquer cette diminution de l'extractibilité (ou augmentation de la séquestration) sont ceux détaillés dans les paragraphes précédents, à savoir :

• la sorption (dissolution) dans le réseau macromoléculaire de la matière organique (Pignatello, 1998 ; Macleod et Semple, 2003) ; ces interactions sont fortes et peu réversibles.

• la diffusion et le piégeage dans la microporosité des agrégats de sol (Nam et Alexander, 1998) ; les polluants ayant diffusé à l'intérieur des structures microporeuses ne pourraient pas repasser en solution ou le feraient avec des cinétiques de désorption très lentes.

Il est à noter également que l'activité de la microflore semble avoir une certaine influence sur le devenir des PoP et de leurs produits de dégradation, et en particulier sur leur séquestration dans les sols (Macleod et Semple, 2003). Une explication possible serait la possibilité de former des liaisons covalentes entre les produits de dégradation des PoP et la matière organique du sol. L'influence de l'activité microbienne, ainsi que les mécanismes impliqués,

Rapport bibliographique

sont encore controversés et mal connus (Macleod et Semple, 2003). Il est à noter également que d'autres paramètres, tels que la taille des agrégats, le type de molécules mais aussi l'état de saturation hydrique du sol, peuvent intervenir sur la séquestration des PoP (White *et al.*, 1997, 1998 ; Nam *et al.*, 2003a).

Pour résumer. La matière organique est la fraction du sol dans laquelle les PoP sont le plus susceptibles d'être retenus. Les caractéristiques de condensation physique et de réduction chimique de la matière organique semblent favoriser fortement la sorption des PoP. Le vieillissement améliore la séquestration des polluants dans les particules du sol et diminue ainsi leur disponibilité.

Tableau I- 10 : Impact du vieillissement sur la disponibilité du Phénanthrène dans le sol (White *et al.*, 1997)

Temps de vieillissement (jours)	Quantité absorbée par les vers de terre (%) (<i>Eisenia foetida</i>)	Minéralisation bactérienne (%) (<i>Pseudomonas</i>, souche <i>R</i>)
0	3,6	26,5
88	1,5	12,3
155	0,7	6,5

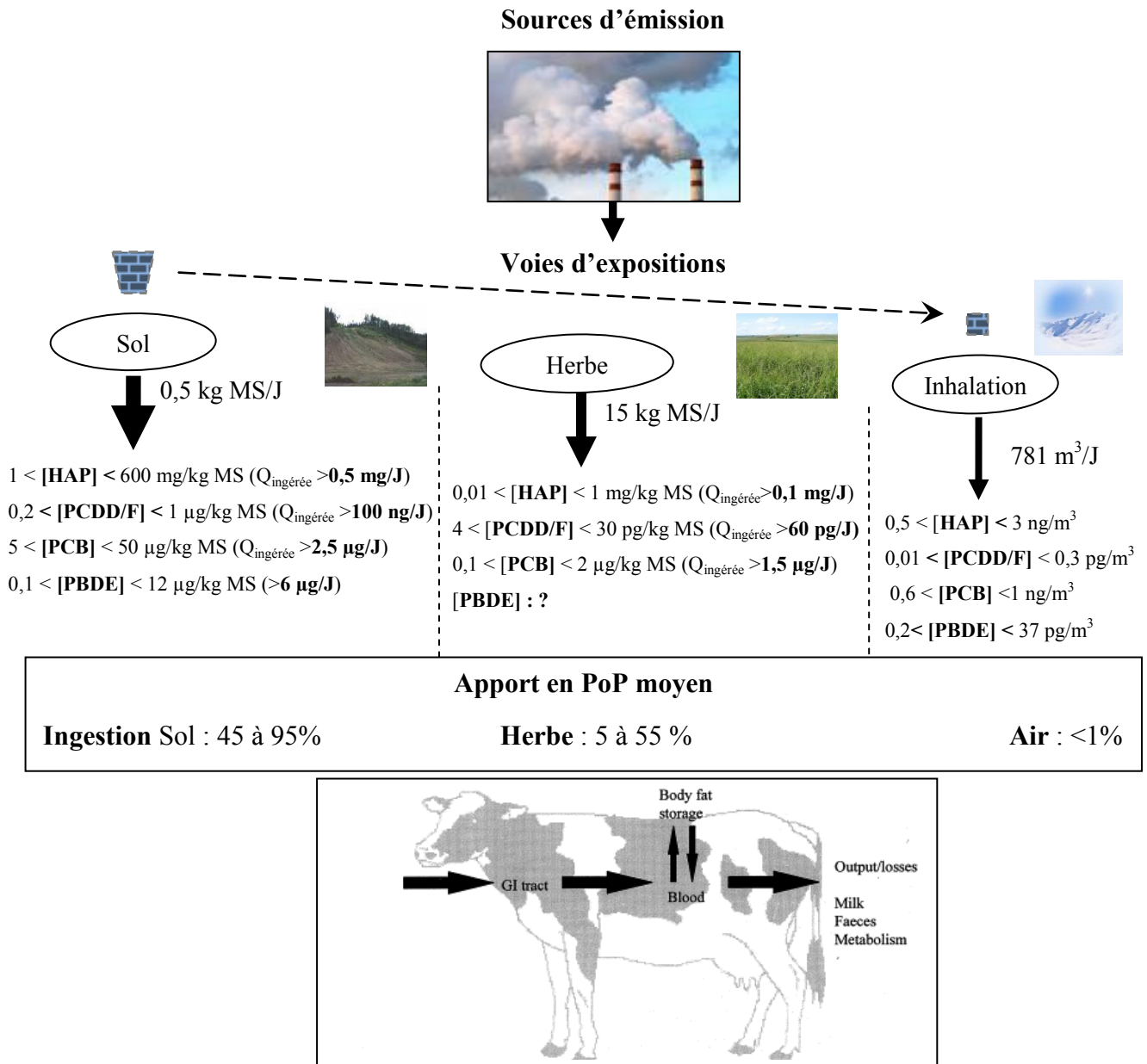
3 Mise en évidence du rôle de la biodisponibilité dans l'évaluation de l'exposition des ruminants laitiers

3.1 Exposition des ruminants laitiers aux PoP du sol

Les animaux élevés en plein air sont directement exposés aux PoP à travers l'ingestion involontaire de sol, d'herbe et de compléments alimentaires (Fries, 1995). En effet, le sol, dans son rôle de « géo-accumulateur » (voir section 1.6 page 34), peut constituer un réservoir naturel de PoP (Dalla Valle *et al.*, 2007). Dans les sols agricoles les concentrations en PoP peuvent atteindre 10 µg/kg (voir section 1.8 page 38). Au pâturage, une vache ingère dans son alimentation, jusqu'à 8% de sol (en matière sèche), ce qui correspond à plusieurs µg de PoP ; cela positionne le sol comme un vecteur d'exposition important aux PoP comparé au fourrage et à l'aliment granulé (Laurent *et al.*, 2005). D'un autre côté, le phénomène de sorption des PoP sur les particules de sol, décrit dans la section 2.4.1, se caractérise par la formation de liaisons hydrophobes voire covalentes (irréversibles) dans certains cas, entraînant ainsi une atténuation de la biodisponibilité des composés et de leur potentiel d'exposition (Gevao *et al.*, 2000 ; Imsilp *et al.*, 2005).

Les données présentées dans le **Schéma I- 1** indiquent que même si les quantités d'herbe consommées par les ruminants sont importantes, celles-ci ne constituent pas le seul vecteur majeur d'entrée de polluants dans l'organisme animal. En effet, considérons le scénario illustré dans le **Schéma I- 1**, où les quantités de PoP apportées par les différents compartiments terrestres de l'environnement sont données pour le sol, l'herbe mais aussi l'air. Les plages de concentrations reflètent des données relevées sur des sites agricoles contaminés, et révèlent l'importance du compartiment sol dans l'ingestion de PoP. Des études de terrain montrent que le sol et l'herbe sont les sources de contamination les plus importantes. Suivent ensuite l'ensilage, les concentrés et autres aliments n'apportant qu'une contribution modeste à cette contamination (Fries, 1985 ; Mc Lachlan, 1997). Les fourrages verts fournissent en effet des surfaces d'adsorption des PoP bien plus importantes que les graines de céréales, constituants majoritaires des concentrés (le phénomène d'absorption plante-PoP est nul).

Pour estimer les quantités de sol ingérées, deux marqueurs sont couramment utilisés : le titane (Ti), mesuré par fluorescence aux rayons X (Healy, 1968 dans Laurent *et al.*, 2005) et l'oxyde de silice (SiO₂), estimé par le dosage des cendres insolubles dans l'acide chlorhydrique (HCl) (Van Keulen et Young, 1977). Les origines de l'ingestion de sol sont multiples ; le sol adhérent aux racines en est toutefois la source prépondérante. Les poussières adsorbées sur les tiges, les feuilles et la couverture végétale, ainsi que les cas de géophagie sont également



Nadal *et al.*, 2004 ; Schuhmacher *et al.*, 2004 ; Hassanin *et al.*, 2004 ; Law *et al.*, 2006 ; Blanchard *et al.*, 2007

Schéma I- 1 : Estimation de la quantité de PoP ingérée ou inhalée (daily intake) par une vache laitière lors d'une contamination diffuse.

des facteurs impliqués dans l'ingestion de sol par les animaux (Mayland *et al.*, 1975). La quantité de PoP ingérée par les animaux d'élevage est conditionnée par la quantité de sol ingérée. Cette ingestion de sol par les animaux est un paramètre extrêmement variable. La quantité ingérée est directement dépendante des conditions environnementales et d'élevage : conditions climatiques (région aride ou pluvieuse), système d'élevage (conduite des animaux, abondance ou non de la végétation, densité d'animaux, complémentation alimentaire).

Fries (1996) considèrent que l'ingestion de sol chez les bovins est comprise entre 2 et 4% de la MS totale ingérée (soit respectivement 400 et 800 g par jour pour une ingestion de 20 kg de MS), et ce au printemps (**Tableau I-11**), lorsque l'abondance de l'herbe limite les prises de sol. L'ingestion de sol est en effet inversement proportionnelle à la disponibilité du fourrage sur les pâturages. Fries (1996) est ainsi parvenu à une estimation de l'ingestion de sol, en prenant compte également des valeurs de digestibilité du fourrage :

$$I_{Sol} = \frac{I_{DM} \cdot (1 - D) \cdot F_{Sol}}{1 - D \cdot F_{Sol}}$$

où I_{Sol} est la quantité ingérée en kg/j, I_{DM} est la quantité de matière sèche ingérée, D est la fraction de matière sèche digérée, et F_{Sol} est la fraction de sol dans les fèces.

Il est évident que le système d'élevage influence le comportement des animaux et par là-même leur ingestion d'herbe et de sol. En Europe la majeure partie de la production laitière (63%) s'effectue selon un modèle fourrager dans des régions herbagères de plaine ou de cultures fourragères avec un accès à la pâture de plusieurs mois (par exemple de 8 à 10 mois en Irlande) (Pflimlin, 2006). Les animaux sont alors exposés par voie directe *via* le pâturage et par voie indirecte *via* les matrices distribuées (l'ensilage herbagé, le foin etc.).

Tandis que, dans le cas extrême du modèle dit industriel (le feed lot californien), la production laitière ne dépend pas du pâturage (système beaucoup plus coûteux, largement développé aux Etats-Unis, (Pflimlin, 2006)) car les animaux sont soumis à la seule exposition *via* les matrices distribuées.

La génétique de l'animal (la race, le poids, le rendement laitier, etc.) peut également moduler l'ingestion d'aliments (augmentant ainsi l'ingestion de sol). Par exemple, une vache de 350 kg et qui produit 5 kg de lait par jour n'aura pas les mêmes besoins énergétiques qu'une vache de 700 kg et qui produit 40 kg de lait par jour (Thomas *et al.*, 1983 in Sweetman *et al.*, 1999).

Pour résumer. L'exposition des ruminants aux PoP se fait essentiellement par voie alimentaire ; la contribution de l'air et de l'eau est mineure. L'ingestion de sol par les ruminants laitiers au pâturage peut contribuer au transfert des PoP vers la chaîne alimentaire terrestre. Cette voie d'exposition est importante pour les bovins, qui ingèrent entre 400 et 800 g de sol/jour. Il est donc indispensable d'évaluer et d'anticiper les répercussions de l'exposition des ruminants laitiers à des environnements pollués (terrains, air). Cette question prend tout son sens lorsque les pâtures sont proches de sources d'émission des polluants.

Tableau I- 11 : Evaluation des quantités de sol ingérées par espèces animales en fonction de la saison (Laurent *et al.*, 2005 ; Jurjanz et Delagarde, 2010)

Espèce	Saison	Quantité moyenne de sol ingérée en g/j	Quantité moyenne de sol ingérée en g/kg Poids Vif	Quantité moyenne de sol ingérée en g/g d'aliment
Mouton	Hiver	60	1,2	0,06
	Printemps	63	1,2	0,06
	Eté	90	1,8	0,09
	1 an	70	1,9	0,063
Bovin laitier	Printemps	310*	0,7	0,022
	Eté	400	0,4	0,019
Bovin laitier	Printemps	< 200*	0,3	0,010

*Différence peut être associée à la méthode de mesure de la quantité de sol ingérée.

3.2 Concept de biodisponibilité orale des PoP du sol

La toxicologie tente de révéler les effets nocifs des xénobiotiques. Elle aborde deux aspects : **la toxicité** et **la toxicocinétique**. La toxicité est la mesure de l'action des xénobiotiques sur l'organisme, dont la relation dose-réponse. La toxicocinétique est l'étude de l'action de l'organisme sur les xénobiotiques, incluant l'Absorption, la Distribution, le Métabolisme et l'Excrétion (A.D.M.E). Pour définir ces processus (A.D.M.E), des modèles physiologiques (modèle PBPK) reposant sur une réalité biologique ont été élaborés. La biodisponibilité est une des composantes de ces modèles. Le terme biodisponibilité est généralement utilisé pour décrire l'intensité et les taux de xénobiotiques qui atteignent la circulation systémique sous la forme native (**Schéma I- 2**) (Hrudey *et al.*, 1995 ; Oomen *et al.*, 2000 ; Van de Wiele, 2005). La biodisponibilité orale des PoP liés au sol est définie comme la résultante de quatre étapes successives, à savoir :

Ingestion

Bioaccessibilité

Absorption

First pass effect

3.2.1 Ingestion

Le transfert des polluants organiques du sol vers les ruminants s'effectue par ingestion involontaire de sol au pâturage ou par les fourrages contaminés (voir section 3.1).

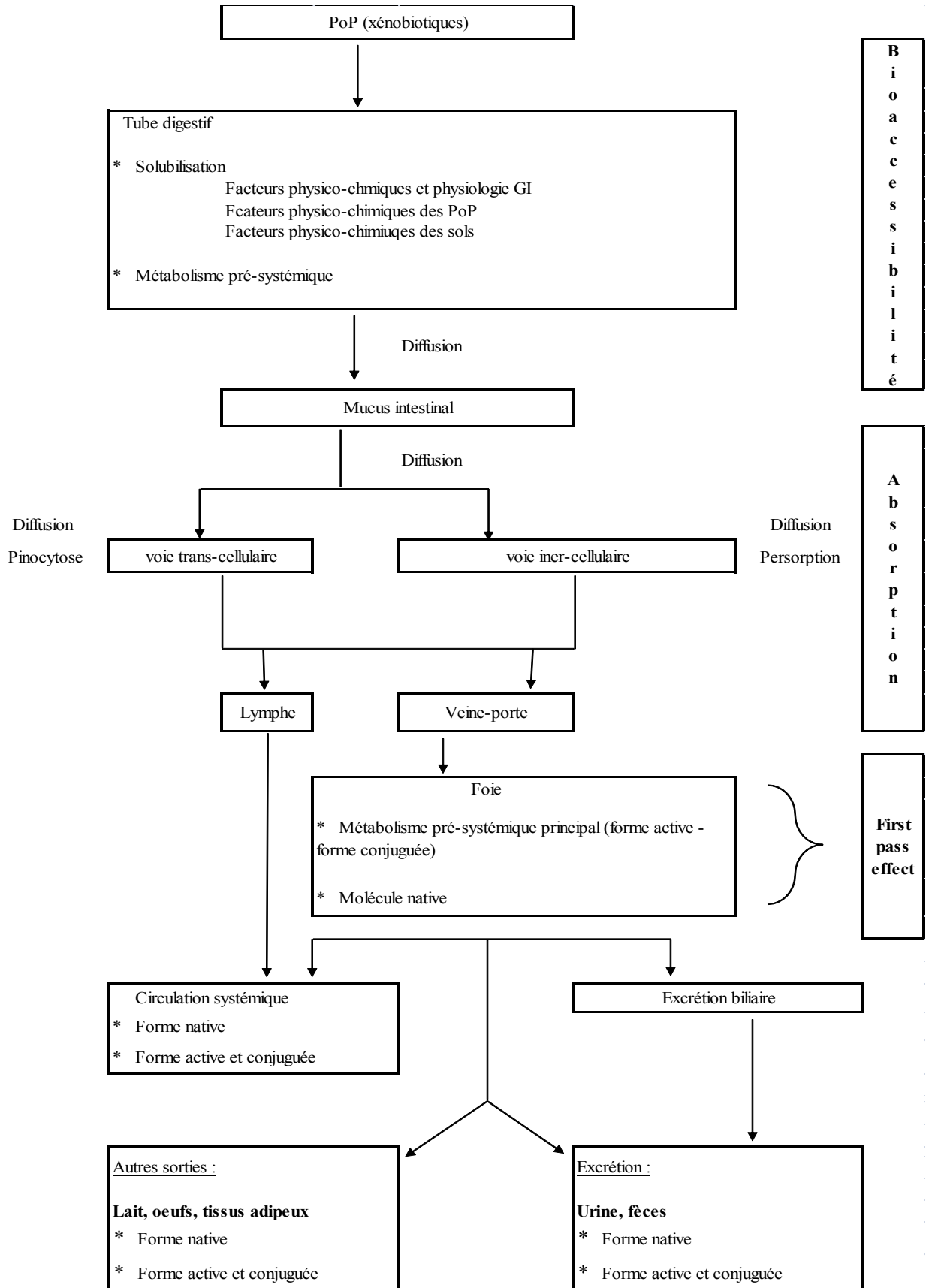
3.2.2 Bioaccessibilité

La bioaccessibilité représente la fraction de contaminant disponible pour l'absorption intestinale. Dans ce contexte la capacité de rétention du sol est une source majeure de variation. Différents facteurs intrinsèques (physiologiques) et extrinsèques (liés aux propriétés du sol) peuvent affecter cette bioaccessibilité. Actuellement, nombreux sont les résultats qui simulent *in vitro* les fluides digestifs et les phénomènes de digestion de l'homme pour mesurer la bioaccessibilité des PoP liés au sol (Dean et Ma, 2007). En revanche, un seul article (Jurjanz et Rychen, 2007) décrypte la spécificité de la digestion *in vitro* des PoP chez les polygastriques.

Les principaux facteurs physiologiques mis en avant pour expliquer l'accessibilité des PoP sont : a) le compartiment de digestion, à savoir l'estomac des monogastriques ou le rumen des polygastriques, b) le ratio Liquide/Solide, c) le temps de transit, d) la présence de

Rapport bibliographique

Schéma I- 2 : Biodisponibilité orale des PoP du sol et le transfert vers les matrices alimentaires (adaptée de Dean, 2004)



Rapport bibliographique

nutriments et de la bile de par son effet surfactant (Hack et Selenka, 1996 ; Oomen *et al.*, 2000 ; Van de Wiele *et al.*, 2004 ; Jurjanz et Rychen, 2007 ; Gron *et al.*, 2007). Il est surprenant de voir que l'action du pH sur la bioaccessibilité des PoP reste controversée. Les retours d'expériences menées par Van de Wiele *et al.* (2004) montrent que les variations du pH n'ont aucune incidence sur la bioaccessibilité des HAP, tandis que Minhas *et al.* (2006) démontrent le contraire. En effet, l'augmentation de la bioaccessibilité des HAP en milieu basique a été associée à l'augmentation de la solubilité de la matière organique du sol.

D'autre part, il ressort des études *in vitro* menées par Van de Wiele *et al.* (2004) et Siciliano *et al.* (2010), que la flore bactérienne du côlon humain n'exerce aucun rôle dans l'accessibilité des HAP. En revanche, une forte biotransformation notamment du Pyrène et du Benzo[a]Pyrène (1-hydroxypyrene et 7-hydroxybenzo[a]pyrene) a été remarquée. La question qui en découle est l'impact possible de la flore bactérienne ruminale (bactéries, protozoaires, champignons) sur la biotransformation des HAP dans le rumen. Cependant, l'étude menée *in vitro* sur l'effet de la flore ruminale anaérobie par Fries *et al.* (1997) n'a révélé aucun impact significatif de la fermentation sur la dégradation des PCDD/F.

D'autres études ont mis en évidence l'effet des aliments et de la bile sur l'augmentation de l'accessibilité des PoP (Holman *et al.*, 2002 ; Tang *et al.*, 2006). Ainsi, la mobilisation des HAP et des PCB a été augmentée d'un facteur 2 à 4. L'augmentation de la bioaccessibilité correspondrait à la solubilisation des PoP dans les micelles formées par les sels biliaries et les composés lipidiques et protéiques issus des aliments.

Parmi les propriétés intrinsèques du sol qui gouvernent la bioaccessibilité des PoP, il apparaît clairement que la teneur en matière organique, et dans une moindre mesure l'argile, sont des facteurs clés dans la mobilisation des PoP du sol vers la solution aqueuse (Luthy *et al.*, 1997 ; Northcott et Jones, 2001 ; Bogan et Sullivan, 2003 ; Huang *et al.*, 2003 ; Roos *et al.*, 2004 ; Tang *et al.*, 2006).

La teneur en matière organique d'un sol est citée comme le principal facteur de variation de l'accessibilité des PoP (Reid *et al.*, 2000). Mais d'autres facteurs, comme la taille des particules et la teneur en argiles, qui présentent une grande surface de contact, ne sont pas négligeables. Ainsi, l'accessibilité *in vitro* des PCB 118 (40 à 63%) et 52 (56 à 79%) (Pu *et al.*, 2006) et celle du Phénanthrène (53 à 89%) (Pu *et al.*, 2004) diminuent avec l'augmentation de la teneur en matière organique et en argiles des sols. Avec un test *in vitro* similaire, Oomen *et al.* (2004) ont montré que l'accessibilité du Benzo[a]Pyrène est environ deux fois plus élevée dans un sol sableux que dans un sol riche en matière organique. Tang *et al.* (2006) ont également démontré le rôle de la matière organique sur l'accessibilité *in vitro*

des HAP ; ainsi, l'accessibilité du Fluoranthène passe de 10 à 0,5% pour des sols contenant 2 et 6% de matière organique respectivement ; quant à celle du Benzo[a]Pyrène, elle passe de 20 à 0%.

Les propriétés du contaminant peuvent également jouer sur sa bioaccessibilité. En effet, plus la molécule est hydrophobe, plus l'adsorption par la matière organique du sol est élevée et moins la molécule est accessible. Ce phénomène a été observé pour des HAP dont l'accessibilité *in vitro* diminue lorsque le nombre de cycles augmente : elle passe ainsi de 70% pour le Fluorène ($\log K_{ow} = 4,18$) à une valeur proche de 0 pour le Benzo[a]Pyrène ($\log K_{ow} = 6,50$) (Tang *et al.*, 2006). De même, Pu *et al.* (2006) ont observé une accessibilité *in vitro* du PCB 118 ($\log K_{ow} = 6,74$) plus faible que celle du PCB 52 ($\log K_{ow} = 6,09$).

La bioaccessibilité *in vitro* des HAP dans le tractus gastro-intestinal a été corrélée au paramètre de solubilité dans l'étude menée par Van de Wiele *et al.* (2004). L'équation générée est la suivante :

$$\%_{\text{bioaccess}} = 0,37 + 0,21 \cdot \log S + 0,067 \cdot \log S^2, \text{ avec } S = \text{solubilité en mg/L.}$$

L'origine de la contamination a été également rapportée dans la littérature comme un élément important régulant la bioaccessibilité des PoP. Ainsi, Gron *et al.* (2007) ont rapporté que les HAP issus de cendres (industrielles) ou de particules (bitume) sont moins accessibles (15 à 20%) que les HAP adsorbés en surface près d'une voie rapide, suite à des dépôts atmosphériques (40%). Dans le même sens, Hack *et al.* (1998) ont démontré que les sols issus de l'industrie gazière et de coke présentaient les plus faibles valeurs de bioaccessibilité *in vitro*.

3.2.3 Absorption

Des investigations ont été menées à travers des modèles de fugacité (f) (1), sur la tendance naturelle des molécules à se distribuer dans le milieu digestif. Ainsi, chaque composé aura tendance à s'accumuler dans un compartiment dont « la constante de fugacité » (Z) est élevée. Minhas *et al.* (2006) ont démontré que lorsque les molécules de HAP sont solubilisées à partir du sol, elles vont essentiellement se diriger vers les membranes biologiques pour être absorbées. En effet, les constantes de fugacité obtenues entre la membrane éthylène vinyle acetate-EVA (qui simule une membrane biologique), le sol et la solution aqueuse sont les suivantes : $Z_{EVA} : Z_{sol} : Z_{Aq} = 7 : 1 : 10^{-5}$. Les molécules de HAP solubilisées auront donc un « potentiel chimique » naturel qui les orientera vers la membrane entérocytaire.

(1) $C = Z * f$

f = fugacité (Pa)

Z = capacité de fugacité (mol/m³Pa). Dépend de la nature du composé, de la nature du médium ou compartiment et de la température (pression et concentration négligeables)

C = concentration (mol/m³)

Rapport bibliographique

La majorité des données animales suggère que le site principal de l'absorption des PoP dans l'intestin se situerait dans la troisième partie finale de l'intestin grêle à savoir sa partie iléon (Ramesh *et al.*, 2004). De par leur hydrophobicité, les PoP emprunteraient la même voie d'absorption que les lipides. En effet, les PoP s'accumulent dans les micelles formées par les sels biliaires, et sont ainsi solubilisés, ce qui favorise leur flux vers les cellules intestinales. Après désorganisation des micelles et relargage des PoP, ceux-ci traversent les entérocytes par diffusion passive. Le mécanisme de transport des PoP à travers les cellules n'est pas complètement connu, mais ce processus est probablement comparable à celui des lipides. Les PoP atteignent alors les flux sanguin et lymphatique en s'associant à des lipoprotéines telles que les « Very Low Density Lipoproteins » (Dulfer *et al.*, 1996). Busbee *et al.* (1985) et Turner *et al.* (1980) ont démontré chez le bovin que les composés très hydrophobes tels que les PCB sont déversés presque exclusivement dans la lymphe.

D'autres auteurs tels que Van de Wiele (2005) soutiennent l'intervention d'un autre mécanisme d'absorption des PoP, à savoir la diffusion para-cellulaire à travers les jonctions intercellulaires serrées qui séparent les entérocytes. Ce type de transport est réservé aux petites molécules hydrophobes qui peuvent migrer facilement entre deux entérocytes par le processus de diffusion.

L'hydrophobicité des PoP est la propriété physico-chimique souvent retenue comme paramètre prédictif d'absorption des PoP chez les ruminants (**Figure I- 12**) (Sweetman *et al.*, 1999 ; Kierkegard *et al.*, 2009). Ainsi, le taux d'absorption digestive dépend essentiellement du log K_{ow} des divers congénères : il est élevé (jusqu'à 80%) pour des log K_{ow} entre 5,5 et 6,5 puis chute brutalement à 40% pour un log $K_{ow} > 8$, les composés trop hydrophobes traversant difficilement les membranes biologiques de la paroi digestive. Par exemple, les congénères tétra- et penta-PCB sont de ce fait beaucoup mieux absorbés que les hepta- et octa-PCB (McLachlan, 1994). En effet, l'absorption intestinale répond au modèle mathématique suivant :

$$\%_{d'absorption} = \frac{1}{1,28 + 2,875 \times 10^{-8} K_{ow}} \times 100$$

Cette caractéristique suggère et confirme que l'absorption des PoP est essentiellement gouvernée par des phénomènes de diffusion passive, et non par un transport actif. Moins une molécule est lipophile, plus son transit entérocytaire et son apparition dans le compartiment sanguin sont rapides.

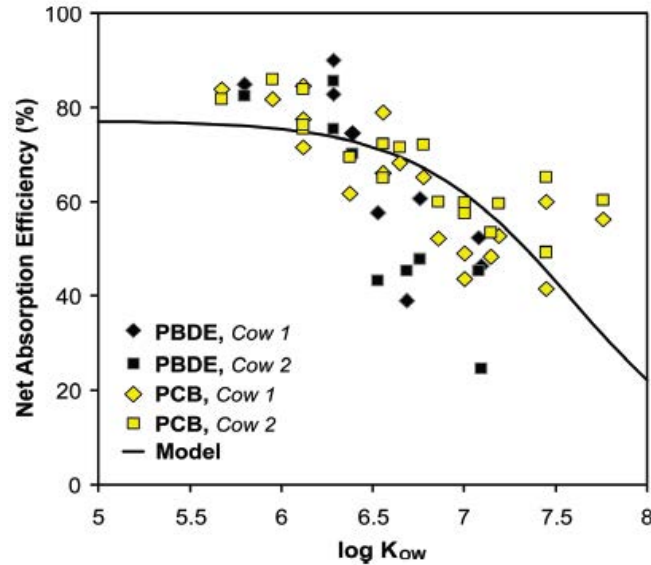


Figure I- 12 : Effet du log K_{ow} sur le taux d'absorption des PCB et des PBDE chez les ruminants (d'après Kierkegaard *et al.*, 2009).

3.2.4 First pass effect (effet du premier passage)

Le processus de métabolisation pré-systémique des contaminants ingérés après absorption orale est connu sous le nom de first pass effect (Klassen, 1986 dans Laurent *et al.*, 2005). La plupart des contaminants organiques qui traversent la barrière intestinale sont soumis à l'activité enzymatique de l'organisme dans le but de le détoxifier. Bien que le foie soit le site principal de cette biotransformation, chaque organe ou tissu dans le corps est capable de réaliser des réactions de biotransformation (Connelly et Ponts, 1988 dans Laurent *et al.*, 2005). La durée de la persistance d'un composé est alors définie comme la demi-vie ($t_{1/2} = \ln 2 / k_e$ avec k_e constante d'élimination en s^{-1}). L'élimination des PCDD/F et PCB chez la vache laitière est beaucoup plus rapide que chez l'homme et la plupart des mammifères ; les demi-vies d'élimination globale sont comprises entre 30 et 60 jours (McLachlan, 1997).

Fondamentalement, le processus de biotransformation dans l'organisme peut être divisé en deux phases (Nebbia, 2001 ; Gibson et Skett, 2002) :

Phase I : Les réactions consistent habituellement dans l'introduction de groupements fonctionnels (- OH, - NH₂, - SH, - COOH), qui rendent les PoP plus faciles à conjuguer avec les substrats endogènes. Plusieurs enzymes sont impliquées dans la catalyse des réactions de la phase I. Les réactions principales de la phase I sont catalysées par les membres de la classe d'enzymes cytochromes P450 (CYP) (Wacher *et al.*, 1995).

Phase II : Les PoP fonctionnalisés subissent des réactions de conjugaison, dans le foie principalement. L'enzyme la plus représentative de cette phase est la glucuronyl-S-transférase. Lors de cette phase, les co-facteurs (groupements hydrophiles) glucoronides et sulfates sont les plus mobilisés. Les molécules conjuguées sont ensuite excrétées dans la bile (circulation entéro-hépatique) et les urines (Dybing *et al.*, 2002).

Dans certains cas comme les HAP, les réactions métaboliques de la phase I convertissent les PoP inactifs en une forme biologiquement active plus toxique (Hakk et Letcher, 2003).

L'activité des enzymes de détoxification peut différer significativement en fonction de la molécule, mais aussi en fonction de l'individu et de l'espèce (Roos *et al.*, 2004 ; Borga *et al.*, 2005). En effet, l'activité des enzymes impliquées dans le métabolisme des PoP comme de tous les autres xénobiotiques, varie d'un individu à l'autre ; ces différences sont surtout contrôlées par des facteurs génétiques. L'expression de ces enzymes peut également varier en fonction de l'environnement, ces enzymes étant fréquemment inductibles et répressibles.

Notons également que chez les mammifères, une large gamme de réactions métaboliques peut être catalysée par une grande diversité d'enzymes microbiennes du côlon ou du rumen. Celles-ci peuvent rivaliser parfois avec le foie dans le nombre de réactions biochimiques et de biotransformations (Macfarlane et Macfarlane, 1997). Ainsi, la flore intestinale et dans une plus large mesure la flore du côlon peuvent également perturber le processus de biotransformation à travers la circulation entéro-hépatique des xénobiotiques. Les composés conjugués, une fois relargués dans le lumen intestinal, peuvent être encore hydrolysés par les enzymes bactériennes telles que les glucuronidases, sulfatases et autres glycosidases. Cela perturberait le cycle de la désintoxication car les molécules pourraient être réabsorbées (Ilett *et al.*, 1990).

Pour résumer. La biodisponibilité des PoP est tributaire d'un certain nombre de mécanismes. En effet, des processus successifs jouent un rôle dans la régulation du passage des molécules vers la circulation systémique. La capacité de rétention des PoP par le sol constitue un paramètre important dans ce transfert car elle déterminera leur bioaccessibilité c'est-à-dire la fraction maximale de PoP potentiellement absorbable.

3.3 Acheminement des PoP biodisponibles vers le lait

Après leur absorption, les PoP se distribuent dans les différents compartiments de l'organisme. La lipophilicité des tissus (adipocytes pour les tissus adipeux et hépatocytes pour

Rapport bibliographique

le foie), la présence de protéines de liaison spécifiques (dans le foie) et les propriétés intrinsèques des molécules, influencent fortement cette distribution (Laurent *et al.*, 2005). En effet, les PoP sont distribués en étant associés à des protéines plasmatiques ou à des lipoprotéines(1) (Noren *et al.*, 1999 ; Hjelmberg *et al.*, 2008). L'étude menée chez le rat par Gallenberg et Vodcnik (1987) a montré que toutes les fractions de lipoprotéines du sang étaient capables de prendre en charge les PCB sans être saturées (avec une contamination non extrême). Les protéines plasmatiques telles que l'albumine et l'hémoglobine sont également susceptibles de jouer le rôle de transporteur chez le bovin (par la formation d'adduits avec les PoP) (Sugihara et James, 2003 ; Wu *et al.*, 2007).

Des transferts de PoP entre les différents transporteurs sanguins est également possible. Les études sur la liaison lipoprotéines/HAP *in vitro* ont permis de mettre en évidence que ces micropolluants possèdent des affinités supérieures aux macromolécules telles que les VLDL. Le Benzo[a]Pyrène se répartirait de la même façon que le 2,3,7,8-TCDD entre les diverses lipoprotéines, principalement au niveau des VLDL puis des LDL et enfin des HDL (Smith et Doody, 1981 dans Laurent *et al.*, 2005). Une autre étude sur les hépatocytes montre que la majeure partie (80%) du PCB 153 se lie aux VLDL (Gallenberg et Vodcnik, 1987). Les protéines plasmiques par contre seraient les transporteurs de certains métabolites des HAP, les lipoprotéines véhiculeraient à long terme des HAP parents, quant aux globules rouges leur contamination par les HAP non métabolisés serait transitoire. Peterson *et al.* (1989) dans Laurent *et al.* (2005) ont également démontré que l'affinité des molécules les moins chlorées est supérieure vis-à-vis des lipoprotéines, tandis que les plus chlorées privilégieraient les liaisons avec les protéines plasmatiques. Pour les HAP, la répartition des molécules dans le compartiment sanguin dépend de la nature des molécules (métabolites ou composés mères). Des études ont montré que les formes métaboliques hydroxylées sont principalement véhiculées par la sérum-albumine. Quant aux formes conjuguées, elles ne se lieraient pas à des transporteurs sanguins (Van Veld *et al.*, 1990).

Après la prise en charge des PoP par les différents constituants du sang, suit une phase de distribution tissulaire par des phénomènes de diffusion passive qui intervient lorsque les PoP sont transportés par les lipoprotéines, tandis que les protéines plasmatiques sont prises en charge par des récepteurs protéiques spécifiques (Laurent *et al.*, 2005). Ainsi, le transfert des PoP se fait préférentiellement vers les tissus adipeux et hépatique. Le foie du fait de sa vascularisation et de la présence de récepteurs protéiques spécifiques de détoxification, constitue le premier compartiment cible dans la distribution tissulaire ; il est secondé par le tissu gras caractérisé par sa teneur en lipides. La répartition des PoP dans l'organisme serait

(1) Différentes catégories de lipoprotéines dont répertoriées, selon leur taille et leur densité :

Les HDL : High Density Lipoprotein

Les LDL : Low Density Lipoprotein

Les VLDL : Very Low Density Lipoprotein

Rapport bibliographique

donc régie d'une part par la capacité tissulaire à dégrader les molécules (rein et foie), propriété souvent à rattacher à la présence des protéines de liaison (protéines de captation). D'autre part, la teneur en lipides des organes est souvent associée au volume de distribution qui se définit comme le volume fictif dans lequel se distribue une quantité de polluants pour être en équilibre avec la concentration plasmatique. En effet, Plant *et al.* (1985) dans Laurent *et al.* (2005) ont montré lors d'étude *in vitro* qu'une augmentation des lipides dans les fibroblastes humains engendre une incorporation cellulaire plus importante de Benzo[a]Pyrène. Il est évident que dans ce contexte les propriétés des molécules et l'état physiologique des animaux vont intervenir également dans la régulation de la distribution et de la répartition des composés. Ainsi, au cours d'une exposition chronique, les PoP suivent une cinétique de transfert en deux étapes :

- 1) La phase de bioaccumulation ou bioconcentration, qui est la phase initiale durant laquelle les tissus surtout adipeux et hépatiques se chargent en polluants ;
- 2) La phase d'équilibre ou de biosaturation, durant laquelle les concentrations des contaminants dans les tissus sont constantes.

Les contaminants qui ne se retrouvent pas dans les compartiments internes et qui ne sont pas biotransformés seront éliminés. La lactation constitue une voie d'élimination majeure des polluants bioaccumulables (PCB par exemple). Au contraire, les polluants biotransformés seront excrétés par voies urinaire et fécale (par exemple, les métabolites de HAP).

La notion de « carry-over rate » a été développée par McLachlan (1993), qui la définit comme la quantité de contaminant excrétée dans le lait, divisée par la quantité de contaminant ingérée par une vache exposée à l'état d'équilibre (c'est-à-dire lorsque les quantités stockées dans les tissus demeurent constantes, l'élimination compensant les quantités absorbées). Les « carry-over rates » (COR) calculés à l'équilibre varient énormément entre congénères de la même famille. Ils passent en moyenne de 5 à 94% pour les PCB et varient entre 2 à 70% pour les PCDD/F, mais ne dépassent pas 0,1 à 1% pour les HAP (on parlera plus de taux de transfert dans ce dernier cas car l'équilibre n'est jamais atteint).

Le COR ne permet pas d'estimer précisément l'impact d'une matrice ingérée sur la biodisponibilité des PoP. En revanche, le COR est assimilé à un facteur de biodisponibilité dans de nombreuses études (Slob *et al.*, 1995, Huwe et Smith, 2005 ; Costera *et al.*, 2009). En effet, il est évident que lorsque les matrices étudiées sont susceptibles d'atténuer la biodisponibilité des PoP, il en résultera un effet sur les niveaux de COR. Le **Tableau I- 12** montre clairement que lorsque la contamination est apportée dans des cendres d'incinérateur adsorption très forte), les COR des PCDD/F et de certains PCB coplanaires sont fortement affectés (COR = 0,7% en moyenne). La différence de COR (biodisponibilité) constatée entre

Rapport bibliographique

Tableau I- 12 : Récapitulatif des « Carry-Over Rates » (%) des PCB et des PCDD/F vers le lait

Polluants introduits dans la matrice	Matrice de référence										
	Aliment (fourrage + concentré ou ensilage)	Aliment (fourrage + concentré ou ensilage)	Foin	Supplément minéral alimentaire contaminé	Foin	Foin contaminé par des cendres d'incinérateur	Cendres d'incinérateur	Aliment (fourrage + concentré ou ensilage)	Aliment (fourrage + concentré ou ensilage)	capsules de bois traité au pentachlorophénol	Aliment (fourrage + concentré ou ensilage)
	Thomas <i>et al.</i> , 1999	Mclachlan, 1993	Kerst <i>et al.</i> , 2004	Huwe <i>et al.</i> , 2005	Costera <i>et al.</i> , 2006	Slub <i>et al.</i> , 1995	Slub <i>et al.</i> , 1995	Lober <i>et al.</i> , 2000	Schuler <i>et al.</i> , 1997	Fries <i>et al.</i> , 2002	Mclachlan et Richter, 1998
2,3,7,8 Tetra CDF				0,3	8	0,8	0,0	9	4		
1,2,3,7,8 Penta CDF				2,3	14	0,5	0,0	18	4		
2,3,4,7,8 penta CDF				23,8	28	12,3	0,8	31			40
1,2,3,4,7,8 Hexa CDF				21,3	22	4,3	0,3	24	10	32,1	24
1,2,3,6,7,8 Hexa CDF				20,6	18	3,6	0,2	27		31,4	18,7
1,2,3,7,8,9 Hexa CDF				17,5	5	0,0	0,1	18			18,9
2,3,4,6,7,8 Hexa CDF				14,0	12	4,2	0,4	15		21,4	
1,2,3,4,6,7,8 Hepta CDF				4,4	4	0,4	0,0	8	2	4,6	3,4
1,2,3,4,7,8,9 Hepta CDF				5,6	4	0,8	0,1	15		7,3	
Octa CDF				0,5	2	0,0	0,0	5	2	0,4	
2,3,7,8 Tetra CDD				3,4	39	15,2	0,7	17	70		38
1,2,3,7,8 Penta CDD				26,9	34	10,4	0,7	25	30	66,5	39
1,2,3,4,7,8 Hexa CDD				20,0	23	5,6	0,3	30	7	31,7	33
1,2,3,6,7,8 Hexa CDD				27,3	22	0,8	0,3	64		34,5	33
1,2,3,7,8,9 Hexa CDD				15,8	14	3,1	0,1	28		25,9	16
1,2,3,4,6,7,8 Hepta CDD				4,8	6	0,8	0,1	11		4,9	3,4
Octa CDD				0,7	3	0,1	0,0	1	0,1	0,9	0,68
PCB 77			2,4		10	1,2	nd				
PCB 81			8,7		26	nd	nd				
PCB 126			40	26,1	55	35,3	nd				
PCB 169			50	37,6	53	31,4	nd				
PCB 105	0		28		90						
PCB 101	5				8						
PCB 114			44		75						
PCB 118	100		33		85						
PCB123			8,9		18						
PCB 28	4				25						
PCB 52	0				11						
PCB 138	74	63			55						
PCB 153	83	78			47						
PCB 156	76		19		78						
PCB 157			24		82						
PCB 167	91		21		52						
PCB 180	67	63			55						
PCB 189			13		66						

nd : non déterminé.

Rapport bibliographique

certaines études chez les bovins a été attribuée à l'origine de la contamination des matrices alimentaires ingérées. En effet, les matrices ingérées au pâturage sont contaminées généralement par des sols ou des particules, par opposition à des matrices alimentaires pures (concentré ou ensilage) contaminées par leurs constituants pendant leur processus de fabrication (Huwe et Smith., 2005).

Les variations des COR inter-congénères sont dues à la biotransformation générale subie par les PoP dans les organismes animaux. En effet, le métabolisme des PoP dépend essentiellement de leurs propriétés structurales (Maervoet *et al.*, 2004 ; De Vos *et al.*, 2005). Par exemple, les PCB ayant un hydrogène en position *para*, tels que les PCB 52 et 101, sont facilement éliminés chez les oiseaux et les mammifères (taux de transfert réduit). Ces molécules sont plus métabolisables que les congénères avec un chlore en position *para*, tels que les PCB 28 et 118. Les molécules à fort niveau de chloration n'ayant pas d'hydrogène en position *ortho/méta*, telles que les PCB 138, 153 et 180, s'accumulent quant à elles dans toutes les espèces animales. En outre, Covaci *et al.* (2002) et Traag *et al.* (2006) ont indiqué que les cinétiques de transfert des PCDD/F et des PCB non-planaires (non-ortho) (PCB 77, 126 et 169) sont identiques chez la volaille. Concernant les PCDD/F, de nombreux auteurs (Fries, 1995 ; Lorber *et al.*, 2000 ; Costera *et al.*, 2006 ; Hoogenboom *et al.*, 2006) ont observé une diminution des taux de transfert dans le lait et l'œuf avec l'augmentation du degré de chloration. Fries *et al.* (2002) ont effectué un bilan massique après 58 jours d'exposition à des PCDD/F (degré élevé en chloration). Les bilans obtenus dépassent même pour certains les 100%. Cette "synthèse" apparente de congénères de PCDD/F peut être attribuée à un phénomène de déchloration.

Le profil des HAP dans le lait est quant à lui expliqué par un fort métabolisme associé à une absorption intestinale préférentielle des molécules à faible poids moléculaire (<5 cycles) (Hietaniemi et Kumpulainen, 1995 ; Grova *et al.*, 2002 ; Cavret *et al.*, 2003, 2005a). Par ailleurs, l'épithélium mammaire peut faire varier, avec la même affinité que l'épithélium intestinal, le passage des molécules vers le lait (Cavret *et al.*, 2005a). Une étude récente sur le lait humain rapporte des conclusions similaires, puisque ce sont les molécules à faible poids moléculaire (naphtalène, acénaphtylène, fluorène) qui sont les plus présentes dans le lait maternel (1 à 6,9 µg/kg MS lait) (Del bubba *et al.*, 2005).

Peu de travaux ont étudié le transfert des PBDE vers les produits animaux. Pirard *et al.* (2007) se sont intéressés au transfert vers l'œuf. Ils ont décrit une cinétique de transfert se caractérisant par une phase d'accumulation, suivie d'une étape de décontamination associée à l'induction du métabolisme enzymatique (fort métabolisme). Dans le cas présent des PBDE,

les voies métaboliques impliquent essentiellement des processus de débromation (Hakk *et al.*, 2009). De la même façon, Kierkegaard *et al.* (2007, 2009) ont réalisé un bilan de transfert des PBDE hautement bromés (tétra- jusqu'au déca-) dans le lait de vache. Les taux de transfert rapportés ont été très bas pour les molécules les plus bromées (<0,2%), tandis qu'ils ont atteint les 20% pour les molécules faiblement bromées. Ces chiffres ont été expliqués par une forte débromation de ces composés, notamment lorsque le brome est en positions méta et ortho. Chez le ruminant, la fermentation ruminale est supposée jouer un effet notable sur la débromation des PBDE (**Figure I- 13**).

Des études portent sur les teneurs en PoP dans les produits animaux (lait, œuf, foie, etc.) (**Annexe I- 6**). Ces résultats ont été souvent obtenus suite à l'ingestion par les animaux de molécules diluées dans de l'huile ou dans des matrices alimentaires contaminées. Le profil des molécules (concentrations) varie en fonction du tissu considéré. Cette capacité de dilution apparente des molécules dans un compartiment tissulaire précis est définie comme le volume de distribution (Benoist, 1999). Ce volume de distribution est tributaire de plusieurs facteurs à savoir : la présence de récepteurs spécifiques, les caractéristiques du polluant, l'irrigation des organes et enfin la physiologie de l'animal. Ainsi, par exemple le PCB 153 est distribué largement dans le tissu gras car il s'agit d'une molécule fortement persistante, contrairement au PCB 126 qui est fortement distribué dans le foie grâce à la présence de récepteurs d'induction de CYP 1A1 et A2. Le tissu gras présente de forts volumes de distribution pour les molécules hautement lipophiles (comme les PCCD/F fortement chlorés, Hepta et Oct-CDD/F). Au contraire, le gras affiche un faible volume de distribution pour les HAP, constat établi à partir des résultats obtenus dans le lait (**Annexe I- 6**).

Pour résumer. Le transfert des PoP vers les produits animaux dépend :

-de leur stabilité métabolique dans les organismes vivants (vis-à-vis des enzymes)

-de leur lipophilicité, due à leur caractère apolaire (un passage facile des PoP par diffusion passive à travers les membranes biologiques).

Soulignons que, pour ces deux paramètres, stabilité et lipophilicité, le nombre et la position des atomes de chlore ou de brome jouent un rôle important ; les comportements des divers congénères dans la chaîne alimentaire peuvent donc être très différents.

Les études de transfert menées jusqu'à présent ne prennent pas en compte l'effet du sol sur le transfert des polluants organiques dans les produits animaux.

Le COR est souvent utilisé comme un moyen de comparer les biodisponibilités orales des PoP halogénés ayant un potentiel d'accumulation élevé tels que les PCB et les PCDD/F. La

valeur de COR obtenue constitue un paramètre stable car obtenue à l'équilibre (i.e. lorsque le taux d'excrétion dans le lait est fixe), et cela indépendamment des autres voies d'élimination comme le métabolisme hépatique.

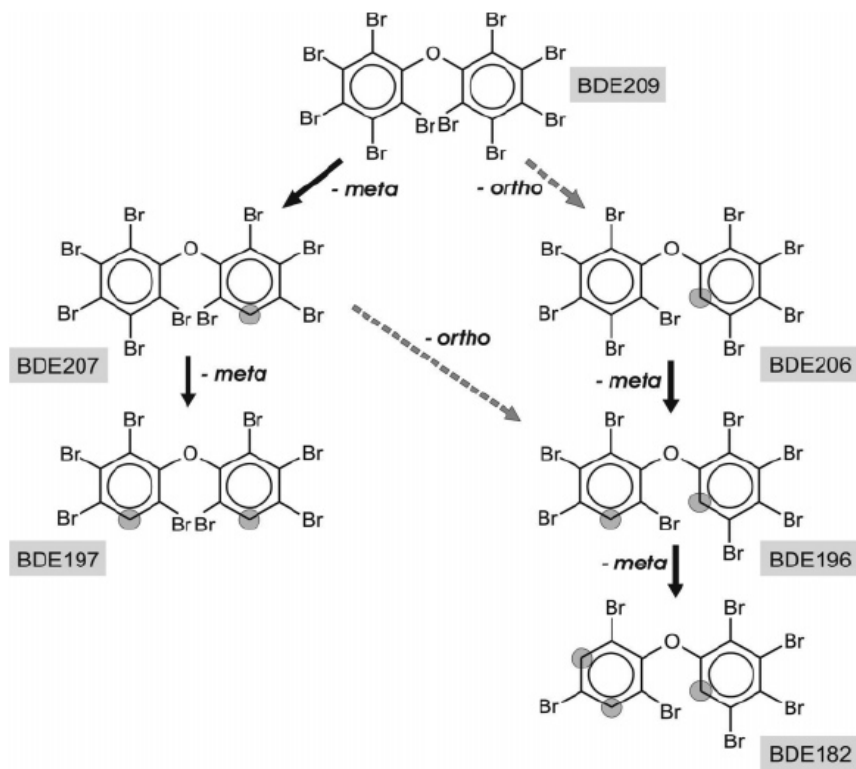


Figure I- 13 : Les voies métaboliques impliquées dans la débromation des BDE 209 et 206 (Kierkegaard *et al.*, 2007).

- **Facteurs physiologiques affectant le « Carry-Over Rate » des PoP vers le lait**

Des études portant sur la modélisation du transfert des polluants vers le lait ont été publiées (par exemple Thomas *et al.*, 1998 ; Sweetman *et al.*, 1999). Elles révèlent que de nombreux facteurs physiologiques peuvent moduler le transfert des polluants vers le lait. Parmi ces facteurs, le poids corporel et les rendements laitiers sont les indices les plus utilisés. En effet, ces deux paramètres agissent directement sur le régime alimentaire des ruminants, en modifiant les niveaux de contaminants ingérés.

Les productions de lait et de matière grasse sont corrélées et sont en perpétuel changement en fonction du poids corporel, mais également au cours du cycle de lactation conduisant à la mobilisation des réserves énergétiques. La **Figure I- 14** illustre une courbe typique de lactation, en montrant l'évolution de la teneur en matière grasse pour une vache de race Holstein (Sweetman *et al.*, 1999). Dès le stade *post-partum*, la production de matière grasse du lait provient de la mobilisation des réserves de graisse accumulées au cours des mois précédents. La contamination des réserves de graisse se répercute alors sur le niveau de contamination du lait. Ainsi, l'état de contamination des réserves en gras joue un rôle certain dans l'augmentation ou la diminution des flux des contaminants dans le lait (**Figure I- 15**).

Les ruminants allaitants présentent un processus lent de renouvellement des lipides (turn-over lent). Cet aspect induit une augmentation de la demi-vie des PoP dans l'organisme. McLachlan (1994) a élaboré un modèle d'estimation de la vitesse d'élimination des composés organiques dans les ruminants laitiers et allaitants présentant une réserve graisseuse de 50 kg. La demi-vie des composés avec un log K_{ow} de 7, passerait de 50 jours pour les vaches laitières avec production de 1 kg MG laitière/j, à 500 jours pour les ruminants allaitants. Il en va de même pour les PCDD/F : des durées d'élimination de 160 à 280 jours ont été calculées chez les ruminants non laitiers. Ces constatations démontrent d'une part l'importance du lait comme voie d'excrétion et d'autre part la contribution des lipides de stockage à la contamination du lait.

3.4 Méthodes de mesure de la biodisponibilité

D'une manière générale, la mesure de la biodisponibilité orale des PoP dérive de l'utilisation de techniques couramment utilisées en pharmacocinétique (Toutain et Bousquet-Melou, 2000).

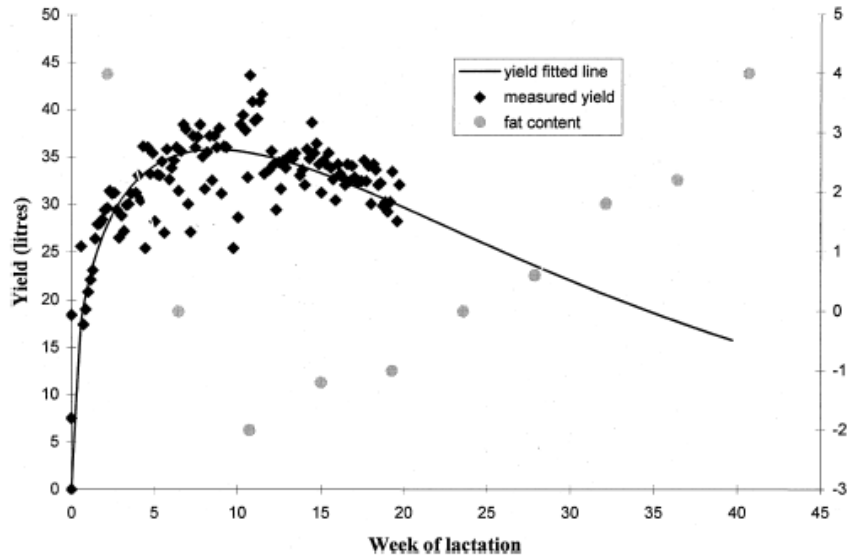


Fig. 2. Volume milk yield and deviation from mean fat content over a typical lactation.

Figure I- 14 : Evolution de la production laitière et de la matière grasse au cours de la lactation (Sweetman *et al.*, 1999).

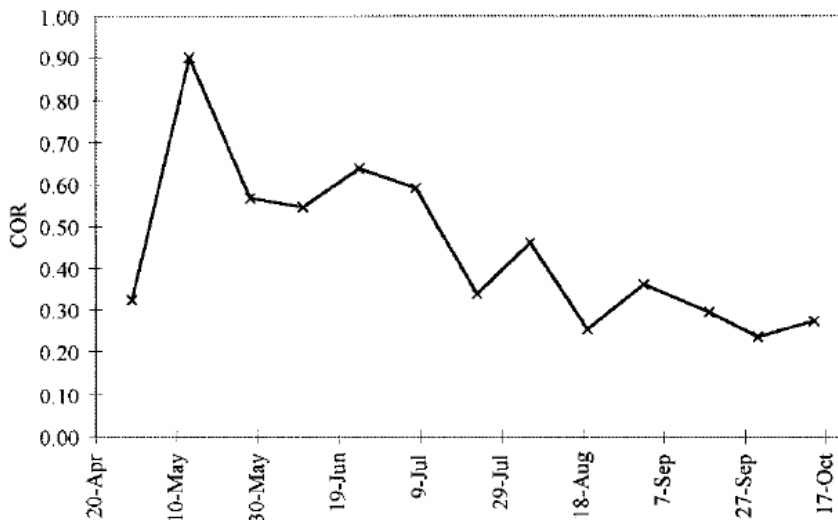


FIGURE 2. Average CORs for the persistent PCBs throughout the growing season.

Figure I- 15 : Evolution des COR de PCB dans le lait en fonction des différentes saisons (Sweetman *et al.*, 1999).

Rapport bibliographique

Il s'agit d'une part de la biodisponibilité absolue, qui rend compte du pourcentage de la dose administrée qui atteint la circulation systémique. Elle est estimée en divisant l'exposition par voie extravasculaire (EV) par celle obtenue par voie intraveineuse (IV) et qui sert de référence (présumée être de 100%).

D'autre part, la biodisponibilité relative se réfère à la comparaison de deux formulations sans faire référence à la voie intraveineuse. Le but d'une mesure de biodisponibilité relative est de comparer deux biodisponibilités l'une par rapport à l'autre, en vue par exemple de mettre en évidence l'effet de la modalité d'administration ou d'ingestion (à jeun ou dans la nourriture par exemple).

D'un point de vue pratique, la biodisponibilité absolue consiste de manière générique à comparer les aires sous les courbes des concentrations plasmatiques (AUC), obtenues sur les premières 72h après une administration par voie IV (100%) et par voie orale (équation 1) :

$$\text{Biodisponibilité Absolue}(\%) = \frac{AUC_{\text{orale}}}{AUC_{\text{ref}}} \times 100 \dots\dots\dots \text{Equation 1}$$

La biodisponibilité relative consiste classiquement à comparer les aires sous les courbes des concentrations plasmatiques (AUC) obtenues sur les premières 72h après une administration par voie orale *via* une matrice testée et une matrice de référence (équation 2) :

$$\text{Biodisponibilité Relative}(\%) = \frac{AUC_{\text{test}}}{AUC_{\text{ref}}} \times 100 \dots\dots\dots \text{Equation 2}$$

Il est évident que l'utilisation directe de ces équations nécessite la prise en compte du métabolisme initial (effet du premier passage) et des cinétiques d'excrétion des composés considérés dans les différentes matrices biologiques étudiées. On doit garder également à l'esprit que l'interprétation d'une biodisponibilité relative peut être sujette à caution si on ignore complètement l'ordre de grandeur de la biodisponibilité absolue de la matrice de référence.

Il découle de ces deux équations plus de 15 équations susceptibles d'être utilisées en pharmacotoxicologie en fonction des propriétés de la molécule, du compartiment étudié, du stade pharmacocinétique, de l'effet du premier passage, de la voie d'administration et de la dose administrée (Toutain et Bousquet-Melou, 2000).

3.5 Biodisponibilité orale des PoP liés au sol

La notion de biodisponibilité orale des PoP liés au sol a été largement étudiée dans l'évaluation du risque d'exposition de l'homme, à travers des études réalisées sur des rongeurs (rat, souris) et sur le cochon (Van Schooten *et al.*, 1997 ; Ruby *et al.*, 2002 ; Gron *et al.*, 2007 ; Wiettsieppe *et al.*, 2007). Le but de ces études a été de déterminer l'impact réel de la matrice sol ou de ses propriétés sur la biodisponibilité des PoP. Cependant, très peu d'études ont été consacrées à l'estimation de la biodisponibilité orale des PoP chez les animaux d'élevage (Fries, 1985 ; Hoogenboom *et al.*, 2006).

Ainsi, la biodisponibilité par voie orale a été la plus étudiée même si d'autres voies d'exposition ont également fait l'objet de travaux : par inhalation (Fouchécourt *et al.*, 1999 ; Billeret *et al.*, 2000) et par contact cutané (Turkall *et al.*, 1988, 1991 ; Kadry *et al.*, 1995).

Parce que les caractéristiques du sol peuvent varier considérablement selon le lieu, une évaluation spécifique au site (sur un sol unique) est généralement préférée pour évaluer le risque sur la santé ou le risque de transfert dans la chaîne alimentaire (Fries, 1985 ; Van Shooten *et al.*, 1997 ; Hoogenboom *et al.*, 2006 ; Wittsiepe *et al.*, 2007).

Même si dans les approches fournies l'expression de la biodisponibilité par la variante relative a été souvent étudiée (voir **Tableau I- 13**), la biodisponibilité absolue a été également rapportée (Fries *et al.*, 1989 ; Pu *et al.* 2004, 2006). L'ingestion orale du ou des sols contaminés est alors confrontée à une injection du ou des polluants mélangés à une solution saline contenant de l'éthanol et de l'huile de ricin (Alkamul®). Cependant, la technique de mesure de la biodisponibilité absolue reste difficile à mettre en place pour des molécules lipophiles. En outre, elle reste une technique qui requiert des coûts importants, ainsi que des tests préliminaires de toxicité (Lappin *et al.*, 2006).

Concernant les études de biodisponibilité relative, elles ont généralement été effectuées avec des composés purs ajoutés aux matrices « sol » et de référence (huile végétale ou solvants organiques de type éthanol). Lorsqu'un sol est issu d'une contamination environnementale, le profil des composés dans la matrice de référence correspond alors en général, aux contaminants majoritaires dans le sol testé (Gron *et al.*, 2007 ; Wiettsieppe *et al.*, 2007 ; Budinsky *et al.*, 2008). L'estimation de la biodisponibilité relative se base alors sur la réduction de l'absorption des polluants (donnée non quantifiable), qui se traduira par la réduction de leur concentration dans le compartiment cible (donnée quantifiable), en comparant à une même dose de contaminant ingérée *via* la matrice de référence et *via* le sol contaminé étudié. De nombreux auteurs ont tenté d'établir une relation entre la

Rapport bibliographique

biodisponibilité orale des PoP liés au sol et les caractéristiques du sol (telles que les teneurs en argile et en carbone organique) mais également la source et l'âge de la contamination (Stroo *et al.*, 2000 ; Hack *et al.*, 2002 ; Pu *et al.*, 2004, 2006).

Jusqu'à présent, aucune relation entre la biodisponibilité des PoP et les paramètres du sol (argile ou carbone organique) n'a été clairement établie. Cela s'explique partiellement par une contamination artificielle du sol, et la trop grande similitude des sols étudiés (Fries et Marrow, 1992 ; Pu *et al.*, 2004, 2006 ; Stroo *et al.*, 2005).

En revanche, une corrélation négative a été rapportée entre l'âge de la contamination du sol et la biodisponibilité orale des HAP (Hack *et al.*, 2002). De même, la biodisponibilité orale de la TCDD diminue à mesure que le temps de contact avec le sol augmente (Poiger et Schlatter, 1980). Les sources de contamination des sols ont été également abordées ; par exemple, Hack *et al.* (2002) ont démontré qu'après contamination du sol par des HAP suite à des retombées humides ou des poussières atmosphériques, les HAP présentent une faible biodisponibilité relative, nettement inférieure à celle des sols contaminés à la suite d'une adsorption en surface sur les particules de sol.

La relation entre la biodisponibilité et les propriétés physico-chimiques des PoP a été discutée dans de nombreuses études (Fries *et al.*, 1989 ; Wittsiepe *et al.*, 2007 ; Finley *et al.*, 2009). La lipophilicité des composés s'avère être corrélée négativement à la biodisponibilité relative des PoP. Ainsi, l'augmentation du degré de chloration des PCDD/F et des PCB et du nombre de cycles des HAP est associée à la diminution de leur biodisponibilité. En effet, l'affinité des PoP pour les particules de sol augmente avec leur lipophilicité.

En fonction des molécules considérées, le compartiment cible étudié n'est pas le même. En effet, le sang, les urines, les fèces et les tissus de stockage comme le gras et le foie sont autant de compartiments cibles utilisés dans le calcul de la biodisponibilité. Ainsi, pour les molécules faiblement biotransformées comme les dioxines mais également les PCB, la biodisponibilité est assimilée à la fraction ingérée accumulée dans le foie ou/et les tissus gras de rats ou de porcelets (**Tableau I- 13**). Concernant les molécules fortement biotransformées comme les HAP, la quantification s'établit à partir de l'excrétion urinaire ou rénale des métabolites issus de la biotransformation. La biodisponibilité du polluant considéré est alors associée à la fraction quantitative (concentration du polluant) ou enzymatique (activité Ethoxyrésoufurine-*0*-dééthylase (EROD) ou Methoxyrésoufurine-*0*-dééthylase (MEROD)) rapportée à la dose ingérée.

L'utilisation des fèces comme compartiment cible pour l'estimation de la biodisponibilité des HAP a été vivement critiquée car la mesure de biodisponibilité est fortement biaisée par le

Rapport bibliographique

métabolisme gastro-intestinal issu de l'activité enzymatique intestinale (au niveau des cellules entérocytaires) ; elle est également biaisée à cause de la circulation entéro-hépatique importante des métabolites, notamment des métabolites de HAP les plus lourds comme les Benzo[a]Pyrène (Gron *et al.*, 2007). L'utilisation du sang comme compartiment cible reste limitée par la contrainte analytique et la forte variation de la teneur en PoP dans le temps et de l'état physiologique de l'animal.

Lutz et Dedrick (1987), cités par Abbes (2010), ont effectué un suivi des résidus mono-, di-, penta- et hexa-ChloroBiphenyles chez de nombreuses espèces : souris, rat, chien, singe. Les résultats de ces mesures indiquent que ces composés sont localisés selon l'ordre suivant : gras > peau > foie > muscle > sang. Les métabolites, quant à eux, sont principalement localisés dans le foie.

La comparaison des biodisponibilités relatives obtenues à partir de réponses enzymatiques (biologiques) semble impossible à établir entre espèces. En effet, les données exprimées par des activités enzymatiques sont organe-espèce-dépendantes : l'activité EROD par exemple chez le rat est dominée par une activité hépatique alors que l'activité EROD au niveau du duodénum est équivalente à celle dans le foie chez le porcelet (Roos *et al.*, 2004). En effet, Budinsky *et al.* (2008) ont démontré que sur deux sols contaminés la biodisponibilité relative des PCDD/F chez les porcelets est respectivement de 37 et 66%, alors que chez le rat, la biodisponibilité relative est respectivement de 23 et 27%. Ces notions enzymatiques deviennent encore plus complexes à interpréter lorsque le sol utilisé présente une contamination environnementale souvent multiple. En effet, les molécules les plus toxiques ont une prise en charge métabolique qui masque la réponse des congénères présents dans le mélange.

La corrélation entre inductions enzymatiques et quantités excrétées et/ou stockées semble un bon compromis dans l'estimation de la biodisponibilité relative des PoP (Budinsky *et al.*, 2008, Finley *et al.*, 2009). Finley *et al.* (2009) ont ainsi démontré que les biodisponibilités relatives de PCDD/F de cinq sols, variant entre 17 et 51%, présentaient une bonne corrélation avec les activités EROD retrouvées dans le foie (elles viennent renforcer les données quantitatives retrouvées dans l'organisme).

Il est clair que le choix de la matrice de référence dans le cas d'une estimation de la biodisponibilité relative, se révèle être un paramètre déterminant. Etant donné la lipophilicité des polluants organiques, l'utilisation d'une huile végétale comme matrice de référence semble un choix judicieux. Les PoP sont fortement co-absorbés avec les produits lipidiques qui facilitent leur pénétration à travers la barrière intestinale (Ramesh *et al.*, 2004). Par

exemple, Busbee *et al.* (1990) ont démontré que le Benzo[a]Pyrène chez le mouton est absorbé *via* des chylomicrons (formés avec des aliments lipidiques) et atteint ainsi la circulation systémique *via* le flux lymphatique. Egalement, Laurent *et al.* (2001) ont démontré chez le porcelet qu'il existe une relation entre l'absorption des HAP et les lipides absorbés. Les animaux ont été alimentés avec du lait contaminé au ¹⁴C-Phénanthrène et ¹⁴C-Benzo[a]Pyrène, la cinétique plasmatique retrouvée était maximale entre 5 et 6 heures après ingestion, ce qui correspondait à la période d'absorption maximale des lipides. De la même manière, les PCB les plus fortement absorbés contournent le first pass effect en entrant directement dans le flux lymphatique (Busbee *et al.*, 1985).

Outre le choix de la matrice de référence, le choix de la technique d'administration (ingestion) et de la dose ingérée semble être très important à considérer. En effet, Shu *et al.* (1988) ont démontré qu'en fonction des conditions expérimentales utilisées (dose, temps d'administration), la part de TCDD retrouvée dans le foie passe de 37 à 56 %. Longtemps le gavage direct des animaux a été utilisé dans ce type d'étude (Van Schooten *et al.*, 1997 ; Pu *et al.*, 2004, 2006). Même si l'huile paraît une matrice de référence adaptée, le gavage direct des animaux se traduit généralement par des troubles intestinaux (type diarrhées), des refus d'ingestion et par conséquent une sous-estimation potentielle de la biodisponibilité due à une accélération du transit intestinal (Pu *et al.*, 2004, 2006). A ces inconvénients viennent s'ajouter la forte variabilité des résultats inter-individus (coefficient de variation >20%).

Plus récemment, des formulations alimentaires contenant des matrices contaminées ont été utilisées pour estimer la biodisponibilité relative (Budinsky *et al.*, 2008). La biodisponibilité peut être évaluée après une prise unique ou bien après des prises itératives (chroniques). Toutefois, l'administration chronique représente des conditions plus proches des circonstances environnementales retrouvées et en outre, les concentrations plasmatiques sont habituellement plus élevées que celles observées après une administration unique, ce qui facilite l'analyse des données.

Pour résumer. Différentes études ont déjà été élaborées pour estimer ponctuellement la biodisponibilité orale des PoP. Cependant, il apparaît que la mise en place in vivo de méthodes de mesures de la biodisponibilité est difficile. L'estimation de la biodisponibilité a été souvent déterminée par sa composante relative et cette méthode paraît la plus adaptée pour déterminer l'influence du sol sur l'absorption (donnée non quantifiable) des PoP tout en tenant compte de la spécificité intrinsèque de chaque famille de molécules (métabolisme, stéréochimie, etc.).

Rapport bibliographique

Tableau I- 13 : Principales études *in vivo* déterminant la biodisponibilité orale des PoP liés au sol

Modèle <i>in vivo</i>	Compartiment(s) cible(s)	Molécule mère	Molécule fille	Type de contamination	Nombre de sols	Méthode utilisée	Durée d'exposition	BR	BA	Référence
Rat	Sang	Phénanthrène	3-OH Phe	Artificielle	4	Excrétion (AUC)	Dose unique	61 à 70%	53 à 67%	Pu <i>et al.</i> , 2004
Souris	Excrétion rénale	Benzo[a]pyrène	3-OH BaP	Environnementale	3	Excrétion (urine)	28 jours	6-50%		Hack <i>et al.</i> , 2002
Porcelet	Excrétion rénale	Benzo[a]pyrène	3-OH BaP	Artificielle	4	Excrétion (urine)	28 jours	36-55%		Hack <i>et al.</i> , 2002
Rat	Tissus gras Foie	PCDD/F		Environnementale	2	Stockage	30 jours	37 à 66%		Budinsky <i>et al.</i> , 2008
Porcelet	Tissus gras Foie	PCDD/F		Environnementale	2	Stockage	30 jours	23 à 27%		Budinsky <i>et al.</i> , 2008
Rat	Tissus gras Foie	PCDD/F		Environnementale	5	Stockage	Dose unique	17 à 50%		Finley <i>et al.</i> , 2009
Rat	Tissus gras Urine	¹⁴ C-PCB 18 ¹⁴ C-PCB 52 ¹⁴ C-PCB 101		Environnementale	1	Stockage Excrétion	5 jours	nd 84% 82%	82% 79% 67%	Fries <i>et al.</i> , 1989
Rat	Sang	PCB 118 PCB 52		Artificielle	5	Excrétion (AUC)	Dose unique	87 à 99% nd	61 à 70% 53 à 67%	Pu <i>et al.</i> , 2006

4. Conclusion de l'approche bibliographique

L'ingestion du sol par les animaux d'élevage peut contribuer à un fort transfert de PoP vers les produits animaux. La quantification du transfert par cette voie d'exposition est cependant mal renseignée. L'estimation de la biodisponibilité orale des PoP permet d'évaluer l'impact de la matrice sol sur la part de polluants atteignant l'organisme.

L'examen de la littérature relative à la biodisponibilité des PoP suite à l'ingestion de sol amène aux constats suivants : les études visant à déterminer la biodisponibilité des PoP du sol sont peu nombreuses et essentiellement focalisées sur les modèles rat ou souris. Les animaux d'élevage ont été jusqu'à présent peu concernés par les investigations menées dans ce domaine. De plus, les résultats de biodisponibilité sont parfois incertains et les possibilités de généralisation hasardeuses : en effet, les valeurs de biodisponibilité actuellement disponibles sont obtenues à partir d'approches très différentes, selon la voie d'exposition, la dose administrée, le compartiment cible étudié, ou encore le choix du modèle animal. Par conséquent, la comparaison inter-études *in vivo* n'est pas aisée à établir. La mesure directe de la biodisponibilité orale reste difficile, et son assimilation à une simple notion d'excrétion ou de transfert (approches directes) ou bien à une simple notion d'activité enzymatique (approches indirectes), demeure discutable.

Les estimations de biodisponibilité orale proposées par les différents auteurs sont en moyenne du même ordre de grandeur, à savoir 50% ; cependant, elles varient d'un facteur de 2, selon les types d'expérimentation (durée et modalités d'exposition, modèle animal, type de sol). De plus, ces études ne prennent pas toujours en compte les paramètres affectant les interactions entre les particules du sol et les PoP, comme le temps de maturation et la source de contamination.

Au cours de ce travail de thèse, nous appréhendons par différentes approches l'impact du sol sur la biodisponibilité des PoP du sol, afin d'améliorer l'estimation du transfert des PoP vers les ruminants laitiers.

La première étape de nos travaux (chapitres II et III) consiste à mettre en place des protocoles expérimentaux en milieu contrôlé. Il s'agit de deux expérimentations dont les résultats ont fait l'objet de publications. La première expérience vise à étudier le devenir des PCB et des PBDE chez les chèvres en lactation suite à l'ingestion chronique d'un sol multi-contaminé. Son objectif premier est de déterminer l'effet du sol sur la biodisponibilité de ces composés en se basant sur les COR calculés à l'équilibre. En second plan, cette étude doit nous permettre de

Conclusion de l'approche bibliographique

caractériser le devenir des PBDE ainsi que des PCB en déterminant les paramètres cinétiques de transfert et de bioaccumulation de ces deux familles de molécules. La seconde étude concerne la validation d'une méthode *in vivo* d'estimation de la biodisponibilité relative des HAP du sol chez les ruminants laitiers. Cette expérience a pour but de quantifier de façon précise l'impact du sol sur la biodisponibilité des HAP.

La dernière étape de la thèse (chapitre IV) consiste en une méthodologie de récolte de données quantitatives axées sur la bioaccessibilité *in vitro* des HAP liés au sol. Le but de cette recherche est de caractériser l'influence des propriétés du sol (essentiellement la matière organique) sur la bioaccessibilité des HAP.

La structure des études menées dans le cadre de cette thèse est résumée comme suit :

- Etude du transfert des PCB et des PBDE du sol vers le lait chez la chèvre en lactation,
- Etude de la biodisponibilité relative des HAP liés au sol chez la chèvre en lactation,
- Création, à partir d'une méta-analyse, d'un modèle faisant intervenir les principaux paramètres qui agissent sur la bioaccessibilité des HAP.

Ces travaux permettront de fournir des données utilisables pour quantifier le transfert des PoP du sol vers le ruminant. A long terme, ils visent à la sécurisation des systèmes de production dans une optique de développement durable des systèmes d'élevage.

5. Organisation générale des travaux de thèse

La biodisponibilité des PoP du sol chez les animaux d'élevage est exprimée de différentes façons. Elle est souvent assimilée à une quantité excrétée ou accumulée. Les coefficients de transfert vers le lait ou les facteurs de bioaccumulation dans les tissus ont été mis à contribution pour déterminer l'effet de diverses matrices alimentaires sur la biodisponibilité des PCB et PCDD/F chez les ruminants laitiers. Dans ce cas les mesures de biodisponibilité sont tributaires du potentiel des molécules à être bioaccumulées. C'est suite à ce constat que nous déciderons, dans le premier volet de nos travaux, d'évaluer l'impact du sol sur la biodisponibilité des PCB à travers la notion de « Carry-Over Rate » (COR) vers le lait. Cette approche est assimilée à une notion d'absorption minimale. L'intérêt porté aux COR est justifié par les conclusions actuelles qui indiquent que les matrices alimentaires telles que le fourrage, l'ensilage et le concentré ont un faible impact sur la biodisponibilité des PCB et des PCDD/F (COR de 20 à 50% dans le lait), tandis que la suie d'incinérateur, par exemple, réduit de façon drastique la biodisponibilité des PCB et des PCDD/F (COR de 0,5% dans le lait). Cette démarche reste pertinente dans la mesure où les molécules de PCB étudiées présentent de forts niveaux de transfert vers le lait.

Le deuxième volet de nos expériences concernera les HAP, une famille de polluants fortement biotransformés pour lesquels nous avons appliqué une stratégie différente et plus précise que celle précédemment évoquée. La méthode de comparaison (relative), de deux biodisponibilités, l'une obtenue avec le sol et l'autre avec une matrice de référence, sera mise en œuvre. La biodisponibilité des HAP sera assimilée à la pente de la droite de corrélation obtenue entre les doses ingérées et les quantités de métabolites excrétées dans les urines. L'intérêt de cette investigation est de préciser la biodisponibilité des HAP du sol.

Il est important de noter que dans l'ensemble des investigations menées *in vivo*, la biodisponibilité est assimilée à une réponse quantitative et globale de l'organisme. Ces mesures sont moins tributaires des facteurs biologiques contrairement aux approches qualitatives de type activité enzymatique.

La dernière partie de ce travail de thèse sera consacrées à une méta-analyse sur le rôle des propriétés du sol dans la bioaccessibilité *in vitro* des PoP. Cette démarche permettra de mieux cerner les fractions du sol qui agissent sur les phénomènes de désorption des PoP. Elle contribuera également à mieux comprendre et positionner les résultats obtenus dans les études *in vivo* et qui ne mettent en jeu qu'un sol unique.

Ainsi, la question de la biodisponibilité des PoP chez le ruminant laitier sera abordée sous trois angles différents (**Figure I- 16**). Ce trépied construit à partir de méthodes d'investigations différentes permet de mieux définir la place du sol dans l'évaluation transfert des PoP chez le ruminant. La complémentarité des approches mises en œuvre sera discutée dans le chapitre V de discussion générale.

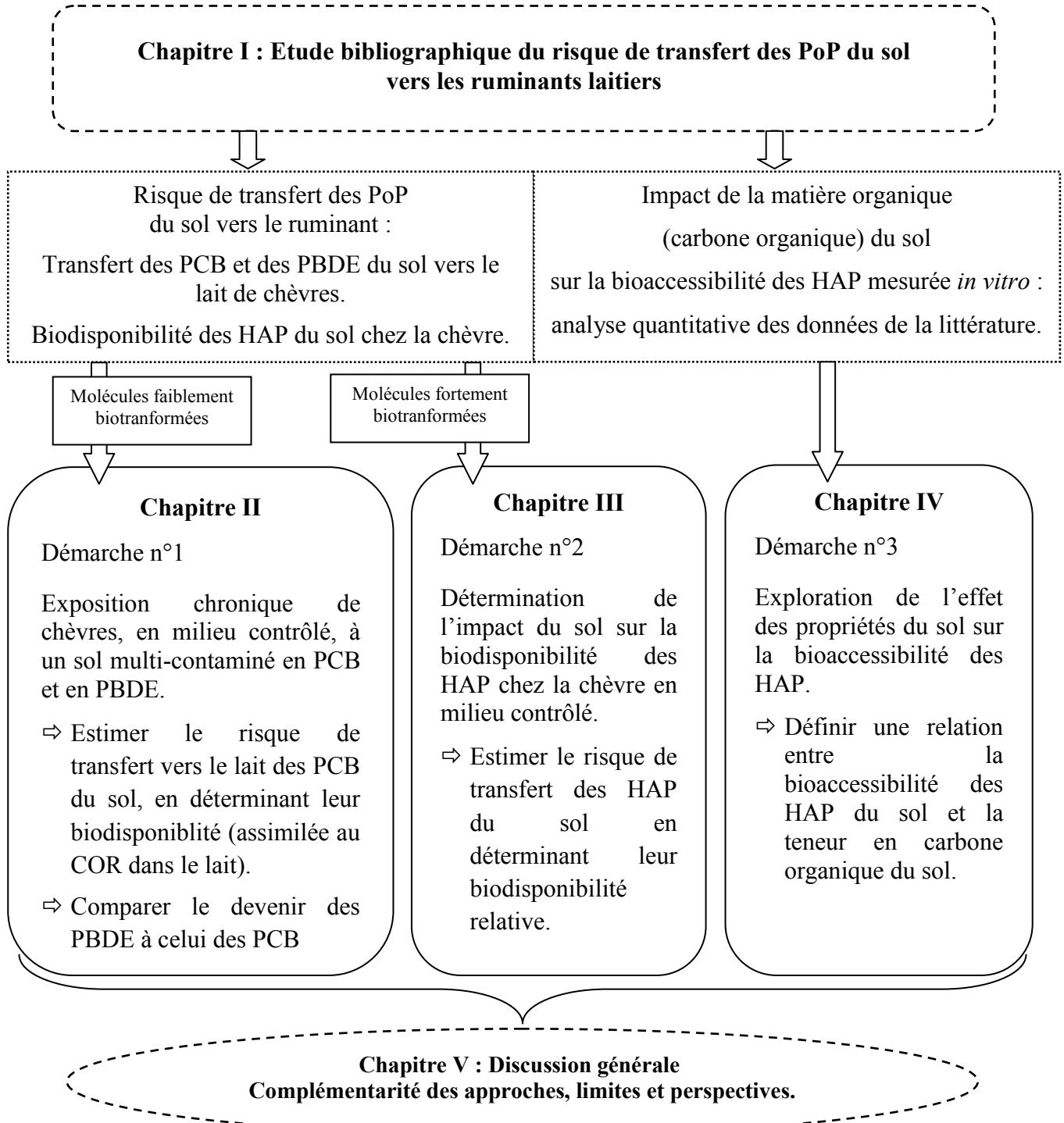


Figure I- 16 : Organisation structurelle des travaux de la thèse

CHAPITRE II

Chapitre II : Etude du transfert des PolyChloroBiphényles et des PolyBromoDiphénylEthers du sol vers le lait de chèvre

1 Introduction

Les résultats d'expériences menées sur les PCB et les PCDD/F chez le ruminant laitier montrent un intérêt particulier pour l'impact des matrices alimentaires telles que le fourrage, l'ensilage et le concentré, sur la biodisponibilité des contaminants. Ainsi, ces études ont montré que le transfert des PCDD/F et des PCB à partir d'une alimentation quotidienne pouvait être élevé (COR de PCB dans le lait allant jusqu'à 80%) (Thomas *et al.*, 1999 ; Malisch *et al.*, 2000 ; Kerst *et al.*, 2004). Une seule étude, menée par Slob *et al.* (1995) sur l'estimation de l'impact des particules de suie sur la biodisponibilité orale des PCDD/F et de quelques PCB coplanaires (PCB 77, 126 et 169), a été réalisée chez le ruminant laitier. Les résultats ont montré que la biodisponibilité des PCDD/F et des PCB était fortement réduite lorsque ces composés étaient ingérés directement avec des cendres d'incinérateur « fly ashes » (le transfert a chuté à 0,5% en moyenne dans le lait) tandis que le fourrage contaminé avec ces mêmes poussières de cendres fournirait une meilleure biodisponibilité (COR de 7% en moyenne retrouvés dans le lait).

Il apparaît à travers ces recherches qu'un manque d'informations subsiste sur le rôle du sol dans la réduction potentielle de la biodisponibilité des éléments halogénés comme les PCB chez les ruminants laitiers. Pour répondre à cette question en suspens, une expérience en milieu contrôlé a été réalisée durant 80 jours avec des chèvres en lactation. Elle repose sur l'administration quotidienne d'aliment contenant du sol contaminé. Il s'agit d'un sol de prairie avec une contamination environnementale connue en PCB. Deux molécules modèles et ubiquistes de PBDE (47 et 99) ont été rajoutées au sol afin d'obtenir une contamination multiple (PCB et PBDE). Après une période de maturation de 40 jours, ce sol a été par la suite intégré dans une formulation alimentaire pour chèvres en lactation.

Le but de cette exposition chronique est d'atteindre l'équilibre afin de calculer les coefficients de biotransfert ; il s'agira par la suite :

- 1) d'évaluer l'impact du sol sur la biodisponibilité des PCB chez les ruminants en lactation à travers l'estimation des niveaux de COR,
- 2) de définir le devenir des PBDE chez les ruminants en lactation en décrivant la cinétique de contamination du lait et d'accumulation dans les tissus biologiques après ingestion orale. Les données sur le devenir chez le ruminant de ce groupe de polluants bromés sont rares (deux

publications seulement, trouvées sur le moteur de recherche Scopus : Kierkegaard *et al.*, 2007, 2009).

Ce chapitre de thèse a fait l'objet d'une publication dans le journal « Environmental Science and Technology » :

Unnas, F., Feidt, C., Toussaint, H., Marchand, P., Le Bizec, B., Rychen, G., Jurjanz, S.

Polychlorinated Biphenyl and Low Polybrominated Diphenyl Ether Transfer to Milk in Lactating Goats Chronically Exposed to Contaminated Soil. *Envi. Sci. Tech.* 44 (2010), 2682-2688.

2 Matériels et Méthodes

2.1 Préparation du sol expérimental

Vingt kilogrammes de sol d'une prairie permanente ont été prélevés en surface à l'horizon H0. Ce site, localisé au nord-est de la France, a été choisi suite à une alerte sanitaire concernant des concentrations élevées en PCB dans le lait de l'ordre de 30 ng/g MG (données LABERCA). Le sol historiquement contaminé issu de cette zone a été précédemment contrôlé et il a présenté des niveaux de contamination s'élevant jusqu'à 20 ng/g de sol brut. La source de contamination de ce sol serait une mixture lourde de PCB caractérisée par la prévalence des congénères penta/hexa-chlorés (comme dans le mélange Aroclor 1254) (Thomas *et al.*, 1999).

Le sol collecté (1,6% carbone organique, 14% argile, 18% limons, 68% sable ; pH 8,1 ; 95% Matière Sèche) a été séché à température ambiante (18-20°C) pendant deux semaines, puis broyé (BB100-rostoffrei, Kurt Retsch GmbH & Co. KG, Haan, Germany) avant d'être tamisé à 2 mm, homogénéisé et stocké dans un container teinté. Il a été ensuite contaminé de façon artificielle, par des PBDE (multi-contamination). Cette technique de contamination artificielle du sol tient compte d'une période de maturation minimale de 40 jours (White *et al.*, 1997, 1998 ; Frederiksen *et al.*, 2009).

Lors de cette étude, le sol a été enrichi avec deux molécules : le tétra-BDE (BDE 47-33670, Oekanal[®], 50 µg/mL in isoctane) et le penta-BDE (BDE 99-33676, Oekanal[®], 50 µg/mL in isoctane). Le choix de ces deux composés de PBDE a été établi sur la base de leur persistance, de leur toxicité et de leur concentration dans les sols agricoles (Frame *et al.*, 1996 ; Law *et al.*, 2006). De plus, ces congénères sont considérés comme les composés majoritaires du mélange commercial penta-BDE (Bromkal-70[®]).

Le but est d'atteindre des concentrations de 1,5 et 3 ng/g de sol pour le BDE 47 et le BDE 99 respectivement. La description de la méthode de contamination avec un test d'homogénéité sera être abordée ultérieurement (voir description dans la section 2.2. chapitre III page 108).

2.2 Préparation de l'aliment contaminé

Une formulation alimentaire composée de maïs, de tourteau de soja et de farine de luzerne a été établie afin de couvrir l'ensemble des besoins nutritionnels de chèvres en lactation (INRA, 2007). La contribution du sol dans cette formulation a été fixée à 5%. La quantité de sol intégrée dans cette farine est comprise dans un intervalle moyen d'ingestion involontaire par une vache en pâture, estimée à 0,8g/kg de poids vif par jour (Laurent *et al.*, 2005). La farine obtenue est par la suite transformée en granulés pour faciliter l'ingestion par les animaux.

2.3 Conditions expérimentales d'élevage des chèvres en lactation

Trois chèvres multipares de race Alpine chamoisée ont été choisies pour leurs performances zootechniques similaires (*Capra hircus*, 65 ± 7 kg poids vif, animaux multipares, second mois post-partum, rendement laitier de 4 L/j). Elles proviennent du site expérimental de la Bouzule. Elles ont été contaminées dans des boxes individuels, situés dans les locaux de l'animalerie à l'ENSAIA.

Le protocole animal est conforme à la directive européenne No. 1986/609/CEE régissant le bien-être animal. Pendant toute la période expérimentale s'étendant des jours j 0 à j 80, la même ration journalière a été distribuée à chacune des chèvres. Il s'agit de 1 kg de foin, de 2 kg de concentré complet non contaminé et de 1 kg de concentré contaminé afin de couvrir l'ensemble des besoins nutritionnels nécessaires à la production de 4 L de lait par jour.

L'eau et une pierre à sel ont été disponibles à volonté. Les animaux ont bénéficié d'une durée d'adaptation de deux semaines à ces nouvelles conditions d'élevage avant le début de l'exposition aux contaminants.

2.4 Exposition des animaux aux PCB et PBDE

Durant la période d'adaptation, le lait témoin a été collecté avec un pas de temps de cinq jours. Après cela, toutes les chèvres ont été exposées à l'aliment contaminé. Ainsi, chaque chèvre s'est vue administrer 1 kg d'aliment contaminé contenant 5% de sol durant 80 jours.

Chapitre II

Pendant cette période d'exposition, le lait a été récolté régulièrement à 7 jours d'intervalle (**Schéma II- 1**). Directement après le prélèvement, un échantillon de 100 mL de chaque lait a été stocké dans des flacons (50 mL) en verre à -20°C, avant d'être analysé. A la fin de l'exposition, les animaux ont été euthanasiés sous anesthésique (Pentobarbital, Ceva santé animal, Libourne, France), afin de prélever et d'analyser les tissus adipeux surrénaux et hépatiques. Tous les échantillons tissulaires ont été récupérés dans des boîtes en plastique et stockés à -20°C avant leur lyophilisation et analyse par GC-MS-HR.

Afin de caractériser l'exposition des chèvres aux PCB et aux PBDE à travers leur alimentation, une analyse de toutes les matrices ingérées a été réalisée. Cette caractérisation s'est basée sur un régime alimentaire journalier de 1kg d'aliment contaminé (contenant du sol), de 2 kg d'aliment non contaminé et enfin approximativement de 1 kg de foin.

Durant la période expérimentale, 15 échantillons de foin et d'autres d'aliments non contaminés ont été prélevés, rassemblés et broyés afin de préparer des témoins homogènes représentatifs pour l'analyse par GC-MS-HR.

Rappelons que l'eau et l'air sont connus pour être des voies d'exposition mineures aux polluants organiques (McLachlan, 1993).

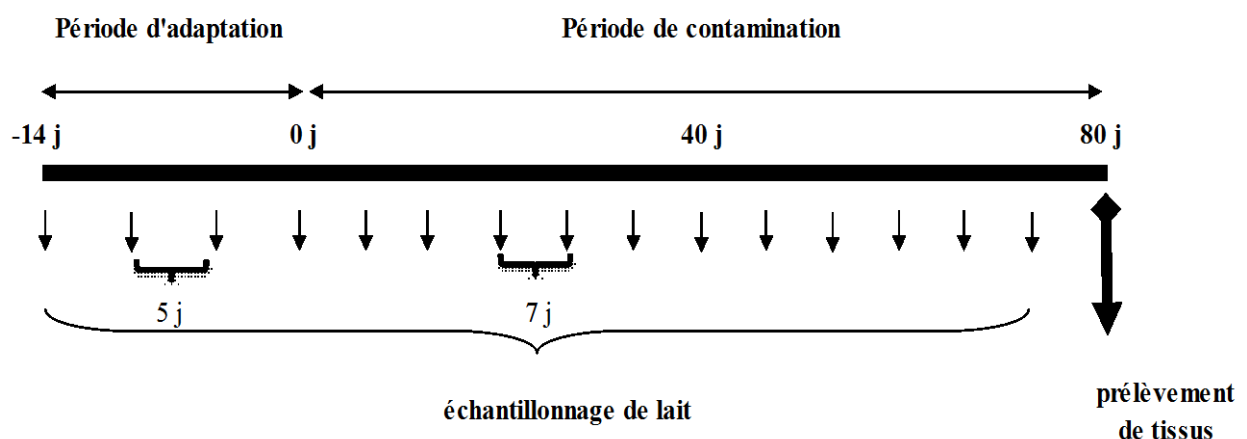


Schéma II- 1 : Récapitulatif des traitements appliqués aux chèvres (n=3) au cours de l'expérience

2.5 Analyse des PCB et des PBDE dans le lait et les tissus de chèvres en lactation

2.5.1 Assurance qualité et contrôle qualité

Dans la limite du possible, un blanc de protocole a été inclus dans chaque série d'analyses et ceci en plus des solutions d'étalonnage qui ont systématiquement été introduites. De plus, les taux de réapparition des étalons internes de quantification ajoutés avant traitement de l'échantillon, ont été mesurés par rapport aux deux étalons internes de sensibilité.

Ainsi, toutes les procédures utilisées ont intégré les paramètres nécessaires pour assurer la qualité selon la directive 2002/69/EC et 2002/70/EC de juillet 2002. De plus, toutes les méthodes utilisées ont été validées et accréditées ISO 17025 et ISO 9001 v. 2000 standard.

2.5.2 Réactifs et produits chimiques

Cyclohexane (Picograde[®], 1179 Promochem); Hexane (Picograde[®], 1244 Promochem); Isooctane (Picograde[®], 1364 Promochem); Sulfate de sodium anhydre (1.06649.1000 Merck); Dichlorométhane (Picograde[®], 1185 Promochem); Méthanol (Picograde[®], 1263 Promochem); Florisil 100-200 mesh (41883, Promochem); Célite (545, Cogter - 16391) 20/45 µm; Carbo-pack C, 80/100 mesh (10258, Supelco); Acide sulfurique concentré à 98% (100748.2500, Merck); Gel de silice 70/230 mesh (60741, Fluka); Toluène (Picograde[®], 1350 Promochem); Eau ultrapure (>14 mΩ.cm); Acétone (Picograde[®], 1142 Promochem).

2.5.3 Etapes successives de traitement des échantillons

Les PBDE et PCB ont été quantifiés par GC-MS-HR. Trois étapes sont indispensables pour effectuer ces analyses (**Schéma II- 2**)

a) Première étape l'extraction

Le but de cette première étape est d'éliminer la matrice et d'isoler la fraction contenant les composés d'intérêt, les PCB et les PBDE, qui en raison de leur caractère lipophile se retrouvent dans la matière grasse.

Chapitre II

Les échantillons de lait (~30 g), tissus et aliment (~3 g) ont été pesés, et les standards internes 18 PCB et 7 PBDE marqués au ^{13}C (Cambridge Isotope Laboratories et Wellington Laboratories) leur ont été ajoutés.

Les échantillons solides ont été lyophilisés ou séchés, réduits en poudre et transférés dans les cellules d'un extracteur de solvants accéléré (ASE 300, Dionex, Sunnyvale, CA, USA). La pression a été fixée à 100 bars et la température à 120°C. Le solvant d'extraction était composé d'un mélange de toluène (Picograde-1350 Promochem) et d'acétone (Picograde-1142 Promochem) dans la proportion 70/30 (v/v). Trois cycles d'extraction de cinq minutes chacun ont été réalisés. Les extraits après leur évaporation ont été dissous à nouveau dans de l'hexane.

Pour le lait, 2 mL d'oxalate de sodium saturé ont été ajoutés pour précipiter les protéines. Un ajout d'éthanol et de diethyl-éther a ensuite été effectué afin d'extraire la graisse avec du n-pentane, à deux reprises. Les extraits ont été évaporés à sec, de manière à déterminer par gravimétrie la teneur en graisse. Enfin, 25 mL d'hexane (Picograde-1244 Promochem) ont été ajoutés avant la purification.

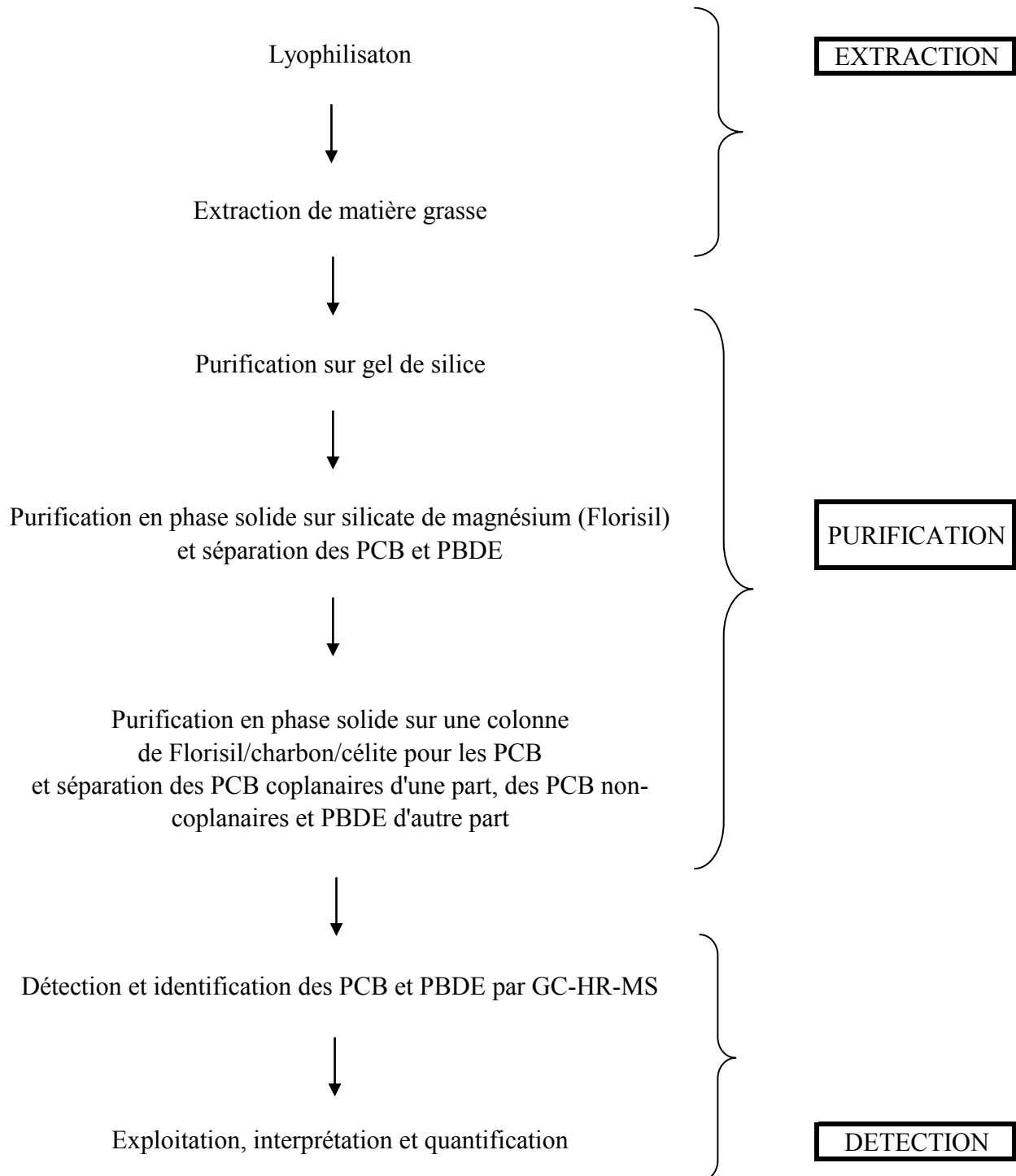
b) Deuxième étape la purification

L'extraction a donné un extrait brut qu'il a été nécessaire de purifier pour éliminer la matière grasse et les autres composés extraits conjointement avec les PCB et les PBDE. Cette purification a été obtenue à l'issue de trois étapes de chromatographie avec différents réactifs. Elle s'est décomposée en trois étapes successives sur trois systèmes chromatographiques ouverts avec des phases de silice, de florisil et de charbon.

La première étape du protocole de purification a été effectuée dans une colonne en verre (50 cm de longueur et 2,5 cm de diamètre interne), composée de couches successives de 5 g de sulfate de sodium anhydre (ASC, ISO, Merck Eurolab, Darmstadt, Allemagne), 5 g de silice pure (Fluka, Allemagne), 20 g de silice acidifiée avec de l'acide sulfurique concentré (Merck) (44%) et 5 g de sulfate de sodium. Les PCB et les PBDE ont été élués dans la même fraction avec 150 mL d'hexane.

La colonne de Florisil (25 cm de longueur et 1,25 cm de diamètre interne) a été préparée en ajoutant 6 g de Florisil à 6% d'eau (Promochem) à 10 mL d'hexane. Les échantillons purifiés sur la colonne précédente ont été réduits à 1 mL et placés sur la colonne de Florisil avant d'être rincés avec 9 mL d'hexane. Les PCB et PBDE ont été élués avec 110 mL d'hexane. Cette fraction a été concentrée jusqu'à 1 mL puis évaporée à sec sous flux d'azote, et enfin

Schéma II- 2 : Méthode de mesure des PCB et des PBDE dans les matrices biologiques contaminées.



Chapitre II

dissoute à nouveau dans 1 mL d'hexane.

La fraction contenant les PCB et les PBDE dissous a été transférée sur la colonne de charbon et de cérite (20 cm de longueur et 1 cm de diamètre interne), remplie avec un mélange de 0,25 g de Carbo-pack C et de cérite 12/82 (g/g) activée au préalable pendant la nuit à 130°C. La colonne a ensuite été lavée avec 5 mL de toluène (Picograde-1263 Promochem), puis avec 5 mL de dichlorométhane (Picograde-1179 Promochem) et finalement avec 5 mL d'hexane. La colonne de charbon a été complétée avec 1 g de Florisil actif qui a été au préalable placé à 130°C pendant la nuit.

Les extraits contenant les PCB et les PBDE après leur dépôt sur la colonne ont été élués. L'éluion a été faite avec 10 mL d'hexane pour les PCB non coplanaires (fraction incluant les PCB NDL), ainsi que pour les PBDE, dans des ballons de 50 mL. L'hexane a ensuite été évaporé à sec après ajout de 1 mL de solution du standard externe (400 pg/mL). L'éluion des PCB DL s'est faite avec 20 mL de toluène, qui ont ensuite été évaporés à sec après l'ajout de 1 mL de solution de standard externe (400 pg/mL).

Pour finir, les deux échantillons ont été évaporés à sec après ajout d'un standard externe, et repris avec 20 µL de toluène pour la fraction de PCB NDL et PBDE, et avec 50 µL pour les autres.

c) Troisième étape la quantification

La quantification par dilution isotopique est certainement la méthode la plus appropriée pour quantifier les PCB et les PBDE. A cette fin, une quantité connue d'homologues marqués au ^{13}C a été ajoutée. Les extraits purifiés ont reçu également un ou plusieurs étalons internes marqués au ^{13}C appelés aussi "étalons internes de sensibilité". Ils permettent de mesurer les taux de réapparition des étalons internes de quantification introduits au début de l'analyse.

Les PCB et les PBDE ont été analysés grâce à un chromatographe de gaz HP-5890 de Hewlett Packard (Palo Alto, CA, USA) couplé à un spectromètre de masse haute résolution JMS 700 D, Jeol (Tokyo, Japon) avec une résolution de 10000 (ou 100 ppm) et en mode impact électronique (38 et 40 eV d'énergie d'ionisation). L'enregistrement du signal de l'ion moléculaire le plus abondant (contribution isotopique ^{35}Cl et ^{37}Cl) a été fait avec un SIM (Single Ion Monitoring). Une colonne capillaire DB5MS (30 m X 0,25 mm X 0,25 µm) de J&W a été utilisée en mode splitless.

Le programme de températures du GC pour les PBDE a été le suivant : 120°C (2 min), augmentation de la température à raison de 10°C/min jusqu'à 215°C (0 min), puis

Chapitre II

augmentation de la température à raison de 3°C/min jusqu'à 270°C (0 min) et finalement montée de 10°C/min jusqu'à 310°C (4 min). Le programme GC pour les PCB était : 120°C (3 min), 20°C/min jusqu'à 170°C (0 min), 3°C/min jusqu'à 245°C (0 min) et finalement 20°C/min jusqu'à 275°C (7 min). Les signaux ont été intégrés par le logiciel JEOL Diok V2. Toutes les valeurs ont été corrigées automatiquement en prenant en compte le taux de recouvrement des molécules marquées au ¹³C.

Les limites de détection (LOD) des PCB et PBDE dans les échantillons analysés sont résumés ci-dessous :

Concernant les PBDE dans le lait, la LOD a été de 0,002 ng/g de MG pour les tri-, les tétra- et les penta-, et de 0,005 ng/g MG pour les hexa- et les hepta-. Dans l'aliment, la LOD a été de 0,001 ng/g de matrice à 12% de MS pour les tri-, les tétra- et les penta-, et de 0,002 ng/g MG pour les hexa- et les hepta. Enfin, dans les tissus, la LOD a été de 0,01 ng/g de MG pour les tri-, les tétra- et les penta-, et de 0,02 ng/g MG pour les hexa- et les hepta-.

Concernant les PCB dans le lait, la LOD a été de 0,1 pg/g de MG pour les PCB-DL et de 1 pg/g de MG pour les Indicateurs.

Dans l'aliment, la LOD a été de 0,1 pg/g de matrice à 12% de MS pour les PCB-DL et de 1 pg/g matrice pour les Indicateurs. Enfin, dans les tissus, la LOD a été de 1 pg/g de MG pour les PCB-DL et de 10 pg/g de MG pour les Indicateurs.

Nos limites de détection ont été identiques aux limites de quantification car la détection s'est faite par haute résolution (LOD=LOQ).

2.6 Mesure des paramètres du biotransfert

Au cours de mes travaux, nous avons déterminé le transfert des polluants vers le lait ainsi que leur accumulation dans les différents tissus.

Dans le but d'éliminer les composés dont le sol n'est pas le contributeur majoritaire, deux critères de sélection ont été choisis. Le premier critère est que la concentration du composé considéré dans l'aliment expérimental soit cinq fois supérieure à celle dans l'aliment non contaminé. Le deuxième critère est que la contribution de l'aliment contaminé à la quantité de composé ingérée quotidiennement soit au minimum de 66% (2/3). Ainsi, les composés ne remplissant pas ces deux critères ont été systématiquement éliminés.

Le Facteur de BioConcentration « BCF » désigne le rapport entre concentration du composé organique dans le tissu et celle dans l'aliment. Le Facteur de Transfert « COR » désigne le

Chapitre II

rapport entre la quantité du composé organique excrétée dans le lait et celle ingérée dans l'aliment (Fries *et al.*, 1999 ; Thomas *et al.*, 1999).

$$BCF = \frac{C_{MF}}{C_{Aliment}}$$

Où le C_{MF} correspond à la concentration du composé testé dans la MG du lait à l'équilibre (pg/g) et $C_{Aliment}$ est la concentration du composé testé dans l'aliment (pg/g).

Ce facteur permet de déterminer l'aptitude d'une molécule à se bioconcentrer dans l'organisme.

$$COR(\%) = \frac{100 \cdot Ex_{Lait}}{I}$$

où le Ex_{Lait} désigne la quantité du composé testé excrétée dans le lait (pg/j), et I est la quantité du composé testé ingérée dans l'aliment (pg/j).

2.7 Analyse statistique

Les valeurs de BCF (dans le foie et dans le tissu adipeux) et les COR (lait) ont été analysées statistiquement en utilisant le logiciel StatBox version 6.5 (GrimmerSoft, Paris, France) suivant une analyse de variance (ANOVA) à un facteur (nombre de congénères de PCB = 9 et nombre de congénères de PBDE = 2) répété ($N_{chèvres} = 3$).

Les valeurs individuelles de BCF et de COR ont été comparées en utilisant un test-*t* de Bonferroni et la probabilité a été considérée comme significative pour $P < 0,05$.

3 Résultats

3.1 Contribution des matrices ingérées à l'exposition des chèvres en lactation aux PCB et aux PBDE

Les concentrations des PCB et des PBDE dans l'aliment contaminé sont données dans le **Tableau II- 1**. La contribution du sol pour les PCB Dioxin-Like 77, 118, 126, 105, 123, 156, 157 et 167, pour le PCB Non-Dioxin-Like 138 ainsi que pour les BDE 47 et BDE 99, est au moins cinq fois supérieure à celle de l'aliment non contaminé et représente au moins les 2/3 de l'apport journalier en contaminants (**Tableau II- 1**).

D'autre part, la contribution du foin et de l'aliment non contaminé à l'exposition des animaux aux PCB 81, 169, 114 et 189 (PCB-DL), aux PCB 28, 52, 101, 153 et 180 (PCB-NDL) et aux PBDE 28, 100, 153, 154 et 183 (PBDE Indicateurs), représente au moins 57% (**Tableau II- 1**). C'est pourquoi ces composés n'ont pas été considérés dans l'évaluation de l'exposition.

Le PCB 153 (composé marqueur des PCB) a été éliminé de nos discussions développées autour des paramètres de biotransfert (BCF et COR), car la contribution de l'aliment contaminé (sol) ne dépasse pas les 51%.

3.2 Transfert des PCB et des PBDE de l'aliment contaminé vers le lait

Les concentrations des composés étudiés sont données dans le **Tableau II- 1**. Le profil des concentrations en PCB dans le lait présente une forte différence avec celui des PCB présents dans l'aliment. En effet, la contribution des PCB-NDL marqueurs à l'enrichissement total en PCB de l'aliment contaminé est de 83%, contre seulement 63% dans le lait.

Dans le lait, le PCB 153 est le congénère majoritaire participant à plus de 24% de la concentration totale en PCB (données non présentées). Il est suivi des PCB 118 et 138 avec des contributions de 18% et 15% respectivement. La contribution des non-ortho et des mono-ortho PCB (PCB-DL) ne dépasse pas les 30% et 0,6% respectivement.

Concernant les PBDE Indicateurs, les concentrations du BDE 47 et du BDE 99 ont dominé le profil des différents congénères constituant cette famille de composés, avec des contributions dans l'aliment et le lait de 92 et 91% respectivement. La **Figure II- 1** illustre les cinétiques d'enrichissement en PCB et en PBDE dans le lait. Ces cinétiques indiquent qu'une tendance vers l'état d'équilibre est atteinte après deux semaines seulement. Les concentrations en PCB et PBDE majoritaires sont exprimées en ng/g de MG, les concentrations des PCB-DL sont exprimées en pg/g MG.

Chapitre II

Tableau II- 1 : Niveaux de PCB et de PBDE dans la ration alimentaire journalière et dans le lait, déterminés par GC-MS-HR après 45j d'exposition

Composés	Concentration du composé			Quantités de PCB ingérées (n=3)	Contribution du sol à l'ingestion des PCB		Concentration moyenne dans le lait	COR individuel moyen (n=3)
	Aliment contrôlé (ingestion)	Concentré contaminé (ingestion mesurée)	Foin (ingestion)		pg/jour	%		
		pg/g MS		pg/jour	pg/jour	%	pg/g MG	%
PCB 77	1,5	22,0	3,2	26453 ± 509	21750	82	13 ± 1	6 ^g
PCB 81	0,1	0,1	0,1	244 ± 2	92	38		
PCB 126	0,2	5,4	0,4	5928 ± 124	5285	89	25 ± 1	47 ^{bc}
PCB 169	0,1	0,1	0,1	191 ± 2	84	44		
Total of the Non-ortho-PCB	1,8	27,9	3,8	33123	27537		40 ± 4	
PCB 105	6,4	81,5	16,1	102949 ± 1883	80435	78	504 ± 15	57 ^a
PCB 114	1,0	2,9	1,7	5522 ± 67	2863	52		
PCB 118	16,11	175,32	43,17	232259 ± 4000	173000	72	1200 ± 100	59 ^a
PCB123	0,6	4,9	1,8	7150 ± 112	4799	67	12 ± 1	21 ^f
PCB 156	1,8	26,1	4,1	31706 ± 603	25780	81	165 ± 9	62 ^a
PCB 157	0,3	7,5	1,1	8852 ± 174	7440	84	41 ± 7	52 ^{ab}
PCB 167	0,8	12,7	2,3	15681 ± 294	12564	80	64 ± 1	48 ^{bc}
PCB 189	0,1	1,0	1,3	2388 ± 24	1035	43		
Total of the Mono-ortho-PCB	26,5	312,1	81,6	416010	307902		1995 ± 175	
		ng/g MS		ng/jour	ng/jour	%	ng/g MG	%
PCB 28	0,03	0,02	0,03	79 ± 0,4	17	19		
PCB 52	0,03	0,02	0,02	67 ± 0,4	18	25		
PCB 101	0,03	0,08	0,03	139 ± 1,9	83	57		
PCB 138	0,02	0,24	0,06	322 ± 5,5	236	70	1 ± 0,1	36 ^{de}
PCB 153	0,04	0,23	0,16	425 ± 5,4	230	51		
PCB 180	0,01	0,04	0,03	76 ± 0,9	38	47		
Total of the Non Dioxin-Like-PCB	0,16	0,63	0,33	1110	623		3,4 ± 0,3	
		ng/g MS		ng/jour	ng/jour	%	ng/g MG	%
PBDE 28	0,002	0,002	0,000	5 ± 0,0	2	41		
PBDE 47	0,03	0,14	0,02	188 ± 3	142	73	0,4 ± 0,05	30 ^e
PBDE 99	0,02	0,18	0,01	211 ± 4	175	81	0,5 ± 0,08	30 ^e
PBDE 100	0,01	0,01	0,00	17 ± 0,2	9	49		
PBDE 153	0,00	0,00	0,01	12 ± 0,1	4	33		
PBDE 154	0,00	0,00	0,00	7 ± 0,1	4	46		
PBDE 183	0,01	0,01	0,02	27 ± 0,2	7	22		
Total of the PBDE	0,07	0,35	0,06	468	343		1 ± 0,1	

^{a, b, c, d, e, f, g} : Les valeurs moyennes avec la même lettre ne sont pas significativement différentes ($P > 0.05$).

La matière sèche (MS) de l'aliment et du foin est de 88 et 92%, respectivement.

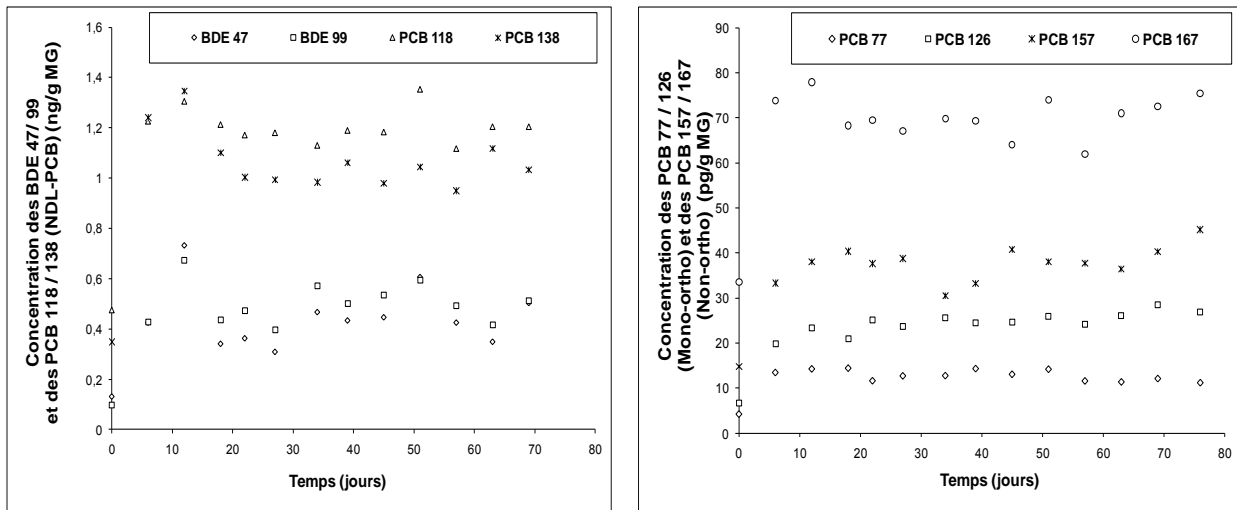


Figure II- 1 : Cinétique d'excrétion de quelques composés (PCB-DL, PCB-NDL et PBDE) dans le lait.

Chapitre II

Les concentrations équivalentes TEQ sont résumées également dans le **Tableau II- 1**. Il apparaît clairement que le lait de consommation s'enrichit rapidement suite à une exposition orale des animaux aux PCB et aux PBDE et surtout concernant les composés Dioxin-Like (les plus toxiques).

Les COR des PCB et des PBDE ont été calculés après 45 jours d'exposition et ils sont rapportés dans le **Tableau II- 1**. Les COR des PCB du sol vers le lait varient entre 6 et 62%. Les COR du BDE 47 et du BDE 99 sont de l'ordre de 30%. Les PCB 118, 157, 156 et 105 présentent les valeurs de COR les plus élevées, tandis que le PCB 77 recueille le plus faible COR.

3.3 Processus de biodégradation et de bioaccumulation

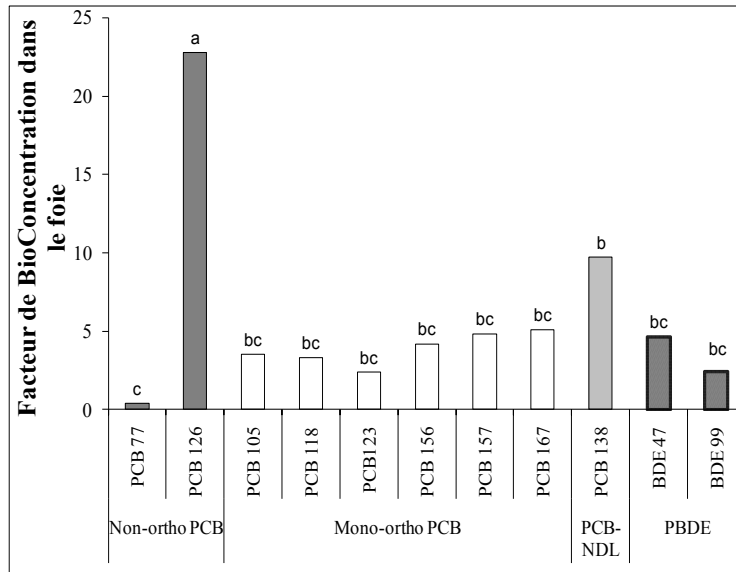
La **Figure II- 2** montre les concentrations des PCB, BDE 47 et BDE 99 dans le foie (a) et le tissu adipeux (b) obtenues après 80 jours d'exposition. Les BCF des PCB et des PBDE indiquent une disparité entre les niveaux de concentration dans les tissus gras et hépatique.

Le PCB 138 (PCB-NDL) a le même niveau d'accumulation que la majorité des composés mono-ortho PCB (sans le PCB 167). Le mono-ortho PCB 123 et le non-ortho PCB 77 présentent les plus faibles niveaux d'accumulation dans le gras ($P < 0,05$) alors que le PCB 126 présente le même niveau d'accumulation que la majeure partie des mono-ortho PCB.

Les BDE 47 et 99 présentent une accumulation identique dans le tissu gras ($P < 0,05$). Dans le foie, aucune différence statistique entre ces deux PBDE (47 et 99) et les PCB 138, 123, 77 et 126 n'a été relevée. En effet, leurs BCF sont compris entre 2 et 3. Le BDE 47 est accumulé à des niveaux similaires à ceux du BDE 99 ($P < 0,05$) ; d'autre part, la valeur du BCF correspondant est statistiquement similaire aux BCF de la majeure partie des PCB. Dans le foie, le PCB 126 présente le plus fort BCF ($P < 0,05$).

Chapitre II

(a)



(b)

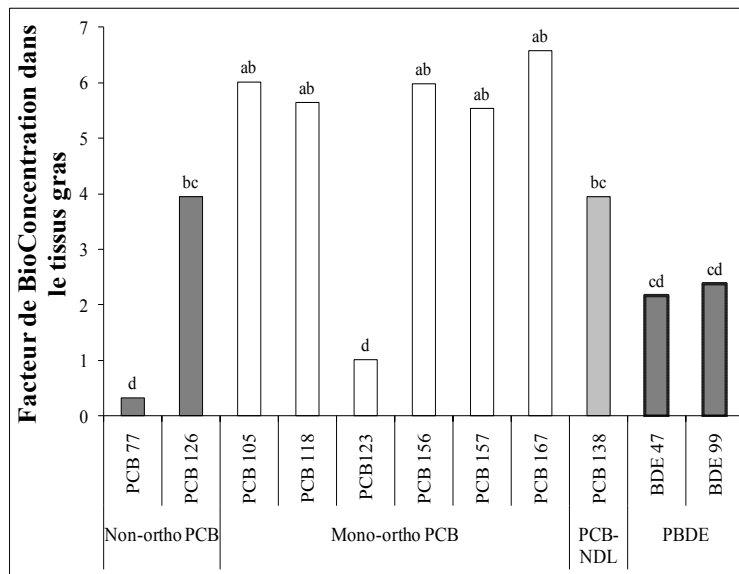


Figure II- 2 : Facteurs de BioConcentration des PCB (n=9) et des PBDE (n=2) dans le foie (a) et le tissu gras (b) obtenus à l'état d'équilibre.

4 Discussion

4.1 Transfert des PCB et des PBDE liés au sol, de l'aliment contaminé vers le lait

Avant la distribution de l'aliment contaminé, les échantillons de lait se sont avérés déjà contaminés en PCB (4 ng/g MG). L'exposition des ruminants témoins aux contaminants avant même le début de l'expérimentation, est certainement due à leur ingestion de foin et du supplément d'aliment non contaminé. En effet, les analyses sur le foin ont démontré que cette matrice représente une source importante de PCB, et elle est d'ailleurs considérée comme étant le facteur fixe qui affecte le plus le bruit de fond des concentrations en PCB dans le lait. Dans cette étude, nous nous sommes focalisés essentiellement sur des composés pour lesquels l'aliment contaminé contribue pour plus de 66% à l'ingestion de PCB. Le **Tableau II- 1** montre la présence de PCB avec des COR élevés $\geq 50\%$ (exemple PCB 138 et 126), suivis par les composés moyennement transférés avec des COR compris entre 20 et 50% (e.g. PCB 138 et 126) et enfin la présence de PCB avec des COR bas $\leq 10\%$. Les mêmes composés dominants transférés vers le lait de ruminant ont été également identifiés dans d'autres études faisant intervenir d'autres matrices que le sol (Costera *et al.*, 2006 ; Kan et Meijer, 2007). Les COR les plus bas ont été obtenus pour le congénère tétra-chloré 77, caractérisé par sa forte métabolisation chez les mammifères (Van de Berg *et al.*, 1998). Les COR des PCB du lait (**Tableau II- 1**) sont du même ordre de grandeur que ceux rapportés pour les dioxines et les furanes polychlorés, qui n'excèdent pas 66% (Kan et Meijer, 2007). Concrètement, les niveaux de PCB-DL du lait ont atteint 2,7 pg WHO-I-TEQ/g MG très rapidement, et cette valeur est proche de la limite européenne qui est de 3 pg TEQ/g MG.

Les COR observés pour les BDE 47 et 99 sont du même ordre de grandeur que celui du PCB 138 et pourront être associés à un métabolisme intermédiaire. Aucune corrélation claire n'a été observée entre les COR et le degré de chloration des congénères de PCB. Par exemple, avec le même degré de chloration en penta, le COR passe de 57% pour le PCB 105, à 21% pour le BCB 123. De la même manière, aucune corrélation évidente n'a pu être faite entre le COR et la substitution sur les deux positions para (4 et 4') des PCB. Cependant, McLachlan (1993) et Costera *et al.* (2006) ont trouvé une corrélation entre les COR et la substitution de PCB en position para.

Le ratio des concentrations des polluants dans la MG du lait et dans le tissu adipeux en fonction de leur $\log K_{ow}$, est représenté dans la **Figure II- 3**. Il est apparu que le ratio des concentrations dans la MG du lait et dans le tissu adipeux dépendait fortement du $\log K_{ow}$ des

composés. Ce ratio restait supérieur à 1 quel que soit le $\log K_{ow}$ pour la majeure partie des composés. Ce résultat indique que les concentrations trouvées dans la MG du lait étaient supérieures à celles trouvées dans le tissu adipeux, et suggère ainsi que la répartition à l'équilibre entre ces deux compartiments est en faveur du lait (les propriétés de sorption des deux tissus sont similaires puisque tous les deux sont constitués de triglycérides), et un mécanisme de diffusion similaire a lieu pour le PBDE faiblement bromés considérés dans l'étude. Seul un congénère (PCB 77) a présenté un comportement différent, avec un ratio élevé de 1,7 semblant indiquer soit une affinité réduite de ce composé pour les tissus gras ou une métabolisation relativement forte (ce qui pourrait justifier le COR faible).

Un ratio « MG du lait/tissu adipeux » supérieur à 1 pourrait être expliqué par les valeurs du $\log K_{ow}$ des différents composés qui sont inférieurs à 7.5. En effet, une tendance inverse a été signalée avec des PBDE et des PCB ayant des K_{ow} élevés ($\log K_{ow} > 7,5$), Kierkegaard *et al.* (2007) ont trouvé que ce ratio était fortement réduit. Par exemple, les concentrations des PBDE les plus élevés (hepta à déca) étaient 9 à 80 fois plus élevées dans le tissu adipeux que dans la MG du lait, la différence augmentant avec le degré de bromation (Kierkegaard *et al.*, 2007). A l'inverse, des valeurs supérieures à 1 ont été trouvées pour les PCDD/F dans les œufs (Hoogenboom *et al.*, 2006).

Par conséquent, nous pouvons suggérer que les composés avec un $\log K_{ow}$ inférieur à 7.5 n'ont pas d'affinité spécifique pour les compartiments gras, et qu'il n'y a pas d'effet particulier de la barrière biologique lors du transfert de ces composés (Kierkegaard *et al.*, 2007, 2009). De plus, on pourrait supposer que les congénères de PCB les plus chlorés ($\log K_{ow} > 7,5$) situés dans la MG sont transférés moins efficacement vers le système circulatoire puis vers le lait, que ne le sont les congénères de PCB moins chlorés (solubilité importante dans les tissus gras).

Les COR des BDE 47 et 99 présentent des niveaux de transfert plus élevés dans le lait (30%, **Tableau II- 1**) lorsqu'on les compare à des PBDE fortement bromés comme le BDE 209, estimé à moins de 0,2% (Kierkegaard *et al.*, 2007). Ainsi, contrairement à de précédents résultats (Kierkegaard *et al.*, 2007), cette étude indique pour la première fois qu'il existe un risque potentiel d'exposition réel aux PBDE faiblement bromés par le biais des produits laitiers.

Chapitre II

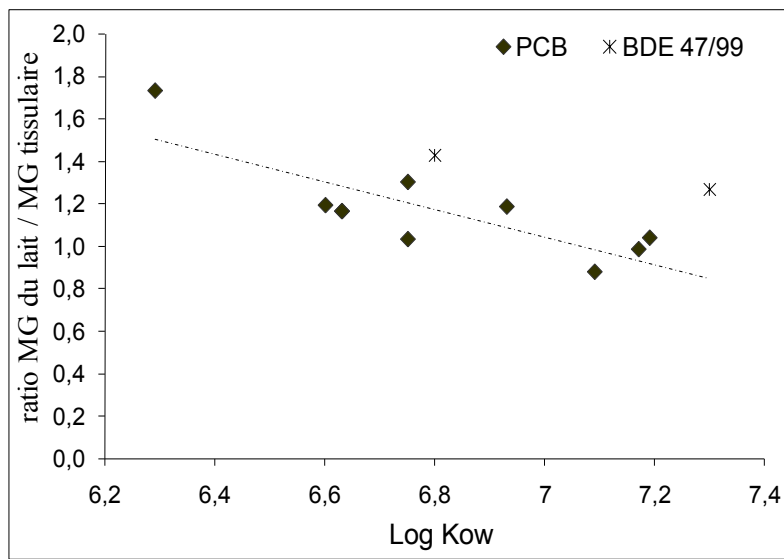


Figure II- 3 : Relation entre le ratio des concentrations des PCB et BDE 47, BDE 99 dans la MG du lait et dans le tissu gras et le log K_{ow} .

4.2 Biodisponibilité des PCB liés au sol

En considérant les conditions d'équilibre, les COR des PCB ont été utilisés pour discuter l'impact du sol sur la réduction de la biodisponibilité orale des PCB chez les chèvres. En effet, ce paramètre (COR) calculé à l'équilibre devrait être stable (indépendamment des perturbations physiologiques susceptibles d'intervenir). Trois études publiées fournissent des COR de PCB à partir d'aliment contaminé sans sol chez les ruminants (**Tableau II- 2**). La comparaison entre les différents niveaux de COR issus de la littérature et de cette étude permettrait d'évaluer l'influence du sol sur la biodisponibilité des PCB.

Les COR de PCB rapportés dans cette étude ont été plus élevés que ceux rapportés par Kerst *et al.* (2004) et sont du même ordre de grandeur que ceux montrés par Thomas *et al.* (1999). De façon intéressante, les COR obtenus avec les PCB liés au sol sont proches de ceux de Costera *et al.* (2006) qui ont réalisé une étude avec du foin contaminé dans des conditions expérimentales très similaires aux nôtres (chèvres en lactation, durée d'exposition). En effet, les COR issus des deux études sont du même ordre de grandeur pour la majorité des composés de PCB (**Tableau II- 2**). Par conséquent, il semble que la biodisponibilité des PCB n'ait pas vraiment été affectée par la matrice sol (1,6% CO et 14% argile). Ce résultat est en accord avec les résultats de Hoogenboom *et al.* (2006) qui n'ont rapporté aucun effet du sol sur la biodisponibilité des PCB dans les œufs. De même, Fries (1985) a montré que la biodisponibilité des PBB dans les tissus gras chez l'agneau n'était pas affectée par la présence de sol. Par contre, Fries *et al.* (1989) ont montré chez les rats une réduction, certes limitée mais significative, de la biodisponibilité orale des PCB liés au sol (10 à 20% pour les trois PCB), avec un sol contenant 5% MO et 10% argile. En revanche, des investigations *in vitro* réalisées sur un modèle monogastrique suggèrent une forte influence du sol, avec une réduction de la fraction de PCB mobilisés de 67% (Pirard *et al.*, 2007).

4.3 Processus de biodégradation et de bioaccumulation

Quel que soit le congénère considéré, les BCF ont été sensiblement du même ordre de grandeur que ceux déjà présentés dans la littérature concernant les autres espèces animales telles que le poulet et le cochon (Thomas *et al.*, 1999 ; Hoogenboom *et al.*, 2006). La persistance (bioconcentration) des PCB chez les mammifères et les poissons est la résultante de trois caractéristiques : leur lipophilicité, leur degré de chloration et leur stéréochimie

Chapitre II

(Borlakoglu *et al.*, 1989). Il a été observé chez la vache que les PCB fortement chlorés ont tendance à être bioaccumulés (**Figure II- 2**). La principale caractéristique qui est généralement mise en relation avec le métabolisme des PCB est la présence d'H vicinal en position méta/para, et dans une moindre mesure, en position ortho/méta. Par exemple, les congénères de PCB sans atome H en ces positions sont très persistants et difficiles à métaboliser (Borlakoglu *et al.*, 1989 ; Hoogenboom *et al.*, 2006). Ces derniers auteurs ont proposé une classification des PCB (groupes 1, 2 et 3) selon la présence d'atome d'H en positions méta/para et ortho/méta comme indiqué ci-après. Le BCF du PCB 167 (groupe 1) dans la matière grasse (**Figure II- 2b**) est considéré comme élevé car ce composé est le plus persistant en raison de l'absence d'H vicinal. Les PCB du groupe 1 sont suivis par les PCB 118, 138, 105, 157 et 156 (groupe 2), qui présentent des atomes vicinaux d'H en position ortho/méta, en combinaison avec des atomes de chlore en position ortho, suggérant une valeur intermédiaire de BCF ainsi qu'une métabolisation partielle. Le PCB 123 qui est classé dans la catégorie « groupe 2 » avec deux atomes d'H vicinaux en position ortho/méta, associé à un Cl en ortho ; semble fortement éliminé par l'organisme des chèvres (**Figure II- 2b**). Enfin, les congénères les moins abondants (groupe 3) font partie des PCB les plus facilement métabolisés, avec des atomes d'H en position ortho/méta (PCB 77 et 126). Notons que le BCF du PCB 126 dans la MG est du même ordre de grandeur que les BCF des composés du groupe 2. Parmi les deux congénères non-ortho coplanaires, il est connu que le PCB 77 est plus biodégradable que le PCB 126 (McLachlan *et al.*, 1993). En effet, le PCB 77 est moins transféré dans le lait que le PCB 126, et ses niveaux de bioconcentration sont également réduits dans les différents tissus, comme l'ont observé Thomas *et al.* (1999).

Cependant, il apparaît que cette classification (groupe 1, groupe 2 et groupe 3) n'est pas toujours suffisante pour expliquer les allures du métabolisme observées dans la **Figure II- 2** (par exemple, le BCF du PCB 123 différerait fortement des BCF du groupe 2). Ainsi, d'autres facteurs que la présence ou l'absence d'atomes vicinaux d'H en positions ortho/méta et méta/para pourraient jouer un rôle important dans les processus de biodégradation des PCB chez les chèvres. Certains auteurs ont rapporté que les substitutions Cl en ortho jouent également un rôle dans la biotransformation des PCB chez les mammifères marins (Jiménez *et al.*, 2000). D'autres auteurs ont suggéré que les PCB moins chlorés sont moins persistants dans les vaches que les PCB plus fortement chlorés (Boon *et al.*, 1989).

Dans le foie (**Figure II- 2a**), le BCF du PCB 126 est particulièrement élevé par rapport à sa valeur dans le tissu gras. Ce résultat a déjà été observé dans d'autres études (Hoshi *et al.*, 1998, Chen *et al.*, 2001), où sa concentration hépatique est cinq fois plus forte que sa

Chapitre II

Tableau II- 2 : Comparaison des Carry-Over Rates (%) obtenus pour les PCB

Molécule contaminante	Carry-Over Rates (%) relatifs à différentes matrices contaminées			
	sol	foin	foin	pâturage
	Conditions contrôlées avec chèvres (Ounnas <i>et al.</i> , 2010)	Conditions contrôlées avec chèvres (Costera <i>et al.</i> , 2006)	Etude sur site avec vaches (Kerst <i>et al.</i> , 2004)	Etude sur site avec vaches (Thomas <i>et al.</i> , 1999)
Non-ortho-PCB				
PCB 77	6	10	2	nd
PCB 126	47	55	40	nd
Mono-ortho-PCB				
PCB 105	57	90	28	0
PCB 118	58	85*	33	100
PCB 123	21	18*	9	nd
PCB 156	62	78	20	76
PCB 157	52	82	24	nd
PCB 167	48	52	21	91
Non-Dioxin-Like-PCB				
PCB 138	36	55	nd	74

nd : non déterminé.

* : La valeur de COR plus importante (facteur de 2) retrouvée chez Costera *et al.*, 2006 peut être attribuée au fait que dans cette étude l'apport en PCB des autres matrices alimentaires n'a pas été considéré.

concentration dans le tissu gras. Ces auteurs expliquent la séquestration hépatique spécifique du PCB 126 par la présence des protéines de fixation associées à l'induction de CYP1A2 (Frederiksen *et al.*, 2009).

Le BCF du PCB 138 a été deux fois plus élevé dans le foie que dans le tissu gras des chèvres, contrairement à ce qu'ont rapporté Lyche *et al.* (2004b). Deux hypothèses sont suggérées pour l'expliquer : la forte plage de variation du taux de MG dans le foie (7 et 14 %), et une possible exposition de certains individus à ces composés en amont de cette étude. La prédominance du PCB 153 dans le foie, suivi du PCB 138 (40% et 20% respectivement), a été précédemment établie par Hoshi *et al.* (1998) chez la vache. La persistance de ces molécules dans les tissus de la vache semble en lien avec leur persistance et concentration dans l'environnement.

Chez les chèvres en lactation, les BDE 47 et 99 ont été retenus dans une moindre mesure dans les tissus hépatiques et graisseux, dans le même ordre de grandeur que le PCB 77. D'une part, ces données semblent en contradiction avec le fait que les congénères de PBDE présentent un potentiel de bioconcentration plus élevé que les PCB (Kierkegaard *et al.*, 2007). D'autre part, suite aux observations d'une forte débromation des PBDE chez les vaches, on s'attendait à ce que le BDE 99 soit métabolisé en BDE 47, mais ce métabolisme semble ne pas intervenir dans notre cas. En effet, il apparaît que le BDE 99, dans les conditions du rumen, n'est pas soumis au même métabolisme de débromation que celui rapporté chez la carpe (Stapleton *et al.*, 2004) ou chez la vache avec des PBDE fortement bromés (Kierkegaard *et al.*, 2009).

Du point de vue de biotransfert des BDE 47 et 99 vers le tissu gras et le lait, ces composés ont montré des ordres de grandeur similaires à ceux des PCB du groupe 2 (soumis à un métabolisme partiel). De plus, ces données montrent que le BDE 47 présente la même cinétique de transfert vers le lait que le BDE 99. Enfin, étant donné qu'une allure de cinétique différente a été observée chez la poule (Lyche *et al.*, 2004b), l'hypothèse d'un mécanisme spécifique de prise en charge de ces composés, propre à chaque espèce, est suspecté.

5 Conclusion

Les résultats montrent que suite à une exposition chronique des chèvres aux PCB et aux PBDE à partir d'un sol contaminé, le lait se révèle être une voie d'excrétion importante de composés halogénés persistants. Après seulement deux semaines, la limite internationale de conformité de 3 WHO-I-TEQ pg/g MG a été atteinte.

Chapitre II

De plus, les COR des PCB du sol vers le lait semblent dépendre du métabolisme au sein de l'animal. Les BDE 47 et 99 semblent être soumis chez la chèvre à la même biotransformation que les PCB à métabolisme moyen.

Enfin, les résultats obtenus ne semblent pas appuyer l'hypothèse d'un rôle du sol dans l'atténuation de la biodisponibilité des PCB. Par conséquent, l'estimation de l'exposition des ruminants aux polluants halogénés *via* le sol, mérite une attention des plus particulières.

Il est certain que la généralisation de ces résultats aux autres sols reste limitée. Néanmoins, ces résultats permettent pour la première fois d'aborder concrètement le transfert des PCB et des PBDE du sol vers le ruminant.

CHAPITRE III

Chapitre III : Biodisponibilité relative des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques liés au sol chez les chèvres en lactation

1 Introduction

Les seules expériences menées sur la biodisponibilité des HAP chez le ruminant ont été réalisées au sein de notre laboratoire. Ces travaux ont montré que ces polluants, en raison de leur forte biotransformation, sont faiblement transférés dans le lait et fortement excrétés *via* les urines. Deux études ont tenté de révéler le transfert des HAP de la matrice sol vers le ruminant laitier. La première, établie par Lutz *et al.* (2006), a caractérisé la cinétique de transfert des HAP du sol vers le lait. La seconde étude, menée par Costera *et al.* (2009), a tenté de comparer la biodisponibilité des HAP provenant de sol avec celle de plusieurs matrices alimentaires (huile, foin). Dans cette dernière étude, la biodisponibilité a été assimilée au COR obtenu dans le lait et les urines. A ce stade, ces investigations montraient que le sol n'affecte pas le transfert des HAP vers le ruminant. Cependant, il ressort également de ces études que le compartiment laitier n'est pas adapté au suivi de l'excrétion des HAP (taux de transfert inférieur à 2%) et que les meilleures réponses obtenues ont été retrouvées dans les urines (taux de transfert allant jusqu'à 30%).

A travers ces études, il apparaît que la biodisponibilité des HAP chez le ruminant ne peut être assimilée à une notion d'excrétion celle-ci est sujette à plusieurs facteurs de variations. C'est pour cela que dans cette étude, le risque de transfert des HAP du sol vers le ruminant a été estimé à travers la biodisponibilité relative. Ainsi, en milieu contrôlé, des chèvres en lactation ont été exposées à différents aliments contaminés administrés successivement à des doses croissantes. Pour faciliter l'ingestion des matrices contaminées (sol et huile), celles-ci ont été au préalable intégrées à de l'aliment granulé. Cette étape de l'intégration uniforme des matrices contaminées à de l'aliment a été essentielle pour s'assurer d'une contribution équivalente de la dose ingérée dans chacun des cas (sol ou huile). La biodisponibilité relative a été assimilée par la suite au ratio entre les pentes des courbes doses-réponses obtenues pour le vecteur sol et le vecteur huile. Dans le cas des HAP, molécules fortement métabolisées, les réponses ont correspondu à l'excrétion urinaire et laitière de métabolites hydroxylés majoritaires. Les données issues de cette étude viendront renforcer les investigations antérieures menées au sein de notre laboratoire (Lutz *et al.*, 2006 ; Costera *et al.*, 2009).

Ce chapitre de thèse a fait l'objet d'une publication dans le journal « Chemosphere ».

Référence : 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*, 77 (2009), 115-122.

2 Matériel et Méthodes

2.1 Précautions particulières pour éviter d'éventuelles contaminations

Afin d'éviter toute contamination accidentelle par des HAP, la verrerie et le matériel ont été soumis à un nettoyage rigoureux. Après un rinçage à l'acétone, tous les ustensiles ont été abondamment rincés à l'eau courante, puis à l'eau milli-Q (résistivité de $16,8 \pm 0,1 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$). Le matériel a été ensuite emballé dans de l'aluminium et chauffé à 600°C durant 24 heures afin d'éliminer définitivement toute trace de résidus.

2.2 Production d'un sol contaminé

Le sol et l'huile ont été contaminés par trois molécules de HAP aux caractéristiques contrastées (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA), avec une pureté $\geq 97\%$ pour le Phénanthrène (Phe), $> 98\%$ pour le Pyrène (Pyr) et $\geq 96\%$ pour le Benzo[a]Pyrène (B[a]P). Le choix de ces molécules s'est basé sur leurs propriétés physico-chimiques, leur toxicité, leur concentration dans le sol et leur métabolisme (Wild et Jones, 1995 ; Juhasz et Naidu, 2000 ; Crépineau *et al.*, 2003 ; Grova *et al.*, 2005).

Le sol a été contaminé de façon artificielle avec pour l'objectif de l'enrichir en HAP de manière homogène. Au vu des interrogations persistantes sur les réelles capacités à produire un sol avec une contamination homogène, nous avons mené une étude préliminaire pour tester l'homogénéité de la distribution des HAP dans le sol artificiellement contaminé.

-Test d'homogénéité de distribution de la contamination dans le sol

Un test d'homogénéité de la contamination du sol a été mis en place afin de s'assurer de la répartition homogène des molécules de HAP sur l'ensemble des particules du sol.

Pour cela, du sol a été contaminé avec un HAP marqué par un traceur radioactif, à savoir le ^{14}C -B[a]P ($26,6 \mu\text{Ci}/\text{mmol}$, $> 98\%$ pureté, Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) : pour cela, 40 g de sol ont été mélangés à 0,5 mg de B[a]P marqué, de façon graduelle.

Chapitre III

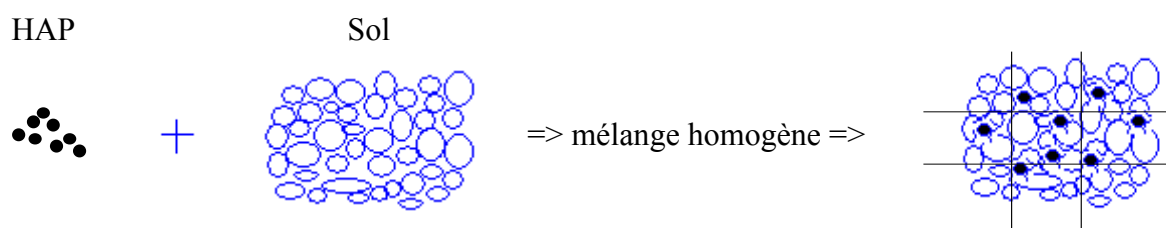


Tableau III- 1 : Caractéristiques physico-chimiques des trois HAP utilisés (adapté de Juhasz et Naidu, 2000 ; WHO, 2003)

HAP	Nb de cycles	^a M (°C)	^b B (°C)	^c S (mg/L)	^d K _{ow}	Pression de vapeur (Pa à 20°C)
Phénanthrène	3	101	340	1,29	4,46	6,8.10 ⁻⁴
Pyrène	4	149	360	0,14	5,32	6,8.10 ⁻⁷
Benzo[a]Pyrène	5	179	496	0,0038	6,04	5,0.10 ⁻⁷

^a M : Point de fusion, ^b B : Point d'ébullition, ^c S : Solubilité aqueuse, ^d logK_{ow} : Coefficient de partage octanol:eau.

Le sol a ensuite été fractionné dans deux barquettes de 20 g. Les sols des deux barquettes ont été soumis à des durées de vieillissement différentes. L'un a été vieilli pendant 24 heures et l'autre durant 40 jours à 25°C. Le vieillissement a eu lieu à l'abri de la lumière afin d'éviter les phénomènes de photolyse. Pour favoriser la bonne diffusion et la rétention de ces molécules de HAP dans les particules de sol, la capacité au champ du sol a été portée à 80% à l'aide d'eau milli-Q (Liste et Alexander, 2002). Le vieillissement a été arrêté par un choc thermique à -20°C.

Le test d'homogénéité de la contamination a été effectué par la mesure de la dispersion de la radioactivité dans les barquettes. Après avoir été séché à l'air libre et broyé finement, le sol de chaque barquette a été quadrillé en trois blocs. L'échantillonnage s'est fait en au moins trois points situés à égales distances les uns des autres à l'intérieur de chaque bloc. Il s'agit d'aliquotes de 300 mg mélangées à 150 mg de cellulose en vue d'une combustion sous

Chapitre III

courant d'O₂ à l'aide d'un Oxidizer Packard 307, à 900 °C pendant 1,5 min. Le ¹⁴CO₂ issu de la combustion a été piégé dans un flacon contenant 10 mL d'une base organique (Carbosorb Packard), auxquels ont été ajoutés 20 mL de liquide scintillant (Permafluor Packard). Le comptage par scintillation a permis de quantifier la radioactivité contenue dans le sol broyé. La radioactivité dans chaque échantillon a été comptée pendant 10 min à l'aide d'un compteur Kontron Betamatic avec standardisation externe et correction du bruit de fond.

Une analyse de variance (ANOVA) a été effectuée pour étudier l'homogénéité de la contamination. La procédure du test de Newman-Keuls a été appliquée en utilisant le logiciel Statbox. Ce test nous a permis de comparer deux à deux tous les échantillons dosés, pour vérifier, l'homogénéité de la contamination artificielle de la matrice sol.

-Préparation de sol contaminé pour l'étude in vivo

Neuf kilogrammes de sol ont été prélevés de l'horizon H0 d'une prairie permanente, sur le domaine expérimental de la Bouzule près de Nancy, France (9% de matière organique, 34% d'argile, 52% de limons, 14% de sable ; pH 6,2 ; 95% matière sèche). Ce sol a été séché à température ambiante (18-20°C) pendant deux semaines, puis broyé avant d'être tamisé à 2 mm et homogénéisé.

Une fraction de sol (5g) a été placée dans un bol à mélangeur automatisé en aluminium (*Kenwood, 1000 W*) à laquelle ont été ajoutés le Phe, le Pyr et le B[a]P pour atteindre une concentration finale de 100 mg/kg pour chacun des composés (concentration avant vieillissement). La quantité de sol mélangée a été augmentée graduellement pour atteindre les 9 kg après 2 heures de mélange. Ce sol artificiellement contaminé a ensuite été soumis à un vieillissement après humidification à 80% de sa capacité au champ par complément d'eau milli-Q, et stocké à 25°C et pendant 40 jours, dans des bocaux hermétiques, en verre teinté, et d'une capacité de deux litres. Durant cette période de vieillissement, le sol a subi deux cycles de séchage à 25°C et de ré-humidification (quatre jours de séchage par cycle). Ces conditions de vieillissement visaient à permettre une bonne diffusion des molécules de HAP, et à favoriser leur forte rétention par les particules de sol. En effet, la formation de liaisons irréversibles réduit la biodisponibilité des HAP (White *et al.*, 1997,1998 ; Kottler et Alexander, 2001 ; Lutz *et al.*, 2006). Le sol vieilli a été stocké à l'état sec, dans des bocaux en verre teinté à - 20°C. Après vieillissement les concentrations en Phe, en Pyr et en B[a]P étaient, respectivement, de 30, de 70 et de 100 mg/kg.

2.3 Préparation de la matrice de référence

Une huile végétale alimentaire (Tournesol, Cargill Oil Packers, France) a constitué la deuxième matrice contaminée (matrice de référence). La contamination de l'huile s'est faite par la solubilisation du Phe, du Pyr et du B[a]P (150 rpm à 25°C) à des concentrations ajustées à celles du sol contaminé précédemment (**Tableau III- 2**). Deux litres d'huile ont été contaminés pour chacune des trois concentrations, les molécules étant dissoutes par agitation. L'huile a été stockée dans des bouteilles en verre teinté.

2.4 Préparation de l'aliment contaminé

La composition de l'aliment expérimental est donnée dans le **Tableau III- 3**. La part de l'huile et du sol dans cette formulation a été fixée à 4% et 9% respectivement. La ration journalière d'une chèvre a été de 1.5 kg de foin et de 1 kg de concentré complet non contaminé et de concentré contaminé permettant de couvrir l'ensemble des besoins nutritionnels pour chacune des chèvres. Cet aliment a été formulé afin de couvrir l'ensemble des besoins nutritionnels de chèvres en lactation comme complément alimentaire (INRA, 2007).

Concrètement, le sol contaminé a été intégré dans de la farine d'une formulation d'aliment contenant du maïs, du tourteau de soja et de la farine de luzerne à des taux de 2% (traitement 1), de 5% (traitement 2) et de 9% (traitement 3) correspondant à une quantité de sol ingérée allant de 20 à 90 g par jour et par animal. Ces valeurs sont comprises dans des intervalles de prise orale involontaire à la pâture (Laurent *et al.*, 2005). Les farines obtenues ont été soumises à un procédé de granulation afin de faciliter leur ingestion par les animaux.

De la même manière, l'huile artificiellement contaminée a été intégrée dans des farines de l'aliment standard afin de vectoriser les mêmes quantités de HAP précédemment introduites dans la matrice sol (les traitements 4, 5 et 6).

Les quantités des deux matrices contaminées (sol et huile) intégrées dans les différentes formulations alimentaires sont résumées dans le **Tableau III- 3**.

2.5 Conditions expérimentales d'élevage des chèvres en lactation

L'expérience a été réalisée avec quatre chèvres multipares de race Alpine chamoisée et de performances zootechniques similaires (production laitière de 3 L/j) provenant du site

Chapitre III

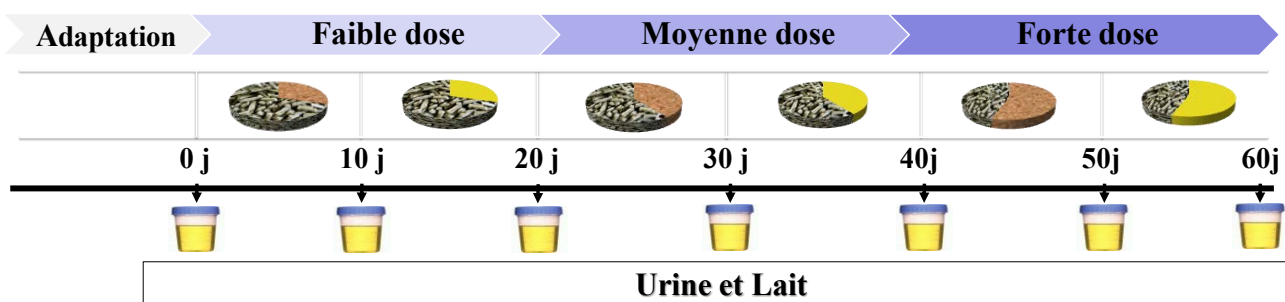
Tableau III- 2 : Concentrations des HAP solubilisés dans l'huile

Huile	Quantités préparées (L)	Concentration (mg/L)		
		Phénanthrène	Pyrène	Benzo[a]Pyrène
1	2	65	145	174
2	2	39	87	103
3	2	13	29	36

Tableau III- 3 : Formulation des différents lots d'aliments

	Aliment		Huile		Sol	
	Traitement	Farine %	Contaminée %	Non contaminée %	Contaminé %	Non contaminé %
SOL	1	87	0	4	2	7
	2	87	0	4	5	4
	3	87	0	4	9	0
HUILE	4	87	4	0	0	9
	5	87	4	0	0	9
	6	87	4	0	0	9

Tableau III- 4 : Récapitulatif des aliments contaminés distribués aux chèvres en lactation



expérimental de la Bouzule. Les chèvres ont été placées dans des boxes individuels, situés dans les locaux de l'Animalerie à l'ENSAIA. Pendant toute la période expérimentale (j 0 à j 60), les animaux ont reçu en plus du kg d'aliment contaminé, 1 kg de foin et 1 kg de concentré complet commercial par jour de manière à couvrir les besoins nutritionnels des animaux. L'eau et une pierre à sel ont été disponibles à volonté. Les animaux ont bénéficié d'une durée d'adaptation de sept jours à ces nouvelles conditions d'élevage.

2.6 Exposition des animaux aux HAP

Après la période d'adaptation de sept jours, les chèvres ont été simultanément exposées au même aliment contaminé. Ainsi, chaque chèvre s'est vue administrer 1 kg d'aliment contaminé contenant 2% de sol (faible dose) durant 10 jours. Les 10 jours suivants, c'est l'aliment à dose faible contenant de l'huile contaminée qui a été distribué. Le même schéma d'exposition a été appliqué pour les autres doses (moyenne et forte) tout en alternant les matrices sol et huile (**Tableau III- 4**). Sur la base d'une consommation moyenne par animal de 1 kg d'aliment contaminé, les chèvres ont ingéré trois doses croissantes de chaque molécule de HAP : 1,9, 5,8 et 9,8 mg par animal et par jour (soit 38, 117 et 196 µg/kg PV/jour). A la fin de chaque période d'exposition de 10 jours, l'urine et le lait des dernières 24 heures ont été prélevés pour y doser les métabolites hydroxylés majoritaires (1-OH Pyr, 1, 2, 3 et 4-OH Phe et 3-OH B[a]P) par chromatographie liquide haute pression (HPLC) couplé à une détection fluorimétrique (FD).

2.7 Prélèvements et enregistrement

Durant l'ensemble de l'essai, la production laitière a été enregistrée de façon individuelle à chaque traite, c'est-à-dire deux fois par jour. Le lait a été récolté quotidiennement mais le suivi du transfert du mélange de HAP vers le lait et l'urine s'est fait aux temps j 0, j 10, j 20, j 30, j 40, j 50 et j 60.

Pour le lait des aliquotes de 200 mL/j ont été prélevées. Les urines ont été prélevées grâce à la pose de sondes urinaires. Les échantillons (lait + urine) ont ensuite été stockés à -20°C.

2.8 Analyse et dosage des échantillons

Les teneurs en métabolites hydroxylés majoritaires associés aux HAP ont été déterminées dans les différentes matrices. Les méthodes d'analyse utilisées reposent sur les travaux précédemment développés au sein de notre unité (Grova *et al.*, 2005 ; Lutz *et al.*, 2006 ; Tankari Dan-Badjo *et al.*, 2007 ; Chahin *et al.*, 2008). Les dosages ont été effectués par HPLC-FD, après une extraction liquide-liquide et une purification sur colonne SPE. L'ajout d'étalons internes a permis de s'affranchir des pertes dues à l'extraction.

2.8.1 Réactifs et produits chimiques

Tous les solvants utilisés sont de qualité HPLC. Les enzymes de déconjugaison, à savoir la β -glucuronidase (G0876) et l'aryle-sulfatase (S9751), nous sont parvenues de Sigma-Aldrich (St-Quentin Fallavier, France). Les solutions standards d'Anthracène, de Phe, de Phe-*d10*, de Pyr, de Perylene-*d12*, de Chrysène *d12* et de B[a]P utilisées dans la quantification des HAP, ont été fournies par Cluzeau Info Labo (Sainte-Foy-La-Grande, France). Les solutions commerciales sont des concentrations de 100 ng/ μ L de cyclohexane, de dichlorométhane ou de méthanol. Le Pyr-*d10* et le Chrysène-*d12* ont été produits par Cluzeau Info Labo (Sainte-Foy-La-Grande, France) à des solutions de 100 ng/ μ L dans de l'acétonitrile et de 10 ng/ μ L dans du cyclohexane, respectivement.

Les solutions standards des 2 et 3-OH Phe et du 1-OH Pyr à 10 ng/ μ L ont été préparées dans l'acétonitrile (Cluzeau Info Labo, Sainte-Foy-La-Grande, France).

Les solutions de B[a]P-*d12* et de 6-OH chrysène (Cluzeau Info Labo, Sainte-Foy-La-Grande, France) à 100 et 200 ng/ μ L ont été diluées dans du toluène et de l'acétonitrile, respectivement. Les solutions de 1- et 4-OH Phe et de 3-OH B[a]P (Chiron, Trondheim, Norway) ont été préparées à de 10 ng/ μ L dans de l'acétonitrile.

2.8.2 Détermination des HAP dans l'aliment contaminé

Le dosage des HAP dans l'aliment contaminé comporte les trois étapes suivantes : l'extraction, la purification et la quantification (**Schéma III- 1**). Elle se base sur la méthode de Tankari Dan-Badjo *et al.* (2007). L'extraction a été réalisée sur une prise d'essai de 0,5 à 1 g à laquelle ont été ajoutés 200 μ L de standards internes (Phe *d10*, Pyr *d10* et B[a]P *d12*), à 5 ng/ μ L. La libération des HAP a été réalisée par sonication dans 20 mL de cyclohexane pendant 30 min à 42 kHz (Branson Ultrasonics Corporation, Danbury, U.S.A.). La sonication a été suivie d'une centrifugation à 3400 g pendant 30 minutes à 0°C ; le surnageant a été

Chapitre III

transféré dans des ballons à évaporation rotative (KNF Neuberger, Village-Neuf, France) pour être évaporé à 25°C sous 93 mbar. Les résidus ont été repris dans 6 mL de cyclohexane en vue d'une purification dans des colonnes SPE Envi Chrom-P (Supelco, St Quentin Fallavier, France) préalablement conditionnées avec 5 mL d'eau Milli-Q, 5 mL de méthanol puis 5 mL de cyclohexane. Après le passage des échantillons, les colonnes ont été lavées avec 6 mL de cyclohexane et les HAP ont été élués avec un mélange de 12 mL de cyclohexane/acétate (50/50, v/v). Cet extrait a été évaporé à sec sous flux d'azote N₂ (Techne, Cambridge, U.K.) pour être ensuite transféré dans des vials contenant 20 µL de dimethyl sulfoxide (DMSO) et 100 µL de standard externe (perylène-*d12* à 0,5 ng/µL). Une nouvelle évaporation à sec a été réalisée avant la reprise dans 180 µL d'acétonitrile.

La quantification a été réalisée par l'injection de 50 µL d'échantillon dans un chromatographe liquide de haute pression (Hewlett-Packard 6890, Palo Alto, CA, USA) couplé à un détecteur fluorimétrique (quadrupole HP-5973, Agilent Technologies, Palo-Alto, USA).

La colonne utilisée pour la séparation des HAP est la Vydac 201 TP 54 (C18, 5 µm, 300 Å, 4,6 x 250 mm, Grace-Vydac, Hesperia, CA). Les phases mobiles utilisées sont l'acétonitrile (A) et l'eau milliQ (B), sous un flux de 0,8 mL/min. Les conditions du gradient d'éluion ont été les suivantes : 0-10 min, gradient linéaire 40% A - 45% A ; 10-17,5 min, 45% A isocratic ; 17,5-20,5 min, gradient linéaire 45% A - 50% A ; 20,5-27,5 min, 50% A isocratic ; 27,5-30,5 min, gradient linéaire 50% A - 60% A ; 30,5-46,5 min, 60% A isocratic ; 46,5-52,5 min, gradient linéaire 60% A - 80% A ; 52,5-62,5 min, 80% A isocratic ; 62,5-63,5 min, gradient linéaire 80% A - 100% A ; 63,5-73,5 min, 100% A isocratic ; 73,5-74,5, retour à 40% A pendant 15 min, avant la nouvelle injection.

Les couples de longueurs d'ondes (d'excitation et d'émission) utilisées pour l'analyse des HAP par détection fluorimétrique ont été les suivantes : 0-40 min, 280-355 nm pour le Phe-*d10* et le Phe ; 40-53 min, 270-405 nm pour le Pyr-*d10* et le Pyr ; 53-64,8 min, 408-438 nm pour le Perylene-*d12* ; après 64,8 min, 295-405 nm pour le B[a]P-*d12* et le B[a]P. Les gammes ont été déterminées à partir d'extraits d'aliment non contaminé, auxquelles ont été ajoutées des quantités croissantes de HAP. Les rendements d'extraction en HAP ont été compris entre 39 et 66% pour le Phe, entre 67 et 73% pour le Pyr, et entre 72 et 75% pour le

B[a]P. Les rendements d'extraction ont été calculés comme suit : $ER = \frac{(\frac{S_I}{S_E})Sp}{(\frac{S_I}{S_E})Sd}$, où S_I et

S_E sont les standards internes et externes ajoutés respectivement dans l'extrait analytique (S_p) et le standard analytique (S_d).

2.8.3 Détermination des métabolites majoritaires de HAP dans le lait

La détermination des métabolites majoritaires dans le lait a été effectuée selon les étapes suivantes : une déconjugaison, une extraction liquide-liquide, une purification pour éliminer les lipides, une séparation entre les molécules mères et les métabolites, et une quantification.

Une prise d'essai de 10 mL de lait a été ajoutée à 50 μ L de β -glucuronidase et 50 μ L de sulfatase à $39 \pm 1^\circ\text{C}$ durant 12 heures de façon à hydrolyser les métabolites conjugués à l'acide glucuronide et aux sulfates. Après l'addition de 75 μ L d'étalon interne (6-OH Chrysène) à raison de 10 ng/mL, le lait a été agité pour une extraction liquide/liquide pendant 30 min avec 40 mL de cyclohexane/acétate d'éthyle (50:50, v/v).

Après agitation, la solution a été centrifugée à 3400 g pendant 30 min. Le surnageant a été récupéré puis évaporé à sec sous flux d'azote. Les résidus d'évaporation ont été récupérés dans 6 mL de cyclohexane, et purifiés sur une colonne SPE Envi (la même procédure de conditionnement des colonnes que celle utilisée pour l'extraction des HAP dans les aliments, a été réalisée). Après passage de l'échantillon sur la colonne, l'ajout de 6 mL de cyclohexane (2x6 mL) a permis l'élimination des impuretés avant l'élution des métabolites avec 12 mL d'un mélange acétate d'éthyle/cyclohexane (50:50, v/v). Après évaporation totale, 2 mL de cyclohexane et 2 mL d'un mélange méthanol/eau (80:20, v/v) ont été ajoutés dans le tube et agités 30 secondes. Les deux phases ont ensuite été séparées par centrifugation (1400 g, 5 min). La phase méthanol/eau contenant les métabolites recherchés a été purifiée une seconde fois avec 2 mL de cyclohexane ; le surnageant a été ajouté à la première phase de cyclohexane.

La fraction méthanol/eau a été évaporée puis purifiée avec 4 mL d'un mélange acétate d'éthyle/eau (50:50, v/v), vortexée et centrifugée (1400 g, 5 min). Le surnageant a été évaporé, pour être ensuite transféré dans des vials contenant 30 μ L de DMSO et 100 μ L d'étalon externe (anthracène à raison de 0,1 ng/ μ L). Une nouvelle évaporation à sec a été réalisée avant la reprise dans 270 μ L de méthanol/eau (65:35, v/v).

La quantification a été réalisée par l'injection de 50 μ L dans une HPLC couplée une FD. La colonne utilisée pour la séparation des métabolites de HAP est la Vydac 201 TP 54. Les phases mobiles utilisées sont le méthanol (A) et l'acide ascorbique à 4 mg/L (B), sous un flux de 0,8 mL/min. Les conditions du gradient d'élution ont été les mêmes que celle décrites dans

la section précédente (extraction des HAP dans les aliments), à l'exception de la fin du gradient : 63,5-80 min, 100% A isocratic ; 80-81 min, puis à 40% A pour 15 min, avant la nouvelle injection.

Les couples de longueurs d'onde (d'excitation et d'émission) utilisés pour l'analyse des HAP par détection fluorimétrique sont les suivants : 0-45 min, 244-370 nm pour tous les Phénanthrènes hydroxylés ; 45-55 min, 240-387 nm pour le 1-OH Pyr ; 55-60, 8 min, 346-400 nm pour le 6-OH chrysène ; 60,8-65 min, 250-420 nm pour l'anthracène ; après 65 min, 248-439 nm pour le 3-OH B[a]P.

Les gammes d'étalonnage ont été établies à partir de lait de chèvre prélevé avant l'essai. Les limites de détection (LD) et de quantification (LQ) ont été établies sur la base de la formule décrite par Feinberg (2001) :

$$LD = \frac{a_0 + 3 \cdot s_{a0}}{a_1} \text{ et } LQ = \frac{a_0 + 10 \cdot s_{a0}}{a_1} .$$

où a_0 , s_{a0} et a_1 sont respectivement le blanc ou ordonnée à l'origine de la droite de régression, l'écart-type de a_0 et la sensibilité ou pente de la droite de régression ($n = 4$).

Les limites de détection et de quantification en HPLC-FD des métabolites majoritaires dans le lait sont présentées dans le **Tableau III- 5**. Les rendements d'extraction ont varié de 24 à 38%.

2.8.4 Détermination des métabolites majoritaires de HAP dans les urines

La détermination des métabolites de HAP majoritaires dans l'urine a été effectuée en suivant les mêmes étapes que pour le lait. La seule spécificité est l'ajustement du pH à 5 avant la déconjugaison, afin d'optimiser les conditions de l'activité enzymatique et l'utilisation du Chrysène *d12* comme standard externe. Les limites de détection et de quantification sont présentées dans le **Tableau III- 6**. Les rendements d'extraction ont varié de 24 à 46%.

2.9 Analyse statistique

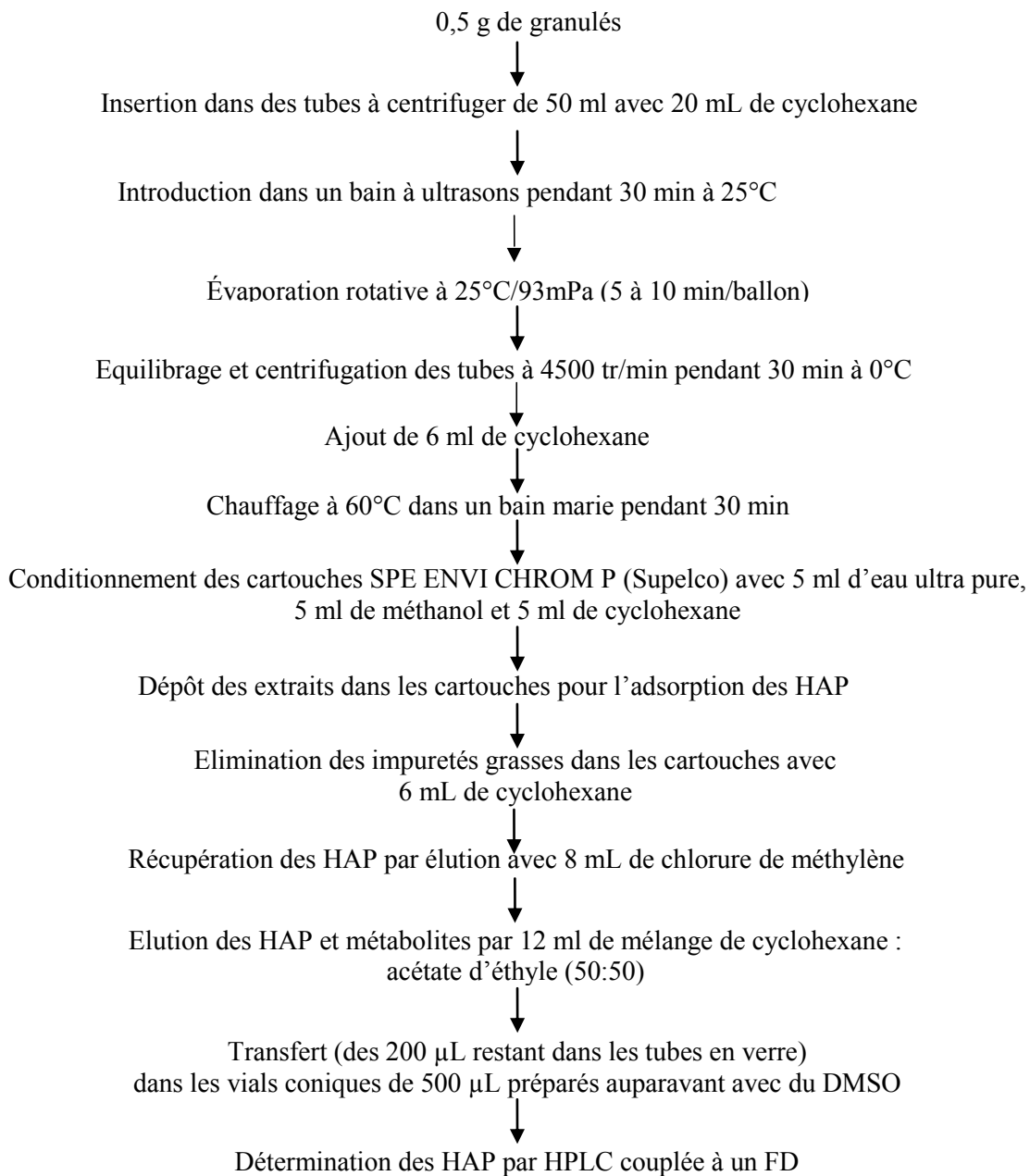
Le quantités de métabolites excrétées sont calculées à partir des concentrations retrouvées rapportées à la production journalière de lait et d'urine. La biodisponibilité relative à chacune des molécules est assimilée au ratio des pentes des courbes doses-réponses obtenues à la suite de l'ingestion du sol et de l'huile.

Chapitre III

Pour valider la méthode de calcul de la biodisponibilité relative, deux hypothèses ont été testées :

- 1) L'excrétion des métabolites augmente **linéairement** avec la dose ingérée.
- 2) Les droites de régression présentent une **ordonnée à l'origine commune** quelle que soit la matrice.

Schéma III- 1 : Méthode d'extraction des HAP de granulés contaminés.



Chapitre III

Les hypothèses ont été testées par l'application d'une analyse de covariance suivant la procédure GLM sur le logiciel statistique SAS (version 9.1, 2004, SAS Institute, Cary, NC). En considérant, la chèvre comme l'unité expérimentale. Le seuil de signification a été fixé à 5%. Ainsi, l'excrétion de chaque quantité de HAP dans l'urine et le lait ($\mu\text{g/j}$) a été représentée par l'équation suivante :

$$Y_{ij} = G_i + M_{ij} + a \cdot D_{ij} + b \cdot D_{ij} \cdot D_{ij} + c \cdot M_{ij} \cdot D_{ij} + d \cdot M_{ij} \cdot D_{ij} \cdot D_{ij} + G_i \cdot M_{ij} + G_i \cdot D_{ij} + \varepsilon_{ij},$$

où Y_{ij} = réponse de la mesure avec la matrice j ($j = 1$ ou 2) pour la chèvre i ($i = 1, 2, 3$ et 4) ($\mu\text{g/j}$), G_i = effet de la chèvre i , M_{ij} = effet de la matrice j ingérée par la chèvre i , D_{ij} = dose quotidienne de HAP ingérée dans la matrice j par la chèvre i (mg/j), et ε_{ij} = erreur résiduelle.

Les effets des facteurs non significatifs ($P > 0,05$) ont été séquentiellement testés et sortis du modèle. Le terme quadratique de la dose a été le premier testé.

Ce modèle de régression multiple a permis de décrire la relation (dose-réponse) entre la quantité de HAP mono-hydroxylés mesurée ($\mu\text{g/j}$) et la dose ingérée ($\mu\text{g/j}$). Le ratio entre les pentes des régressions linéaires a ensuite été calculé pour déterminer la BR.

Les valeurs analytiques en-dessous des limites de détection et de quantification n'ont pas été prises en compte.

Le test- t de Student a été utilisé pour comparer les concentrations en HAP dans l'aliment contaminé.

Chapitre III

Tableau III- 5 : Limites de détection et de quantification (HPLC-FD) des métabolites de HAP dans le lait (ng/mL)

	Limite de détection	Limite de quantification
1-OH Phe 4-OH Phe	1	1,8
2-OH Phe 3-OH Phe	0,6	3,2
1-OH Pyr	0,9	3,7
3-OH B[a]P	2,2	6,1

Tableau III- 6 : Limites de détection et quantification (HPLC-FD) des HAP dans les urines (ng/mL)

	Limite de détection	Limite de quantification
2-OH Phe	4,5	10
3-OH Phe	4,5	10
4-OH Phe	4,5	10
1-OH Phe	0,6	2
1-OH Pyr	12	46
3-OH B[a]P	0,1	0,6

3 Résultats

3.1 Homogénéité de la contamination artificielle du sol en HAP

Les résultats exposés dans le **Tableau III- 7** montrent que le vieillissement agit favorablement sur l'homogénéité de dispersion du B[a]P sur les particules de sol. Après vieillissement, dans les trois blocs (trois prélèvements par bloc), les mesures du ^{14}C -B[a]P ne sont pas significativement différentes. Au contraire, une différence significative entre les trois blocs est retrouvée dans le sol non vieilli (**Tableau III- 7**).

3.2 Contamination de l'aliment expérimental

Le **Tableau III- 8** rapporte des concentrations finales en Phe, Pyr et B[a]P dans les différents aliments expérimentaux. Il apparaît clairement que pour toutes les molécules considérées les concentrations dans les aliments augmentent avec les différents traitements, quelle que soit la matrice considérée.

Les concentrations en Pyr et en B[a]P apportées *via* l'huile et le sol sont identiques quel que soit le niveau de contamination. En revanche, une différence significative des concentrations de Phe est observée entre l'huile et le sol pour le plus haut niveau de contamination. Les concentrations de Phe sont systématiquement en-dessous des niveaux en Pyr et B[a]P retrouvés.

3.3 Taux de transfert des métabolites majoritaires dans le lait et l'urine

Le **Tableau III- 9** indique les taux de transfert des métabolites majoritaires retrouvés dans le lait et l'urine après ingestion orale des HAP. Les analyses effectuées sur les extraits des matrices témoins montrent que les concentrations sont en-dessous des limites analytiques. Après dix jours d'exposition à faible dose, deux métabolites majoritaires sur les six dépassent les limites analytiques. Pour tous les autres traitements, ce sont toujours ces mêmes métabolites qui dépassent les limites analytiques, avec des teneurs mesurées augmentant significativement avec le niveau de contamination de l'aliment. Ainsi, l'excrétion des métabolites majoritaires augmente significativement au cours des différents traitements.

Chapitre III

Tableau III- 7 : Radioactivité relative mesurée dans le sol contaminé au ^{14}C Benzo[a]Pyrène (% , n=3)

Vieillessement (J)	Radioactivité relative en ^{14}C Benzo[a]pyrène (%)			
	Bloc 1	Bloc 2	Bloc 3	RMSE*
0	90 ^b	100 ^b	113 ^a	4,8
40	92 ^b	89 ^b	87 ^b	3,9

* : Racine carrée moyenne de l'erreur.

^{a, b} : Les moyennes ayant les mêmes lettres ne diffèrent pas significativement, $P>0,05$.

Tableau III- 8 : Concentrations des différents congénères de HAP dans l'aliment

Niveau de contamination	Matrice contaminée	Molécule contaminante (mg/kg, n=3)		
		Phénanthrène	Pyrène	Benzo[a]pyrène
Faible	Sol	0,5 ^d	1,2 ^c	0,7 ^c
Moyen		1,0 ^c	2,8 ^b	3,7 ^b
Fort		1,6 ^b	5,2 ^a	6,9 ^a
Faible	Huile	0,6 ^d	1 ^c	1,3 ^c
Moyen		1,4 ^b	2,8 ^b	3,8 ^b
Fort		2,3 ^a	4,7 ^a	5,8 ^a

^{a, b, c, d} : Pour chacune des colonnes et pour chacune des molécules de HAP, les valeurs moyennes suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes, $P>0,05$.

Chapitre III

Le 1-OH Pyr est le composé majoritaire excrété dans l'urine et le lait, alors que le 3-OH Phe n'est quantifiable que dans l'urine et en plus faible concentration. Le 3-OH B[a]P n'est détecté que dans l'urine, et uniquement aux traitements à fortes doses (données non présentées). Les autres composés recherchés (1, 2 and 4-monohydroxy Phe) ne sont détectés dans aucune des matrices biologiques étudiées. C'est le taux de transfert du 3-OH Phe dans l'urine suite à l'ingestion d'aliment contenant la matrice sol qui est le plus élevé (**Tableau III- 9**). Pour les autres traitements, sol et huile compris, les taux de transfert se situent autour de 5%.

Concernant le 1-OH Pyr, les taux de transfert dans le lait sont voisins de 1%. Dans l'urine, les taux de transfert se situent entre 20 à 27% pour les traitements avec sol et entre 32 et 36% après traitement avec l'huile.

Il est évident que l'urine, comparée au lait, est la voie d'excrétion majoritaire des HAP mono-hydroxylés. En effet, les taux de transfert du 1-OH Pyr dans l'urine se sont révélés 30 fois supérieurs à ceux dans le lait, quelle que soit la dose ingérée.

3.4 Biodisponibilité relative (BR) des HAP liés au sol

La BR est estimée en utilisant un modèle de régression multiple ; ce modèle décrit la relation (dose-réponse) entre la quantité excrétée de l'HAP mono-hydroxylé considéré ($\mu\text{g}/\text{j}$) et la dose ingérée ($\mu\text{g}/\text{j}$). Les **Figure III- 1**, **Figure III- 2**, et **Figure III- 3** présentent les relations dose-réponse obtenues et les tableaux associés rapportent les résultats de l'analyse de covariance (l'effet quadratique a été éliminé car non significatif). Dans tous les cas étudiés le modèle statistique prend en compte la valeur de Y-l'intercepte (ordonnée à l'origine). En effet, cette valeur est considérée comme le bruit de fond.

Le modèle retenu intègre l'effet individu et ses interactions avec la dose et la matrice. En effet, ce modèle multi-variables présente la meilleure distribution de la variation des effets considérés. Les effets dose, dose*matrice et matrice serviront à valider la méthode de calcul de la RB.

Ainsi, pour le 3-OH Phénanthrène, les ordonnées à l'origine des courbes ne sont pas significativement différentes entre les matrices (effet matrice non significatif). D'autre part, leurs valeurs sont statistiquement non différentes de la valeur zéro (**Figure III- 1**).

Chapitre III

Tableau III- 9 : Excrétion cumulée dans le lait et l'urine des métabolites majoritaires après les traitements oraux des chèvres

Traitements		Excrétion cumulée du 3-OH phénanthrène (24 h) chez les chèvres (n=4)	
Phénanthrène ingéré mg j^{-1}		Taux d'excrétion %	
		urine	lait
Contrôle (blanc)	0	-	-
Sol	0,48	7 (2)	*
	1	5 (1)	*
	1,6	5 (1)	*
Huile	0,57	5 (1)	*
	1,4	4,5 (1)	*
	2,3	5 (0,7)	*

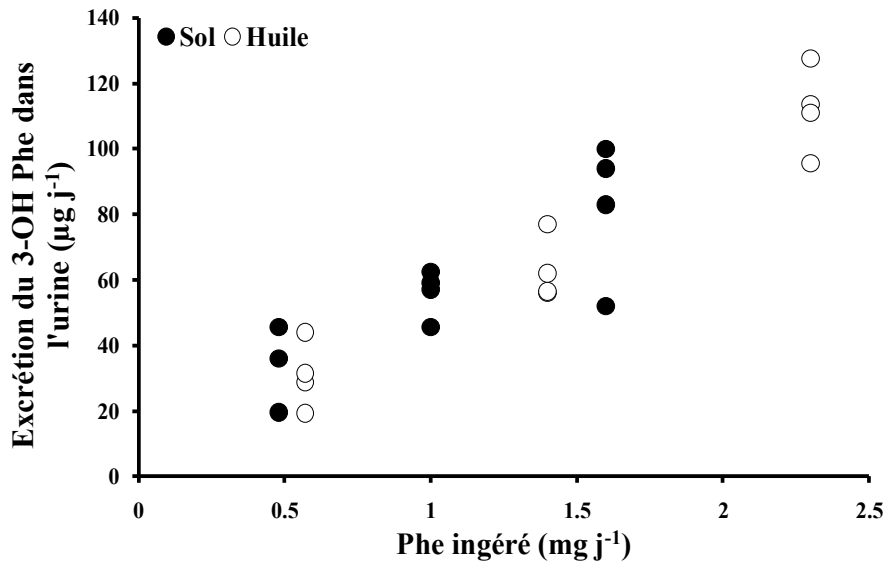
Traitements		Excrétion cumulée du 1-OH pyrène (24 h) chez les chèvres (n=4)	
Pyrène ingéré mg j^{-1}		taux d'excrétion %	
		urine	lait
Contrôle (blanc)	0	-	-
Sol	1,2	27 (8)	1 (0,3)
	2,8	25 (5)	1 (0,3)
	5,2	20 (6)	0,7 (0,3)
Huile	1	32 (8)	1 (0,3)
	2,8	33 (3)	1 (0,3)
	4,7	36 (5)	1 (0,3)

- : non calculé,

* : valeurs en dessous de nos limites analytiques.

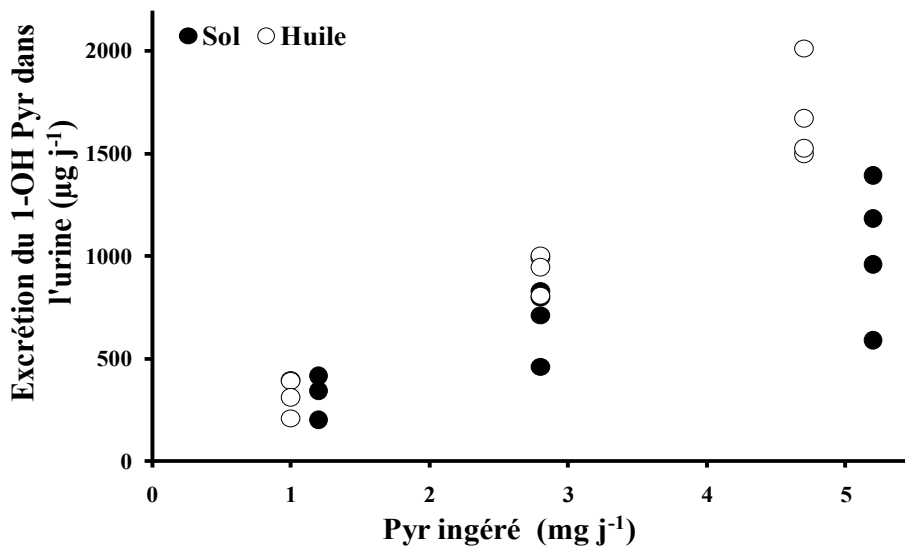
(SD) : Ecart-type.

Chapitre III



Probabilité						
Dose	Matrice	Ordonnée à l'origine	Matrice*Dose	Chèvre	Chèvre*Dose	Chèvre*Matrice
<0,001	N.S	N.S	N.S	N.S	N.S	N.S

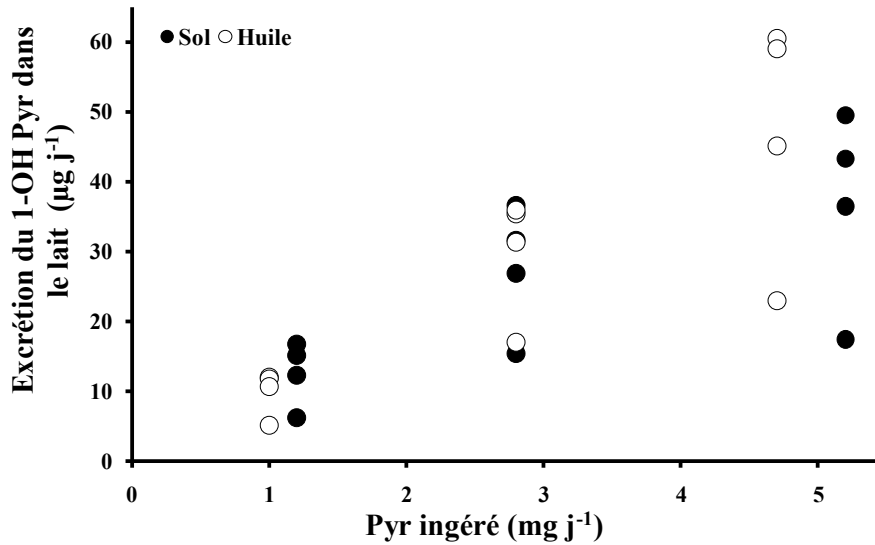
Figure III- 1 : Relation dose-réponse entre la quantité de Phénanthrène ingérée et l'excrétion du 3-OH Phe dans l'urine ($R^2=0,96$).



Probabilité						
Dose	Matrice	Ordonnée à l'origine	Matrice*Dose	Chèvre	Chèvre*Dose	Chèvre*Matrice
<0,001	N.S	N.S	<0,001	N.S	N.S	N.S

Figure III- 2 : Relation dose-réponse entre la quantité de Pyrène ingérée et l'excrétion du 1-OH Pyr dans l'urine ($R^2=0,96$).

Chapitre III



Probabilité						
Dose	Matrice	Ordonnée à l'origine	Matrix*Dose	Chèvre	Chèvre*Dose	Chèvre*Matrice
<0,001	0,07	N.S	0,002	N.S	0,005	N.S

Figure III- 3 : Relation dose-réponse entre la quantité de Pyrène ingérée et l'excrétion du 1-OH Pyr dans le lait ($R^2=0,97$).

Tableau III- 10 : Biodisponibilité Relative du Phénanthrène et du Pyrène chez les chèvres en lactation

	Pente		P	Ordonnée à l'origine		P	Ratio des pentes = RB %
	Sol	Huile		Sol	Huile		
Phe dans l'urine	43 (8)	48 (7)	N.S	21	-2	N.S	100
Pyr dans l'urine	203 (52)	403 (38)	<0,0001	240	-165	0,1	50
Pyr dans le lait	8 (1)	13 (2)	0,002	7	-0,6	0,07	61

Chapitre III

Le résultat de la covariance obtenu à partir des données du 3-OH Phe excrété dans les urines est résumé dans la **Figure III- 1**. Ces données montrent que l'effet de l'interaction dose*matrice est non significatif, ce qui suggère que les deux courbes ne sont pas différenciables. L'excrétion du 3-OH Phe dans l'urine est indépendante de la matrice. Ainsi, les excrétions du Phe *via* le sol et l'huile sont statistiquement non différentes.

L'analyse de covariance rapportée dans la **Figure III- 2** révèle que l'excrétion du 1-OH Pyr dans l'urine est linéaire en fonction de la dose ingérée. Les ordonnées à l'origine des régressions sont statistiquement indépendantes de la matrice. La valeur de l'intercepte (ordonnée à l'origine) commun n'est pas significativement différente de zéro (**Figure III- 2**). L'analyse de covariance (**Figure III- 2**) montre également que l'effet de l'interaction matrice*dose est significatif ($P < 0,001$), ce qui indique une différence significative entre les pentes des régressions.

Concernant les régressions rapportées dans la **Figure III- 3**, les valeurs de l'excrétion du 1-OH Pyr dans le lait augmentent linéairement avec la dose ingérée. Les ordonnées à l'origine sont semblable pour les deux matrices ; aussi leurs valeurs ne sont pas significativement différentes de zéro (**Figure III- 3**).

La covariance (**Figure III- 3**) montre que l'effet de l'interaction matrice*dose est significatif : les pentes des régressions sont différentes. Ceci signifie que l'excrétion du 1-OH Pyr dans le lait varie significativement selon la matrice huile ou sol, tout en dépendant de la dose ingérée. Ces résultats montrent aussi que les deux hypothèses de départ, à savoir la linéarité du modèle et les interceptes communs entre les regressions, sont validées. L'interprétation statistique permet donc le calcul des BR (**Tableau III- 10**).

La matrice sol ne réduit pas significativement la biodisponibilité du Phe dans l'urine quelle que soit la dose ingérée (la BR du Phe peut être estimée par défaut à 100%). La biodisponibilité du Pyr dans le lait et l'urine est significativement réduite par le sol (BR du Pyr égale à 61 et 50% respectivement).

4 Discussion

4.1 Taux de transfert des métabolites de HAP dans l'urine et le lait

Les métabolites mono-hydroxylés de HAP, en particulier le 1-OH Pyr et plus récemment l'ensemble des OH Phe urinaires, sont communément utilisés comme biomarqueurs d'exposition aux HAP (Strickland et Kang, 1999 ; Kang *et al.*, 2007).

Dans cette étude, les taux de transfert du 1-OH Pyr dans l'urine sont élevés comparés à ceux rapportés par Chahin *et al.* (2008) (de 9 à 13%), probablement en raison d'une durée d'exposition plus longue de quatre jours. Deux phénomènes physiologiques peuvent être impliqués : le premier est la plus forte induction des enzymes de Phase I après dix jours d'exposition (Grova *et al.*, 2006 ; Lutz *et al.*, 2006). Le second, suggéré par Bouchard et Viau (1998), est la saturation des transporteurs dans la voie biliaire, ce qui entraînerait l'augmentation de l'excrétion par la voie urinaire.

En outre, l'étude démontre que le Pyr peut être absorbé jusqu'à 36% (**Tableau III- 9**). Cette mesure d'absorption est nettement supérieure aux résultats des autres investigations menées sur la chèvre avec la même molécule (Grova *et al.*, 2006 ; Lapole *et al.*, 2007 ; Chahin *et al.*, 2008). La pertinence du mode d'exposition, à savoir l'incorporation des matrices contaminées dans le bol alimentaire, prend ici toute son importance. En effet, dans les travaux rapportés dans la littérature, les animaux étaient gavés directement avec de l'huile contaminée. Outre les problèmes d'homogénéité et de dispersion, ce type d'apport peut produire une perturbation de l'absorption intestinale en accélérant le transit (Pu *et al.*, 2004). Ces résultats confortent le choix fait par Chahin *et al.* (2008) d'utiliser le 1-OH Pyr dans l'urine comme biomarqueur de l'exposition des ruminants aux HAP.

L'excrétion du 1-OH Pyr dans le lait (1%) est similaire à celle trouvée par Lutz *et al.* (2006) et par Chahin *et al.* (2008) (1,4 et 2% respectivement). A l'inverse, le 3-OH Phe n'a pas été détecté dans le lait mais seulement dans l'urine, et à des taux avoisinant les 5%. Une investigation plus exhaustive des métabolites du Phe doit être envisagée, notamment pour les métabolites 1- et 9-OH Phe. En effet, les différences entre les niveaux d'excrétion du Phe et du Pyr peuvent être expliquées par la structure du Phe qui favorise plusieurs voies métaboliques. En effet, contrairement au Pyr, le Phe présente une structure avec une région *bay* qui favorise sa biotransformation en plusieurs composés filles (Hecht *et al.*, 2003 ; Grova *et al.*, 2008).

Les concentrations du 3-OH B[a]P dans le lait et l'urine indiquent que le B[a]P est transféré de façon très limitée vers le lait, comme rapporté par Lapole *et al.* (2007).

Toutes ces données confirment que l'urine joue un rôle majeur dans l'excrétion des métabolites de HAP. D'autre part, la mesure de la biodisponibilité des HAP à partir de l'excrétion fécale peut être surestimée à cause de la biodégradation des HAP dans le tractus gastro-intestinal ; elle peut être aussi sous-estimée à cause de la circulation entéro-hépatique à travers l'excrétion biliaire (Gron *et al.*, 2007). De ce fait, la voie urinaire représente le compartiment d'excrétion le plus approprié pour estimer la biodisponibilité apparente minimale des HAP chez les ruminants.

4.2 Biodisponibilité relative (BR) des HAP liés au sol

Les résultats obtenus montrent que l'impact du sol sur la biodisponibilité des HAP reste limité. Cette observation est en accord avec les retours d'expériences menées chez le rat et qui révèlent que la matrice sol n'affecte pas considérablement la biodisponibilité (>90%) du Phe et du Pyr (Kadry *et al.*, 1995 ; Van Schooten *et al.*, 1997).

Il semblerait également que la réduction de la biodisponibilité soit spécifique à chaque composé (BR de 100% et de 50% pour le Phe et le Pyr respectivement). Cet aspect a été révélé par les investigations menées *in vitro* sur la désorbabilité des HAP dans le tractus gastro-intestinal. En effet, la bioaccessibilité des composés à deux et à trois cycles était deux fois supérieure à celle des composés à quatre et à six cycles (Tang *et al.*, 2006 ; Khan *et al.*, 2008). L'augmentation de la séquestration des HAP par le sol est interprétée comme la conséquence de la diminution de leur solubilité et de l'augmentation concomitante du K_{ow} et du nombre de cycles. Ces données sont en accord avec la rétention plus prononcée du Pyr par rapport au Phe (**Tableau III- 10**). De même, les mesures de biodisponibilité biologique et chimique à travers l'utilisation de différents solvants et micro-organismes (biodégradation), montrent que la biodégradation et l'extraction des HAP sont toujours supérieures pour les composés à deux et à trois cycles. En effet, leur disponibilité est deux fois supérieure à celle des molécules à quatre cycles, et jusqu'à quatre fois supérieure à celle des composés à cinq et six cycles (Picado *et al.*, 2001 ; Cuypers *et al.*, 2002).

A ce stade de la discussion, deux aspects émergent des résultats. D'une part, l'effet du sol sur la biodisponibilité des HAP est limité. D'autre part, malgré cet effet limité, le sol retient le Pyr de façon plus prononcée que le Phe. Cet effet du sol sur la biodisponibilité du Phe et du Pyr

Chapitre III

peut être interprété par des paramètres extrinsèques (physiologiques) et intrinsèques (propriétés du sol).

L'impact des paramètres physiologiques a été largement étudié à travers des modèles *in vitro* simulant le tractus gastro-intestinal. Il apparaît que le compartiment gastrique affecte la solubilisation des HAP liés au sol à travers l'augmentation du ratio liquide/solide (L/S). L'effet du ratio L/S s'explique par l'augmentation de la solubilité des HAP avec l'augmentation de la dissolution de la matière organique. Chez le monogastrique, l'extraction optimale est atteinte pour un ratio L/S de 40 (Van de Wiele *et al.*, 2004). Dans nos conditions expérimentales, le ratio L/S varie de 100 à 500, ce qui suppose que notre sol a été soumis à des conditions d'extraction extrêmes. Cependant, il faut noter qu'en dépit de ce ratio L/S élevé, l'effet du sol sur la rétention du Pyr est significatif (RB = 51% et 60% dans l'urine et le lait respectivement).

Parmi les autres paramètres qui caractérisent le tractus gastro-intestinal, il y a le pH, le microbiote et la bile. D'après la littérature (Hack et Selenka, 1996 ; Van de Wiele *et al.*, 2005 ; Gron *et al.*, 2007), seule la bile jouerait un rôle clé dans la solubilisation des HAP grâce à son effet surfactant (Tang *et al.*, 2006 ; Khan *et al.*, 2008). Par exemple, la bioaccessibilité du Pyr est multipliée par cinq en présence de bile ; quant au Phe, dont la solubilité est neuf fois supérieure à celle du Pyr, sa mobilisation dans le tractus gastro-intestinal est moins dépendante du contenu biliaire (Tang *et al.*, 2006).

Parmi les propriétés du sol qui gouvernent la biodisponibilité des HAP liés au sol, la teneur en matière organique est le facteur majeur qui contrôle la solubilisation des HAP dans la phase aqueuse (Luthy *et al.*, 1997 ; Pignatello, 1998 ; Bogan et Sullivan, 2003). La teneur de la matière organique, assimilée à la teneur en carbone organique du sol, est responsable de la faible désorbabilité des HAP du sol. Dans une moindre mesure, la fraction argileuse peut également réduire la biodisponibilité des HAP (Kadry *et al.*, 1995 ; Pu *et al.*, 2004). Ainsi, les mesures de biodisponibilité du Phe *in vivo* à partir de quatre sols (CO de 0,5 à 1,7% et argile de 8 à 38%) montrent que la biodisponibilité absolue de cette molécule varie entre 22 et 34% selon le sol. Une corrélation négative a été établie entre la biodisponibilité du Phe et l'augmentation de la teneur en matière organique et en argile (Pu *et al.*, 2004). De la même façon, Saghir *et al.* (2007) ont rapporté une BR de 56% pour le ¹⁴C-hexachlorobenzène administré dans du sédiment contenant de l'argile (15%) et du carbone organique (0,5%), suite à son ingestion dans de l'huile. Ainsi, le fort niveau en CO et en argile du sol utilisé dans notre étude (5 et 45% respectivement) peut constituer un élément explicatif de l'effet du sol sur la biodisponibilité du Pyr. Il apparaît clairement que les liaisons entre les contaminants et

les fractions du sol réduisent la quantité de contaminants solubles (potentiellement absorbables) dans l'environnement gastro-intestinal du ruminant. Les résultats obtenus tendent vers une corrélation entre le degré de séquestration des contaminants dans le sol et le poids moléculaire de ces composés.

5 Conclusion

Les résultats montrent que la chèvre en lactation absorbe au moins 36% de la dose de certains HAP ingérés. L'urine est la voie d'excrétion majeure des métabolites de HAP mono-hydroxylés.

Ces travaux indiquent que le sol réduit de façon limitée la biodisponibilité des HAP chez les ruminants. La réduction de la biodisponibilité est sensiblement liée au type de molécule considéré. L'effet du sol est significatif sur la biodisponibilité du Pyr (quatre cycles), tandis qu'il est négligeable pour le Phe (trois cycles).

CHAPITRE IV

Chapitre IV : Influence de la matière organique (carbone organique) du sol sur la bioaccessibilité des HAP mesurée *in vitro* : analyse quantitative des données de la littérature

1 Introduction

De nombreuses investigations ont tenté de simplifier l'estimation de la biodisponibilité des polluants contenus dans le sol, en mettant en place une approche chimique qui permettrait de mimer l'action d'un organisme vivant dans le sol. Il existe des méthodes dites « d'extraction sélective ». Elles utilisent des solvants organiques comme le butanol, ou des solutions aqueuses comme les oligosaccharides cycliques (cyclodextrine) qui présentent des cavités hydrophobes (McAllister et Semple., 2010). Ces méthodes chimiques permettent d'obtenir une appréciation générique de la biodisponibilité des polluants organiques persistants (PoP) du sol. Dans ce cas, la part bioaccessible représente la fraction du contaminant susceptible d'être disponible pour la dégradation, l'accumulation ou l'assimilation par un organisme (Semple *et al.*, 2003). D'autres investigations, mettant en œuvre des procédures physico-chimiques *in vitro*, ont mimé l'action du tractus digestif sur la bioaccessibilité des PoP chez l'homme et plus particulièrement chez l'enfant. Dans ce cas, la part bioaccessible représente la fraction solubilisée dans la lumière intestinale, susceptible d'être absorbée.

Les premières simulations des différents compartiments gastro-intestinaux pour estimer l'impact du sol sur la bioaccessibilité des polluants datent de 1973. Elles concernent les éléments en traces métalliques. Les travaux consacrés aux PoP ont été abordés dans les années 90. Les premières études ont été publiées par Rotard *et al.* (1992, 1995), qui ont étudié la mobilisation des PCDD/F à partir d'un sol de type scories rouges « Kieselrot ». Le modèle standard *in vitro* DIN, d'origine allemande, a été le premier développé, à partir des travaux menés par Rotard *et al.* (1995) puis par Hack et Selenka (1996). Notre recherche bibliographique a révélé plus de 25 références à ce sujet, avec des investigations menées *in vitro* sur les PoP (PCDD/F, PCB et HAP). Le groupe des HAP a été le plus étudié (75% des publications).

La méta-analyse est reconnue comme une démarche statistique permettant d'aboutir à une connaissance globale en compilant des résultats d'études indépendantes. Par exemple, Prankel *et al.* (2004) ont établi une loi de réponse de l'accumulation du cadmium dans le foie de mouton en fonction des apports alimentaires de cet élément. Nous avons appliqué cet outil statistique à une base de données que nous avons constituée en regroupant l'ensemble des études cherchant à déterminer l'impact du sol sur la bioaccessibilité des HAP *in vitro*. Le but

de cette méta-analyse est d'étudier l'impact des propriétés du sol, en particulier sa teneur en carbone organique, sur la bioaccessibilité gastro-intestinale des HAP qui y sont présents. Nous avons donc cherché à prédire la concentration de HAP bioaccessibles dans le sol (variable dépendante) en fonction des teneurs en HAP totaux et en carbone organique (variables indépendantes).

2 Matériel et méthodes

2.1 Collecte des données

L'étape première a été de répertorier l'ensemble des articles publiés sur le sujet en tenant compte des mots clés suivant : « bioaccessibilité », « polluants organiques », « sol », « *in vitro* ». Les articles assimilant l'accessibilité à la phase dissoute dans des solvants organiques n'ont pas été considérés. En effet, la finalité de ces études est d'estimer la part bioremédiable ou phytoremédiable des polluants contenus dans un sol (**Figure IV- 1**), ce qui n'entre pas dans notre problématique. Une base de données initiale a ainsi été constituée : elle comprend l'ensemble des études *in vitro* publiées entre 1995 et 2010. Elle comprend de plus un ensemble de données non publiées qui nous a été gracieusement transmis par Steven Siciliano (University of Saskatchewan). Au total, elle est constituée de 30 références et porte à la fois sur les PCB, les PCDD/F et les HAP.

La deuxième étape a été le tri des données. Les travaux simulant les conditions gastro-intestinales chez le ruminant ne concernent que deux publications sur les 30 références sélectionnées. La majorité des données contenues dans la base provient de méthodes qui se réfèrent aux paramètres physico-chimiques du tractus digestif chez le monogastrique (plus spécifiquement chez l'enfant). Le but de ces travaux était de déterminer la part de polluants organiques bioaccessibles présents dans les sols pour optimiser l'évaluation du risque sanitaire chez l'enfant.

D'autre part, les publications concernant les PCB et les PCDD/F ne sont pas assez nombreuses pour pouvoir alimenter une analyse quantitative de la littérature (méta-analyse). En effet, il existe seulement trois références concernant les PCB (Hack et Selenka, 1996 ; Pu *et al.*, 2006 ; Oomen *et al.*, 2000) et cinq références concernant les PCDD/F (Rotard *et al.*, 1992, 1995 ; Wittsiepe *et al.*, 2001 ; Fehling *et al.*, 2001 ; Ruby *et al.*, 2002). Une nouvelle base de données a donc été créée en sélectionnant les 22 références concernant la famille des HAP ; ces travaux sont résumés dans le tableau présenté en **Annexe IV- 1**.

Chapitre IV

Par la suite, seules les références comprenant au minimum deux sols étudiés dans des conditions expérimentales identiques ont été sélectionnées. L'objectif de cette sélection était de disposer d'une variabilité intra-référence permettant d'éviter de confondre, lors de l'analyse statistique, l'effet de la référence avec celui l'effet des paramètres du sol, sur la bioaccessibilité des HAP. Dans ce cadre, les articles dont le but était de déterminer l'effet de la maturation d'un sol unique sur la bioaccessibilité des HAP (Jin *et al.*, 1999 ; Reeves *et al.*, 2001 ; Lemasson *et al.*, 2003 ; Van de Wiele *et al.*, 2004 ; Jurjanz et Rychen, 2007) ont été écartés.

Étant donné que la séquestration dépend à la fois de la composition du géosorbant, des propriétés des contaminants hydrophobes et de leurs concentrations, nous nous sommes basés sur ces trois critères pour affiner notre sélection. Parmi les propriétés du sol, la matière organique (MO) a été décrite comme le paramètre déterminant qui régit la rétention des PoP et, par conséquent, la part potentiellement bioaccessible (Luthy *et al.*, 1997 ; Zimmerman *et al.*, 2004 ; Khan *et al.*, 2008). Ainsi, seules les références testant au moins deux sols dont les teneurs en carbone organique (CO) ou en MO étaient renseignées, ont été maintenues dans la base de données. Les publications de Hack et Selenka (1996), Hack *et al.* (1998), Holman (2000), pour lesquelles ces teneurs n'étaient pas renseignées, ont été écartées. Les teneurs en argile et en autres composants du sol, souvent non renseignées, n'ont pas été considérées dans la construction de la base de données.

Nous avons travaillé sur des mélanges de HAP plutôt que sur des molécules de HAP individuelles. Ainsi, les travaux entrepris par Sips *et al.* (2001), Pu *et al.* (2004), Minhas *et al.* (2006) et Vasiluk *et al.* (2007), qui ne portent que sur une seule molécule de HAP comme le Chrysène, le Phe ou le B[a]P, ont été également écartés (tableau en **Annexe IV- 1**).

Les études décrivant une contamination artificielle sans maturation avec souvent une concentration élevée de polluant, n'ont pas été retenues elles non plus. En effet, ce type de contamination pourrait ne pas permettre une interaction efficace entre les molécules organiques et les particules de sol (Sips *et al.*, 2001). Les données présentées dans l'article de Hassen *et al.* (2007) ont été également écartées car les résultats concernant les mêmes sols ont été publiés par Gron *et al.*, (2007), dont les travaux ont été maintenus dans la base de données. Dans notre étude, nous avons considéré la fraction bioaccessible de HAP dans l'ensemble du compartiment gastro-intestinal. En effet, la part extraite dans le compartiment stomacal seul n'en représente qu'une partie et de plus, l'effet surfactant des sels biliaries dans l'intestin est indispensable à la libération des molécules de HAP les plus hydrophobes et donc les plus toxiques. En général, la bioaccessibilité estimée dans le compartiment stomacal est plus faible

et présente une variabilité plus importante que lorsque le compartiment intestinal est également pris en compte (Khan *et al.*, 2008).

2.2 Variables sélectionnées et calculs

Dans la base de données, chaque sol est caractérisé par huit variables : la référence dont il est issu, son numéro d'ordre dans la référence, son origine (agricole, urbaine ou industrielle), le type de modèle *in vitro* mis en œuvre, le nombre de HAP pris en compte dans la somme de HAP, sa teneur en HAP totaux ($\mu\text{g/g}$), sa teneur en CO (%) et sa teneur en HAP soluble ($\mu\text{g/g}$). Dans la majorité des références sélectionnées, la bioaccessibilité est exprimée en proportion de la concentration totale de HAP dans le sol. La variable dépendante introduite dans les modèles est la concentration de HAP bioaccessibles exprimée en $\mu\text{g/g}$ de sol. Elle est calculée comme le produit de la teneur en HAP totaux ($\mu\text{g/g}$ de sol) par la bioaccessibilité.

Lorsque seule la teneur en MO est présentée, la teneur en CO est calculée en appliquant le facteur de conversion standard connu sous le nom de « facteur de van Bemmelen » :

$$CO = \frac{MO}{1,724}, \text{ en admettant l'hypothèse selon laquelle le carbone organique représente 58\% de}$$

la matière organique (Pribyl, 2010).

Chapitre VI

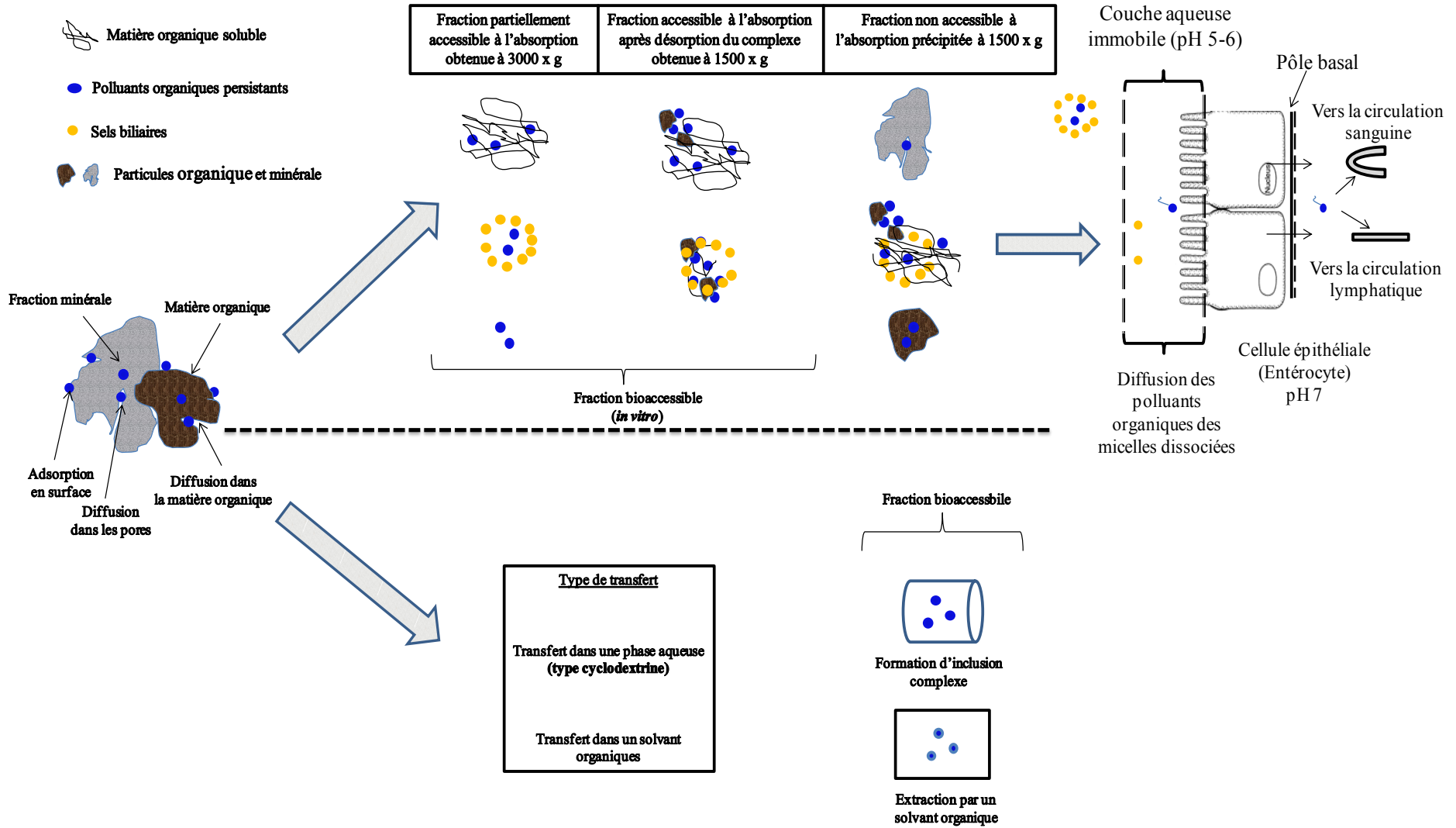


Figure IV -1 : Méthodologies d'estimation de la bioaccessibilité des PoP du sol par des méthodes physico-chimiques et chimiques (Van de Wiele, 2005 ; McAllister et Semple, 2010)

2.3 Méta-dispositif

La sélection a conduit à une base de données comprenant neuf références, publications ou ensemble de données non publiées, comparant différents sols dans les mêmes conditions. Une seule référence correspond à des données non publiées qui nous ont été transmises par Steven Siciliano (Siciliano *et al.*). Chacune de ces références porte sur quatre à dix-huit sols si bien qu'au total la base comprend 90 sols (N_{sol} points expérimentaux). Le test *in vitro* qui y est majoritairement utilisé est le PBET (voir **Annexe IV- 2**).

Dans cette base de données deux populations se distinguent par leurs origines. Il apparaît que les sols urbains ou agricoles se distinguent des sols industriels par leurs teneurs en HAP et en CO. Les teneurs en HAP des sols urbains ou agricoles sont 100 voire 1000 fois inférieures à celles des sols industriels. La même tendance est constatée pour les teneurs en CO, puisque les teneurs moyenne et maximale en CO des sols urbains ou agricoles sont de l'ordre de 10 fois inférieures aux teneurs rencontrées dans les sols industriels. La base de données a donc été fractionnée en deux groupes en fonction de l'origine de la contamination : les sols urbains ou agricoles (cinq références, 52 sols, **Figure IV- 2a**) et les sols industriels (six références, 38 sols, **Figure IV- 2b**). Chacune des deux bases de données a été traitée séparément.

L'examen graphique de la structure de chacune des deux bases nous a conduit à procéder à l'élimination supplémentaire de quelques données. Il s'agit de points qui se détachent nettement du reste de la population, et qui risqueraient d'exercer un effet levier important et de biaiser les modèles. Ainsi, un sol de la catégorie « urbains ou agricoles » issu des travaux de Tang *et al.* (2006) a été éliminé en raison d'une teneur élevée en HAP atteignant 27 $\mu\text{g/g}$. Un sol industriel issu des travaux de Stroo *et al.* (2005) a été écarté en raison d'une teneur en CO anormalement élevée (88%). Les neuf sols étudiés par Holman (2000), en dehors du nuage de points global, ont également été éliminés. Au total dix sols ont donc été éliminés du groupe des sols industriels.

Enfin, afin de ne considérer que les sols présentant un risque important, une concentration minimale de 1 μg de HAP /g de sol a été fixée. Cela a conduit à l'élimination de 22 sols parmi les sols urbains ou agricoles. Tous les sols industriels se situaient au-dessus de ce seuil.

Pour ces sols industriels, au vu de la dispersion encore importante des données (**Figure IV- 3**), les données trop écartées du nuage de points, avec un carbone organique supérieur à 30% ou une concentration de HAP supérieure à 500 $\mu\text{g/g}$, ont été éliminées (huit sols), aboutissant à une base de données de $n=20$ sols issus de trois références. Cette restriction réduit

Chapitre IV

considérablement la portée des modèles générés par rapport à la population des sols industriels. Cependant, ces modèles seront utilisés pour être comparé avec les modèles obtenus sur les sols urbains et agricoles.

La description des deux bases de données finales (sols urbains ou agricoles, et sols industriels) est présentée au **Tableau IV- 1**.

Le test de corrélation de Pearson appliqué au groupe de sols urbains ou agricoles (**Figure IV- 4**) révèle une liaison entre les variables indépendantes ($n = 29$, $R^2 = 0,394$, $P = 0,035$). Pour des sols industriels (**Figure IV- 5**) les deux variables sont non corrélées ($n= 20$, $R^2 = 0,160$, $P = 0,48$).

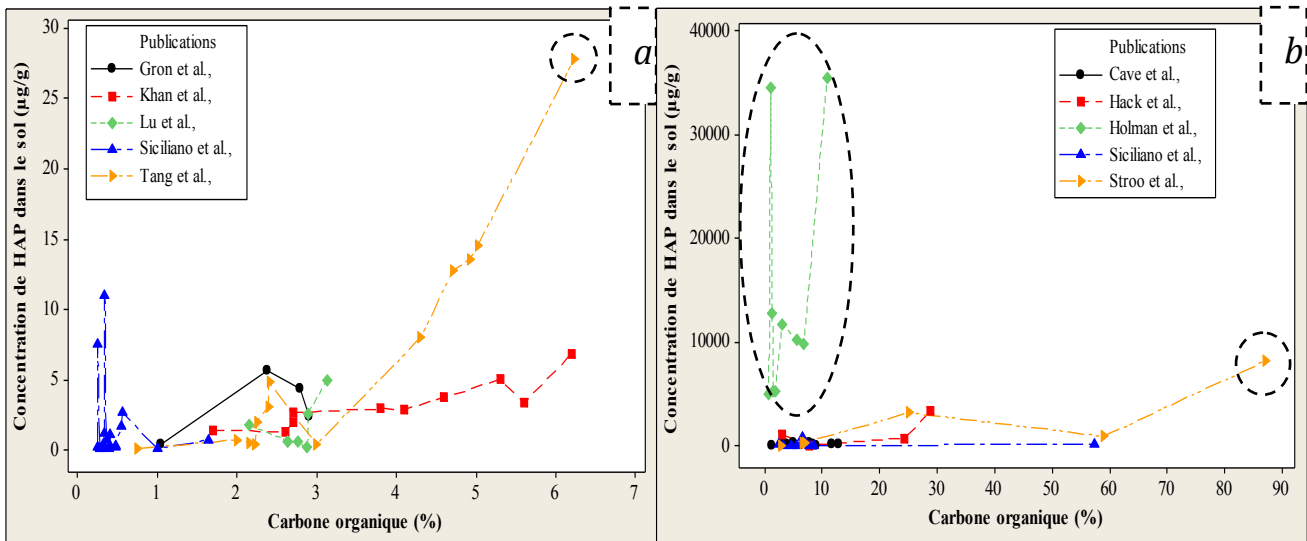


Figure IV- 2 : Relation intra-référence entre les variables indépendantes (teneurs en HAP (µg/g) et en CO (%)) pour les 52 sols urbains ou agricoles (a) et les 38 sols industriels (b). Chaque point correspond à un sol.

Les points entourés correspondent aux points éliminés des bases de données

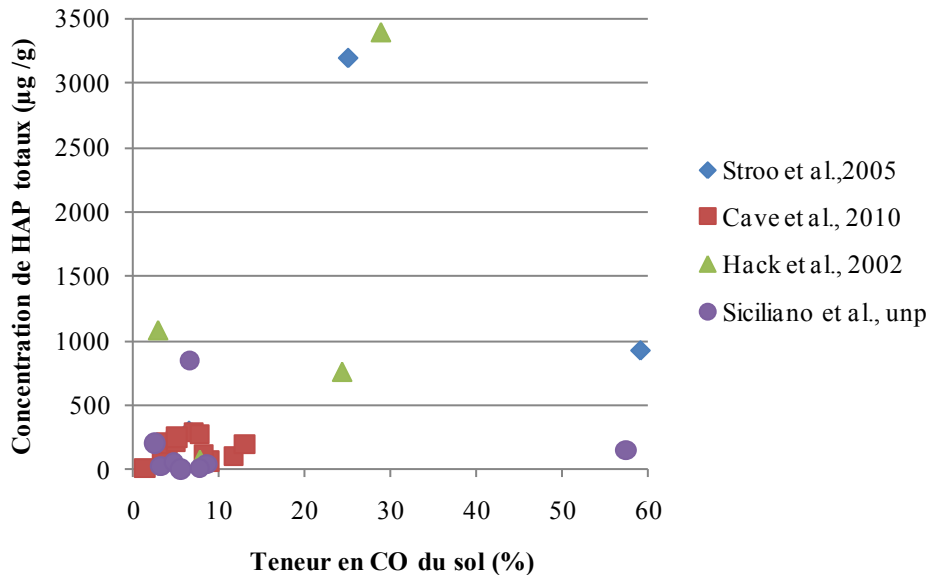


Figure IV- 3 : Relation intra-référence entre les variables indépendantes (teneurs en HAP (µg/g) et en CO (%)) pour la base comprenant 28 sols industriels. Chaque point correspond à un sol.

Chapitre IV

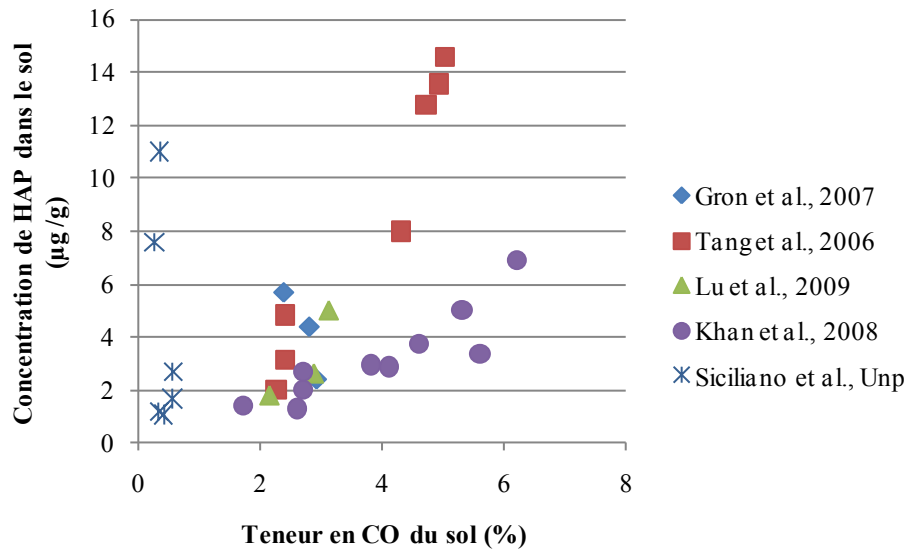


Figure IV- 4 : Relation intra-référence entre les variables indépendantes (teneurs en HAP (µg/g) et teneur en CO (%)) pour la base comprenant 29 sols urbains ou agricoles. Chaque point correspond à un sol.

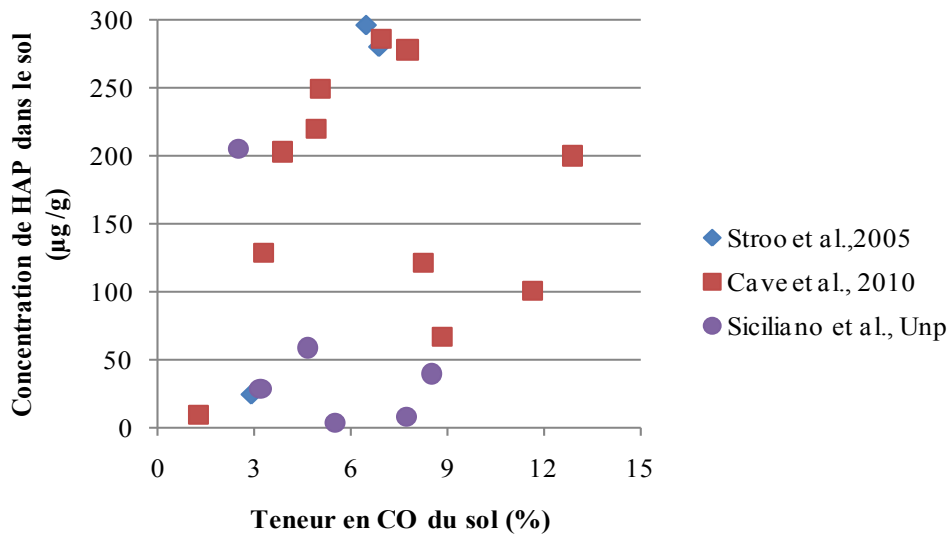


Figure IV- 5 : Relation intra-référence entre les variables indépendantes (teneurs en HAP (µg/g) et teneur en CO (%)) pour la base comprenant 20 sols industriels. Chaque point correspond à un sol.

Chapitre IV

Tableau IV- 1 : Description des variables indépendantes

Référence	Nsols	Nb HAP	Modèle <i>in vitro</i>	Concentration de HAP ($\mu\text{g/g}$)				Teneur en CO (%)			
				Moyenne	Médiane	Min	Max	Moyenne	Médiane	Min	Max
Sols urbains ou agricoles											
Gron <i>et al.</i> , 2007	3	16EPA	RIVM	4,17	4,4	2,43	5,69	2,69	2,79	2,38	2,91
Tang <i>et al.</i> , 2006	7	16EPA	PBET	8,41	7,98	1,99	14,6	3,71	4,3	2,25	5,02
Lu <i>et al.</i> , 2009	3	16EPA	PBET	3,14	2,62	1,79	5,01	2,72	2,89	2,15	3,13
Khan <i>et al.</i> , 2008	10	16EPA	PBET	3,23	2,92	1,31	6,89	3,93	3,95	1,7	6,2
Siciliano <i>et al.</i> , Unp*	6	16EPA	SHIME	4,21	2,19	1,07	11	0,41	0,37	0,25	0,559
Total	29			4,77	3,13	1,07	14,6	2,9	2,7	0,25	6,2
Sols industriels											
Stroo <i>et al.</i> , 2005	3	16EPA	LNBL	200	280	24	296	5,43	6,5	2,9	6,9
Cave <i>et al.</i> , 2010	11	6*	DIN	170	201	9,9	287	6,79	6,94	1,27	12,9
Siciliano <i>et al.</i> , Unp**	6	16EPA	RBALP	57,4	34	3,35	206	5,34	5,07	2,49	8,5
Total	20			141	125	3,35	296	6,15	6	1,27	12,9

16^{EPA} : les concentrations ont été établies sur la somme des 16 HAP listés par l'US EPA,

6* : Benzo[*a*]anthracène, Benzo[*b*]fluoranthène, Benzo[*k*]fluoranthène, Benzo[*a*]pyrène,
Dibenzo[*a,h*]anthracène, Indeno[*1,2,3-c,d*]pyrène,

Siciliano *et al.*, Unp* : données non publiées.

3 Analyse statistique

Les données ont été analysées avec la procédure GLM du logiciel Minitab. L'effet fixe de la référence a été introduit dans le modèle afin de prendre en compte la variabilité inter-référence qui peut parfois excéder celle induite expérimentalement à l'intérieur des références (Sauvant *et al.*, 2008). Cet effet agrège des facteurs tels que les caractéristiques du modèle *in vitro* comme le ratio liquide/solide ou la masse de la prise d'essai ou encore le mode de séparation de la fraction dite bioaccessible et les méthodes analytiques utilisées.

L'examen graphique de la relation entre les concentrations de HAP solubles et totaux dans les sols, suggère une réponse de type quadratique dans le cas des sols agricoles et urbains, et linéaire dans le cas des sols industriels (**Figure IV- 6**).

Notre objectif étant de tester l'effet du CO sur l'accessibilité des HAP du sol, le modèle suivant a été ajusté sur chacune des deux bases :

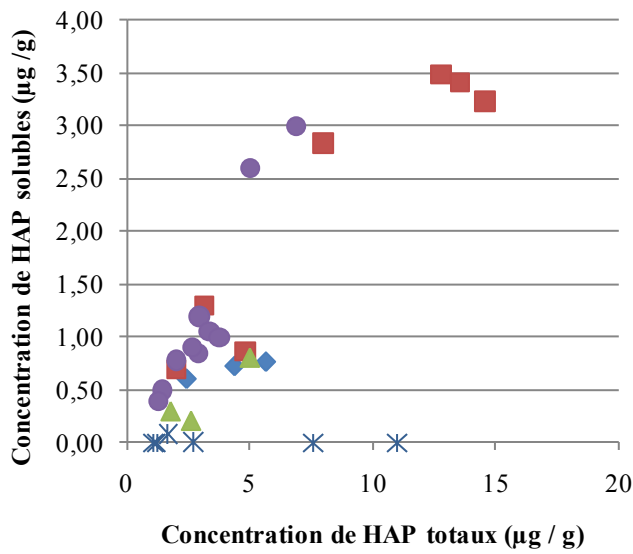
$$\text{HAPsol}_{ij} = a + a_i + b \text{HAPtot}_{ij} + c \text{CO}_{ij} \text{HAPtot}_{ij} + d \text{HAPtot}_{ij}^2 + e \text{CO}_{ij} \text{HAPtot}_{ij}^2 + e_{ij}$$

où HAPsol_{ij} est la concentration de HAP solubles ($\mu\text{g/g}$ de sol) obtenue lors de l'essai i avec un sol j présentant les teneurs en HAP totaux HAPtot_{ij} ($\mu\text{g/g}$ de sol) et en CO CO_{ij} ($\text{g}/100\text{g}$ de sol). Le paramètre a est l'ordonnée à l'origine ; la somme des effets a_i dus à chaque expérimentation étant nulle, b et d sont respectivement les composantes linéaire et quadratique de la réponse de HAP_{sol} à la concentration de HAP totaux dans le sol, d et e sont respectivement les composantes linéaire et quadratique de la réponse de HAP_{sol} à la concentration de HAP totaux dans le sol en interaction avec sa teneur en CO et e_{ij} est l'erreur résiduelle.

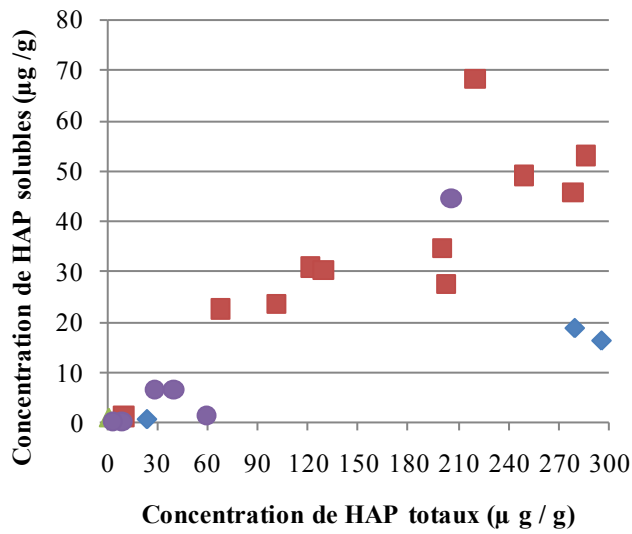
Les variables non significatives sont éliminées séquentiellement du modèle. Les modèles n'ont pu être validés par un jeu de données externes car nous avons utilisé l'ensemble des données disponibles à notre connaissance pour les calibrer.

4 Résultats

Les résultats sont présentés dans le **Tableau IV- 2** et dans les **Figure IV- 7 et IV- 8**. Dans les sols agricoles ou urbains, la prédiction de HAP_{sol} en fonction de HAP_{tot} et de CO est obtenue avec un coefficient de détermination de 0,96 et un écart type résiduel de 0,264 $\mu\text{g/g}$ de sol,



a



b

Figure IV- 6 : Concentration de HAP solubles en fonction de la concentration de HAP totaux dans les sols urbains ou agricoles (n=29) (a) et industriels (n=20) (b).

(Interactions $CO \cdot HAP_{tot}$ et $CO \cdot HAP_{tot}^2$, $P < 0,001$).

Chapitre IV

soit un coefficient de variation résiduelle de 1,1%. Les HAP_{sol} répondent de façon linéaire et quadratique à HAP_{tot} , les deux termes étant modulés par la teneur en CO du sol.

Cette relation permet d'estimer que la bioaccessibilité des HAP, qui est le rapport entre HAP_{sol} et HAP_{tot} , est de la forme $0,0881CO \hat{R} 0,00323 HAP*CO$. La bioaccessibilité diminue donc lorsque la teneur en HAP du sol augmente. L'ordonnée à l'origine et la pente de cette relation linéaire dépendent de la teneur en CO du sol.

Ainsi, l'augmentation de la teneur en CO des sols urbains ou agricoles entraîne une augmentation de la bioaccessibilité des HAP d'autant plus importante que la teneur en HAP du sol est faible. L'augmentation de la bioaccessibilité due à l'augmentation de la teneur en CO du sol de 1% est de 0,082 et de 0,049 pour des sols contenant respectivement 2 et 12 $\mu\text{g/g}$ de HAP (**Figure IV- 9**). La bioaccessibilité des HAP diminue avec l'augmentation de leur concentration dans le sol, d'autant plus rapidement que la teneur en CO du sol est élevée. Pour un sol contenant 1,5% de CO la bioaccessibilité diminue de 0,0048 par μg de HAP. Cette diminution est de 0,018 par μg de HAP pour un sol contenant 5,5% de CO.

Pour les sols industriels, la prédiction de HAP_{sol} en fonction de HAP_{tot} est de moins bonne qualité que la prédiction obtenue pour les sols urbains et agricoles. Le modèle est ajusté avec un coefficient de détermination de 0,80 et un écart type résiduel de 9,95 $\mu\text{g/g}$ de sol, soit un coefficient de variation résiduelle de 41%. La réponse de HAP_{sol} à HAP_{tot} est linéaire. Le terme HAP_{tot} n'est pas modulé par la teneur en CO du sol ($CO*HAP_{tot}$, $P>0,10$). Selon notre modèle, la bioaccessibilité des HAP présents dans les sols industriels est indépendante de leur concentration et de la teneur en CO du sol. Elle est de 0,146 quelles que soient la teneur en CO et la concentration de HAP_{tot} (**Figure IV- 9**).

Selon nos modèles, la bioaccessibilité des HAP du sol augmente donc significativement avec la teneur en CO des sols urbains ou agricoles, tandis qu'elle en est indépendante dans les sols industriels (**Figure IV- 9**).

Chapitre IV

Tableau IV- 2 : Ajustement de la concentration de HAP solubles ($\mu\text{g/g}$ sol) en fonction de la concentration de HAP totaux ($\mu\text{g/g}$ sol) et de carbone organique ($\text{g}/100 \text{ g}$) dans les sols urbains ou agricoles¹ et dans les sols industriels²

Concentration de HAP solubles				
Modèle	sols urbains ou agricoles ¹ ($\mu\text{g/g}$ de sol)		sols industriels ² ($\mu\text{g/g}$ de sol)	
	Coefficient	<i>Probabilité</i>	Coefficient	<i>Probabilité</i>
Ordonnée à l'origine		NS		NS
CO . HAP _{tot}	0,0881	***	0,146	***
CO . HAP _{tot} ²	-0,00323	***		
R ²	0,955		0,80	
ETR	0,264		9,95	

¹**n**= 29, les limites de validité sont $1,07 < \text{HAP}_{\text{tot}} < 14,6 \mu\text{g/g}$ sol et $0,25 < \text{CO} < 6,2\%$,

²**n** =20, les limites de validité sont $3,35 < \text{HAP}_{\text{tot}} < 296 \mu\text{g/g}$ sol et $1,27 < \text{CO} < 12,9\%$,

Le modèle inclut l'effet fixe de la référence,

NS, $P > 0,1$,

*, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$,

HAP_{tot}, Concentration de HAP dans le sol ($\mu\text{g/g}$ de sol) ; CO, teneur en carbone organique du sol (%).

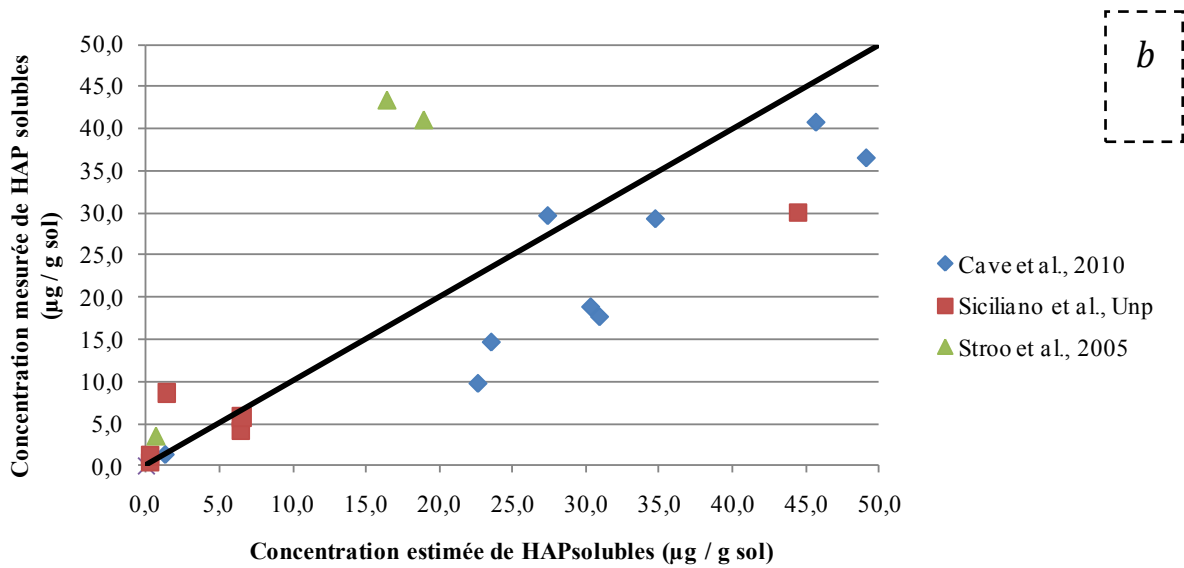
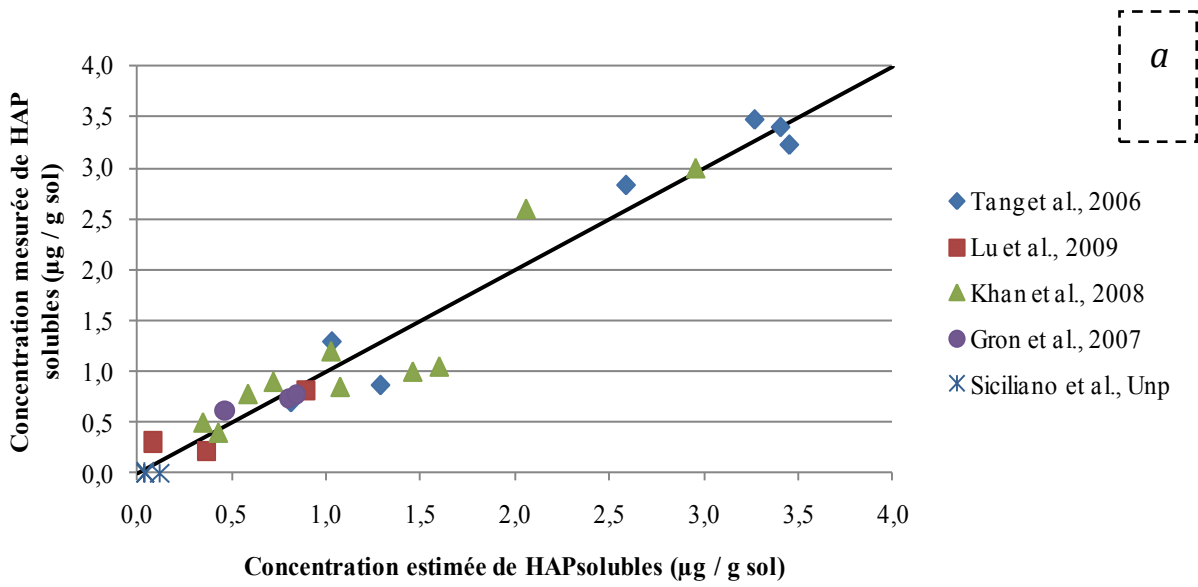
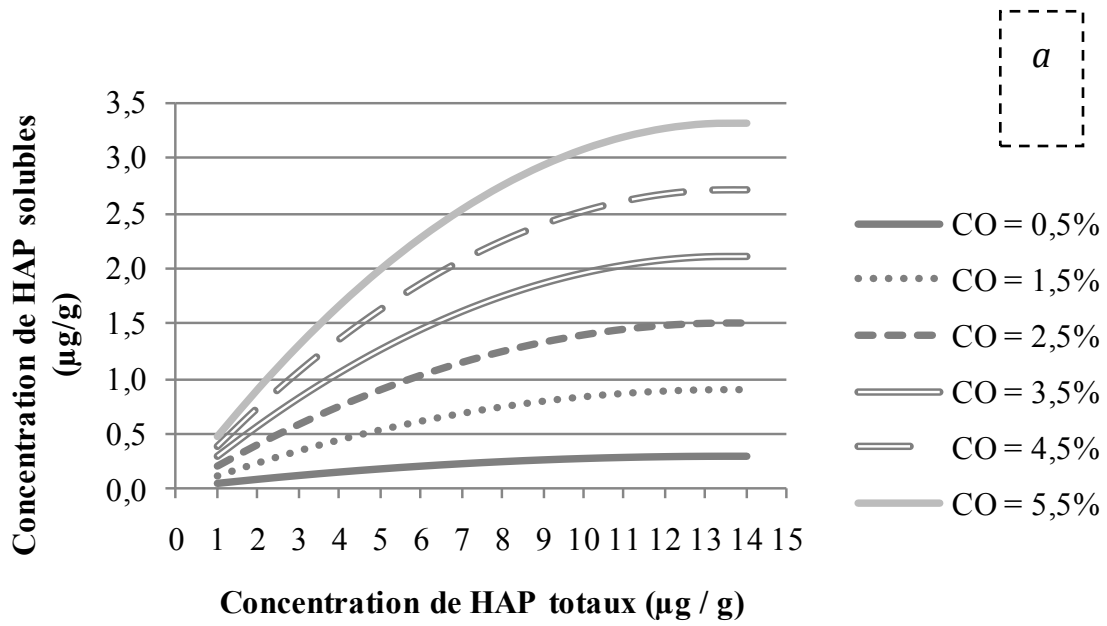
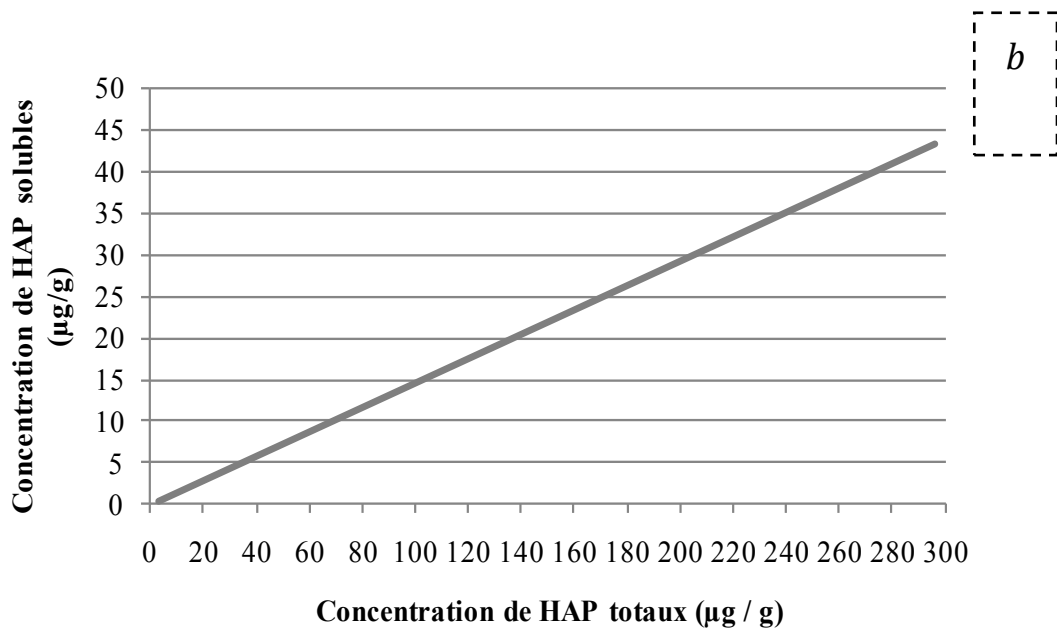


Figure IV- 7 : Relation entre les concentrations estimées et mesurées de HAP solubles dans les sols urbains ou agricoles (a) (n=29) et les sols industriels (b) (n=20).

Les paramètres des modèles sont présentés au **Tableau IV- 2**



Les limites de validité sont $1,07 < \text{HAP}_{\text{tot}} < 14,6 \mu\text{g/g sol}$ et $0,25 < \text{CO} < 6,2\%$



Les limites de validité sont $3,35 < \text{HAP}_{\text{tot}} < 296 \mu\text{g/g sol}$ et $1,27 < \text{CO} < 12,9\%$

Figure IV- 8 : Estimation de la concentration de HAP solubles en fonction de la concentration de HAP totaux dans les sols urbains ou agricoles (a) et industriels (b) présentant des teneurs en CO variables.

Les paramètres des modèles sont présentés au **Tableau IV- 2**

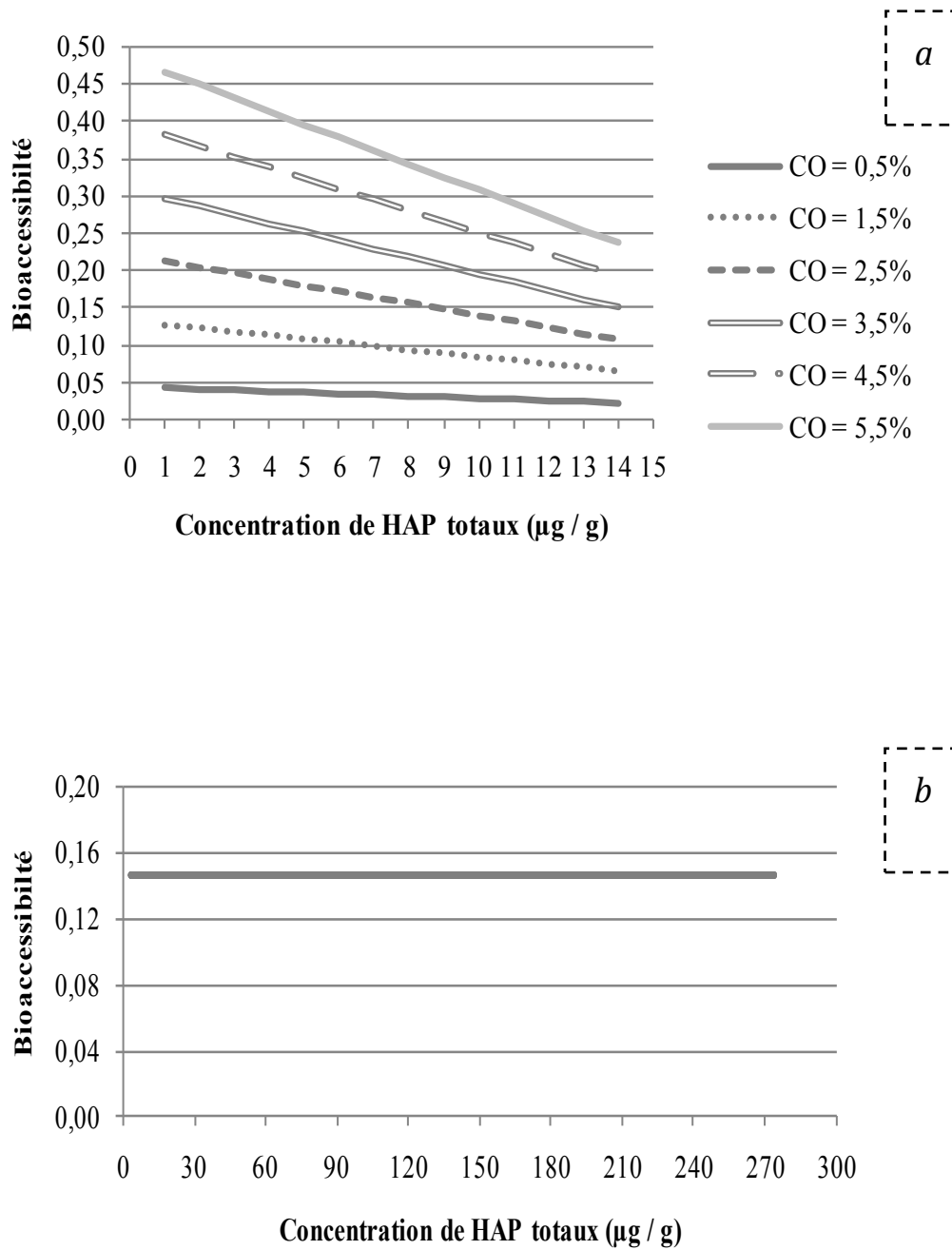


Figure IV- 9 : Estimation de la bioaccessibilité des HAP en fonction de leur concentration dans les sols urbains ou agricoles (a) et industriels (b) présentant des teneurs en CO variables.

Les paramètres des modèles sont présentés au **Tableau IV- 2**

5 Discussion

Les modèles ajustés n'ont pas pu être validés faute de jeu de données externes. Cette absence de validation limite leur portée. Cependant, ils apportent des informations essentielles sur les mécanismes régissant la bioaccessibilité des HAP du sol.

La corrélation positive entre les teneurs en CO et en HAP dans les sols urbains et agricoles n'est pas surprenante. En effet, la matière organique du sol joue le rôle de puits principal des HAP (Appert-Collin *et al.*, 1999). Les restrictions opérées lors de la constitution de l'échantillon de sols industriels retenu dans notre base de données, avec l'élimination des sols les plus riches en HAP et en CO, est peut-être à l'origine de cette absence de corrélation entre les teneurs en HAP et CO. En ce sens, l'échantillon retenu n'est probablement pas représentatif de la population des sols industriels. Le modèle ajusté est cependant utile comme élément d'interprétation des résultats obtenus sur les sols urbains et agricoles.

Selon les modèles présentés, la bioaccessibilité des HAP présents dans les sols urbains et agricoles est d'autant plus faible que les sols sont riches en HAP. De plus, la présence de quantités importantes de CO favorise la bioaccessibilité des HAP. Celle-ci varie entre 0,45 et 0,03 pour des sols contenant respectivement 1 µg de HAP et 55 g de CO/kg, et 14 µg de HAP et 10 g de CO/kg. Au contraire, la bioaccessibilité des HAP présents dans les sols industriels sélectionnés dans notre base de données se situe aux alentours de 0,15, indépendamment de leur concentration et de leur teneur en CO dans le sol.

Compte tenu de la corrélation entre les concentrations de CO et de HAP dans les sols urbains et agricoles, il est difficile de distinguer leurs effets respectifs sur la bioaccessibilité des HAP. Cette corrélation est probablement le reflet du rôle privilégié de la matière organique dans la fixation des HAP dans les sols (Appert-Collin *et al.*, 1999). Par conséquent, il est également probable que cette fraction du sol contribue de façon significative aux phénomènes de sorption/désorption des contaminants organiques du sol (Huang *et al.*, 2003) et pilote leur accessibilité. C'est pourquoi, en dépit de cette corrélation, nous avons maintenu les deux variables dans le modèle et interprété les résultats en termes d'impact de la concentration de MO dans les sols sur l'accessibilité des HAP.

La différence entre sols urbains ou agricoles et sols industriels peut avoir pour origines la nature de la matière organique qui s'y trouve, ainsi que la source de contamination.

Dans les régions urbaines ou agricoles, la contamination par les HAP des sols s'effectue principalement par les retombées atmosphériques (phase gazeuse et particulaire). Les retombées atmosphériques particulières sont constituées de suie émise par les moteurs Diesel ou lors de la combustion du charbon ou du bois (Afsset, 2007). De plus, la matière organique

Chapitre IV

présente dans l'horizon H0 de ces sols est en grande proportion d'origine naturelle de type « humus » initialement dépourvue de HAP. Elle est composée d'acides fulviques, humiques et d'humine. Yang *et al.* (2010) ont montré que 63 à 95% des HAP contenus dans ce type de sol sont associés à l'acide fulvique. Au contraire, les sols industriels sont contaminés suite à une activité humaine intense et la matière organique qui s'y trouve est principalement de type anthropogénique, chargée en HAP.

En milieu aqueux, les acides fulviques et humiques solubles forment entre eux des complexes à structure micellaire, avec une phase hydrophile à l'extérieur et un cœur hydrophobe au centre (Engebretson et Von Wandruzka, 1994). Cette structure auto-organisée facilite la solubilisation des HAP. Lors de la digestion, cette solubilisation est particulièrement efficace du pH neutre rencontré dans l'intestin (Yang *et al.*, 2001 ; Minhas *et al.*, 2006). Ces acides constitutifs de la matière organique des sols urbains et agricoles facilitent donc la désorption des HAP du sol, en accord avec l'effet positif sur l'accessibilité de la variable CO dans le modèle que nous avons ajusté. Cet effet pourrait s'apparenter à l'action des nutriments comme la poudre de lait, ajoutés dans les tests *in vitro* et qui augmentent de façon significative (facteur moyen de 4) la bioaccessibilité des polluants organiques de plusieurs types de sols (Hack et Selenka, 1996 ; Witssiepe *et al.*, 2001 ; Van de Wiele *et al.*, 2004)

La diminution de l'accessibilité des HAP avec l'augmentation de leur concentration dans les sols urbains ou agricoles pourrait avoir pour origine des phénomènes d'hystérèse. Ces phénomènes ont été observés lors d'expériences destinées à déterminer les isothermes d'adsorption et de désorption sur des sols industriels riches en matière organique complexe comme le « *black carbon* » (Pignatello et Xing, 1995 ; Nam *et al.*, 2003b). Bien que ces phénomènes n'aient pas été rapportés pour des sols urbains ou agricoles, il est possible que la suie y joue un rôle équivalent à celui du *black carbon*. Les particules de suie qui se déposent sur les sols urbains ou agricoles sont composées de carbone sphérique (graphite), et sont poreuses. Ces caractéristiques ménagent une surface d'adsorption importante qui permet de piéger les polluants tels que les HAP.

Les sols industriels prélevés des cokeries et de l'industrie pétrolière et gazière, sont généralement riches en matière organique de type *black carbon* (Laor *et al.*, 1999). Ce type de matière organique (par exemple, le goudron ou la houille) est issu de conditions extrêmes de pression et/ou de température rencontrées lors de phénomènes géologiques (fossilisation) et de procédés industriels (combustion). Elle est composée de feuillets aromatiques superposés et présente une surface spécifique et une microporosité élevées (Kwon et Pignatello, 2005 ; Brandli *et al.*, 2008). Contrairement à l'humus, elle est souvent très condensée physiquement (ratio H/C faible) et réduite chimiquement (Weber et Lanno, 2001). Pour ces raisons, elle est

très peu soluble en milieu aqueux, qu'il soit acide ou basique. En particulier, aucun élément constitutif du sol ne permet d'en faciliter la désorption, contrairement aux phénomènes observés dans les sols urbains ou agricoles. L'absence d'humus expliquerait donc l'absence d'interaction CO*HAP dans le modèle que nous avons ajusté. Dans ce type de sol, comme dans les sols de type urbain ou agricole, nous nous attendions *a priori* à une diminution de l'accessibilité des HAP avec l'augmentation de leur concentration, résultat des phénomènes d'hystérèse. Or, dans notre modèle, la concentration de HAP solubles était strictement proportionnelle à la concentration de HAP totaux. L'absence de terme quadratique (HAP² ou CO*HAP²), si HAP et CO sont corrélés, pourrait avoir pour origine la restriction de la base de données sur laquelle nous avons travaillé, aux sols les moins concentrés en HAP et en MO. Notre travail ne permet pas de statuer sur ce point.

Cette méta-analyse permet donc d'explicitier les conclusions données par certains auteurs à l'issue d'études expérimentales menées *in vivo* ou *in vitro* (Gustafsson *et al.*, 1997 ; Salloum *et al.*, 2002 ; Pu *et al.*, 2004 ; Gron *et al.*, 2007). En particulier, les rôles distincts de la source de la contamination et du type de matière organique présente dans le sol ont été précisés. L'humus présent dans les sols urbains et agricoles favorise l'accessibilité des HAP, surtout pour des niveaux de contamination faibles. Au contraire, l'accessibilité des HAP des sols industriels n'est pas influencée par la matière organique anthropogénique, elle-même vecteur de HAP.

Le manque de renseignements sur les autres paramètres du sol comme la teneur en argile, ne nous a pas permis d'explorer l'impact du complexe argilo-humique sur la bioaccessibilité des HAP du sol.

6 Conclusion

L'objectif principal de cette méta-analyse était de compiler les données quantitatives recueillies dans la bibliographie afin de quantifier l'impact de la matière organique du sol sur la bioaccessibilité des HAP dans le tractus gastro-intestinal. Compte tenu des données disponibles dans la littérature, nos modèles ont été ajustés sur des échantillons restreints et n'ont pas pu être validés. Cependant, ils permettent clairement de distinguer la population des sols urbains et agricoles de celle des sols industriels. D'autre part, les teneurs en HAP et en MO des premiers sont souvent plus élevées que celles des seconds.

L'ajustement des modèles nous a par ailleurs permis de mettre en évidence le rôle important de l'humus des sols agricoles dans la modulation de l'accessibilité des HAP.

CHAPITRE V

Chapitre V : Discussion générale

Les ruminants sont exposés aux contaminants organiques *via* l'ingestion involontaire de sol. Il est donc essentiel de connaître l'effet du sol sur leur biodisponibilité afin de préciser leur transfert vers les produits animaux. En effet, certaines réactions chimiques (adsorption, diffusion) entre les particules du sol et les polluants organiques peuvent induire une réduction de la part dite «biodisponible».

Parmi les propriétés du sol, la matière organique a été largement décrite dans la littérature comme étant l'élément central régissant ces interactions. De même, parmi les propriétés chimiques des composés organiques, la lipophilicité a été citée comme le facteur modulant la biodisponibilité.

Dans ce travail de thèse, des investigations ont été menées pour mesurer l'influence du sol sur la biodisponibilité des PoP. Ainsi, ces travaux ont concerné des sols contenant des molécules fortement biotransformées (HAP) et d'autres faiblement biotransformées (PCB). Ces investigations ont été par la suite complétées par une méta-analyse dans le but de récolter un maximum d'informations sur le rôle du sol et de ses propriétés sur la bioaccessibilité des PoP. Cette discussion dressera tout d'abord un bilan de toutes les études réalisées. Puis, une estimation de la biodisponibilité orale des HAP du sol chez le ruminant, permettra de mieux appréhender l'effet de chacun des processus impliqués dans la mesure de la biodisponibilité. Enfin, nous évaluerons la pertinence des études réalisées et discuterons des perspectives des recherches à venir.

1 Bilan du transfert des PoP du sol vers les ruminants laitiers

Les résultats obtenus dans les chapitres II et III démontrent que la biodisponibilité des PoP du sol dans l'animal est conséquente et révèle donc la nécessité de prendre en compte cette source de contamination pour l'évaluation du transfert. Les teneurs retrouvées dans les produits animaux sont comparables à celles obtenues *via* des matrices alimentaires contaminées (Grova *et al.*, 2004 ; Costera *et al.*, 2006 ; Lutz *et al.*, 2006). Le faible impact de la matrice sol sur la biodisponibilité des PoP chez le polygastrique pourrait être expliqué par les fortes conditions d'extraction (par exemple un ratio solide/liquide important et la présence d'aliment) auxquelles sont soumis les sols. Cependant, les interactions physico-chimiques « sol-HAP » semblent limiter la biodisponibilité de certains HAP. Si l'impact du sol sur la biodisponibilité du Phe est limité (molécule à trois cycles), la réduction de la biodisponibilité

du Pyr a été estimée à 50% (molécule à quatre cycles), tandis que les interactions des éléments du sol avec les PCB ne semblent pas réduire leur biodisponibilité.

Cependant, une autre investigation menée *in vivo* avec le même principe de mesure de la biodisponibilité relative appliquée aux HAP a été adaptée aux PCB-NDL (**Figure V- 1**). Il s'agit d'un sol contaminé accidentellement à la suite d'un incendie industriel. Les résultats préliminaires obtenus semblent montrer une forte implication de la lipophilicité des PCB-NDL dans la variation de la biodisponibilité (BR varie de 45 à 100%).

Ces travaux menés *in vivo* ont été complétés par une méta-analyse (chapitre IV) qui a permis de générer une équation reliant la bioaccessibilité des HAP dans le tractus digestif de l'enfant aux concentrations des HAP et aux teneurs en MO dans le sol. Ces deux dernières valeurs ont été obtenues avec de fortes conditions de digestion en présence d'aliments. Ainsi, la bioaccessibilité a varié de 2 à 47%. Bien qu'estimées dans les conditions de tractus digestion humain, ces bioaccessibilités permettent néanmoins de mettre en évidence les sols potentiellement à risque pour le ruminant laitier. Il ressort de cette démarche que le couple concentration des HAP et teneur en matière organique régit la bioaccessibilité des HAP.

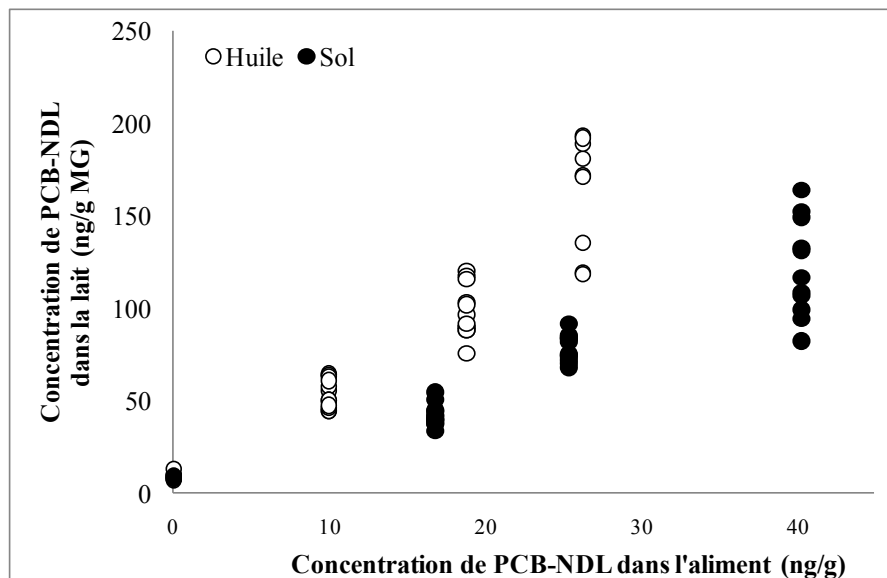


Figure V- 1 : Relation dose-réponse entre la concentration de PCB-NDL ingérée dans l'aliment et la concentration de PCB excrétée dans le lait.

2 Estimation de la biodisponibilité avec l'exemple des HAP du sol

Le choix des HAP a été motivé par le manque de données disponibles sur les autres familles de polluants. Nous nous sommes attelés à calculer les facteurs (voir **Figure V- 2** ci-dessous) associés à chacune des étapes déterminant la biodisponibilité des HAP du sol chez le

Discussion générale

ruminant. La biodisponibilité est assimilée à la dose interne, produit de facteurs calculés à partir des données récoltées dans nos travaux de thèse mais également de données tirées de la littérature si nécessaire.

Le calcul se structure en trois composantes déterminées comme suit :

Le facteur de bioaccessibilité (Fb) est la fraction du polluant qui sera solubilisée dans le tractus gastro-intestinal. Elle est soumise à l'action de l'environnement digestif et varie en fonction des propriétés du sol et des molécules, et de la concentration en polluants. Cette fraction a été estimée à partir du modèle généré par la méta-analyse (voir chapitre IV page 133). Ainsi, cette fraction bioaccessible du polluant du sol dans le tractus digestif peut varier de 0,02 à 0,47 (voir chapitre IV section 4 page 143).

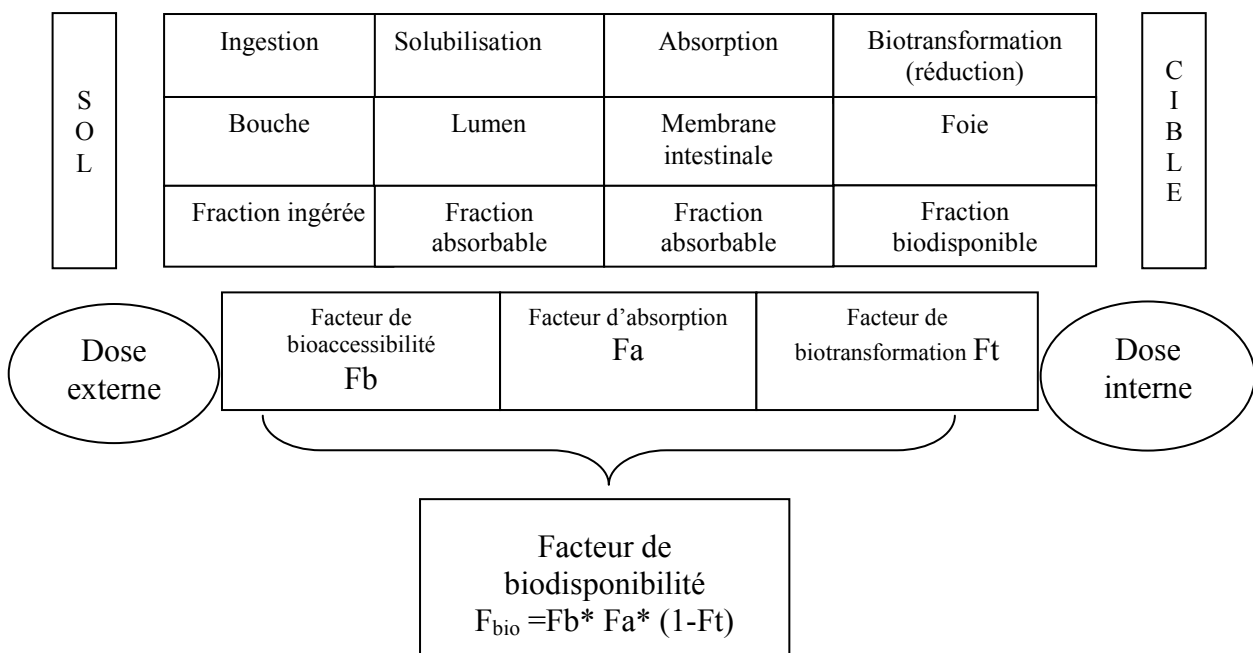


Figure V- 2 : Etapes majeures du calcul de la biodisponibilité orale des PoP du sol.

Le facteur d'absorption (Fa) est la fraction du polluant absorbée à travers la barrière intestinale et qui se retrouve dans la veine porte. Les études menées par Cavret *et al.* (2003, 2005b) chez l'espèce porcine et sur Caco 2 ont révélé que le Phe, le Pyr et le B[a]P étaient absorbés respectivement, à hauteur de 0,86, 0,77 et 0,30 ; ce sont les valeurs retenues pour le calcul de la biodisponibilité de ces trois polluants. L'absorption intestinale est négativement corrélée à la lipophilicité des HAP. La même tendance a été constatée dans nos travaux sur les PCB et les PBDE excrétés dans le lait.

Le facteur de biotransformation (Ft) est la fraction du polluant qui sera métabolisée et éliminée. Le facteur métabolique global pour les HAP a été estimé à 0,1 pour le bœuf (Hofelt *et al.*, 2001), valeur retenue pour notre calcul de biodisponibilité. Cette estimation du métabolisme repose sur les paramètres toxicocinétiques qui sont la constante d'élimination (ke), le volume de distribution (Vd) et la concentration moyenne obtenue à l'équilibre (Css). Ce facteur du métabolisme est congénère-dépendant et il a été par exemple estimé chez le rat à 0,4 pour le B[a]P et à 0,3 pour le Pyr.

Le produit de ces trois facteurs a été calculé pour estimer l'exposition interne (biodisponibilité) des ruminants en fonction du sol et de la lipophilicité des composés : 0,002 à 0,04 pour le Phe, 0,0016 à 0,036 pour le Pyr et 0,001 à 0,014 pour le B[a]P (**Figure V- 3**). Il apparaît que la dose interne chute avec l'augmentation de la lipophilicité des composés de HAP. Ce paramètre semble jouer un rôle clé dans la régulation de la biodisponibilité des PoP du sol. En effet, la même tendance a été révélée dans l'étude *in vivo* de la biodisponibilité relative des HAP et des PCB liés au sol. Il apparaît clairement que la matière organique du sol et la lipophilicité des composés organiques contribuent largement à la régulation des phénomènes de rétention et de solubilisation des PoP dans le tractus gastro-intestinal des ruminants laitiers.

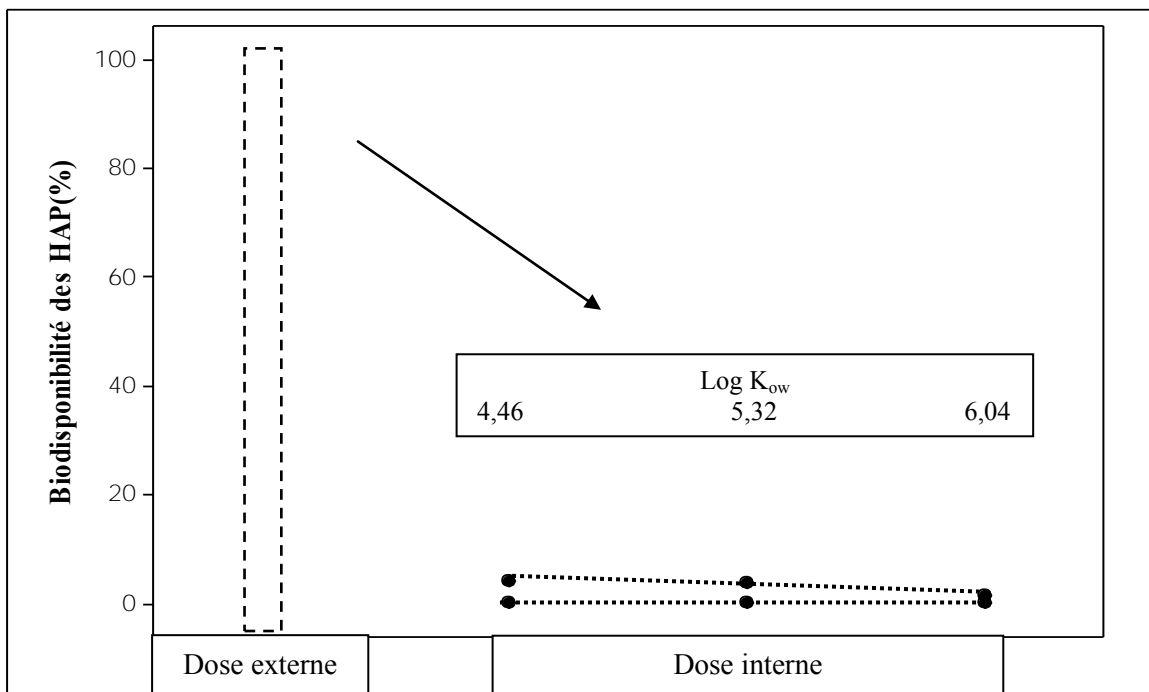


Figure V- 3 : Evaluation des doses internes du B[a]P et du Phe chez le ruminant laitier

3 Limites et perspectives des expérimentations menées

Le but de nos travaux était de générer les premiers éléments nécessaires à l'estimation de l'impact du sol sur la biodisponibilité des PoP chez le ruminant laitier. Les investigations menées démontrent la faisabilité et la pertinence des outils utilisés à ces fins. Néanmoins, de nombreux points peuvent être améliorés.

3.1 Le choix des sols contaminés dans les études menées

Dans nos études, le choix des sols contaminés s'avère être un élément fondamental. Les propriétés intrinsèques du sol, les concentrations des polluants et l'origine de la contamination sont des caractéristiques clés qui doivent être étayées afin de définir au mieux les relations entre le polluant et la fraction du sol.

La contamination artificielle utilisée pour enrichir nos sols en HAP et en PBDE a été motivée par le souci de maîtriser les concentrations et/ou profils des PoP et par la disponibilité de quantités suffisantes de sol pour les besoins expérimentaux. Cette technique de contamination artificielle est souvent utilisée dans les approches *in vivo* mais elle présente un certain nombre de défauts relatifs à sa représentativité vis-à-vis d'une contamination environnementale (temps de vieillissement, source et profil de contamination, etc.). En effet, même si l'utilisation de la contamination artificielle est un moyen rapide et efficace d'enrichissement des sols, les interactions mises en jeu peuvent être moins prononcées que les interactions existant dans un milieu naturel.

Il conviendrait dans le futur de mettre en place une cartographie détaillée de toutes les composantes du sol et des conditions de contamination afin de répondre au mieux aux besoins émis. La matière organique doit être scrupuleusement explorée et caractérisée en fonction de son degré de condensation (ratio C/O). L'historique de la contamination doit être également exploré en déterminant la source, le type et l'âge de contamination. Cependant, il est clair qu'il n'est pas aisé de répertorier l'ensemble des caractéristiques de la contamination du sol supposées agir sur les phénomènes de rétention des PoP.

3.2 Méthode *in vivo* d'investigation de la biodisponibilité orale des PoP liés au sol

La finalité de nos études était de déterminer le transfert des PoP du sol vers le ruminant laitier. Dans nos investigations, la biodisponibilité a été assimilée exclusivement à une notion quantitative. Aucune donnée qualitative quant à l'activité d'enzymes comme l'EROD n'a été directement mesurée pour appuyer les données quantitatives obtenues. Il s'agira à l'avenir d'apporter des renseignements sur les mécanismes du métabolisme des polluants afin de consolider les mesures d'excrétion dans les urines ou le lait.

De plus, l'étude menée sur les HAP s'est focalisée sur seulement trois molécules modèles dont le B[a]P comme molécule référence de toxicité. Cependant, le niveau de transfert dans l'organisme du B[a]P et de son métabolite majoritaire, le 3-OH B[a]P, s'est avéré limité et a empêché l'obtention d'une réponse quantifiable. Il apparaît donc nécessaire à l'avenir d'utiliser d'autres molécules modèles ayant un fort potentiel toxique comme le Benzo[a]anthracène ou le Dibenzo(a,h)anthracène.

Lors de ces études, le modèle caprin a été utilisé comme modèle ruminant laitier ; ce choix a été motivé par la taille des animaux adaptés aux installations de l'animalerie, l'aisance dans la pose de sondes urinaires, les coûts d'entretien modérés et enfin les volumes des produits excrétés et les organes faciles à prélever et à stocker. L'extrapolation des résultats aux vaches laitières peut sensiblement être affectée par de nombreux facteurs tels que l'aptitude du ruminant à métaboliser les polluants organiques ou la charge en lipides de l'animal.

3.3 De l'utilité de préciser l'influence des autres paramètres du sol sur la bioaccessibilité des PoP

Il est vrai que les investigations menées jusqu'à présent n'ont pas permis de mettre en évidence le rôle des différentes caractéristiques du sol sur la bioaccessibilité des PoP. Cependant, de nombreux auteurs ont associé l'effet de la matière organique au complexe argilo-humique. En théorie, toutes les surfaces du sol (minérales ou organiques) peuvent adsorber des polluants organiques, d'où un impact possible sur la biodisponibilité. L'intensité d'adsorption dépend de la conformation des associations organo-minérales (Hwang et Cutright, 2002 ; Hwang *et al.*, 2003). Elle est minimale sur la fraction minérale et notamment l'argile, si celle-ci ne possède pas un enduit de matière organique (Murphy *et al.*, 1990). En effet, dans cette association la matière organique jouerait le rôle d'adsorbant des PoP et les

argiles minérales permettraient la stabilisation et l'augmentation de la surface d'échange de la matière organique.

La fraction argileuse du sol va interagir principalement avec les molécules ionisées. En effet, les argiles qui présentent des colloïdes minéraux chargés négativement sont susceptibles d'adsorber les molécules protonées (Calvet *et al.*, 2005). Dans ce contexte, les HAP et les PCB, contrairement aux pesticides, sont neutres et non ionisés dans le sol, ce qui suggère une faible interaction des argiles avec ces molécules de type non ionique.

En ce qui concerne la granulométrie du sol, les retours d'expériences des investigations *in vitro* ont révélé le fort impact de la taille des particules du sol sur la bioaccessibilité et la distribution des PoP. Les travaux *in vitro* menés par Siciliano *et al.* (2010) sur dix-huit sols urbains ont démontré que la bioaccessibilité des HAP contenus dans les particules fines (<45 µm) était significativement inférieure à celle des HAP contenus dans la fraction brute tamisée à 2 mm. Ceci suggère que le contrôle de la taille des particules du sol est essentiel lors des études de biodisponibilité car celle-ci intervient dans la structure et l'arrangement spatial des particules entre elles.

Enfin, il faut noter que les sols contaminés présentent souvent une contamination multiple, avec à la fois des PoP et de fortes concentrations d'éléments en traces métalliques tels que l'aluminium et le cuivre. Ces métaux présents dans le sol vont favoriser la formation de complexes métallo-organiques à travers la mise en place de ponts ioniques ou de liaisons de coordination (Schulten et Schnitzer, 1997 ; Varadachari *et al.*, 1997). Cette complexation associée à la présence de métaux a été avancée pour expliquer la réduction de la biodisponibilité des HAP du sol car elle réduirait leur capacité de diffusion.

Comme tous les paramètres décrits précédemment, le temps de maturation et la source de contamination des polluants dans le sol sont autant d'autres paramètres à considérer pour définir la bioaccessibilité des PoP.

3.4 Approche quantitative des données de la littérature

La méta-analyse a été utilisée pour tester l'effet de la teneur en carbone organique sur la bioaccessibilité des HAP. Néanmoins, certains points sont à améliorer afin de consolider cette démarche. Il sera utile de valider le modèle grâce à des données externes provenant d'autres études non utilisées dans la construction du modèle ; ces données sont encore trop rares dans la littérature.

Discussion générale

Lors de la construction du modèle, la bioaccessibilité a été établie en considérant la somme des seize HAP listés et ne donne aucune information sur les molécules à fort pouvoir toxique. Afin de couvrir ces besoins, il faudra, dans la limite des données disponibles, orienter le modèle vers ce type de molécules. Ceci contribuera à préciser l'impact du sol sur les risques d'exposition aux HAP.

Concernant le modèle appliqué aux sols industriels, celui-ci pourra incontestablement être renforcé et surtout amélioré.

L'élargissement du champ de représentativité du modèle aux autres propriétés du sol (telles que l'argile et la taille des particules) et à d'autres familles de composés de type pesticides, contribuera à mieux décrire les phénomènes intervenant dans la bioaccessibilité des PoP du sol.

Conclusion générale

Conclusion générale

L'objectif principal de nos travaux était de déterminer le transfert des PoP du sol vers le ruminant laitier. La biodisponibilité des polluants a été un paramètre pertinent de mesure du potentiel de transfert des PoP du sol vers l'animal. Des expériences menées sur des animaux ainsi qu'une démarche statistique (méta-analyse) ont été effectuées pour évaluer l'impact de plusieurs facteurs sur la biodisponibilité des PoP : le sol et ses propriétés mais également les caractéristiques des molécules organiques.

Ces travaux ont démontré le faible impact du sol sur la biodisponibilité des PCB et des HAP. Un fort transfert des molécules halogénées de type PCB vers le lait et le tissu gras a été constaté. De même, les résultats ont démontré également que certains PBDE semblent présenter des caractéristiques de biotransfert similaires à celles des PCB. Enfin, notons également qu'il a suffi de seulement deux semaines d'exposition à un sol contaminé, pour que la concentration des PCB-DL dans le lait dépasse la valeur réglementaire en vigueur.

Les interactions des éléments du sol avec les polluants halogénés ne semblent pas être sensibles à la lipophilicité des PCB. Cependant, pour les HAP, une atténuation significative de la biodisponibilité du Pyr (BR de 50%) par rapport à celle du Phe (BR de 100%) a été décelée. Aucune donnée n'a pu être récoltée concernant le B[a]P au vu des faibles niveaux retrouvés dans les urines et le lait.

Pour la première fois, une méthode de mesure de la biodisponibilité relative des PoP chez le ruminant a été développée au sein du laboratoire et semble pouvoir être applicable à n'importe quel modèle animal.

La bioaccessibilité, qui est considérée comme l'une des composantes principales de la biodisponibilité des PoP dans l'organisme, semble être affectée par la présence de matière organique naturelle ou humus. En effet, la solubilisation des HAP au niveau digestif augmente avec la teneur en matière organique du sol. La nature de la contamination et de la matière organique interviendrait également dans la régulation de la bioaccessibilité des polluants : en effet, le modèle de bioaccessibilité généré à partir de la population des sols industriels semble différent du modèle appliqué aux sols urbains ou agricoles.

Les données *ex post* obtenues montrent que le transfert des PoP du sol vers le ruminant laitier demeure important. Il est certain à travers les résultats obtenus, que le champ d'exploration reste ouvert aux propriétés des sols et à la complémentarité des approches *in vitro* et *in vivo*.

Références bibliographiques

- Abbes K., Bizzozero L., Jacqueline-Boutros K., Jean K. (2010). Les Polychlorobiphényles. Un problème nouveau pour une pollution ancienne. *Ecole des Hautes Etudes en Santé Publique (EHESP)*, 1-51.
- Aceves M., et Grimalt J.O. (1993). Seasonally dependent size distributions of aliphatic and polycyclic aromatic hydrocarbons in urban aerosols from densely populated areas. *Environment Science Technology* 27, 2896-2908.
- ADEME. (2004). Dioxine & polluants organiques persistants. Journées techniques nationales organisées par l'ADEME à la Maison de la Chimie, Paris 7^e, 1-22.
- Afssa. (2006). Etablissement de teneurs maximales pertinentes en polychlorobiphényles qui ne sont pas de type dioxine (PCB « non dioxin-like », PCB-NDL) dans divers aliments. Afssa RéSaisine n° 2006-SA-0305, 1-28.
- Afsset. (2007). "Propositions de valeurs guides de qualité d'air intérieur. Bulletin de veille sanitaire. www.afsset.fr/upload/bibliotheque/690189948934515241975103896378/vdef.pdf
- Alcock R. E., Johnston A. E., McGrath, S. P., Berrow, M. L., Jones, K. C. (1993). Long-term changes in the polychlorinated biphenyl content of United Kingdom soils. *Environmental Science and Technology* 27, 1918-1923.
- AMAP. (1998). Artic Monitoring and Assessment Programme. <http://www.amap.no/?main=http%3A//www.amap.no/>.
- Appert-Collin, J. C., Dridi-Dhaouadi, S., Simonnot, M. O., Sardin, M. (1999). Nonlinear sorption of naphthalene and phenanthrene during saturated transport in natural porous media. *Physics and Chemistry of the Earth, Part B: Hydrology, Oceans and Atmosphere* 24, 543-548.
- Armitage, J. M., Hanson, M., Axelman, J., Cousins, I. T. (2006). Levels and vertical distribution of PCBs in agricultural and natural soils from Sweden. *Science of The Total Environment* 371, 344-352.
- ATSDR. (2000). Potential for human exposure. <http://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp17-c6.pdf>, 1-118.
- Barnier, C. (2009). Disponibilité des HAP dans les sols de friches industrielles en influence des conditions rhizosphériques - Thèse doctorat : Sciences Agronomiques. http://pegase.scd.inpl-nancy.fr/theses/2009_BARNIER_C.pdf.
- Brandli, R. C., Hartnik, T., Henriksen, T., Cornelissen, G. (2008). Sorption of native polyaromatic hydrocarbons (PAH) to black carbon and amended activated carbon in soil. *Chemosphere* 73, 1805-1810.
- Bakker, M. I., Casado, B., Koerselman, J. W., Tolls, J., Kollöffel, C. (2000). Polycyclic aromatic hydrocarbons in soil and plant samples from the vicinity of an oil refinery. *Science of the Total Environment* 263, 91-100.
- Bakker, M. I., Koerselman, J. W., Tolls, J., Kollöffel, C. (2001). Localization of deposited polycyclic aromatic hydrocarbons in leaves of *Plantago*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20, 1112-1116.
- Barriuso, E., et Calvet, R. (1992). Soil type and herbicides adsorption. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 46, 117-128.
- Barriuso, E., Koskinen, W., Sorenson, B. (1992). Modification of atrazine desorption during field incubation experiments. *Science of the Total Environment* 123-124, 333-344.
- Barriuso, E., Calvet, R., Schiavon, M., Soulas, G. (1996). Les pesticides et les polluants organiques des sols. Transformations et dissipation. *Étude et Gestion des Sols* 3, 279-296.

Références bibliographiques

- Benoist, J. M. (1999). Apparent volume of distribution of drugs. Evaluation. Value and limitations. *La semaine des hôpitaux de Paris* 75, 281-288.
- Berthelot, Y., Trottier, B., Robidoux, P. Y. (2009). Assessment of soil quality using bioaccessibility-based models and a biomarker index. *Environment International* 35, 83-90.
- Billeret, M., Berny, P., Mazallon, M., Buronfosse, T. (2000). 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* 19, 2614-2620.
- Blanchard, M., Teil, M. J., Guigon-Moreau, E., Larcher-Tiphagne, K., Ollivon, D., Garban, B., Chevreuril, M. (2007). Persistent toxic substance inputs to the river Seine basin (France) via atmospheric deposition and urban sludge application. *Science of The Total Environment* 375, 232-243.
- Bocio, A., Llobet, J. M., Domingo, J. L., Corbella, J., Teixido, A., Casas, C. (2003). Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in foodstuffs: Human exposure through the diet. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 3191-3195.
- Bogan, B. W., and Sullivan, W. R. (2003). Physicochemical soil parameters affecting sequestration and mycobacterial biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. *Chemosphere* 52, 1717-1726.
- Bollag, J. M., Myers, C. J., Minard, R. D. (1992). Biological and chemical interactions of pesticides with soil organic matter. *Science of the Total Environment* 123-124, 205-217.
- Boon, J. P., Everaarts, J. M., Kastoro, W. W., Razak, H., Sumanta, I., Sumarno, Nelissen, P. H., Stefels, J., Hillebrand, M. T. J. (1989). Cyclic organochlorines in epibenthic organisms from coastal waters around East Java. *Netherlands Journal of Sea Research* 23, 427-440.
- Borga, K., Wolkers, H., Skaare, J. U., Hop, H., Muir, D. C. G., Gabrielsen, G. W. (2005). Bioaccumulation of PCBs in Arctic seabirds: Influence of dietary exposure and congener biotransformation. *Environmental Pollution* 134, 397-409.
- Borlakoglu, J. T., et Walker, C. H. (1989). Comparative aspects of congener specific PCB metabolism. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 14 127-131
- Bouchard, M., et Viau, C. (1998). Urinary and biliary excretion kinetics of 1-hydroxypyrene following intravenous and oral administration of pyrene in rats. *Toxicology* 127, 69-84.
- 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.
- Busbee, D. L., Norman, J. O., Ziprin, R. L. (1990). Comparative uptake, vascular transport, and cellular internalization of aflatoxin-B1 and benzo(a)pyrene. *Archives of Toxicology* 64, 285-290.
- Busbee, D. L., Yoo, J. S. H., Norman, J. O., Joe, C. O. (1985). Polychlorinated biphenyl uptake and transport by lymph and plasma components (42073). *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 179, 116-122.
- Calvet, R., Barriuso, E., Bedos, R., Charnay, M.-P., Coquet, Y. (2005). Les pesticides dans le sol. *France Agricole*, 1-637.
- Calderbank, A. (1989). The occurrence and significance of bound pesticide residues in soil. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 108, 71-103.
- Cave, M. R., Wragg, J., Harrison, I., Vane, C. H., Van De Wiele, T., De Groeve, E., Nathanail, C. P., Ashmore, M., Thomas, R., Robinson, J., Daly, P. (2010).

Références bibliographiques

- Comparison of Batch mode and dynamic physiologically Based Bioaccessibility tests for PAHs in soil samples. *Environmental Science and Technology* 44, 2654-2660.
- Cavret, S., et Feidt, C. (2005a). Intestinal metabolism of PAH: *In vitro* demonstration and study of its impact on PAH transfer through the intestinal epithelium. *Environmental Research* 98, 22-32.
- Cavret, S., Feidt, C., Laurent, F. (2005b). Differential transfer of organic micropollutants through intestinal barrier using Caco-2 cell line. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 2773-2777.
- Cavret, S., Laurent, C., Feidt, C., Laurent, F., Rychen, G. (2003). Intestinal absorption of ^{14}C from ^{14}C -phenanthrene, ^{14}C -benzo[a]pyrene and ^{14}C -tetrachlorodibenzo-para-dioxin: Approaches with the Caco-2 cell line and with portal absorption measurements in growing pigs. *Reproduction Nutrition Development* 43, 145-154.
- 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. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 1780-1786.
- Chen, C.-Y., Hamm, J. T., Hass, J. R., Birnbaum, L. S. (2001). Disposition of Polychlorinated Dibenzo-p-dioxins, Dibenzofurans, and non-ortho Polychlorinated Biphenyls in Pregnant Long Evans Rats and the Transfer to Offspring. *Toxicology and Applied Pharmacology* 173, 65-88.
- Chiou, C. T., et Kile, D. E. (1998). Deviations from sorption linearity on soils of polar and nonpolar organic compounds at low relative concentrations. *Environmental Science and Technology* 32, 338-343.
- Chung, N., et Alexander, M. (1998). Differences in Sequestration and Bioavailability of Organic Compounds Aged in Dissimilar Soils. *Environmental Science & Technology* 32, 855-860.
- CITEPA. (2010). Emissions dans l'air en France - Métropole - Substances relatives à la contamination par les polluants organiques persistants. 1-13. http://www.citepa.org/emissions/nationale/Pop/Emissions_FRmt_POP.pdf
- CITEPA. (2007). Centre Interprofessionnel Technique d'Etudes de la Pollution Atmosphérique-Emissions dans l'air en France métropole substances relatives à la contamination par les polluants organiques persistants. http://www.citepa.org/emissions/nationale/Pop/Emissions_FRmt_POP.pdf
- Cooke, A. I., Green, N., Rimmer, D. L., Weekes, T. E. C., Wilkins, B. T., Beresford, N. A., Fenwick, J. D. (1996). Absorption of radiocaesium by sheep after ingestion of contaminated soils. *Science of The Total Environment* 192, 21-29.
- Cornelissen, G., Rigterink, H., Ferdinandy, M. M. A., Van Noort, P. C. M. (1998a). Rapidly desorbing fractions of PAHs in contaminated sediments as a predictor of the extent of bioremediation. *Environmental Science and Technology* 32, 966-970.
- Cornelissen, G., Van Noort, P. C. M., Govers, H. A. J. (1998b). Mechanism of slow desorption of organic compounds from sediments: A study using model sorbents. *Environmental Science and Technology* 32, 3124-3131.
- Cornelissen, G., Gustafsson, Ö., Bucheli, T. D., Jonker, M. T. O., Koelmans, A. A., Van Noort, P. C. M. (2005). Extensive sorption of organic compounds to black carbon, coal, and kerogen in sediments and soils: Mechanisms and consequences for distribution, bioaccumulation, and biodegradation. *Environmental Science and Technology* 39, 6881-6895.
- Costera, A., Feidt, C., Dziurla, M. A., Monteau, F., Le Bizec, B., Rychen, G. (2009). Bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from soil and hay matrices in lactating goats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 5352-5357.

Références bibliographiques

- Costera, A., Feidt, C., Marchand, P., Bizec, B. L., Rychen, G. (2006). PCDD/F and PCB transfer to milk in goats exposed to a long-term intake of contaminated hay. *Chemosphere* 64, 650-657.
- Covaci, A., Ryan, J. J., Schepens, P. (2002). Patterns of PCBs and PCDD/PCDFs in chicken and pork fat following a Belgian food contamination incident. *Chemosphere* 47, 207-217.
- Crépineau-Ducoulombier, C., Dan-Badjo, A. T., Rychen, G. (2004). PAH contamination of the grass *Lolium perenne* exposed to vehicular traffic. *Agronomie* 24, 503-506.
- Crépineau-Ducoulombier, C., et Rychen, G. (2003). Assessment of soil and grass Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) contamination levels in agricultural fields located near a motorway and an airport. *Agronomie* 23, 345-348.
- Crépineau-Ducoulombier, C., Rychen, G., Feidt, C., Le Roux, Y., Lichtfouse, E., Laurent, F. (2003). Contamination of pastures by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the vicinity of a highway. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 4841-4845.
- Cuypers, C., Clemens, R., Grotenhuis, T., Rulkens, W. (2001). Prediction of Petroleum Hydrocarbon Bioavailability in Contaminated Soils and Sediments. *Soil and Sediment Contamination: An International Journal* 10, 459 - 482.
- Cuypers, C., Grotenhuis, T., Joziase, J., Rulkens, W. (2000). Rapid Persulfate Oxidation Predicts PAH Bioavailability in Soils and Sediments. *Environmental Science & Technology* 34, 2057-2063.
- Cuypers, C., Pancras, T., Grotenhuis, T., Rulkens, W. (2002). The estimation of PAH bioavailability in contaminated sediments using hydroxypropyl- β -cyclodextrin and Triton X-100 extraction techniques. *Chemosphere* 46, 1235-1245.
- Dalla Valle, M., Codato, E., Marcomini, A. (2007). Climate change influence on POPs distribution and fate: A case study. *Chemosphere* 67, 1287-1295.
- Danielsson, A. (2000). Rate-Limiting Factors During Bioremediation of Soil Containing HOCs, State of the Art Report Prepared for the Board of COLDREM. *Chemical Engineering II, Lund Institute of Technology, Lund, Sweden*, 1-24.
- Darnerud, P. O., Eriksen, G. S., Jóhannesson, T., Larsen, P. B., Viluksela, M. (2001). Polybrominated diphenyl ethers: Occurrence, dietary exposure, and toxicology. *Environmental Health Perspectives* 109, 49-68.
- 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.
- Dean, J., R. (2004). Bioavailability, Bioaccessibility And Mobility Of Environmental Contaminants *Analytical Techniques in the Sciences* 1-292.
- Dean, J. R., et Ma, R. (2007). Approaches to assess the oral bioaccessibility of persistent organic pollutants: A critical review. *Chemosphere* 68, 1399-1407.
- Dean, J. R., et Scott, W. C. (2004). Recent developments in assessing the bioavailability of persistent organic pollutants in the environment. *TrAC. Trends in Analytical Chemistry* 23, 609-618.
- Del Bubba, M., Zanieri, L., Galvan, P., Paolo, G., Donzelli, L., et Checchini, L. L. (2005). Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) and Total Fats in Human Milk. *Annali di Chimica* 95, 629-641.
- Domingo, J. L. (2006). Polychlorinated diphenyl ethers (PCDEs): Environmental levels, toxicity and human exposure: A review of the published literature. *Environment International* 32, 121-127.
- Domingo, J. L., Schuhmacher, M., Agramunt, M. C., Llobet, J. M., Rivera, J., et Müller, L. (2002). PCDD/F levels in the neighbourhood of a municipal solid waste incinerator after introduction of technical improvements in the facility. *Environment International* 28, 19-27.

Références bibliographiques

- Drouillard, K. G., et Norstrom, R. J. (2000). Dietary absorption efficiencies and toxicokinetics of polychlorinated biphenyls in ring doves following exposure to aroclor® mixtures. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19, 2707-2714.
- Dulfer, W. J., Groten, J. P., Govers, H. A. J. (1996). 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* 37, 950-961.
- Dybing, E., Doe, J., Groten, J., Kleiner, J., O'Brien, J., Renwick, A. G., Schlatter, J., Steinberg, P., Tritscher, A., Walker, R., Younes, M. (2002). Hazard characterisation of chemicals in food and diet: Dose response, mechanisms and extrapolation issues. *Food and Chemical Toxicology* 40, 237-282.
- Eisenberg, J. N. S., Bennett, D. H., McKone, T. E. (1998). Chemical dynamics of persistent organic pollutants: A sensitivity analysis relating soil concentration levels to atmospheric emissions. *Environmental Science and Technology* 32, 115-123.
- Engelbreton, R. R., et Von Wandruszka, R. (1994). Microorganization in dissolved humic acids. *Environmental Science and Technology* 28, 1934-1941.
- Frame, G. M., Cochran, J. W., Bøwadt, S. S. (1996). Complete PCB congener distributions for 17 aroclor mixtures determined by 3 HRGC systems optimized for comprehensive, quantitative, congener-specific analysis. *Journal of High Resolution Chromatography* 19, 657-668.
- Frederiksen, M., Vorkamp, K., Thomsen, M., Knudsen, L. E. (2009). Human internal and external exposure to PBDEs - A review of levels and sources. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 212, 109-134.
- Farrell, J., et Reinhard, M. (1994). Desorption of halogenated organics from model solids, sediments, and soil under unsaturated conditions. 2. Kinetics. *Environmental Science and Technology* 28, 63-72.
- Fehling, K. A., Ruby, M. V., et Paustenbach, D. J. (2001). *In vitro* bioaccessibility study of low concentrations (50-350 ppt TEQ) of dioxin/furans in weathered soils. *Organohalogen Compounds* 52, 180-184.
- Feidt, C., Grova, N., Crépineau, C., Lutz, S., et Rychen, G. (2002). Polycyclic aromatic hydrocarbons transfer in lactating ruminant: Methodological approach and preliminary results =Transfert des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques chez le ruminant laitier. Approche méthodologique et résultats préliminaires. In "Journée Rencontres Recherches Ruminants", 9, 343 - 345, Paris, France.
- Fernández, P., et Grimalt, J. O. (2003). On the global distribution of persistent organic pollutants *Chimia* 57, 514-521.
- Finley, B., Fehling, K., Warmerdam, J., Morinello, E. J. (2009). Oral bioavailability of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins/dibenzofurans in industrial soils. *Human and Ecological Risk Assessment* 15, 1146-1167.
- Focant, J. F., Eppe, G., Pirard, C., Massart, A. C., André, J. E., De Pauw, E. (2002). Levels and congener distributions of PCDDs, PCDFs and non-*ortho* PCBs in Belgian foodstuffs: Assessment of dietary intake. *Chemosphere* 48, 167-179.
- Fouchécourt, M. O., Arnold, M., Berny, P., Videmann, B., Rether, B., Rivière, J. L. (1999). Assessment of the Bioavailability of PAHs in Rats Exposed to a Polluted Soil by Natural Routes: Induction of EROD Activity and DNA Adducts and PAH Burden in Both Liver and Lung. *Environmental Research* 80, 330-339.
- Franzaring, J., Bierl, R., Ruthsatz, B. (1992). Active biological monitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons using kale (*Brassica oleracea*) as a monitor-species. *Chemosphere* 25, 827-834.
- Fries, G. F. (1985). Bioavailability of soil-borne polybrominated biphenyls ingested by farm animals. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 16, 565-579.

Références bibliographiques

- 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 (Historical Archive)* 43, 683-690.
- Fries, G. F., et Marrow, G. S. (1992). Influence of soil properties on the uptake of hexachlorobiphenyls by rats. *Chemosphere* 24, 109-113.
- Fries, G. F. (1995). Transport of organic environmental contaminants to animal products. *Reviews-of-Environmental-Contamination-and-Toxicology* 141, 71-109.
- Fries, G. F. (1996). Ingestion of sludge applied organic chemicals by animals. *Science of The Total Environment* 185, 93-108.
- Fries, G. F., Dawson, T. E., Paustenbach, D. J., Mathur, B. M., Luksembur, W. J. (1997). Biosynthesis of hepta- and octa-chlorodioxins in cattle and evidence for lack of involvement by rumen microorganisms. *Organohalogen compounds* 33, 296-301.
- Fries, G. F., Paustenbach, D. J., Mather, D. B., and Luksemburg, W. J. (1999). A congener specific evaluation of transfer of chlorinated dibenzo-p- dioxins and dibenzofurans to milk of cows following ingestion of pentachlorophenol-treated wood. *Environmental Science and Technology* 33, 1165-1170.
- Fries, G. F., Paustenbach, D. J., Luksemburg, W. J. (2002). Complete mass balance of dietary polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in dairy cattle and characterization of the apparent synthesis of hepta- and octachlorodioxins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 4226-4231.
- Gallenberg, L. A., et Vodicknik, M. J. (1987). The disposition and elimination of two sequential doses of 2,4,5,2',4',5'-hexachlorobiphenyl. *Drug Metabolism and Disposition* 15, 363-366.
- Gevao, B., Semple, K. T., Jones, K. C. (2000). Bound pesticide residues in soils: a review. *Environmental Pollution* 108, 3-14.
- Gibson, G. G., et Skett, P. (2002). Introduction to drug metabolism (3rd Ed.). *Pharmacology science* Nelson thornes, 1-256.
- Grøn, C., Andersen, L. (2005). Human Bioaccessibility of Heavy Metals and PAH from Soil. *Danish Environmental Protection Agency*, 1-113.
- Grøn, C., Oomen, A., Weyand, E., Wittsiepe, J. (2007). Bioaccessibility of PAH from Danish soils. *Journal of Environmental Science and Health . Part A* 42, 1233 - 1239.
- Grova, N., Feidt, C., Crepineau, C., Laurent, C., Lafargue, P. E., Hachimi, A., Rychen, G. (2002). Detection of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Levels in Milk collected Near Potential Contamination Sources. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 4640-4642.
- Grova, N., Feidt, C., Laurent, C., Rychen, G. (2002). [¹⁴C] Milk, urine and faeces excretion kinetics in lactating goats after an oral administration of [¹⁴C]polycyclic aromatic hydrocarbons. *International Dairy Journal* 12, 1025-1031.
- 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. *Journal of Analytical Toxicology* 29, 175-181.
- Grova, N., Rychen, G., Monteau, F., Le Bizec, B., Feidt, C. (2006). Effect of oral exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons on goat's milk contamination. *Agronomy for Sustainable Development* 26, 195-199.
- Grova, N., Feidt, C., Monteau, F., Le Bizec, B., Rychen, G. (2008). Transfert of phenanthrene and its hydroxylated metabolites to milk, urine and faeces. *Polycyclic Aromatic Compound* 28, 98 - 111.
- Hack, A., et Selenka, F. (1996). Mobilization of PAH and PCB from contaminated soil using a digestive tract model. *Toxicology Letters* 88, 199-210.

Références bibliographiques

- Hack, A., Selenka, F., Wilhelm, M. (1998). Mobilization of PAH by synthetic gastrointestinal juice from contaminated soil of a former landfill area [in German], [Mobilisierung von PAK durch synthetische verdauungssäfte aus dem kontaminierten bodenmaterial einer altlastenfläche]. *Umweltmedizin in Forschung und Praxis* 3, 275-280.
- Hack, A., Welge, P., Wittsiepe, J., Wilhelm, M. (2002). Aufnahme und Bilanzierung (Bioverfügbarkeit) ausgewählter Bodenkontaminanten im Tiermodell (Minischwein). <http://www.umweltdaten.de/publikationen/fpdf-l/2259.pdf>. 1-324.
- Hakk, H., et Letcher, R. J. (2003). Metabolism in the toxicokinetics and fate of brominated flame retardants - A review. *Environment International* 29, 801-828.
- Hakk, H., Huwe, J. K., Larsen, G. L. (2009). Absorption, distribution, metabolism and excretion (ADME) study with 2,2',4,4',5,6'-hexabromodiphenyl ether (BDE-154) in male Sprague-Dawley rats. *Xenobiotica* 39, 46-56.
- Harkey, G. A., Van Hoof, P. L., Landrum, P. F. (1995). Bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons from a historically contaminated sediment core. *Environmental Toxicology and Chemistry* 14, 1551-1560.
- Hassanin, A., Breivik, K., Meijer, S. N., Steinnes, E., Thomas, G. O., Jones, K. C. (2004). PBDEs in European Background Soils: Levels and Factors Controlling Their Distribution. *Environmental Science and Technology* 38, 738-745.
- Haws, L. C., Su, S. H., Harris, M., DeVito, M. J., Walker, N. J., Farland, W. H., Finley, B., Birnbaum, L. S. (2006). Development of a refined database of mammalian relative potency estimates for dioxin-like compounds. *Toxicological Sciences* 89, 4-30.
- Haws, N. W., Ball, W. P., Bouwer, E. J. (2006). Modeling and interpreting bioavailability of organic contaminant mixtures in subsurface environments. *Journal of Contaminant Hydrology* 82, 255-292.
- Hecht, S. S., Chen, M., Yagi, H., Jerina, D. M., Carmella, S. G. (2003). *r*-1,*t*-2,3,*c*-4-Tetrahydroxy-1,2,3,4-tetrahydrophenanthrene in Human Urine: A Potential Biomarker for Assessing Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Metabolic Activation. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 12, 1501-1508.
- Hietaniemi, V., et Kumpulainen, J. T. (1995). Contents of PCBs, organochlorine pesticide residues and PAH compounds in finnish foodstuffs. www.mtt.fi/et/etk/fao/pdf/hietanie.pdf, 157-167
- Hjelmborg, P. S., Andreassen, T. K., Bonefeld-Jørgensen, E. C. (2008). Cellular uptake of lipoproteins and persistent organic compounds-An update and new data. *Environmental Research* 108, 192-198.
- Hofelt, C. S., Honeycutt, M., McCoy, J. T., Haws, L. C. (2001). Development of a metabolism factor for polycyclic aromatic hydrocarbons for use in multipathway risk assessments of hazardous waste combustion facilities. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 33, 60-65.
- Holman, H.-Y. N. (2000). *In vitro* gastrointestinal mimetic protocol from measuring bioavailable contaminants. *United State Patent* (6 040 188), 1-6.
- Holman, H. Y. N., Goth-Goldstein, R., Aston, D., Yun, M., Kengsoontra, J. (2002). Evaluation of gastrointestinal solubilization of petroleum hydrocarbon residues in soil using an *in vitro* physiologically based model. *Environmental Science and Technology* 36, 1281-1286.
- 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.
- Hoshi, H., Minamoto, N., Iwata, H., Shiraki, K., Tatsukawa, R., Tanabe, S., Fujita, S., Hirai, K., Kinjo, T. (1998). Organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyl congeners in wild terrestrial mammals and birds from Chubu region, Japan:

Références bibliographiques

- Interspecies comparison of the residue levels and compositions. *Chemosphere* 36, 3211-3221.
- Hrudey, S. E., Weiping, C., Rousseaux, C. (1995). Bioavailability in Environmental Risk Assessment *CRC-Press (Hardcover)*, 1-320.
- Huang, H., and Buekens, A. (1996). De novo synthesis of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans. Proposal of a mechanistic scheme. *Science of the Total Environment* 193, 121-141.
- Huang, W., Peng, P., Yu, Z., Fu, J. (2003). Effects of organic matter heterogeneity on sorption and desorption of organic contaminants by soils and sediments. *Applied Geochemistry* 18, 955-972.
- Huang, W., Schlautman, M. A., Weber Jr, W. J. (1996). A distributed reactivity model for sorption by soils and sediments. 5. The influence of near-surface characteristics in mineral domains. *Environmental Science and Technology* 30, 2993-3000.
- Huwe, J. K., et Smith, D. J. (2005). Laboratory and on-farm studies on the bioaccumulation and elimination of dioxins from a contaminated mineral supplement fed to dairy cows. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 2362-2370.
- Huwe, J. K., et Smith, D. J. (2007). Accumulation, whole-body depletion, and debromination of decabromodiphenyl ether in male sprague - Dawley rats following dietary exposure. *Environmental Science and Technology* 41, 2371-2377.
- Hwang, S., et Cutright, T. J. (2002). The impact of contact time on pyrene sorptive behavior by a sandy-loam soil. *Environmental Pollution* 117, 371-378.
- Hwang, S., Ramirez, N., Cutright, T. J., et Ju, L. K. (2003). The role of soil properties in pyrene sorption and desorption. *Water, Air, and Soil Pollution* 143, 65-80.
- Iida, T., Hirakawa, H., Matsueda, T., Takenaka, S., Yu, M. L., Guo, Y. L. L. (1999). Recent trend of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and their related compounds in the blood and sebum of Yusho and Yu-Cheng patients. *Chemosphere* 38, 981-993.
- Ilett, K. F., Tee, L. B. G., Reeves, P. T., Minchin, R. F. (1990). Metabolism of drugs and other xenobiotics in the gut lumen and wall. *Pharmacology and Therapeutics* 46, 67-93.
- INERIS. (2005). Les pentabromodiphényléthers. Données technico-économiques sur les substances chimiques en France, 1-13.
- Imsilp, K., Schaeffer, D. J., Hansen, L. G. (2005). PCB disposition and different biological effects in rats following direct soil exposure vs. PCBs off-gassed from the soil. *Toxicological & Environmental Chemistry* 87, 267 - 285.
- Jayr, E. (2001). Behavior and fate of polycyclic aromatic hydrocarbons in chalky environment : Sorption and biodegradation [Devenir des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) en milieu crayeux : sorption et biodégradation.], *Institut National des Sciences Appliquées de Lyon, Villeurbanne.*, 1-196
- Jiménez, O., Begona, J., Maria, J. G. (2000). Isomer-specific PolyChlorinated Biphenyl determination in Cetaceans from the Mediterranean sea: Enantioselective occurrence of Chiral PolyChlorinated Biphenyl congeners *Environmental Toxicology and Chemistry* 19, 2653-2660.
- Jin, Z., Simkins, S., Xing, B. (1999). Bioavailability of freshly added and aged naphthalene in soils under gastric pH conditions. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18, 2751-2758.
- Johnson, M. D., Keinath II, T. M., Weber Jr, W. J. (2001). A distributed reactivity model for sorption by soils and sediments. 14. Characterization and modeling of phenanthrene desorption rates. *Environmental Science and Technology* 35, 1688-1695.
- Jones, K. C., Stratford, J. A., Waterhouse, K. S., Vogt, N. B. (1989). Organic contaminants in welsh soils: Polynuclear aromatic hydrocarbons. *Environmental Science and Technology* 23, 540-550.

Références bibliographiques

- Juhasz, A. L., et Naidu, R. (2000). Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene. *International Biodeterioration & Biodegradation* 45, 57-88.
- Jurjanz, S., et Rychen, G. (2007). *In Vitro* Bioaccessibility of Soil-Bound Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Successive Digestive Compartments in Cows. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 8800-8805.
- Jurjanz, S., et Delagarde, R. (2010). Ingestion de sol chez la vache laitière selon la quantité d'herbe offerte et le type de pâtûre. . *Rencontres, Recherches, Ruminants. Paris, les 8 et 9 décembre* 17, 109.
- Kadry, A. M., Skowronski, G. A., Turkall, R. M., Abdel-Rahman, M. S. (1995). Comparison between oral and dermal bioavailability of soil-adsorbed phenanthrene in female rats. *Toxicology Letters* 78, 153-163.
- Khan, S. U. (1982). Bound pesticide residus in soil and plants. *Residus reviews* 84, 1-25.
- Khan, S., Cao, Q., Lin, A.-J., Zhu, Y.-G. (2008). Concentrations and bioaccessibility of polycyclic aromatic hydrocarbons in wastewater-irrigated soil using *in vitro* gastrointestinal test. *Environmental Science and Pollution Residus* 15, 344-353.
- Kan, C. A., et Meijer, G. A. L. (2007). The risk of contamination of food with toxic substances present in animal feed. *Animal Feed Science and Technology* 133, 84-108.
- Kang, H. G., Jeong, S. H., Cho, M. H., Cho, J. H. (2007). Changes of biomarkers with oral exposure to benzo(a)pyrene, phenanthrene and pyrene in rats. *Journal of Veterinary Science* 8, 361-368.
- Karimi-Lotfabad, S., Pickard, M. A., Gray, M. R. (1996). Reactions of polynuclear aromatic hydrocarbons on soil. *Environmental Science and Technology* 30, 1145-1151.
- Kaupp, H., et McLachlan, M. S. (1999). Gas/particle partitioning of PCDD/Fs, PCBs, PCNs and PAHs. *Chemosphere* 38, 3411-3421.
- Kelsey, J. W., et Alexander, M. (1997). Declining bioavailability and inappropriate estimation of risk of persistent compounds. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16, 582-585.
- Kelsey, J. W., Kottler, B. D., Alexander, M. (1997). Selective chemical extractants to predict bioavailability of soil-aged organic chemicals. *Environmental Science & Technology* 31, 214-217.
- Kerst, M., Waller, U., Reifenhäuser, W., Körner, W. (2004). Carry-over rates of dioxin-like PCB from grass to cow's milk. *Organohalogen compounds* 66, 2240-2244.
- Khan, S., Cao, Q., Lin, A.-J., Zhu, Y.-G. (2008). Concentrations and bioaccessibility of polycyclic aromatic hydrocarbons in wastewater-irrigated soil using *in vitro* gastrointestinal test. *Environmental Science & Pollution Research* 15, 344-353.
- Khan, S. U. (1982). Bound pesticide residues in soil and plants. *Residues Reviews* 84, 1-25.
- Kierkegaard, A., Asplund, L., De Wit, C. A., McLachlan, M. S., Thomas, G. O., Sweetman, A. J., Jones, K. C. (2007). Fate of higher brominated PBDEs in lactating cows. *Environmental Science and Technology* 41, 417-423.
- Kierkegaard, A., Wit, C. A. d., Asplund, L., McLachlan, M. S., Thomas, G. O., Sweetman, A. J., Jones, K. C. (2009). A Mass Balance of Tri-Hexabrominated Diphenyl Ethers in Lactating Cows. *Environmental Science & Technology* 43, 2602-2607.
- Kjeller, L. O., Jones, K. C., Johnston, A. E., Rappe, C. (1991). Increases in the polychlorinated dibenzo-p-dioxin and -furan content of soils and vegetation since the 1840s. *Environmental Science and Technology* 25, 1619-1627.
- Kouimtzis, T., Samara, C., Voutsas, D., Balafoutis, C., Müller, L. (2002). PCDD/Fs and PCBs in airborne particulate matter of the greater Thessaloniki area, N. Greece. *Chemosphere* 47, 193-205.
- Kraaij, R., Ciarelli, S., Tolls, J., Kater, B. J., Belfroid, A. (2001). Bioavailability of lab-contaminated and native polycyclic aromatic hydrocarbons to the amphipod

Références bibliographiques

- Corophium volutator relates to chemical desorption *Environmental Toxicology and Chemistry* 20, 1716-1724.
- Kraaij, R. H., Tolls, J., Sijm, D., Cornelissen, G., Heikens, A., Belfroid, A. (2002). Effects of contact time on the sequestration and bioavailability of different classes of hydrophobic organic chemicals to benthic oligochaetes (Tubificidae). *Environmental Toxicology and Chemistry* 21, 752-759.
- Krauss, M., et Wilcke, W. (2002). Sorption Strength of Persistent Organic Pollutants in Particle-size Fractions of Urban Soils. *Soil Science Society of America Journal* 66, 430-437.
- Kwon, S., et Pignatello, J. J. (2005). Effect of natural organic substances on the surface and adsorptive properties of environmental black carbon (char): Pseudo pore blockage by model lipid components and its implications for N₂-probed surface properties of natural sorbents. *Environmental Science and Technology* 39, 7932-7939.
- Laor, Y., Strom, P. F., Farmer, W. J. (1999). Bioavailability of phenanthrene sorbed to mineral-associated humic acid. *Water Research* 33, 1719-1729.
- 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. *Journal of Dairy Science* 90, 2624-2629.
- Lappin, G., et Garner, R. C. (2006). Absolute bioavailability: The complete picture. *European Pharmaceutical Contractor*, 88-89.
- Laurent, C., Feidt, C., Grova, N., Mpassi, D., Lichtfouse, E., Laurent, F., and Rychen, G. (2002). Portal absorption of ¹⁴C after ingestion of spiked milk with ¹⁴C-phenanthrene, ¹⁴C-benzo[a]pyrene or ¹⁴C-TCDD in growing pigs. *Chemosphere* 48, 843-848.
- Laurent, C., Feidt, C., and Laurent, F. (2005). Livre, "Contamination des sols: Transferts des sols vers les animaux," Vandoeuvre-lès-Nancy.
- Laurent, C., Feidt, C., Lichtfouse, E., Grova, N., Laurent, F., and Rychen, G. (2001). Milk-Blood Transfer of ¹⁴C-Tagged Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Pigs. *Journal-of-agricultural-and-food-chemistry* 49, 2493-2496.
- Law, R. J., Allchin, C. R., de Boer, J., Covaci, A., Herzke, D., Lepom, P., Morris, S., Tronczynski, J., de Wit, C. A. (2006). Levels and trends of brominated flame retardants in the European environment. *Chemosphere* 64, 187-208.
- Lead, W. A., Steinnes, E., Bacon, J. R., Jones, K. C. (1997). Polychlorinated biphenyls in UK and Norwegian soils: Spatial and temporal trends. *Science of the Total Environment* 193, 229-236.
- Lemasson, P., Schiavon, M., Rychen, G., Perrin-Ganier, C., Feidt, C. (2003). *In vitro* extractibility by rumen juice of two Polycyclic Aromatic Hydrocarbons from soil. In "Qualité des produits" In Rencontres Recherches Ruminants 10, 245-245.
- Liem, A. K. D., Fürst, P., Rappe, C. (2000). Exposure of populations to dioxins and related compounds. *Food Additives and Contaminants* 17, 241-259.
- Lijinsky, W. (1991). The formation and occurrence of polynuclear aromatic hydrocarbons associated with food. *Mutation Research - Genetic Toxicology Testing and Biomonitoring of Environmental or Occupational Exposure* 259, 251-261.
- Lijzen, J. P. A., Baars, A. J., Otte, P. F., Rikken, M. G. J., Swartjes, F. A., Verbruggen, E. M. J., van Wezel, A. P. (2001). Technical evaluation of the Intervention Values for Soil/sediment and Groundwater. *RIVM report 711701 023*, 1-147.
- 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.
- Liste, H. H., et Alexander, M. (2002). Butanol extraction to predict bioavailability of PAHs in soil. *Chemosphere* 46, 1011-1017.

Références bibliographiques

- Liu, P. Y., Zheng, M. H., Xu, X. B. (2002). Phototransformation of polychlorinated dibenzo-p-dioxins from photolysis of pentachlorophenol on soils surface. *Chemosphere* 46, 1191-1193.
- Lorber, M., Fries, G. F., Winters, D., Ferrario, J., Byrne, C. (2000). A study of the mass balance of dioxins and furans in lactating cows in background conditions. Part 2: Mass balance and bioconcentration factors. *Organohalogen compounds* 46, 326-329.
- Lu, M., Yuan, D., Lin, Q., Ouyang, T. (2009). 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* 166, 29-39.
- Lu, X., Reible, D. D., Fleeger, J. W. (2006). Bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons in field-contaminated Anacostia River (Washington, DC) sediment. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25, 2869-2874.
- Luthy, R. G., Aiken, G. R., Brusseau, M. L., Cunningham, S. D., Gschwend, P. M., Pignatello, J. J., Reinhard, M., Traina, S. J., Weber, W. J., Westall, J. C. (1997). Sequestration of Hydrophobic Organic Contaminants by Geosorbents. *Environmental Science & Technology* 31, 3341-3347.
- Lutz, S., Feidt, C., Monteau, F., Rychen, G., Le Bizec, B., Jurjanz, S. (2006). Effect of exposure to soil-bound polycyclic aromatic hydrocarbons on milk contaminations of parent compounds and their monohydroxylated metabolites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 263-268.
- Lyche, J. L., Larsen, H. J. S., Skaare, J. U., Tverdal, A., Dahl, E., Johansen, G. M., Ropstad, E. (2004a). Effects of perinatal exposure to low doses of PCB 153 and PCB 126 on lymphocyte proliferation and hematology in goat kids. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* 67, 889 - 904.
- Lyche, J. L., Skaare, J. U., Larsen, H. J. S., Ropstad, E. (2004b). Levels of PCB 126 and PCB 153 in plasma and tissues in goats exposed during gestation and lactation. *Chemosphere* 55, 621-629.
- Murphy, E. M., Zachara, J. M., Smith, S. C. (1990). Influence of mineral-bound humic substances on the sorption of hydrophobic organic compounds. *Environmental Science & Technology* 24, 1507-1516.
- Macfarlane, G. T., et Macfarlane, S. (1997). Human colonic microbiota: Ecology, physiology and metabolic potential of intestinal bacteria. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 32 Supplement 222, 3-9.
- Macleod, C. J. A., et Semple, K. T. (2003). Sequential extraction of low concentrations of pyrene and formation of non-extractable residues in sterile and non-sterile soils. *Soil Biology and Biochemistry* 35, 1443-1450.
- 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.
- Malisch, R. (2000). Increase of the PCDD/F-contamination of milk, butter and meat samples by use of contaminated citrus pulp. *Chemosphere* 40, 1041-1053.
- Manz, M., Wenzel, K. D., Dietze, U., Schüürmann, G. (2001). Persistent organic pollutants in agricultural soils of central Germany. *Science of the Total Environment* 277, 187-198.
- Masclet, P., Hoyau, V., Jaffrezo, J. L., Legrand, M. (1995). Evidence for the presence of polycyclic aromatic hydrocarbons in the polar atmosphere and in the polar ice of Greenland. *Analisis* 23, 250-252.
- Masuda, Y., Schecter, A., Pöpke, O. (1998). Concentrations of PCBs, PCDFs and PCDDs in the blood of Yusho patients and their toxic equivalent contribution. *Chemosphere* 37, 1773-1780.

Références bibliographiques

- Mayland, H. F., Shewmaker, G. E., Bull, R. C. (1977). Soil Ingestion by Cattle Grazing Crested Wheatgrass. *Journal of Range Management* 30, 264-265.
- McAllister, L., et Semple, K. T. (2010). Measurement of bioaccessibility of organic pollutants in soil. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 599, 1-14.
- McLachlan, M., et Richter, W. (1998). Uptake and Transfer of PCDD/Fs by Cattle Fed Naturally Contaminated Feedstuffs and Feed Contaminated as a Result of Sewage Sludge Application. 1. Lactating Cows. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46, 1166 -1172.
- McLachlan, M. S. (1993). Mass balance of polychlorinated biphenyls and other organochlorine compounds in a lactating cow. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 41, 474-480.
- McLachlan, M. S. (1994). Model of the fate of hydrophobic contaminants in cows. *Environmental Science Technology* 28, 2407-2414.
- McLachlan, M. S. (1997). A simple model to predict accumulation of PCDD/Fs in an agricultural food chain. *Chemosphere* 34, 1263-1276.
- Menzie, C. A., Potocki, B. B., and Santodonato, J. (1992). Exposure to carcinogenic PAHs in the environment. *Environmental Science & Technology* 26, 1278-1284.
- Mersch-Sundermann, V., Rosenkranz, H. S., Klopman, G. (1992). Structural basis of the genotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutagenesis* 7, 211-218.
- Mesa, A. C., et Spokas, K. A. (2010). Impacts of Biochar (Black Carbon) Additions on the Sorption and Efficacy of Herbicides. *Herbicides and Environment* 15, 115-131.
- Minhas, J. K., Vasiluk, L., Pinto, L. J., Gobas, F. A. P. C., Moore, M. M. (2006). Mobilization of chrysene from soil in a model digestive system. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25, 1729-1737.
- Nadal, M., Schuhmacher, M., Domingo, J. L. (2004). Levels of PAHs in soil and vegetation samples from Tarragona County, Spain. *Environmental Pollution* 132, 1-11.
- Nam, K., et Alexander, M. (1998). Role of nonporosity and hydrophobicity in sequestration and bioavailability: Tests with model solids. *Environmental Science and Technology* 32, 71-74.
- Nam, K., Chung, N., Alexander, M. (1998). Relationship between Organic Matter Content of Soil and the Sequestration of Phenanthrene. *Environmental Science & Technology* 32, 3785-3788.
- Nam, K., Kim, J. Y., Oh, D. I. (2003a). Effect of soil aggregation on the biodegradation of phenanthrene aged in soil. *Environmental Pollution* 121, 147-151.
- Nam, J. J., Song, B. H., Eom, K. C., Lee, S. H., Smith, A. (2003b). Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in agricultural soils in South Korea. *Chemosphere* 50, 1281-1289.
- Nebbia, C. (2001). Biotransformation enzymes as determinants of xenobiotic toxicity in domestic animals. *Veterinary Journal* 161, 238-252.
- Norén, K., Weistrand, C., Karpe, F. (1999). 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* 37, 408-414.
- Northcott, G. L., Jones, K. C. (2001). Partitioning, Extractability, and Formation of Nonextractable PAH Residues in Soil. 2. Effects on Compound Dissolution Behavior. *Environmental Science & Technology* 35, 1111-1117.
- Nwaneshiudu, O. C., Autenrieth, R. L., McDonald, T. J., Donnelly, K. C., Degollado, E. D., Abusalih, A. A. (2007). Risk of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) exposure from ingested food: the Azerbaijan case study. *Journal of environmental science and health. Part. B, Pesticides, food contaminants, and agricultural wastes* 42, 201-209.

Références bibliographiques

- Nylund, L., Hakala, E., Sorsa, M. (1992). Application of a semi-automated SOS chromotest for measuring genotoxicities of complex environmental mixtures containing polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research* 276, 125-132.
- Offenberg, J. H., et Baker, J. E. (2002). The influence of aerosol size and organic carbon content on gas/particle partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Atmospheric Environment* 36, 1205-1220.
- Oleszczuk, P. (2009). Application of three methods used for the evaluation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) bioaccessibility for sewage sludge composting. *Bioresource Technology* 100, 413-420.
- 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.
- Oomen, A. G., Tolls, J., Kruidenier, M., Bosgra, S. S. D., Sips, A. J. A. M., Groten, J. P. (2001). Availability of Polychlorinated Biphenyls (PCBs) and Lindane for Uptake by Intestinal Caco-2 Cells *Environmental Health Perspectives* 109, 731-737
- Oomen, A. G., Rempelberg, C. J. M., Bruil, M. A., Dobbe, C. J. G., Pereboom, D. P. K. H., Sips, A. J. A. M. (2003). Development of an *In Vitro* Digestion Model for Estimating the Bioaccessibility of Soil Contaminants. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 44, 281-287.
- Oomen, A. G., Tolls, J., Sips, A. J. A. M., Groten, J. P. (2003). *In Vitro* Intestinal Lead Uptake and Transport in Relation to Speciation. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 44, 116-124.
- Oomen, A. G., Rempelberg, C. J. M., Van de Kamp, E., Pereboom, D. P. K. H., De Zwart, L. L., Sips, A. J. A. M. (2004). Effect of Bile Type on the Bioaccessibility of Soil Contaminants in an *In Vitro* Digestion Model. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* V46, 183-188.
- OSPAR. (2004). Brominated flame retardants. http://qsr2010.ospar.org/media/assessments/p00395_supplements/p00395_supp_09_brominated_flame_retardants.pdf.
- Park, K. S., Sims, R. C., Dupont, R. R., Doucette, W. J., Matthews, J. E. (1990). Fate of PAH compounds in two soil types: influence of volatilization, abiotic loss and biological activity. *Environmental Toxicology and Chemistry* 9, 187-195.
- Park, S. S., Park, J.-W., Uchrin, C., Cheney, M. A. (2002). A micelle inhibition model for the bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons in aquatic systems. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21, 2737-2741.
- Pflimlin, A. (2006). Place du pâturage dans les systèmes laitiers en Europe evolution et nouveaux enjeux. <http://www.adcf.ch/pdf/8mars06/07.pdf> Institut de l'élevage, 1-12.
- Picado, A., Nogueira, A., Baeta-Hall, L., Mendonça, E., Rodrigues, M. d. F., Sàágua, M. d. C., Martins, A., Anselmo, A. M. (2001). Landfarming in a PAH-contaminated soil. *Journal of Environmental Science and Health . Part A* 36, 1579 - 1588.
- Pignatello, J. J. (1998). Soil organic matter as a nanoporous sorbent of organic pollutants. *Advances in Colloid and Interface Science* 76-77, 445-467.
- Pignatello, J. J., et Xing, B. (1995). Mechanisms of Slow Sorption of Organic Chemicals to Natural Particles. *Environmental Science & Technology* 30, 1-11.
- Pirard, C., et De Pauw, E. (2007). Absorption, disposition and excretion of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in chicken. *Chemosphere* 66, 320-325.
- PNUE. (2006). Pentabromodiphényléther. Rapport K0653880 230107.
- Poiger, H., et Schlatter, C. (1980). Influence of solvents and adsorbents on dermal and intestinal absorption of TCDD. *Food and Cosmetics Toxicology* 18, 477-481.

Références bibliographiques

- Prankel, S. H., Nixon, R. M., Phillips, C. J. C. (2004). Meta-analysis of feeding trials investigating cadmium accumulation in the livers and kidneys of sheep. *Environmental Research* 94, 171-183.
- Pribyl, D. W. (2010). A critical review of the conventional SOC to SOM conversion factor. *Geoderma* 156, 75-83.
- Pu, X., Carlson, G. P., Lee, L. S. (2003). Oral bioavailability of Pentachlorophenol from soils of varying characteristics using a rat model. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* 66, 2001 - 2013.
- Pu, X., Lee, L. S., Galinsky, R. E., Carlson, G. P. (2004). Evaluation of a rat model versus a physiologically based extraction test for assessing phenanthrene bioavailability from soils. *Toxicological Sciences* 79, 10-17.
- 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.
- Ramesh, A., Inyang, F., Hood, D. B., Archibong, A. E., Knuckles, M. E., Nyanda, A. M. (2001). Metabolism, bioavailability, and toxicokinetics of Benzo(a)pyrene F-344 rats following oral administration. *Experimental and Toxicologic Pathology* 53, 275-290.
- Ramesh, A., Walker, S. A., Hood, D. B., Guillén, M. D., Schneider, K., Weyand, E. H. (2004). Bioavailability and risk assessment of orally ingested polycyclic aromatic hydrocarbons. *International Journal of Toxicology* 23, 301-333.
- Reeves, W. R., McDonald, T. J., Bordelon, N. R., George, S. E., Donnelly, K. C. (2001). Impacts of aging on *in vivo* and *in vitro* measurements of soil-bound polycyclic aromatic hydrocarbon availability. *Environmental Science and Technology* 35, 1637-1643.
- 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.
- Roos, P. H., Tschirbs, S., Hack, A., Welge, P., and Wilhelm, M. (2004). Different mechanisms of handling ingested polycyclic aromatic hydrocarbons in mammalian species: organ-specific response patterns of CYP1A1-induction after oral intake of PAH-contaminated soils. *Xenobiotica* 34, 781-795.
- Rotard, W., Christmann, W., Knoth, M. (1992). Investigation on the absorption availability of PCDD/PCDF from industriogenic soil. Model experiments on absorption assessment after oral ingestion, . *Organohalogen Compounds* 10, 199-200.
- Rotard, W., Christmann, W., Knoth, W., Mailahn, W. (1995). Bestimmung der resorptionsverfügbaren PCDD/PCDF aus Kieselrot. *UWSF-Z Umweltchem Ökotox* 7, 3R9.
- Ruby, M. V., Davis, A., Schoof, R., Eberle, S., Sellstone, C. M. (1996). Estimation of lead and arsenic bioavailability using a physiologically based extraction test. *Environmental Science and Technology* 30, 422-430.
- Ruby, M. V., Fehling, K. A., Paustenbach, D. J., Landenberger, B. D., and Holsapple, M. P. (2002). Oral bioaccessibility of dioxins/furans at low concentrations (50-350 ppt toxicity equivalent) in soil. *Environmental Science and Technology* 36, 4905-4911.
- Rugge, C. D., et Ahlert, R. C. (1993). Contact angle hysteresis in chlorinated hydrocarbon-water mixtures. *Journal of Physical Chemistry* 97, 8776-8779.
- Ryan, J. A., Bell, R. M., Davidson, J. M., O'Connor, G. A. (1988). Plant uptake of non-ionic organic chemicals from soils. *Chemosphere* 17, 2299-2323.
- Rychen, G., Ducoulombier-Crépineau, C., Grova, N., Jurjanz, S., Feidt, C. (2005). Modalités et risques de transfert des polluants organiques persistants vers le lait. *INRA Productions Animales* 18, 355-366.

Références bibliographiques

- Saghir, S. A., Bartels, M. J., Budinsky, R. A., Harris, E. E., Clark, A. J., Staley, J. L., Chai, Y., Davis, J. W. (2007). Effect of organic carbon content, clay type, and aging on the oral bioavailability of Hexachlorobenzene in rats *Environmental Toxicology and Chemistry* 26, 2420-2429.
- Saison, C., Perrin-Ganier, C., Amellal, S., Morel, J. L., Schiavon, M. (2004). Effect of metals on the adsorption and extractability of ¹⁴C-phenanthrene in soils. *Chemosphere* 55, 477-485.
- Sauvant, D., Schmidely, P., Daudin, J. J., St-Pierre, N. R. (2008). Meta-analyses of experimental data in animal nutrition. *Animal* 2, 1203-1214.
- Schechter, A., Paul, C., Kathy, B., John, S., Olaf, P., James, O., Andrew, S., Michael, S. (2001). Intake of Dioxins and related compounds from food in the U.S. population. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* 63, 1-18.
- Schreitmüller, J., et Ballschmiter, K. (1994). The equilibrium distribution of semivolatile organochloro compounds between atmosphere and surface water in the Atlantic Ocean. *Angewandte Chemie (International Edition in English)* 33, 646-649.
- Schuhmacher, M., Nadal, M., Domingo, J. L. (2004). Levels of PCDD/Fs, PCBs, and PCNs in Soils and Vegetation in an Area with Chemical and Petrochemical Industries. *Environmental Science and Technology* 38, 1960-1969.
- 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.
- Schulten, H. R., et Schnitzer, M. (1997). Chemical model structures for soil organic matter and soils. *Soil Science* 162, 115-130.
- Semple, K. T., Morriss, A. W. J., Paton, G. I. (2003). Bioavailability of hydrophobic organic contaminants in soils: fundamental concepts and techniques for analysis. *European Journal of Soil Science* 54, 809-818.
- Sewart, A., et Jones, K. C. (1996). A survey of PCB congeners in U.K. cows' milk. *Chemosphere* 32, 2481-2492.
- Shu, H., Paustenbach, D., Murray, F. J., Marple, L., Brunck, B., Dei Rossi, D., Teitelbaum, P. (1988). Bioavailability of soil-bound TCDD: Oral bioavailability in the rat. *Fundamental and Applied Toxicology* 10, 648-654.
- Siciliano, S. D., Laird, B. D., Lemieux, C. L. (2010). Polycyclic aromatic hydrocarbons are enriched but bioaccessibility reduced in brownfield soils adhered to human hands. *Chemosphere* 80, 1101-1108.
- Sips, A., Bruil, M. A., Dobbe, C. J. G., van de Kamp, E., Oomen, A. G., Pereboom, D. P. K. H., Rempelberg, C. J. M., Zeilmaker, M. J. (2001). "Bioaccessibility of contaminants from ingested soil in humans. Method development and research on the bioaccessibility of lead and benzo[a]pyrene." National Institute of Public Health and the Environment Bilthoven. 1-67
- Sjödin, A., Patterson Jr, D. G., Bergman, Å. (2003). A review on human exposure to brominated flame retardants - Particularly polybrominated diphenyl ethers. *Environment International* 29, 829-839.
- Slob, W., Oiling, M., Derks, H. J. G. M., De Jong, A. P. J. M. (1995). Congener-specific bioavailability of PCDD/Fs and coplanar PCBs in cows: Laboratory and field measurements. *Chemosphere* 31, 3827-3838.
- Smith, K. E. C., Thomas, G. O., Jones, K. C. (2001). Seasonal and species differences in the air - Pasture transfer of PAHs. *Environmental Science and Technology* 35, 2156-2165.
- Song, Y. F., Gong, P., Wilke, B. M., Zhang, W., Song, X. Y., Sun, T. H., Ackland, M. L. (2007). Genotoxicity assessment of soils from wastewater irrigation areas and bioremediation sites using the *Vicia faba* root tip micronucleus assay. *Journal of Environmental Monitoring* 9, 182-186.

Références bibliographiques

- Strickland, P., et Kang, D. (1999). Urinary 1-hydroxypyrene and other PAH metabolites as biomarkers of exposure to environmental PAH in air particulate matter. *Toxicology Letters* 108, 191-199.
- Stroo, H. F., Jensen, R., Loehr, R. C., Nakles, D. V., Fairbrother, A., Liban, C. B. (2000). Environmentally acceptable endpoints for PAHs at a manufactured gas plant site. *Environmental Science and Technology* 34, 3831-3836.
- Stroo, H. F., Nakles, D. V., Kreitinger, J. P., Loehr, R. C., Hawthorne, S. B., Luthy, R. G., Holman, H. Y., LaPierre, A. (2005). Improving risk assessments for manufactured gas plant soils by measuring PAH availability. *Integrated environmental assessment and management* 1, 259-266.
- Stockholm, C. d. (2001). La convention a été signée le 22 mai 2001 dans la ville éponyme. Elle est entrée en vigueur le 17 mai 2004.
- Sugihara, N., et James, M. O. (2003). Binding of 3-hydroxybenzo[a]pyrene to bovine hemoglobin and albumin. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 17, 239-247.
- Sweetman, A. J., Thomas, G. O., Jones, K. C. (1999). Modelling the fate and behaviour of lipophilic organic contaminants in lactating dairy cows. *Environmental Pollution* 104, 261-270.
- Tang, X.-Y., Tang, L., Zhu, Y.-G., Xing, B.-S., Duan, J., Zheng, M.-H. (2006). Assessment of the bioaccessibility of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils from Beijing using an *in vitro* test. *Environmental Pollution* 140, 279-285.
- Tankari Dan-Badjo, A., Ducoulombier-Crépineau, C., Soligot, C., Feidt, C., and Rychen, G. (2007). Deposition of platinum group elements and polycyclic aromatic hydrocarbons on ryegrass exposed to vehicular traffic. *Agronomy for Sustainable Development* 27, 261-266.
- Thomas, G. O., Smith, K. E. C., Sweetman, A. J., Jones, K. C. (1998). Further studies of the air-pasture transfer of polychlorinated biphenyls. *Environmental Pollution* 102, 119-128.
- Thomas, G. O., Sweetman, A. J., Jones, K. C. (1999). Input-output balance of polychlorinated biphenyls in a long-term study of lactating dairy cows. *Environmental Science and Technology* 33, 104-112.
- Thomas, G. O., Moss, S. E. W., Asplund, L., Hall, A. J. (2005). Absorption of decabromodiphenyl ether and other organohalogen chemicals by grey seals (*Halichoerus grypus*). *Environmental Pollution* 133, 581-586.
- Thron, K. U., Bruhn, R., McLachlan, M. S. (2004). The influence of age, sex, body-condition, and region on the levels of PBDEs and toxaphene in harbour porpoises from European waters. *Fresenius Environmental Bulletin* 13, 146-155.
- Toutain P. L et Bousquet-Melou, A. (2000). La biodisponibilité et son évaluation. 1-38 http://physiologie.envt.fr/spip/IMG/pdf/La_biodisponibilite_et_son_evaluation.pdf.
- 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.
- Tuháčková, J., Cajthaml, T., Novák, K., Novotný, Č., Mertelík, J., Šásek, V. (2001). Hydrocarbon deposition and soil microflora as affected by highway traffic. *Environmental Pollution* 113, 255-262.
- Turkall, R. M., Skowronski, G., Gerges, S., Von Hagen, S., Abdel-Rahman, M. S. (1988). Soil adsorption alters kinetics and bioavailability of benzene in orally exposed male rats. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 17, 159-164.
- Turkall, R. M., Skowronski, G. A., Abdel-Rahman, M. S. (1991). Differences in kinetics of pure and soil-adsorbed toluene in orally exposed male rats. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 20, 155-160.

Références bibliographiques

- Turner, J. C., et Shanks, V. (1980). Absorption of some Organochlorine Compounds by the Rat Small Intestine - *In vivo*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 24, 652-655.
- Turrio-Baldassarri, L., Abate, V., Alivernini, S., Battistelli, C. L., Carasi, S., Casella, M., Iacovella, N., Iamiceli, A. L., Indelicato, A., Scarcella, C., La Rocca, C. (2007). A study on PCB, PCDD/PCDF industrial contamination in a mixed urban-agricultural area significantly affecting the food chain and the human exposure. Part I: Soil and feed. *Chemosphere* 67, 1822-1830.
- US EPA. (2005). Toxic Equivalency Factors (TEF) for Dioxin and Related Compounds. http://www.epa.gov/ncea/pdfs/dioxin/nasreview/pdfs/part2/dioxin_pt2_ch09_dec2003.pdf
- US EPA. (1999). Persistent Bioaccumulative Toxic (PBT) Chemicals; Proposed Rule. *Federal Register* 64, 687-729.
- Van Keulen, J., et Young, B. A. (1977). Evaluation of Acid-Insoluble Ash as a Natural Marker in Ruminant Digestibility Studies. *Journal of Animal Science* 44, 282-287.
- Van de Wiele T. R. (2005). Oral exposure to environmental contaminants : Processes of bioavailability and interactions with intestinal microorganisms-PhD University of Gent, 1-216.
- Van de Wiele, T., Vanhaecke, L., Boeckaert, C., Peru, K., Headley, J., Verstraete, W., Siciliano, S. (2005). Human Colon Microbiota Transform Polycyclic Aromatic Hydrocarbons to Estrogenic Metabolites *Environmental Health Perspectives* 113, 6-10.
- Van De Wiele, T. R., Verstraete, W., Siciliano, S. D. (2004). Polycyclic aromatic hydrocarbon release from a soil matrix in the *in vitro* gastrointestinal tract. *Journal of Environmental Quality* 33, 1343-1353.
- 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., Waern, F., Zacharewski, T. (1998). Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife. *Environmental Health Perspectives* 106, 775-792.
- Van der Gon, H. D., van het Bolscher, M., Visschedijk, A., Zandveld, P. (2007). Emissions of persistent organic pollutants and eight candidate POPs from UNECE-Europe in 2000, 2010 and 2020 and the emission reduction resulting from the implementation of the UNECE POP protocol. *Atmospheric Environment* 41, 9245-9261.
- Van Schooten, F. J., Moonen, E. J. C., Van Der Wal, L., Levels, P., Kleinjans, J. C. S. (1997). 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* 33, 317-322.
- Van Veld, P. A., Westbrook, D. J., Woodrin, B. R., Hale, R. C., Smith, C. L., Huggett, R. J., Stegeman, J. J. (1990). Induced cytochrome P-450 in intestine and liver of spot (*Leiostomus xanthurus*) from a polycyclic aromatic hydrocarbon contaminated environment. *Aquatic Toxicology* 17, 119-131.
- Varadachari, C., Chattopadhyay, T., Ghosh, K. (1997). Complexation of humic substances with oxides of iron and aluminum. *Soil Science* 162, 28-34.
- Vasiluk, L., Pinto, L. J., Walji, Z. A., Wing, S. T., Gobas, F. A. P. C., Eickhoff, C., Moore, M. M. (2007). Benzo[a]pyrene bioavailability from pristine soil and contaminated sediment assessed using two *in vitro* models. *Environmental Toxicology and Chemistry* 26, 387-393.

Références bibliographiques

- Wacher, V. J., Wu, C. Y., Benet, L. Z. (1995). Overlapping substrate specificities and tissue distribution of cytochrome P450 3A and P-glycoprotein: Implications for drug delivery and activity in cancer chemotherapy. *Molecular Carcinogenesis* 13, 129-134.
- Weber Jr, W. J., Huang, W. (1996). A distributed reactivity model for sorption by soils and sediments. 4. Intraparticle heterogeneity and phase-distribution relationships under nonequilibrium conditions. *Environmental Science and Technology* 30, 881-888.
- Weber Jr, W. J., LeBoeuf, E. J., Young, T. M., Huang, W. (2001). Contaminant interactions with geosorbent organic matter: Insights drawn from polymer sciences. *Water Research* 35, 853-868.
- White, J. C., Kelsey, J. W., Hatzinger, P. B., Alexander, M. (1997). Factors affecting sequestration and bioavailability of Phenanthrene in soils. *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 2040-2045.
- White, J. C., Quinones-Rivera, A., Alexander, M. (1998). Effect of wetting and drying on the bioavailability of organic compounds sequestered in soil. *Environ. Toxicol. Chem.* 17, 2378-2382.
- WHO. (2003). Health risks of Persistent Organic Pollutants from long-range transboundary air pollution. *The world health report* www.euro.who.int/Document/e78963.pdf.
- WHO. (1998). Assessment of the health risk of dioxins: re-evaluation of the Tolerable Daily Intake (TDI). <http://www.who.int/ipcs/publications/en/exe-sum-final.pdf>, 1-28.
- Wilcke, W., et Amelung, W. (2000). Persistent organic pollutants in native grassland soils along a climosequence in North America. *Soil Science Society of America Journal* 64, 2140-2148.
- Wilcke, W., Zech, W., Kobza, J. (1996). PAH-pools in soils along a PAH-deposition gradient. *Environmental Pollution* 92, 307-313.
- Wild, S. R., et Jones, K. C. (1995). Polynuclear aromatic hydrocarbons in the United Kingdom environment: A preliminary source inventory and budget. *Environmental Pollution* 88, 91-108.
- Wilson, S. C., et Jones, K. C. (1993). Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): A review. *Environmental Pollution* 81, 229-249.
- Wittsiepe, J., Schrey, P., Hack, A., Selenka, F., and Wilhelm, M. (2001). 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* 203, 263-273.
- Wittsiepe, J., Erlenkämper, B., Welge, P., Hack, A., Wilhelm, M. (2007). Bioavailability of PCDD/F from contaminated soil in young Goettingen minipigs. *Chemosphere* 67, S355-S364.
- Wu, W. Z., Schramm, K. W., Kettrup, A. (2002). Bioaccumulation of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in the foodweb of Ya-Er Lake area, China. *Water Research* 35, 1141-1148.
- Wu, T., Wu, Q., Guan, S., Su, H., Cai, Z. (2007). Binding of the environmental pollutant naphthol to bovine serum albumin. *Biomacromolecules* 8, 1899-1906.
- Wyrzykowska, B., Hanari, N., Orlikowska, A., Bochentin, I., Rostkowski, P., Falandysz, J., Taniyasu, S., Horii, Y., Jiang, Q., Yamashita, N. (2007). Polychlorinated biphenyls and -naphthalenes in pine needles and soil from Poland - Concentrations and patterns in view of long-term environmental monitoring. *Chemosphere* 67, 1877-1886.
- Yang, Y., Ratté, D., Smets, B. F., Pignatello, J. J., Grasso, D. (2001). Mobilization of soil organic matter by complexing agents and implications for polycyclic aromatic hydrocarbon desorption. *Chemosphere* 43, 1013-1021.
- Yang, Y., Zhang, N., Xue, M., and Tao, S. (2010). Impact of soil organic matter on the distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in soils. *Environmental Pollution* 158, 2170-2174.

Références bibliographiques

- Zhao, X., Zheng, M., Zhang, B., Zhang, Q., Liu, W. (2006). Evidence for the transfer of polychlorinated biphenyls, polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins, and polychlorinated dibenzofurans from soil into biota. *Science of the Total Environment* 368, 744-752.
- Zhong, Y., Overcash, M. R., and McPeters, A. L. (1993). Near sunlight zone model for photodegradation of TCDD in soils containing organic solvents. *Chemosphere* 26, 1263-1272.
- Zimmerman, J. R., Ghosh, U., Millward, R. N., Bridges, T. S., Luthy, R. G. (2004). Addition of carbon sorbents to reduce PCB and PAH bioavailability in marine sediments: Physicochemical tests. *Environmental Science and Technology* 38, 5458-5464.

Annexe I- 1: Persistance et bioaccumulation des PCB (US EPA, 1999)

Nom chimique (IUPAC)	Numéro du congénère	BCF	Persistance (demi-vie)	
			Air (jours)	Sol (années)
2,3,3',4,4',5,5'-heptachlorobiphenyle	PCB 189	4922	19-191	>3,9-5
2,3,3',4,4',5-hexachlorobiphenyle	PCB 156	37590	13-127	>3,4-5
2,3,3',4,4',5'-hexachlorobiphenyle	PCB 157	37590	11-114	>3,4-5
2,3',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyle	PCB 167	37590	11-115	>3,4-5
3,3',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyle	PCB 169	73840	9-88	>3,4-6
2,3,3',4,4'-pentachlorobiphenyle	PCB 105	196900	8-80	0,91-7,25
2,3,4,4',5-pentachlorobiphenyle	PCB 114	196900	7-67	0,91-7,26
2,3',4,4',5-pentachlorobiphenyle	PCB 118	184300	8-80	0,91-7,27
2,3',4,4',5'-pentachlorobiphenyle	PCB 123	196900	5-50	0,91-7,28
3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyle	PCB 126	196900	6-57	0,91-7,29
3,3',4,4'-tétrachlorobiphenyle	PCB 77	105900	4-37	0,91-4,83

BCF: Facteur de BioConcentration calculé sur la base du rapport entre la concentration de polluant ingérée dans l'aliment et la concentration de polluant retrouvé dans les tissus.

Annexes

Annexe I- 2 : Persistance et bioaccumulation des HAP (US EPA, 1999)

Nom chimique	BCF*	Persistance (demi-vie)	
		Air	Sol
Benzo[a]pyrène	912	2,4 h	151 j-14,6 ans
Benzo[b]fluoranthène	5631	3,4 h-1,4 j	87 j-14,2 ans
Benzo[r,s,t]pentaphène	26280	1-13 h	232-371 j
Benzo[a]anthracène	800	1-13 h	240 j-2,0 ans
Dibenzo[a,h]anthracène	31440	1-13 h	240 j-2 ans
Benzo[k]fluoranthène	10,090	1-12 h	139 j-11 ans
Benzo[j]fluoranthène	10090	1-12 h	10,5 ans
Dibenzo[a,e]pyrène	6,875	1-13 h	232-371 j
Dibenzo[a,h]pyrène	26280	1-13 h	232-371 j
Indeno[1,2,3-cd]pyrène	28620	0,34-7,6 h	58-730 j
Benzo[g,h,i]perylène	25420	0,31-10 h	173 j-1,8 ans
Dibenzo[a,e]fluoranthène	26280	1-10 h	232-371 j
Benzo[a]phénanthrène	800	1-13 h	255 j-2,7 ans
Fluoranthène	5100	2-20 h	110 j-13 ans

*BCF : Facteur de BioConcentration.

Annexes

Annexe I- 3 : Concentration et profil en PCB de différents types de sols

	Sol urbain- agricole	Sol agricole	Sol région polaire	Sol agricole	Sol urbain	Sol industriel (chimique)	Sol industriel (pétrochimique)
	Turrio <i>et al., 2007</i>	Lead <i>et al., 1997</i>	Miyake <i>et al., 2007</i>	Schuhmacher <i>et al., 2004</i>			
Unité	µg/kg						
Non-Dioxin- Like PCB	28	0,28	0,25	0,08	0,04	0,02	0,04
	52	0,13	0,25	0,01	0,04	0,2	0,4
	101	0,15	0,23	0,07	0,1	1,0	1,4
	138	0,28	0,19	0,1	0,4	2,2	2,6
	153	0,34	0,23	0,2	0,5	3,0	3,0
	180	0,13	0,15	0,17	0,5	2,9	3,4
Unité	ng/kg						
Dioxin-Like PCB	105	1 à 255					
	114	0,3 à 83					
	123	0,05 à 10					
	156	0,7 à 128					
	157	0,1 à 23					
	167	0,4 à 64					
	189	0,8 à 24					
	77	0,09 à 19					
	81	0,005 à 0,5					
	126	0,05 à 2,2					
169	0,012 à 0,2						
Total	5 à 1270	1,52	1,3	12,0	19,6	10,3	0,6

NDL : Non Dioxin-Like ; DL : Dioxin -Like.

Annexe I- 4 : Concentrations et profil en PBDE de différents types de sols

PBDE ($\mu\text{g}/\text{kg MS}$)	Sol urbain ou agricole	Sol amendé en boues
	(Hassanin <i>et al.</i> , 2004)	(Law <i>et al.</i> , 2006)
Tétra-BDE 47	1,4	
Penta-BDE 99	3,2	
Penta-BDE 100	0,4	
Hexa-BDE 153	1,2	
Hexa-BDE 154	0,4	
Σ 5 PBDE*	6,6	29
Σ PBDE	12	

* majoritaires

Annexes

Annexe I- 5 : Concentrations et profil en HAP de différents types de sols

	Crépineau <i>et al.</i> , 2003	Wild et Jones, 1995				Nam <i>et al.</i> , 2003b	Song <i>et al.</i> , 2007			Juhasz et Naidu, 2000			
	à 50 m d'une autoroute	sol rural	sol urbain	sol forestier	sol de cokerie	sol de rizière	Sol agricole irrigué en eaux usées Allemagne + Chine		Site d'extraction de gaz	Site pétrochimique	Site de traitement du bois	Site COGEMA	
	µg/kg MS						mg/kg MS						
(1) Naphthalène	15	6,2	30,5	154	nq	25,3	16	100	na	1131	3925	na	
(2) Acénaphène	4	37	166	86	227	1,5	105	650	2	na	1368	2	
(3) Acénaphthylène	12	na	na	na	na	2,2	nq	nq	na	33	49	28	
(4) Fluorène	5	na	na	na	na	4,6	20	90	225	650	1792	4	
(5) Phénanthrène	76	14	481	533	379	22,4	215	290	379	1595	4434	51	
(6) Anthracène	13	2,4	88	17	156	8	45	50	156	334	3307	58	
(7) Fluoranthène	162	27	1256	1132	2174	32,9	520	360	2174	682	1629	195	
(8) Pyrène	123	31	645	573	491	20,1	330	280	491	642	1303	173	
(9) Benzo[a]anthracène	79	20**	1153**	796**	662**	17	345	120	317	na	171	88	
(10) Chrysène	126	na	na	na	na	10,7	285	140	345	614	481	52	
(11) Benzo[b]fluoranthène	163	9,8	613	492	92	27	470	150	2271***	na	140***	99	
(12) Benzo[k]fluoranthène	54	na	na	na	na	5,7	230	80	nq	na	na	na	
(13) Benzo(a)pyrène	70	6,8	379	352	260	12,4	510	230	92	na	82	106	
(14) Indéno[1,2,3-cd]pyrène	93	na	na	na	na	7,7	nq	nq	120	na	23	46	
(15) Benzo[g,h,i]pérylène	102	33	428	685	nq	8,7	470	180	na	na	na	na	
(16) Dibenzo[a,h]anthracène	48	na	na	na	na	2,3	130	35	192	na	na	na	
Total	1145	187	4239	4809	4441	208	3690	2760	6764	5067	18704	902	

na : non analysé ; nq : non quantifié ; * : Acétaphène+Fluorène ; ** : Benzo[a]anthracène+Chrysène ; *** : Benzo[b]fluoranthène+Benzo[k]fluoranthène ; + : sol d'archive

Annexes

Annexe I- 6 : Récapitulatif des teneurs en PCB, PCDD/F et HAP retrouvées dans les différents organes et compartiments biologiques

Références	Type de contamination	Vecteur de pollution	Dose ingérée	Durée d'exposition	Période de prélèvements	Matrice étudiée	Unité de mesure	PCB non dioxin-like										PCB dioxin-like								
								28	52	101	153	180	77	81	105	114	126	156	167	169	189	118				
Kerst <i>et al.</i> , 2004	Envir.	Aliment	0,15-279 ng/kg	Chronique	Etude <i>in situ</i>	Lait	ng/kg MG	nd	nd	nd	nd	nd	nd	8,6	1,3	357	29	15	228	34	126	1,7	25	1745		
Costera <i>et al.</i> , 2006	Envir.	Aliment	0,12-319 ng/kg	Chronique	Après 71 jours	Lait	ng/kg MG	332	140	225	1890	3524	1191	13,37	2,22	660	29,94	20,97	179	40	72	5,67	18,94	1652		
Zhao <i>et al.</i> , 2006	Envir.	Aliment	<1 à 2357 ng/kg	Chronique	Etude <i>in situ</i>	Œuf	pg/g MG	646	64	62	584	637	103	25,9	<6	301,9	20	5949	84	20266	30,3	223	4541	660		
De Vos <i>et al.</i> , 2005	Artif.	Aliment	6 ng/kg	Chronique	Après 500 jours	Œuf TA	pg/g MG	4 14,6	0,41 0,71	0,38 1,2	3,29 11,1	4,95 19	3,91 16,3	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	2,79 10,73		
Lindstrom <i>et al.</i> , 2002	Envir.	Aliment	analyse 25 laboratoires	Chronique	Etude <i>in situ</i>	poulet	pg/g MG	nd	nd	nd	nd	nd	nd	20	nd	nd	nd	5,7	nd	nd	nd	1,1	nd	nd		
Lyche <i>et al.</i> , 2004	Artif.	Huile végétale	98 et 49 µg/kg PV	Chronique	Après 80 jours	TA	ng/g MG	nd	nd	nd	nd	12000	nd	nd	nd	nd	nd	7	nd	nd	nd	nd	nd	nd		
						Foie	ng/g MG	nd	nd	nd	6000	nd	nd	nd	nd	nd	50	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
						Plasma	ng/g MG	nd	nd	nd	6000	nd	nd	nd	nd	nd	8	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Maervoet <i>et al.</i> , 2004	Artif.	Aliment	12 µg/kg	Chronique	Après 42 jours	TA	ng/g MG	20	2	2	12,5	26	22	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd			
Gruge <i>et al.</i> , 2004	Envir.	Aliment	0,08-110 ng/kg	Chronique	Etude <i>in situ</i>	TA poulet	pg/g MG	nd	nd	nd	nd	nd	nd	40	3,4	380	34	8,4	76	20	170	1	7,7	1300		

Références	Type de contamination	Vecteur de pollution	Dose ingérée	Durée d'exposition	Période de prélèvements	Matrice étudiée	Unité de mesure	2,3,7,8 Tetra CDD	1,2,3,7,8 Penta CDD	1,2,3,4,7,8 Hexa CDD	1,2,3,6,7,8 Hexa CDD	1,2,3,7,8,9 Hexa CDD	1,2,3,4,6,7,8 Hepta CDD	Octa CDD	2,3,7,8 Tetra CDF	1,2,3,7,8 Penta CDF	2,3,4,7,8 penta CDF	1,2,3,4,7,8 Hexa CDF	1,2,3,6,7,8 Hexa CDF	1,2,3,7,8,9 Hexa CDF	2,3,4,6,7,8 Hexa CDF	1,2,3,4,6,7,8 Hepta CDF	1,2,3,4,7,8,9 Hepta CDF	Octa CDF
Fries <i>et al.</i> , 2002	Artif.	Gélatine capsule	Mélange 3g	Chronique	Après 58 jours	Lait Fèces	ng/jour	nd	1,0	1,6	17,5	2,8	101,4	52,2	nd	nd	nd	1,4	1,5	nd	0,9	16,39	1,0	7,9
Costera <i>et al.</i> , 2006	Envir.	Aliment	0,07 - 10,56 ng/kg PV	Chronique	Après 71 jours	Lait	ng/kg MG	0,48	2,81	1,97	2,2	1,19	3,28	2,31	0,52	1,17	3,83	3,34	3,2	0,08	2,81	1,67	0,16	0,16
Zhao <i>et al.</i> , 2006	Envir.	Aliment	0,72 et 59 ng/kg PV	Chronique	Etude <i>in situ</i>	Œuf	pg/g MG	4,9	<0,5	nd	17	nd	17	28	115	117	<3	nd	42	nd	nd	nd	nd	7

Références	Type de contamination	Vecteur de pollution	Dose ingérée	Durée d'exposition	Période de prélèvements	Matrice étudiée	Type de molécule	Unité de mesure	Fluorène	Phénanthrène	Anthracène	Fluranthène	Pyrène	Benzo(a)pyrène
Del Bubbas <i>et al.</i> , 2005	Envir.	Aliment	non évaluée	Chronique	Etude <i>in situ</i>	Lait maternel	Native	µg/kg	1,06	0,55	0,62	Fluranthène	0,6	0,11
Lutz <i>et al.</i> , 2006	Artif.	Sol	33 à 104 mg/kg PV	Chronique	Après 28 jours	Lait	Métabolite	ng/mL	<0,3	5,1	nd	nd	3,1	<0,2
Grova <i>et al.</i> , 2006	Artif.	Huile végétale	0,02 mg/kg PV	Chronique	Après 28 jours	Lait	Métabolite	ng/mL	0,77	1,44	0,5	0,7	0,7	nd

Grova <i>et al.</i> , 2006	Artif.	Tissu adipeux végétale	non déterminé	Chronique	Après 28 jours	Lat	Métabolite	ng/mL	0,77	1,44	0,5	0,7	0,7	nd	187
----------------------------	--------	------------------------	---------------	-----------	----------------	-----	------------	-------	------	------	-----	-----	-----	----	-----

nd : non déterminé
 TA : Tissu adipeux
 Envir. : Environnementale
 Artif. : Artificielle

Annexes

Annexe IV- 1: Récapitulatif des principales études *in vitro* de bioaccessibilité des HAP du sol

Référence littéraire	Modèle <i>in vitro</i>	Nombre de sols étudiés	Type de contamination	Polluant modèle	Caractéristiques granulométriques des sols	Paramètres qui varient		Bioaccessibilité gastrique	Bioaccessibilité gastro-intestinale	Conclusions
Pu <i>et al.</i> , 2004	PBET	4	artificielle	Phénanthrène	CO (0,7 à 1,38%) Argile (8 à 38%)	Concentration du polluant	200 mg/g	17,7 à 69,8 %	53 à 88,8 %	La concentration n'a pas d'effet sur la bioaccessibilité
							400 mg/g			
						teneur en CO	CO (0,7 à 1,38 %)	teneur en argile	Argile (8 à 38 %)	
Hack et Selenka, 1996				HAP		Absence d'aliment		0,5 à 1,6 %	5 à 14 %	La présence d'aliment dans les modèles <i>in vitro</i> engendre une augmentation de la phase organique soluble par la formation de micelles en présence de lipides et de protéines
						Présence d'aliment		8 à 75 %	23 à 66 %	
Van de Wiele, 2004	SHIME	1	naturelle	HAP	CO (3,3%) sable (94%) limon (4%) argile (2%)	pH, bile, ratio S/L...		0,05 à 1,4 %	0,2 à 0,57 %	HAP (µg/l) = 15,35 . CO (g/l) - 0,0486 (R ² = 0,97)
Minhas <i>et al.</i> , 2006	PBET	1	artificielle	6 mois de maturation 12 mois de maturation	Chrysène	MO (15,2 %)	durée de maturation		40%	La durée de maturation n'a pas d'effet sur la bioaccessibilité
Jurjanz et Rychen, 2007	modèle <i>in vitro</i> adapté au ruminant	1	artificielle	pas de maturation	Phénanthrène	MO (13 %)	compartment	3 à 17 %	10 à 30 %	La maturation réduit significativement la bioaccessibilité des HAP
					Pyrène	argile (32,0 %)				
				1 mois de maturation	Benzo[a]pyrène	Limon (54,4 %) sable (13,6 %)	durée de maturation	La bioaccessibilité est dominante dans les compartiments ruminal et intestinal (30 à 50 %). Elle ne dépasse pas 4 % dans la caillette		

Annexes

Cave <i>et al.</i> , 2010	SHIME	11	environnementale	HAP	CO (1,27 à 12,9 %)	modèle <i>in vitro</i> choisi (caractéristiques physico-chimiques différentes)		12 à 58 %	Il existe une corrélation linéaire entre les deux modèles, avec une surestimation des valeurs par SHIME par rapport à RIVM	
	RIVM						12 à 61 %			
Sips <i>et al.</i> , 2001	RIVM	8	artificielle	Benzo[a]pyrène	CO 0,3 à 29,8 %	concentration du polluant	20 µg/g	14 à 50 %	Le sol exerce un effet manifeste sur la bioaccessibilité. Celle-ci est plus forte avec les sols les plus sableux Un modèle de type quadratique a été établi pour définir la bioaccessibilité du BaP en fonction du gradient de concentration	
					argile (< 1 à 29 %)		40 µg/g			
					limon (< 1 à 62 %)		120 µg/g			
					sable (20 à 100 %)	propriétés du sol	200 µg/g			
Hack <i>et al.</i> , 1998	DIN	5	environnementale	HAP	MO (2 à 8 %)	concentration du polluant	37 à 196 µg/g	0,3 à 1,3 %	La présence d'aliment dans les modèles <i>in vitro</i> engendre une augmentation de la bioaccessibilité des HAP	
					Argile (17 à 45 %)	absence d'aliment présence d'aliment (poudre de lait)				10,8 à 14,5 %
Jin <i>et al.</i> , 1999	Solution stomacal	1	artificielle	Naphtalène	MO (2,4 %)	concentration du polluant	2 µg/g	22%	L'effet de la maturation est plus significatif aux faibles concentrations	
							0 jour	8%		
							135 jours	28%		
							20 µg/g	11%		
Siciliano <i>et al.</i> , 2010*	RBALP	8	environnementale	HAP	CO (2,5 à 57 %)	concentration du polluant	0,17 à 650 µg équivalents BaP/g de sol	Log (µg équivalents BaP/g de sol) -1,7 à 0,5	Il y a une mauvaise corrélation entre les modèles <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> . La bioaccessibilité dépend des propriétés chimiques des polluants et du sol	
					argile (< 0,5 à 15 %)					
					limon (< 1 à 62 %)					
Holman <i>et al.</i> , 2002	LNBL	9	environnementale	HAP (résidus d'hydrocarbure)	CO 0,7 à 11 %	concentration du pollua	5 à 35 mg/g	<u>Digestion lipidique</u>		
						origine de la contamination (diesel ou pétrole)		Diesel (7,5% à 30%)	La MO réduit la biodisponibilité des HAP (r ² = 0,54). La présence de bile lors de la digestion lipidique augmente significativement la biodisponibilité.	
					argile/limon (33 à 95 %)	concentration de bile		Pétrole brut (2,5 à A jeun		
						propriétés du sol		Diesel (4% à 11%) Pétrole brut (0,5 à 2,5%)		

Annexes

Stroo <i>et al.</i> , 2005	LNBL	7	environnementale	HAP	CO 2,9 à 59 %	Approche multi- factorielle (pour determiner le facteur de biodisponibilité)	24 à 3260 µg/g	5 à 8%	Une corrélation est établie entre les facteurs de biodisponibilité et les valeurs de bioaccessibilité.
Hack <i>et al.</i> , 2002	SHIME	7	environnementale	HAP	CO 2,95 à 28,8 % argile (6,4 à 17 %) limon (32,4 à 38,3 %) sable (45 à 60,2 %)	concentration du polluant	74 à 3393 µg/g	11,5 à 35 %	En raison du faible effectif, aucune corrélation n'a pu être établie
Siciliano <i>et al.</i> , 2010	SHIME	18	environnementale	HAP		Concentration du polluant Taille des particules	2 mm ou <45µm		Bioaccessibilité = $0,15e^{(e^{6,4 \cdot 10E-7} Z_{sol}/Z_{eau})}$, $r^2 = 0,53$, $p < 0,01$
Lu <i>et al.</i> , 2009	PBET	7	environnementale	HAP	CO =2,15 à 3,13%	zone urbaine	IAP = 0,18 à 5µg/l; 4,9% to 21,8%	14,6% to 63,2%	Aucune corrélation évidente n'a été observée entre les concentrations totales de HAP et les bioaccessibilités gastro-intestinales . La bioaccessibilité n'était pas seulement liée à la MO du sol, mais également aux propriétés physico-chimiques du sol.
Khan <i>et al.</i> , 2008	PBET	10	environnementale	HAP	CO (3,93 %)	Source de la contamination (sols irrigués par des eaux usées)	1,304 à 6,892 µg/g 20,1% à 46,0%	27,4% à 52,8%	La classification des sols en fonction de leur indices moléculaires (exemple : Ph / An ou InP / InP + BghiP) a permis de déterminer les sources de contamination, pétrogéniques ou pyrogéniques. La bioaccessibilité des HAP dans les sols diminue généralement avec le nombre de cycles.
Gron <i>et al.</i> , 2007	RIVM	4	environnementale	HAP	CO (1,05 à 2,91%) Argile (2 à 13%)	concentration de polluant ancienneté de la contamination gène de la contamination	0,393 à 5,69 µg/g	14 à 41 %	Il y a une corrélation linéaire entre les modèles <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> . Les valeurs de bioaccessibilité sont plus faibles que les valeurs de biodisponibilité.
Tang <i>et al.</i> , 2006	PBET	12	environnementale	HAP	CO (0,752 à 6,23%) argile (6,1 à 14,5%) limon (50,5 à 72,5%) sable (17,8 à 40,8 %)	concentration de HAP dans des horizons de surface d'aires de jeu à Pékin	0,112 à 14,6 µg/g 3,9 à 54,9	9,2 à 60,5	La bioaccessibilité des HAP dans les sols diminue généralement avec le nombre de cycles.

Annexes

Annexe IV- 2 : Description des principaux modèles *in vitro* développés pour étudier la bioaccessibilité des polluants organiques présents dans un sol

	PBET (Physiologically BASED Extraction Test), BGS, United Kingdom (Ruby <i>et al.</i> , 1996).	DIN 19738, Ruhr-Universität Bochum, Germany (Hack et Selenka, 1996).	RIVM (National Institute of Public Health and Environment), The Netherlands (Oomen <i>et al.</i> , 2000).	SHIME (Simulatoor of human intestinal microbial ecology), Ghent university Belgium. Van de Wiele <i>et al.</i> , 2004
pH stomacal	1,5	2,0	1,1	4,0
Temps d'incubation dans l'estomac	1h	2h	2h	3h
Ratio Solide/Liquide dans l'estomac	1/100	1/50	1/38	1/2,5
pH dans l'intestin	8,0	7,5	5,5 à 8,0	6,5
Temps d'incubation dans l'intestin	2h	6h	2h	5h
Concentration de bile	0,9 g/L	4,5 g/L	0,9 g/L	1,5 g/L
Ratio Solide/Liquide dans l'intestin	Variable	1 / 100	1 / 98	1 / 4
Additif alimentaire* (hors conditions à jeun)	0,1 g/L de poudre de lait	50 g/L de poudre de lait	118 g/L d'aliment pour enfant**	23g/L d'aliment pour enfant**
Séparation de phases	Filtration à 0,45 µm	Centrifugation à 7000g	Centrifugation à 3000g	Centrifugation à 7000g

* : Optionnel

** : Les aliments pour enfant sont composés de poudre de lait, de pomme de terre, de glucose, de pectine etc.

Annexes

Annexe IV- 3 : Détails des données intégrées dans la base de données

N° essai	Référence	CO du sol (%)	HAP (µg/g)	Caractéristiques du modèle in vitro			Bio accessibilité gastro-intestinale	
				Type	Ratio liquide/sol	Présence d'aliment*	%	µg/g
1	Tang <i>et al.</i> ,	2,0	0,74	PBET	100	Oui	60,5	0,45
2	Tang <i>et al.</i> ,	3,0	0,41	PBET	100	Oui	22,2	0,09
3	Tang <i>et al.</i> ,	2,4	3,13	PBET	100	Oui	41,4	1,30
4	Tang <i>et al.</i> ,	0,8	0,11	PBET	100	Oui	16,6	0,02
5	Tang <i>et al.</i> ,	2,2	0,40	PBET	100	Oui	9,3	0,04
6	Tang <i>et al.</i> ,	2,2	0,54	PBET	100	Oui	40,0	0,22
7	Tang <i>et al.</i> ,	2,3	1,99	PBET	100	Oui	35,0	0,70
8	Tang <i>et al.</i> ,	4,3	7,98	PBET	100	Oui	35,6	2,84
9	Tang <i>et al.</i> ,	4,7	12,79	PBET	100	Oui	27,2	3,48
10	Tang <i>et al.</i> ,	2,4	4,83	PBET	100	Oui	18,0	0,87
11	Tang <i>et al.</i> ,	6,2	27,83	PBET	100	Oui	12,2	3,39
12	Tang <i>et al.</i> ,	4,9	13,57	PBET	100	Oui	25,1	3,41
13	Tang <i>et al.</i> ,	5,0	14,57	PBET	100	Oui	22,2	3,24
14	Lu <i>et al.</i> ,	2,2	1,8	PBET	250	Oui	17,1	0,3
15	Lu <i>et al.</i> ,	2,6	0,6	PBET	250	Oui	27,1	0,2
16	Lu <i>et al.</i> ,	3,1	5,0	PBET	250	Oui	16,3	0,8
17	Lu <i>et al.</i> ,	2,9	2,6	PBET	250	Oui	8,2	0,2
18	Lu <i>et al.</i> ,	2,8	0,6	PBET	250	Oui	15,4	0,1
19	Lu <i>et al.</i> ,	2,9	0,2	PBET	250	Oui	14,8	0,0
20	Lu <i>et al.</i> ,	2,6	0,7	PBET	250	Oui	16,5	0,1
21	Khan <i>et al.</i> ,	5,6	3,4	PBET	100	Oui	31,2	1,1

Annexes

22	Khan <i>et al.</i> ,	4,1	2,9	PBET	100	Oui	29,5	0,9
23	Khan <i>et al.</i> ,	1,7	1,4	PBET	100	Oui	34,9	0,5
24	Khan <i>et al.</i> ,	2,7	2,0	PBET	100	Oui	38,9	0,8
25	Khan <i>et al.</i> ,	2,6	1,3	PBET	100	Oui	30,7	0,4
26	Khan <i>et al.</i> ,	5,3	5,0	PBET	100	Oui	51,7	2,6
27	Khan <i>et al.</i> ,	3,8	3,0	PBET	100	Oui	40,6	1,2
28	Khan <i>et al.</i> ,	4,6	3,8	PBET	100	Oui	26,6	1,0
29	Khan <i>et al.</i> ,	6,2	6,9	PBET	100	Oui	43,5	3,0
30	Khan <i>et al.</i> ,	2,7	2,7	PBET	100	Oui	33,5	0,9
31	Gron <i>et al.</i> ,	2,8	4,4	RIVM	95	Oui	17	0,73
32	Gron <i>et al.</i> ,	1,0	0,4	RIVM	95	Oui	41	0,16
33	Gron <i>et al.</i> ,	2,4	5,7	RIVM	95	Oui	14	0,77
34	Gron <i>et al.</i> ,	2,9	2,4	RIVM	95	Oui	25	0,61
35	Siciliano <i>et al.</i> ,	0,39	0,17	SHIME	60	Oui	0,28	0,0004
36	Siciliano <i>et al.</i> ,	0,29	0,15	SHIME	60	Oui	28,5	0,045
37	Siciliano <i>et al.</i> ,	0,47	0,37	SHIME	60	Oui	0,55	0,002
38	Siciliano <i>et al.</i> ,	0,40	1,07	SHIME	60	Oui	0,23	0,002
39	Siciliano <i>et al.</i> ,	0,35	0,73	SHIME	60	Oui	22,6	0,165
40	Siciliano <i>et al.</i> ,	0,40	0,30	SHIME	60	Oui	28,2	0,086
41	Siciliano <i>et al.</i> ,	0,32	0,16	SHIME	60	Oui	1,1	0,001
42	Siciliano <i>et al.</i> ,	0,99	0,12	SHIME	60	Oui	0,9	0,001
43	Siciliano <i>et al.</i> ,	1,64	0,74	SHIME	60	Oui	6,1	0,045
44	Siciliano <i>et al.</i> ,	0,33	1,19	SHIME	60	Oui	0,3	0,003
45	Siciliano <i>et al.</i> ,	0,34	11,01	SHIME	60	Oui	0,02	0,002
46	Siciliano <i>et al.</i> ,	0,32	0,42	SHIME	60	Oui	43,8	0,184
47	Siciliano <i>et al.</i> ,	0,25	7,57	SHIME	60	Oui	0,04	0,003

Annexes

48	Siciliano <i>et al.</i> ,	0,27	0,13	SHIME	60	Oui	2,77	0,003
49	Siciliano <i>et al.</i> ,	0,24	0,19	SHIME	60	Oui	1,18	0,002
50	Siciliano <i>et al.</i> ,	0,46	0,24	SHIME	60	Oui	0,76	0,001
51	Siciliano <i>et al.</i> ,	0,55	2,70	SHIME	60	Oui	0,31	0,008
52	Siciliano <i>et al.</i> ,	0,54	1,67	SHIME	60	Oui	5,10	0,085
53	Hack <i>et al.</i> ,	7,8	74	DIN	60	Oui	11,0	8
54	Hack <i>et al.</i> ,	28,8	3393	DIN	60	Oui	18,1	613
55	Hack <i>et al.</i> ,	24,3	757	DIN	60	Oui	19,6	148
56	Hack <i>et al.</i> ,	2,95	1080	DIN	60	Oui	33,2	358
57	Holman <i>et al.</i> ,	3,0	11700	LNBL**	625	Oui	4,0	468,0
58	Holman <i>et al.</i> ,	10,8	35500	LNBL**	625	Oui	1,3	443,8
59	Holman <i>et al.</i> ,	5,5	10200	LNBL**	625	Oui	2,0	204,0
60	Holman <i>et al.</i> ,	1,3	12800	LNBL**	625	Oui	10,0	1280,0
61	Holman <i>et al.</i> ,	0,7	5000	LNBL**	625	Oui	3,5	175,0
62	Holman <i>et al.</i> ,	1,8	5200,0	LNBL**	625	Oui	8,0	416,0
63	Holman <i>et al.</i> ,	1,5	5200,0	LNBL**	625	Oui	6,0	312,0
64	Holman <i>et al.</i> ,	1,0	34600,0	LNBL**	625	Oui	2,5	865,0
65	Holman <i>et al.</i> ,	6,8	9800,0	LNBL**	625	Oui	1,5	147,0
66	Stroo <i>et al.</i> ,	59,0	922,0	LNBL**	625	Np	1,5	5,07
67	Stroo <i>et al.</i> ,	6,9	280,0	LNBL**	625	Np	16,4	18,88
68	Stroo <i>et al.</i> ,	87,0	8160,0	LNBL**	625	Np	4,5	203,17
69	Stroo <i>et al.</i> ,	6,5	296,0	LNBL**	625	Np	10,1	16,378
70	Stroo <i>et al.</i> ,	2,9	24,0	LNBL**	625	Np	3	0,66
71	Stroo <i>et al.</i> ,	47,0	3260,0	LNBL**	625	Np	8,2	163,3
72	Stroo <i>et al.</i> ,	25,0	3200,0	LNBL**	625	Np	16,1	316,16
73	Cave <i>et al.</i> ,	1,3	9,93	SHIME	100	Oui	13,0	1,3

Annexes

74	Cave <i>et al.</i> ,	8,8	67,4	SHIME	100	Oui	33,6	22,7
75	Cave <i>et al.</i> ,	8,2	121,3	SHIME	100	Oui	25,5	31,0
76	Cave <i>et al.</i> ,	6,9	286,6	SHIME	100	Oui	18,5	53,0
77	Cave <i>et al.</i> ,	3,3	129,3	SHIME	100	Oui	23,5	30,4
78	Cave <i>et al.</i> ,	11,6	100,8	SHIME	100	Oui	23,4	23,6
79	Cave <i>et al.</i> ,	7,8	278,5	SHIME	100	Oui	16,4	45,7
80	Cave <i>et al.</i> ,	12,9	200,5	SHIME	100	Oui	17,3	34,8
81	Cave <i>et al.</i> ,	3,9	203	SHIME	100	Oui	13,5	27,4
82	Cave <i>et al.</i> ,	4,9	220	SHIME	100	Oui	31,0	68,2
83	Cave <i>et al.</i> ,	5,0	249,7	SHIME	100	Oui	19,7	49,2
84	Siciliano <i>et al.</i> ,	2,49	205,5	RBALP***	125	Oui	21,64	44,48
85	Siciliano <i>et al.</i> ,	8,50	39,8	RBALP***	125	Oui	16,34	6,50
86	Siciliano <i>et al.</i> ,	3,19	28,2	RBALP***	125	Oui	23,00	6,48
87	Siciliano <i>et al.</i> ,	6,49	850,3	RBALP***	125	Oui	4,77	40,59
88	Siciliano <i>et al.</i> ,	4,63	59,0	RBALP***	125	Oui	2,36	1,39
89	Siciliano <i>et al.</i> ,	7,74	8,3	RBALP***	125	Oui	3,57	0,30
90	Siciliano <i>et al.</i> ,	5,49	3,3	RBALP***	125	Oui	1,91	0,23
91	Siciliano <i>et al.</i> ,	57,39	152,4	RBALP***	125	Oui	6,87	2,91

Np : donnée non précisée.

Présence d'aliment* : addition d'acide oléique, de malate et d'acide acétique.

LNBL*** : le test *in vitro* a été développé au Laboratoire National Lawrence Berkeley avec un brevet déposé par Holman, 2000.

AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

Monsieur Tom VAN DE WIELE, Professeur, Coupure Link 653, Belgique

Monsieur Sébastien DENYS, Ingénieur de Recherche, INERIS Parc technologique ALATA, Verneuil-en-Halatte

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Monsieur OUNNAS Fayçal

à soutenir devant un jury de l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE,
une thèse intitulée :

**"Influence de la matrice sol sur la biodisponibilité orale des Polluants Organiques
Persistants chez les ruminants laitiers. "**

en vue de l'obtention du titre de :

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : « **Sciences Agronomiques** »

Fait à Vandoeuvre, le 20 juin 2011

Le Président de l'I.N.P.L.,

F. LAURENT

