



**HAL**  
open science

# Evaluation du risque de transfert des hydrocarbures aromatiques polycycliques du sol vers le lait chez le ruminant laitier

Sophie Lutz

► **To cite this version:**

Sophie Lutz. Evaluation du risque de transfert des hydrocarbures aromatiques polycycliques du sol vers le lait chez le ruminant laitier. Sciences agricoles. Institut National Polytechnique de Lorraine, 2006. Français. NNT : 2006INPL032N . tel-01752745

**HAL Id: tel-01752745**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01752745>**

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](mailto: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.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  
Ecole Doctorale Ressources, Procédés, Produits et Environnement  
UR AFPA, USC INRA 340**

**THESE**

**Présentée en vue de l'obtention du grade de  
Docteur de l'Institut National Polytechnique de Lorraine  
Spécialité : Sciences Agronomiques**

**Sophie LUTZ**

**Evaluation du risque de transfert des Hydrocarbures  
Aromatiques Polycycliques du sol vers le lait  
chez le ruminant laitier**

**Soutenue publiquement le 10 juillet 2006 devant le jury constitué de :**

<b>I. Déportes, Ingénieur ADEME</b>	<b>Examineur</b>
<b>C. Feidt, Maitre de Conférences HDR, ENSAIA-INPL</b>	<b>Président</b>
<b>E. Lichtfouse, Chargé de Recherches HDR, INRA</b>	<b>Rapporteur</b>
<b>F. Monteau, Ingénieur de Recherches, LABERCA</b>	<b>Examineur</b>
<b>G. Rychen, Professeur, ENSAIA-INPL</b>	<b>Examineur</b>
<b>C. Simoes Nunes, Directeur de Recherches, DSM</b>	<b>Rapporteur</b>

## Remerciements

Cette thèse est le résultat d'un travail collectif et je tiens à remercier l'ensemble des personnes m'ayant aidée à la réaliser. Mes premiers remerciements s'adressent à Monsieur le Professeur François Laurent pour m'avoir accueillie au sein du Laboratoire de Sciences Animales.

Je remercie également Monsieur le Professeur Guido Rychen, Messieurs Cyril Feidt et Stefan Jurjanz, Maitres de Conférences, qui ont tous trois dirigé ma thèse pendant ces années. Je suis particulièrement reconnaissante pour le temps, la patience et l'attention qu'ils m'ont accordée pour la réalisation de ce travail.

Je remercie Monsieur Carlos Simoes Nunes, Directeur de Recherches au CRNA, pour avoir accepté de juger ce travail. Je le remercie également pour les conditions de travail très favorables dont j'ai bénéficié au sein du laboratoire de recherches de DSM-Saint Louis.

Mes remerciements vont à Monsieur Eric Lichtfouse, Chargé de Recherche HDR INRA, pour avoir accepté de juger ce travail, ainsi qu'à Madame Isabelle Déportes, Ingénieur ADEME, pour avoir accepté de l'examiner.

Merci à Monsieur Fabrice Monteau, Ingénieur de Recherche au LABERCA, pour ses nombreux encouragements, son implication dans ce travail et pour avoir accepté de l'examiner. J'ai également bénéficié d'un appui technique et de conseils particulièrement avisés de toute l'équipe du LABERCA. Je remercie à cette occasion Monsieur le Professeur François André, Directeur du LABERCA, qui a toujours fait preuve de beaucoup de disponibilité.

Je suis également reconnaissante à toute l'équipe du Laboratoire Sols et Environnement qui s'est toujours intéressée à mon travail qu'elle a agrémenté de conseils judicieux et très appréciés. Je remercie à ce titre Monsieur le Professeur Michel Schiavon, qui m'a permis l'accès au matériel, Monsieur Florentin pour l'ensemble des informations relatives au sol, et Richard, Samira et Stéphane.

Au cours des expérimentations effectuées au Domaine Expérimental de la Bouzule, j'ai bénéficié d'une aide précieuse de la part de François Dugny dont les connaissances et les conseils ont été particulièrement utiles pour le déroulement des essais.

Merci à Yves pour les nombreux échanges que nous avons eu, ses conseils sur la pratique de l'enseignement et des statistiques. Enfin, merci à l'ensemble du personnel du Laboratoire de Sciences Animales qui y rendent les conditions de travail particulièrement favorables.

## Résumé

Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) sont des composés organiques présents dans de nombreux sols contaminés par les émissions d'activités anthropiques (voies routières, usines à gaz de ville, aciérie...). La présence d'animaux sur ces sols de prairies est une voie d'entrée majoritaire des polluants qui, du fait de leur propriété lipophile, vont s'accumuler dans la chaîne alimentaire. Dans ce travail, les concentrations en HAP dans des sols situés aux abords de sources émettrices ont été relevées. Afin de prédire les effets d'une exposition de ruminants laitiers à des prairies polluées sur la qualité du lait, du sol contaminé par 4 HAP (fluorène, pyrène, phénanthrène et benzo[a]pyrène) été administré quotidiennement à des vaches laitières via des fistules ruminales.

Aucune augmentation de la concentration en molécules mères n'a été notée dans le lait. En revanche, 2% des composés sont apparus sous leur forme de métabolite monohydroxylé (2-OH fluorène, 3-OH phénanthrène et 1-OH pyrène) suite à cette exposition. Le dosage de composés parents dans les fèces montre par ailleurs que moins de 5% sont directement éliminés par cette voie. Combiné à l'apparition de métabolites dans le lait, ces résultats témoignent de l'absorption et de la biotransformation de ces composés parents.

Pour préciser ces données, la réalisation d'un modèle *in vitro* simulant le rumen d'une vache laitière a permis d'évaluer l'extractibilité du sol de 2 HAP marqués au  $^{14}\text{C}$  (phénanthrène et benzo[a]pyrène). Moins de 10% de la radioactivité a été mesurée dans le liquide ruminal attestant d'un potentiel d'extraction limité. Les HAP semblent extraits du sol dans le tractus digestif ; des essais complémentaires seraient cependant nécessaires afin de déterminer plus précisément l'extractibilité de chaque compartiment du système gastrointestinal.

**Mots-clés** : hydrocarbures aromatiques polycycliques, sols, lait, transfert, extractibilité.

<b>Introduction générale.....</b>	<b>14</b>
<b>Synthèse bibliographique.....</b>	<b>17</b>
<b>I. Les HAP, problématique actuelle.....</b>	<b>18</b>
1. Propriétés générales des HAP .....	18
2. Sources et niveaux d'émission .....	21
2.1. Sources d'émission des HAP .....	21
2.2. Niveaux d'émission des HAP .....	22
3. Facteurs de variations des concentrations de HAP dans l'environnement .....	23
3.1. Influence de la saison .....	23
3.3. Influence des compartiments terrestres sur la concentration en HAP.....	26
3.4. Influence du relief .....	26
<b>II. Niveaux de contamination en HAP dans les différentes matrices environnementales</b>	<b>27</b>
1. Contamination de l'air .....	27
2. Contamination de l'herbe.....	28
2.1. Voies de contamination des végétaux .....	28
2.2. Niveaux de contamination.....	28
2.3. Profils en HAP dans l'herbe .....	29
<b>III. Devenir des HAP dans le sol .....</b>	<b>32</b>
1. Contamination du sol.....	32
2. Niveaux de contamination du sol .....	32
3. Réglementation sur les teneurs limites en HAP dans les sols.....	35
4. Devenir des HAP du sol.....	36
4.1. Pertes abiotiques des HAP du sol.....	36
4.2. Dégradation des HAP par les microorganismes du sol.....	40
4.3. Profils et localisation des HAP dans le sol .....	43
4.4. Localisation des HAP dans les particules de sol .....	45
5. Mode de liaison des HAP au sol.....	45
5.1. Liaisons faibles .....	46
5.2. Liaisons fortes.....	46
5.3. Facteurs influençant la rétention des HAP dans le sol.....	47
<b>IV. Risque de transfert des HAP du sol dans la chaîne alimentaire.....</b>	<b>52</b>
1. Ingestion de sol par les vaches laitières .....	52
2. Influence du tractus digestif sur l'extractibilité des HAP du sol .....	53
2.1. Caractérisation de l'extractibilité des HAP d'un sol .....	53
2.2. Extractibilité des HAP du sol par le tractus digestif humain .....	54
2.3. Variation de l'extractibilité des HAP du sol .....	56
2.4. Dégradation des HAP par les bactéries du tractus digestif .....	59
3. Spécificité du rumen dans l'extraction et la dégradation des HAP du sol.....	61
3.1. Le rumen .....	61
3.2. Dégradation de composés aromatiques dans le rumen .....	61
4. Concept de biodisponibilité.....	62
4.1. Méthodes de mesure de la biodisponibilité.....	63
4.2. Métabolisme des HAP chez les mammifères.....	69
5. Excrétion des HAP et de leurs produits de dégradation dans le lait.....	69
<b>Chapitre 1 : Caractérisation des niveaux de HAP du sol à proximité de sources d'émission.....</b>	<b>74</b>
<b>I. Protocole expérimental .....</b>	<b>76</b>
1. Conditions de prélèvements .....	76
2. Sites choisis.....	76
3. Protocoles de prélèvements.....	77
4. Préparation de l'herbe et du sol avant dosage .....	80
5. Analyse des échantillons.....	80

6. Traitements statistiques.....	81
<b>II. Résultats.....</b>	<b>81</b>
1. Concentration en HAP dans le sol à 200 m des sites d'émissions retenus .....	81
2. Comparaison des profils de HAP du sol prélevé à 200 m des sites étudiés.....	81
3. Concentration en HAP dans l'herbe à 200 m des sites d'émission retenus .....	82
4. Comparaison des profils de HAP de l'herbe des sites étudiés.....	84
<b>III. Discussion .....</b>	<b>86</b>
 <b>Chapitre 2 : Etude du transfert de HAP et de leur métabolite majoritaire vers le lait de vache suite à une exposition chronique à du sol contaminé . 89</b>	
<b>I. Mesure de l'ingestion de sol.....</b>	<b>92</b>
1. Protocole expérimental .....	92
1.1. Prélèvement de sol .....	92
1.2. Prélèvement d'herbe.....	92
1.3. Prélèvements des fèces.....	93
1.4. Dosages .....	93
2. Résultats.....	93
3. Discussion.....	94
 <b>II. Etude du transfert des HAP vers le lait suite à une exposition chronique de sol contaminé.....</b>	
<b>95</b>	
1. Protocole expérimental .....	95
1.1. Choix des molécules .....	95
1.2. Préparation du sol .....	95
1.3. Contamination du sol .....	96
1.4. Animaux.....	98
1.5. Apport du sol aux animaux.....	98
1.6. Suivi des paramètres d'ingestion .....	98
1.7. Analyse et dosage des échantillons .....	99
1.8. Traitement statistique.....	103
2. Résultats.....	103
2.1 Seuils de détections des HAP et de leur métabolite majoritaire dans les matrices étudiées.....	103
2.2. Apport en HAP par les différentes matrices alimentaires.....	103
2.3. Niveaux de contamination des HAP dans le lait.....	104
2.4. Niveaux de contamination en métabolites dans le lait.....	104
2.5. Coefficient de transfert des HAP du sol vers le lait.....	106
2.6. Niveau de contamination en HAP dans les fèces .....	106
2.7. Concentration en HAP dans le sang.....	108
3. Discussion.....	111
3.1. Effet de l'exposition de vaches laitières à du sol contaminé sur la concentration en HAP et métabolites dans le lait .....	111
3.2. Transfert des HAP du sol ingéré vers les fèces .....	116
 <b>Chapitre 3 : Extractibilité et dégradation du Phé et du B[a]P du sol par un milieu synthétique enrichi en bactéries ruminales .....</b>	
<b>120</b>	
<b>I. Protocole expérimental .....</b>	<b>123</b>
1. Préparation du sol.....	123
1.1. Sol.....	123
1.2. Choix des HAP .....	123
1.3. Solutions de contamination.....	124
1.4. Contamination du sol .....	124
2. Mesure de la radioactivité du sol après maturation.....	125
3. Préparation de la solution de jus de rumen synthétique .....	125
4. Extraction.....	126
5. Mesure de la radioactivité dans les surnageants .....	126
6. Incubation des bactéries dans le jus de rumen synthétique .....	127
6.1. Préparation des bactéries .....	127



6.2. Mélange du jus artificiel et des bactéries.....	127
7. Calcul du pourcentage d'extraction .....	127
8. Calcul de la quantité (en ng) de molécule solubilisée dans le surnageant.....	127
9. Modalités testées .....	129
10. Comptage.....	131
10.1. Mesure de la radioactivité dans les milieux liquides .....	131
10.3. Extraction des HAP/métabolites et conditions chromatographiques.....	131
11. Traitements statistiques.....	132
<b>II. Résultats.....</b>	<b>132</b>
1. Concentration en radioactivité (issue du <sup>14</sup> C-Phé et du <sup>14</sup> C-B[a]P) dans le sol après maturation .....	132
2. Mobilisation de la radioactivité du sol par les différents liquides testés .....	132
3. Effet de la quantité de sol sur l'extractibilité de la radioactivité issue du <sup>14</sup> C-Phé et du <sup>14</sup> C-B[a]P du sol par du jus de rumen enrichi en microorganismes.....	134
4. Influence du ratio solide/liquide sur l'extractibilité de la radioactivité issue du <sup>14</sup> C-Phé du sol par du jus de rumen synthétique.....	134
5. Dégradation in vitro des HAP par les bactéries du rumen .....	135
<b>III. Discussion .....</b>	<b>137</b>
1. Extractibilité in vitro des HAP du sol par du jus de rumen synthétique.....	137
2. Extractibilité des HAP du sol par la caillette et l'intestin.....	138
3. Effet du ratio sol/liquide sur l'extractibilité du Phé du sol.....	140
4. Effet de l'ajout d'herbe .....	140
5. Dégradation du Phé et du B[a]P par les bactéries ruminales.....	141
<b>Discussion générale .....</b>	<b>146</b>
<b>I. Le sol, vecteur de polluants.....</b>	<b>148</b>
<b>II. Sécurité des aliments .....</b>	<b>154</b>
<b>III. Limites des expérimentations réalisées .....</b>	<b>156</b>
<b>Conclusion générale .....</b>	<b>158</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>162</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>181</b>

## **Production Scientifique**

### **Publications**

Lutz S., Feidt C., Monteau F., Rychen G., Le Bizec B., Jurjanz S., 2006. Transfer assessment of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and their principal metabolites to milk after chronic exposure to contaminated soil. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 54, 263-268.

### **Communications orales**

Lutz S., Rychen G., Feidt C., 2003. Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) dans le lait autour du site de Diekirch-Fridhaff en comparaison avec d'autres sites industriels. Séminaire Santé et Sécurité, Arlon, Belgique.

Lutz S., Feidt C., Rychen G., Jurjanz S., 2005. Transfer of polycyclic aromatic hydrocarbons and their principle metabolites to milk after chronic exposure of dairy cows to contaminated soil. Séminaire ISPAAC, Toronto, Canada.

Jurjanz S., Lutz S., Mouriot J., Rychen G., 2005. Extraction in vitro of soil-bound PAH in the rumen. The Sixth European Meeting on Environmental Chemistry, Belgrade, Serbie et Montenegro.

### **Communications avec acte et comité de lecture**

Lutz S., Feidt C., Jurjanz S., Rychen G., 2003. Contamination en HAP de l'herbe et du sol de pâtures proches de sites d'émission et étude de leur biodisponibilité pour le ruminant laitier. Journée des Boursiers de Formation Recherche, Luxembourg.

Lutz S., Feidt C., Rychen G., 2003. Etude de la biodisponibilité des HAP du sol chez le ruminant laitier. Rencontre Ruminants Recherche 8, Paris, France.

Lutz S., Monteau F., Jurjanz S., Rychen G., Le Bizec B., Feidt C., 2005. Bioavailability of soil-bound PAH ingested by dairy cows. The Sixth European Meeting on Environmental Chemistry, Belgrade, Serbie et Montenegro.

### **Autres communications**

Lutz S., Feidt C., Jurjanz S., Rychen G., Janvier 2004. Etude de la biodisponibilité des HAP du sol chez le ruminant laitier. Séminaire de l'Ecole Doctorale RP2E, Nancy.

Lutz S., Feidt C., Jurjanz S., Rychen G., Janvier 2005. Extractibilité in vitro des HAP du sol par du milieu ruminal synthétique. Séminaire de l'Ecole Doctorale RP2E, Nancy.

## Liste des figures

- Fig. 1 Structure des seize Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques prioritaires proposés par l'agence pour la protection de l'environnement des Etats-Unis
- Fig. 2 Emission de HAP dans l'air en France métropolitaine (en tonnes, somme des 16 HAP ; [http://www.citepa.org/emissions/nationale/Pop/pop\\_hap.htm](http://www.citepa.org/emissions/nationale/Pop/pop_hap.htm))
- Fig. 3 Principales voies de contamination du végétal par des molécules organiques (d'après Smith et Jones, 2000)
- Fig. 4 Evolution des HAP dans un sol (d'après Bariuso et al., 1994)
- Fig. 5 Schématisation du devenir des HAP liés au sol ingéré par un ruminant laitier
- Fig. 6 Méthode de prélèvement d'herbe et de sol au bord de l'autoroute
- Fig. 7 Schématisation de la méthode de prélèvement du sol et de l'herbe
- Fig. 8 Moyenne des sommes des 16 HAP dans le sol à proximité de sites d'émission sélectionnés
- Fig. 9 Profils (exprimé en % de la somme totale) en HAP du sol à 200 m des sites étudiés
- Fig. 10 Moyenne des sommes des 16 HAP dans l'herbe à 200 m de sites d'émission sélectionnés
- Fig. 11 Profils en HAP (% de la somme totale) de l'herbe à 200 m des sites étudiés
- Fig. 12 Représentation du coefficient de transfert des HAP du sol vers les fèces en fonction de leur Log  $K_{ow}$  à J28
- Fig. 13 Spectre de 2 HAP en GCMS-HR dans le sang (échantillon supplémenté et échantillon à J0)
- Fig. 14 Chromatogrammes en GCMS des métabolites d'un extrait de lait à J3
- Fig. 15 Schéma du protocole d'extractibilité des HAP du sol par du jus de rumen synthétique enrichi en bactéries
- Fig. 16 extraction du Phé du sol en fonction du ratio solide/liquide (S/L) de sol et de jus de rumen synthétique suite à une incubation 6h à 37°C
- Fig. 17 Chromatogramme d'un extrait de  $^{14}\text{C}$ -B[a]P suite à une incubation de 6h en présence de bactéries ruminales
- Fig. 18 Etapes majeures dans la définition de la biodisponibilité suite à une exposition orale via du sol contaminé (Oomen et al., 2002)

## Liste des tableaux

Tableau 1	Caractéristiques physicochimiques des 16 HAP US-EPA (Dzombak et Luthy, 1984)
Tableau 2	Estimation des émissions de HAP dans l'air (en tonnes)
Tableau 3	Concentrations en HAP (16 HAP) relevées dans l'herbe en fonction du lieu d'exposition (en µg/g MS)
Tableau 4	Molécules majoritaires mesurées dans l'herbe
Tableau 5	Concentrations en HAP dans le sol de zones rurales et semi-rurales (µg/g MS)
Tableau 6	Somme des HAP mesurée dans différents sols prélevés en zone urbaine listée par la littérature (µg/g MS)
Tableau 7	Niveaux de contamination en HAP de sol à proximité d'autoroutes (en µg/g MS)
Tableau 8	Classe de contamination d'un sol en fonction de sa concentration en somme des 16 HAP (Maliszewska-Kordybach)
Tableau 9	Valeurs de Constat d'Impact (VCI) françaises pour le sol (µg/g MS)
Tableau 10	Comparaison des durées de demi-vie de HAP dans un sol et dans un milieu liquide
Tableau 11	Exemple de durée de demi-vie dans les sols (Berthelin et al., 1995)
Tableau 12	Abondance des organismes du sol (le sol vivant, 1998)
Tableau 13	Conditions environnementales favorisant l'activité des microorganismes impliqués dans les dégradations de molécules organiques (Wilson et Jones, 1993).
Tableau 14	Extractibilité de 4 HAP par du butanol après 120 jours de maturation dans des sols en fonction du taux de matière organique (Bogan et al., 2003)
Tableau 15	Extraction du <sup>14</sup> C-Phé et <sup>14</sup> C- B[a]P du sol avec deux solvants différents en fonction du temps de maturation (en jours) et du solvant (Northcott et Jones, 2001).
Tableau 16	Quantité de sol ingérée (g/jour) au pâturage
Tableau 17	Synthèse des modèles <i>in vitro</i> d'étude de l'extractibilité des HAP du sol chez l'homme (d'après Oomen et al., 2002)
Tableau 18	Séparation des composés en fonction de leur densité (Van de Wiele et al., 2004)
Tableau 19	Extractibilité des HAP (somme de 16) du sol dans les différents compartiments digestifs de l'homme (exprimée en % de la dose initiale en HAP du sol)
Tableau 20	Excrétion (en %) d'anthracène, Pyr et B[a]P dans le plasma et les fèces à la suite d'un apport unique via du sol ou via de l'huile

Tableau 21	Excrétion du 1-OH Pyr et du 3-OH B[a]P dans les fèces de rats ayant reçu par voie orale une dose de 17,5 µg de Pyr et 4,6 µg de B[a]P via du sol et 17,5µg de Pyr et 7,6 µg de B[a]P dilué dans de l'huile (Van Schooten et al., 1997)
Tableau 22	Proportion cumulée de radioactivité excrétée dans le lait, l'urine et les fèces à 103h après apport unique de $2,5 \cdot 10^6$ Bq par voie orale (dissout dans de l'huile), (Grova et al., 2002)
Tableau 23	Pourcentage cumulé de radioactivité mesurée dans le lait après ingestion d'une molécule organique marquée
Tableau 24	Part de cendres insolubles (en %) dans les échantillons prélevés
Tableau 25	HAP retenus pour la contamination du sol
Tableau 26	Caractéristiques physiologiques des vaches laitières utilisées dans l'essai
Tableau 27	Calendrier des prélèvements au cours de l'essai
Tableau 28	Seuils de détection en GCMS des différents HAP et métabolites dans les matrices étudiées
Tableau 29	Concentration en HAP dans le sol avant contamination, après maturation et concentration théorique apportée au sol lors de la contamination (en ng/g de sol sec)
Tableau 30	Apport de HAP par les différentes matrices au cours de l'essai
Tableau 31	Concentration en HAP dans le lait (ng/mL) suite à un apport chronique de sol contaminé
Tableau 32	Concentration en métabolites dans le lait (ng/mL) suite à un apport chronique de sol contaminé
Tableau 33	Quantité de métabolites excrétés dans le lait en 24h
Tableau 34	Coefficient de transfert des HAP du sol vers son métabolite principal dans le lait (%)
Tableau 35	Concentrations fécale en HAP (Log 10) pendant un apport chronique en sol contaminé
Tableau 36	Concentration en HAP (ng/mL) dans le sang témoin et contaminé suite à un apport de sol
Tableau 37	Propriétés physicochimiques du Phé et du B[a]P (INERIS 2005)
Tableau 38	Modalités testées sur l'extractibilité des HAP du sol par différents solvants
Tableau 39	Concentration (dpm/g de sol sec) en $^{14}\text{C}$ -Phé et $^{14}\text{C}$ -B[a]P avant et après maturation
Tableau 40	Extractibilité du $^{14}\text{C}$ -Phé et du $^{14}\text{C}$ -B[a]P (en %) par différents liquides
Tableau 41	Pourcentage de $^{14}\text{C}$ -B[a]P extraits selon les modalités appliquées

- Tableau 42 Coefficients de transfert des métabolites vers le lait suite à des administrations unique et chronique de HAP
- Tableau 43 Coefficient de transfert des HAP vers les fèces suite à des administrations uniques et chroniques

## Liste des abréviations

[ <sup>14</sup> C]	Marquage au carbone 14
ADN	Acide Desoxyribo Nucléique
AFSSA	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments
ARN	Acide Ribonucléique
B[a]P	Benzo[a]pyrène
Ci	Curie
CITEPA	Centre Interprofessionnel Technique d'Etudes de la Pollution Atmosphérique
CR	Capacité de Rétention
DDE	DichloroDiphenyldichloroEthylene
DDT	Dichloro-Diphenyl-Trichloroethane
DL 50	Dose Létale 50
Dpm	Désintégration par Minute
eV	Electron Volt
Fluo	Fluorène
GCMS	Chromatographie Gazeuse couplée à un Spectromètre de Masse
GLM	General Linear Model
HCl	Acide Chlorhydrique
HPLC	Chromatographie Liquide Haute Performance
IARC	Agence Internationale de Recherche contre le Cancer
INERIS	Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques
IPCS	International Programme on Chemical Safety
Koc	Coefficient de partage octanol/matière organique
KOH	Potasse alcoolique
Kow	Coefficient de partage octanol/eau
MG	Matière Grasse
MO	Matière Organique
MS	Matière Sèche
Na <sub>2</sub> HCO <sub>3</sub>	Bicarbonate de sodium
nd	Non déterminé
NEPI	National Environmental Policy Insitute
OH	Hydroxylé
Pa	Pascal
PCB	PolyChloroBiphényls
PCDD	PolyChloroDibenzo- <i>para</i> - Dioxine
PCDF	PolyChloroDibenzoFurane
Phé	Phénanthrène
Pyr	Pyrène
Rpm	Rotation par Minute
SHP	Suc d'Helix Pomatia
SIM	Selected Ion Minitoring
TEQ	Facteur d'Equivalent Toxique
tSIE	Index Spectral de la Transformée Inverse sur le Standard Externe
US-EPA	Agence de la protection environnementale des Etats-Unis
UV	Ultra Violet
VCI	Valeurs de Constat d'Impact
WHO	Organisation Mondiale de la Santé
Σ	Somme

## **Introduction générale**



Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques sont des composés ubiquistes produits par la combustion incomplète de la matière organique. De nombreux sols sont contaminés par ces composés organiques suite à des activités humaines qui génèrent des concentrations variables selon les sources d'émission : les sols dont la contamination résulte du bruit de fond environnemental sont peu contaminés, les sols de friches industrielles (vestiges de l'industrie sidérurgique) sont en revanche très fortement contaminés en HAP. Les HAP sont des molécules organiques constituées de plusieurs cycles benzéniques, hydrophobes, peu solubles dans l'eau et persistantes dans les différentes matrices environnementales.

L'hydrophobicité marquée de ces molécules favorise leur entrée puis leur accumulation dans la chaîne alimentaire : ce sont les produits riches en matière grasse qui sont particulièrement enclins à concentrer ces composés. Il existe peu de données sur le transfert des HAP vers les produits animaux, le lait notamment, alors même que la consommation de lait et de ses produits dérivés avoisine 406 kg/habitant/an.

L'ingestion de sol par les ruminants laitiers est probablement l'une des voies d'entrées principales des polluants dans la chaîne alimentaire. Le sol a donc été l'objet d'étude principal de ce travail dont l'objectif est d'évaluer le transfert de polluants du sol vers le lait. Même si l'étendue des interrogations liées à cette problématique est considérable, ce travail contribue à apporter les premiers éléments de réponse sur les conséquences d'une exposition à du sol contaminé en HAP sur les concentrations en HAP et métabolites dans le lait et le comportement des HAP liés au sol dans l'organisme. Des études à différentes échelles, du terrain au modèle *in vitro*, ont été menées conjointement dans ce travail. Le cheminement a été décomposé en 3 étapes complémentaires décrites ci-dessous.

Dans un premier temps, des relevés de sol sur le terrain avaient pour objectif de préciser les niveaux de contamination en HAP à proximité de sources d'émission et justifiaient son rôle de vecteur principal de polluants pour des animaux au pâturage.

La seconde partie de ce travail s'est attachée à caractériser le transfert des HAP et de leurs formes biotransformées vers le lait et les fèces d'animaux exposés à du sol contaminé en conditions contrôlées.

Enfin, nous avons tenté de mesurer l'extractibilité de 2 HAP modèles grâce à la simulation du système gastro-intestinal de ruminants développé *in vitro*. Le marquage des molécules au  $^{14}\text{C}$

a permis de suivre les molécules dans ce milieu et d'appréhender dans quel compartiment digestif les HAP sont potentiellement extraits du sol.

Ces différents aspects ont fait l'objet de 3 chapitres successifs, précédés d'une approche bibliographique relative aux HAP respectivement dans l'environnement et dans la chaîne alimentaire. Pour finir, les résultats et les limites de ces différentes études ont été discutés sur leur contribution et leur adéquation par rapport aux objectifs visés et aux attentes liées à la sécurité des aliments.

## **Synthèse bibliographique**

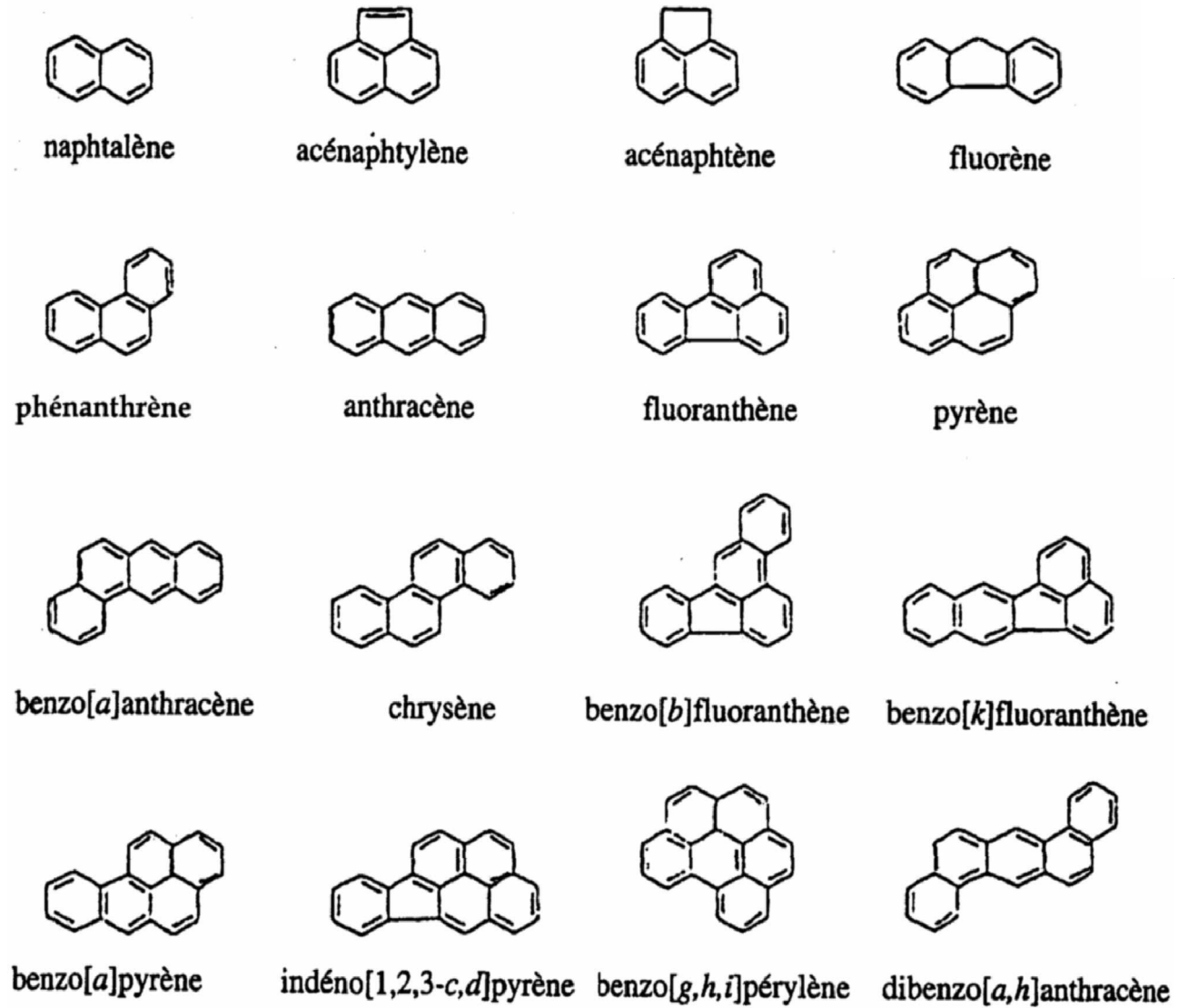
## I. Les HAP, problématique actuelle

### 1. Propriétés générales des HAP

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (**HAP**) sont des molécules organiques constituées d'atomes de carbone et d'hydrogène (figure 1). Associés en cycles benzéniques (2 à 6 cycles), ils confèrent à ces molécules une forte lipophilie (Baek et al., 1991 ; Wilson et Jones, 1993). Parmi ces molécules, 16 ont des propriétés cancérigènes et mutagènes avérées pour certaines (tableau 1) et sont considérés depuis 1976 comme polluants prioritaires par l'Agence Américaine de la Protection de l'Environnement (US-EPA ; Waldman et al., 1991). Les interactions avec des matrices environnementales (adsorption sur des surfaces, volatilisation, dégradation) sont fortement conditionnées par cette propriété hydrophobe. Le caractère lipophile de ces molécules est estimé par le  $\log K_{ow}$ , logarithme du coefficient de partage octanol/eau. Il décrit l'affinité d'une molécule pour les phases lipophiles (Artursson et al., 1996). Variant de 3,4 (naphtalène) à 6,75 (dibenzo[a,h]anthracène), le  $\log$  de  $K_{ow}$  atteste bien de la lipophilie de ces molécules.

Stables chimiquement et physiquement, ces composés sont persistants dans l'environnement. Leur demi-vie dans le sol est comprise entre quelques jours (70 jours pour le naphtalène, 230 jours pour le Fluo) et plusieurs années (708 jours pour le B[a]P) selon le type de molécule (Jones et de Voogt, 1999; MacKay et al., 1991). Dans un milieu organique irradié avec des rayons équivalents à la lumière, ce temps de demi-vie diminue fortement. La durée de demi-vie du Fluo par exemple passe de 230 à moins de 2h (Moeini-Nombel et Matsuzawa, 1998) ce qui témoigne de l'importance des compartiments auxquels sont associés les HAP en terme de dégradation.

Sur l'ensemble des HAP connus, le B[a]P est le seul cancérigène avéré (Wilson et Jones, 1993). Une activation métabolique des HAP est cependant nécessaire pour exprimer un réel effet mutagène : la molécule mère doit être préalablement transformée par des enzymes de type mono oxygénase. Les HAP ainsi modifiés deviennent particulièrement réactifs avec l'ADN, l'ARN et les protéines cellulaires créant ainsi de nombreuses liaisons irréversibles et pouvant induire la formation de tumeurs (Beaune et Moriot, 2000). Qu'elle soit consécutive à une dose unique ou chronique, l'exposition d'organismes à des HAP entraîne des lésions au niveau de l'ADN, des dommages cellulaires et, à forte dose, la mort des organismes testés (la dose létale 50 -DL50- chez des souris est atteinte au terme d'un apport oral de Phé de 700 mg/kg).



**Figure 1** : Structure des seize Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques prioritaires proposés par l'agence pour la protection de l'environnement des Etats-Unis

**Tableau 1:** Caractéristiques physicochimiques des 16 HAP US-EPA (Dzombak et Luthy, 1984)

HAP	Masse moléculaire (g/mol)	Constante de Henry (à 20°C)	Solubilité dans l'eau à 25°C (mg/L)	Log K <sub>oc</sub>	Log K <sub>ow</sub>	Potentiel carcinogène Classification IARC/EPA
Naphtalène	128,2	10 <sup>-2</sup>	32	3,288	3,37	
Acénaphène	154,2	2,5.10 <sup>-3</sup>	3,4	4,276	4,33	
Acénaphthylène	152,2	2,1.10 <sup>-3</sup>	3,93	4,008	4,07	
Fluorène	166,2	4.10 <sup>-4</sup>	1,9	5,305	4,18	
Phénanthrène	178,2	4,5.10 <sup>-3</sup>	1-1,3	4,409	4,46	3
Anthracène	178,2	4,3.10 <sup>-2</sup>	0,05-0,07	4,399	4,45	3
Fluoranthène	202,3	4.10 <sup>-4</sup>	0,26	5,305	5,33	3
Pyrène	202,3	5.10 <sup>-4</sup>	0,14	5,294	5,32	3
Benzo[a]anthracène	228,3	0	0,01	5,593	5,61	2A/B2
Chrysène	228,3	6.10 <sup>-4</sup>	0,002	5,593	5,61	3/B2
Benzo[b]fluoranthène	252,3	Nd	0,0015	6,581	6,57	2B/B2
Benzo[k]fluoranthène	252,3	Nd	0,00081	6,858	6,84	2B
Benzo[a]Pyrène	252,3	0	0,0038	6,035	6,04	2A/B2
Indéno[1,2,3-cd]Pyr	276,3	Nd	0,00026	7,702	7,66	2B/B2
Benzo[ghi]pérylène	276,3	0	0,00026	7,260	7,23	3
Dibenzo[ah]anthracène	278,4	0	0,0006	5,963	5,97	2A/B2

**IARC** : International Agency for Cancer Research, **2A/B2** : probablement carcinogène pour l'homme, **2B** : potentiellement carcinogène pour l'homme, **3** : non classifiable en tant que carcinogène pour l'homme.

K<sub>oc</sub> : coefficient de partage du micro-polluant entre l'octanol et le carbone organique ; K<sub>ow</sub> : coefficient de partage octanol/eau, où Log K<sub>oc</sub> = Log K<sub>ow</sub> - 0,21 (Chiou et al., 1998) ; nd : non déterminé.

Estimer les risques pour l'homme et établir des normes d'exposition est complexe étant donnée la difficulté de transposition à l'homme de résultats obtenus suite à des expérimentations animales. Des normes sur les teneurs en HAP dans diverses sources d'alimentation sont cependant préconisées : des concentrations maximales de B[a]P de 1µg/kg dans les aliments et 0,7µg/L dans l'eau de boisson sont fixées par l'Union Européenne et le WHO (IPCS, 1998).

## 2. Sources et niveaux d'émission

### 2.1. Sources d'émission des HAP

Les sources d'émission de ces molécules sont multiples. De fait, les HAP étant formés lors de la combustion incomplète de matière organique, tout procédé de combustion naturel ou anthropique peut être générateur de HAP. Les molécules formées sont spécifiques du type et de la température de combustion (Mc Elroy et al., 1989 ; Palayer, 1997).

- *Les sources naturelles*

Les molécules présentes dans l'atmosphère et dans l'environnement terrestre peuvent être issues d'émissions naturelles. Les principaux évènements sont les éruptions volcaniques, les feux de forêt et de broussailles ou encore la formation de combustibles fossiles. Une part des HAP formés naturellement provient également de réactions se produisant dans les micro-organismes et les végétaux (Wilson et Jones, 1992). Dans le sol, la génèse de HAP est possible en conditions anaérobies. Elle résulterait de processus biologiques transformant divers précurseurs aromatiques (lignine) en HAP, sous l'action d'enzymes issues de bactéries anaérobies. Ces précurseurs des réactions enzymatiques sont présents respectivement dans les plantes et dans le sol (Thiele et al., 2002). Ils peuvent également être formés par des organismes vivants : insectes, organismes marins, termites (Wilcke et al., 2000). En France, les émissions des sources biotiques et non anthropiques sont minimes, elles représentent moins de 1% des émissions totales (CITEPA, 2004).

- *Les sources anthropiques*

L'émission de HAP par les sources anthropiques est la voie majoritaire de contamination de l'environnement. Les sources sont nombreuses et peuvent être caractérisées de la façon suivante :

*Les sources fixes* : elles participent à hauteur de 90% de la production de HAP. Les principales sources fixes sont :

- le chauffage résidentiel (charbon et fioul ; 37% des émissions en France) produisant des composés à 4 cycles,
- les industries (en particulier les activités industrielles liées aux énergies fossiles ; 18% en France et près de 70% en Norvège),
- toutes les formes d'incinération.

Ces activités en développement constant depuis plusieurs décennies (100 à 150 ans) ont favorisé la production de HAP et l'augmentation de leur concentration dans les différents compartiments terrestres. La hausse régulière de ces taux dans l'environnement a contribué à l'établissement de normes de rejet visant à limiter les émissions (Wilson et Jones, 1992 ; Juhasz et Naidu, 2000).

*Les sources mobiles* : la circulation automobile contribue à la diffusion des molécules dans l'atmosphère, notamment dans les régions urbaines et suburbaines. Les émissions dues à ces sources ne représentent qu'une faible part de l'émission totale dans les pays nordiques (moins de 10% en Norvège et Suède par exemple). En France, en revanche, elles avoisinent 40% du total des émissions. Le fluoranthène et le pyrène constituent entre 70 et 80% des émissions dues aux véhicules (IPCS, 1998). La proportion de HAP provenant des voies aériennes, ferroviaires et fluviales est faible (Baek et al., 1991 ; Wild et Jones, 1995).

## 2.2. Niveaux d'émission des HAP

En France, en 2002, 251 tonnes de HAP ont été émises, soit près de 70 tonnes de moins qu'en 1991 (CITEPA, 2004). Des données plus récentes sur le dégagement des HAP dans l'air en France existent (CITEPA 2005). Elles ne sont pas cependant prises en compte dans ce document, l'évaluation des émissions ne faisant état que de 4 HAP (benzo[a]pyrène, benzo[b]fluoranthène, benzo[k]fluoranthène, indéno(1,2,3)pyrène) qui ne sont pas prépondérants dans l'environnement. Exprimé par rapport à ces 4 molécules, le chauffage résidentiel est le secteur d'émission majoritaire (85 % du total). Selon Baek et al. (1991), les industries (exploitation du charbon, de l'aluminium, du goudron) seraient responsables des plus gros dégagements de polluants dans l'atmosphère, entre 40 et 70 % en Europe du nord et aux Etats-Unis. La contamination des milieux par la production industrielle de HAP reste cependant anecdotique. Seul le seul naphthalène est synthétisé en quantité élevée. Acénaphthène, fluorène, anthracène, phénanthrène, fluoranthène et pyrène sont produits en



quantité moindre. Les émissions annuelles de HAP sont considérables mais une tendance à la stagnation est relevée depuis une dizaine d'année (figure 2). Essentiellement dues au chauffage résidentiel, les émissions sont directement liées à la consommation d'énergie et ne devraient plus évoluer de façon significative au cours des années à venir (CITEPA, 2004).

Le profil en HAP dans certains compartiments environnementaux (herbe, air, sédiments) serait spécifique du type de combustion et donc de la source d'émission. Toutefois, si les profils d'émission sont uniques et propres aux types de combustion, la dégradation, l'oxydation ou encore la volatilisation tendent à homogénéiser les empreintes initiales. Les profils dans certaines matrices, le sol en particulier, sont alors peu représentatifs des sources. Les variations sont en effet atténuées par ces divers phénomènes (Wild et al., 1992 ; Wilcke, 2000).

Cet état des lieux a permis d'appréhender l'importance des émissions de HAP et par conséquent d'expliquer les contaminations environnementales existantes. La multitude de sources est à l'origine du caractère ubiquiste des contaminations en HAP, caractère également favorisé par l'aspect mobile de certaines sources (transport). Les sources mobiles accentuent effectivement la dispersion des polluants dans l'environnement.

### 3. Facteurs de variations des concentrations de HAP dans l'environnement

#### *3.1. Influence de la saison*

L'hiver se traduit par une baisse des températures et induit une utilisation de chauffage domestique accrue. Cette intensification du chauffage (centrales thermiques et électriques sollicitées, feux de cheminées alimentés) a pour conséquence une hausse des émissions de HAP. Les concentrations dans l'herbe et dans l'air en hiver sont de 2 à 4 fois supérieures à celles d'été et peuvent l'être jusqu'à 50 fois pour le B[a]P (Smith et al., 2001 ; Juhasz et Naidu, 2000). En outre, la chute des températures en hiver réduit l'activité et la dégradation des molécules par les microorganismes. Elle est également responsable d'une augmentation des rejets des gaz d'échappement des voitures. Notons enfin que la diminution de la photopériode réduit la photo-dégradation des HAP au cours des mois d'hiver. Les conditions climatiques et leurs effets « secondaires » jouent un rôle prépondérant dans le devenir de ces molécules (Kiss et al., 2001). Selon Wilcke et Amelung (2000), les manifestations de l'hiver, température et pluviométrie, n'auraient pas d'incidence physique ou chimique directe sur la dégradation et le devenir des HAP.

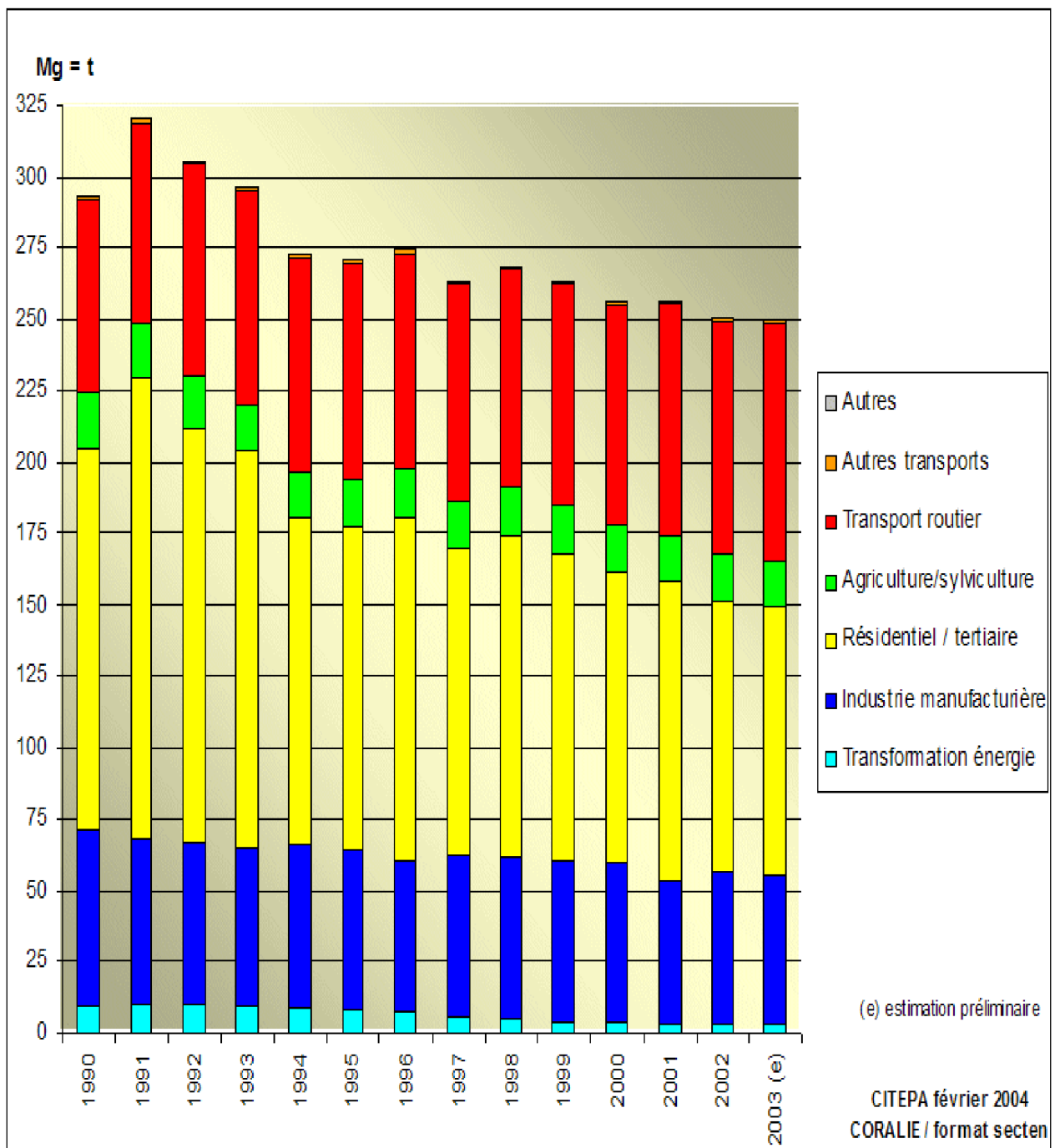
Cousins et al. (1999) ont cependant mis en évidence une action considérable de la température sur la volatilisation des HAP liée à l'augmentation des températures.

### 3.2. Influence de la distance à la source d'émission

Les HAP peuvent être impliqués dans deux types de pollution :

- les pollutions ponctuelles, et souvent accidentelles, où la source d'émission localisée induit des concentrations élevées mais limitées dans l'espace,
- les pollutions diffuses, où la pollution est émise sur de grandes surfaces de façon continue (circulation, industries...), mais à des concentrations faibles (Barriuso et al., 1996).

Seules les pollutions ponctuelles, où l'origine est clairement identifiée, permettent une étude sur l'influence de la distance à la source. L'environnement des axes routiers, en particulier les autoroutes, est fréquemment étudié. Il a été montré une décroissance des concentrations dans divers compartiments proportionnelle à la distance à la source (Hewitt et Rashed, 1991 ; Wilcke et al., 1996 ; Garban et al. (2002). Tuhackova et al. (2001) ont en effet mis en évidence une concentration en HAP dans des échantillons de sol inversement proportionnelle à la distance à la source d'émission. Les prélèvements effectués à proximité d'une autoroute sont près de 30 fois supérieurs (3095 ng/g de sol sec) à ceux prélevés à 500 mètres de cette même source (106 ng/g MS sol) où les concentrations en HAP sont équivalentes au bruit de fond. Notons que la distance que peuvent parcourir des molécules exposées aux conditions climatiques et aux dégradations (thermique, photochimique) est dépendante de sa durée de demi-vie, les molécules adsorbées à des particules étant peu ou pas dégradées (Wilcke, 2000). Meharg et al. (1998) et Bryselbout et al. (2000) ont mis en évidence une relation entre la distance de transport de molécules et leur poids moléculaire. Les plus lourdes (chrysène, benzo[a]pyrène) présentes dans la phase particulaire retombent en effet près de la source. En revanche, les plus légères présentes dans la phase gazeuse (acenaphtène) migreront sur de plus longues distances. Il faut souligner que la direction du vent contribue également à la dispersion des HAP, leur concentration étant supérieure sous le vent dominant (Mastral et al., 2003).



**Figure 2 :** Emission de HAP dans l'air en France métropolitaine (en tonnes, somme des 16 HAP ; [http://www.citepa.org/emissions/nationale/Pop/pop\\_hap.htm](http://www.citepa.org/emissions/nationale/Pop/pop_hap.htm))

### *3.3. Influence des compartiments terrestres sur la concentration en HAP*

Les HAP émis par les diverses sources s'adsorbent sur une grande variété de supports dans l'environnement. Les niveaux de contamination sont très hétérogènes selon les matrices considérées (air, eau, sédiments, sol et végétaux). La capacité de rétention des HAP sur les différents milieux dépend des caractéristiques physicochimiques des molécules d'une part et des propriétés des supports d'adsorption d'autre part (Juhasz et Naidu, 2000). Chez les végétaux par exemple, de légers écarts de contamination sont notés entre espèces de prairies à des moments de prélèvements identiques. L'espèce du végétal influe sur la concentration : des concentrations de 25 (chou) à 239 (endives) ng/g MS (Kipopoulou et al., 1999), et de 2000 à 8000 ng/g MS d'herbe en zone contaminée (Bakker et al., 2000) ont été relevées. Ces différences peuvent être expliquées par les compositions de surface des feuilles (cire, cuticule) qui retiennent les molécules de façon spécifique. L'orientation ou encore l'âge influent de manière significative sur la concentration en HAP d'une plante entière (Bakker et al., 2000 ; Smith et al., 2001). A cela s'ajoutent les types et les caractéristiques de sol qui peuvent agir de façon significative sur la concentration en HAP sur la plante (projection), comme nous le développerons ultérieurement. Du fait des conditions physicochimiques changeantes (température, humidité...) la concentration des polluants dans chacune des phases solide, liquide ou vapeur n'est pas figée dans le temps.

### *3.4. Influence du relief*

Il existerait un lien entre la topographie et la concentration en HAP dans divers supports. Martens et al. (1997) ont montré dans une région rurale que la concentration en HAP est supérieure dans les vallées comparées aux zones d'altitudes. Le vent, plus fort en hauteur, volatiliserait les molécules fraîchement déposées tandis que la pluie lessiverait les HAP les plus hydrophiles les entraînant vers la vallée. L'interaction du vent et du faible poids moléculaire des molécules serait à l'origine de cette dissipation. De plus, selon Wilcke (2000), les particules fines riches en matières organiques, et donc fortement contaminées, sont les plus exposées au lessivage. Entraînées par la pluie, elles contribueraient aux teneurs élevées en HAP relevées dans les vallées.

## II. Niveaux de contamination en HAP dans les différentes matrices environnementales

### 1. Contamination de l'air

Malgré des fortes émissions de HAP dans l'air, la concentration moyenne est assez faible (effet dilution). L'exposition quotidienne des hommes aux HAP via l'inhalation représenterait 0,9% de l'exposition totale. La surveillance de la pollution de l'air paraît donc nécessaire, un être humain brassant près de 15 m<sup>3</sup> d'air par heure. D'après la directive européenne n°76/464/CEE ainsi que l'arrêté du 1er mars 1993, les rejets atmosphériques des industries doivent satisfaire à des exigences sévères. Les quantités de molécules dégagées sont soumises à des contrôles : le rejet maximal de benzo[a]Pyr est limité à 0,5 g/h. Les niveaux de contamination de l'air varient selon les localisations : milieux urbain ou rural, proximité de sites industriels. Les concentrations en HAP dans l'atmosphère sont comprises entre 5,7 et 44,6 ng/m<sup>3</sup> (somme des 16 HAP) selon les saisons en milieu semi rural (Smith et al., 2001), et entre 300 et 400 µg/m<sup>3</sup> dans l'environnement proche d'industries (cokerie) (Baek et al., 1991 ; tableau 2).

**Tableau 2** : Estimation des émissions de HAP dans l'air (en tonnes)

Source	Etats-Unis (1983)*		Suède (1983)*		Norvège (1983)*		France (2002)*	
	Total	%	Total	%	Total	%	Total	%
Chauffage résidentiel	1380	16	132	26	63	21	94	37
Industries	3497	41	312	62	203	69	54	18
Incinération	50	1	2	1	1	0		
Production d'électricité	401	5	7	1	1	0	4	2
Feux sauvages	1100	13	2	1	7	2		
Transport	2170	25	47	9	20	7	82	32
Total	8598		502		294		251	

De Baek et al. (1991) et CITEPA 2004 (\* : somme des 16 HAP)

L'impact du chauffage individuel a été démontré par Kiss et al. (2001). Aux abords du lac Balaton (Hongrie), des concentrations estivales de 0,72 ng/m<sup>3</sup> ont été mesurées malgré une forte circulation automobile (activités touristiques). Ces concentrations atteignent 30 ng/m<sup>3</sup> en hiver en raison d'un chauffage individuel intense au fioul et au charbon. Comparée aux sources domestiques et industrielles, la circulation automobile contribuerait donc de façon limitée à l'émission et à la concentration en HAP dans l'air.

## 2. Contamination de l'herbe

### 2.1. Voies de contamination des végétaux

Les voies de contamination des végétaux sont multiples (figure 3). Les dépôts atmosphériques, les épandages de boues d'épuration, l'effet de « splash » (projection de particules de sol sur les parties aériennes des plantes lors d'un épisode pluvieux), la volatilisation des HAP du sol ou encore le passage des racines à la plantes sont les entrées possibles de molécules sur les végétaux (Fries, 1996 ; Smith et Jones, 2000). Néanmoins, l'arrivée des polluants sur les végétaux provient essentiellement des dépôts atmosphériques (Wild et Jones, 1995). Environ 30% de la teneur en HAP des végétaux résulte d'une souillure de la plante par du sol contaminé (projection, « splash », volatilisation ; Dreicer et al., 1984). La température, le vent et la pluie sont des paramètres agissant directement sur la concentration en HAP de la plante : ces actions physiques favorisent le décrochement et l'élimination des molécules adsorbés sur la plante (Smith et al., 2001). En outre, dans le cas de végétaux poussant sur un sol pollué, la part de HAP entrant par les racines est négligeable (Mc Crady et al., 1990 ; Smith et Jones, 2000). Les polluants organiques se répartiraient sur l'épiderme extérieur des racines résultant en une absorption réduite (Fismes et al., 2002 ; Gao et Zhu, 2004). L'épiderme des racines contient en effet de la subérine, constituant très lipophile capable d'adsorber fortement les HAP (Briggs et al., 1982). La morphologie des feuilles combinée au caractère hydrophobe de la cuticule (rétention des molécules) favoriserait le maintien des HAP déposés via l'air en faisant ainsi la principale source de contamination des plantes.

### 2.2. Niveaux de contamination

Les niveaux de contamination dans l'herbe varient en fonction des localisations, des sources, des saisons et des études. Si les concentrations mentionnées dans les différents articles sont assez disparates, elles ne restent pas moins représentatives de la proximité d'une source d'émission. Les prélèvements sont effectués en fonction de zones, classées selon leur degré et type d'exposition :

- zone rurale, éloignée de toute source d'émission connue et dont la densité de population est inférieure à 58 personnes au km<sup>2</sup>,
- zone semi-rurale (ou semi-urbaine), dont la densité est de 1000 personnes au km<sup>2</sup> environ,
- zone urbaine de 6700 personnes au km<sup>2</sup>, et plus (Wong et al., 2004).

On relève des concentrations disparates en zone rurale (tableau 3). Elles illustrent un manque de méthodes standardisées et de normes associées aux extractions des différentes matrices (végétaux et sol). Les méthodes de prélèvement, d'extraction, de dosage et d'analyse sont en effet spécifiques à chaque étude. Ces hétérogénéités dans les protocoles induisent des variations notables au sein d'une même matrice et pour une même modalité (Baek et al., 1991, Smith et al., 2001 ; Niederer et al., 1995).

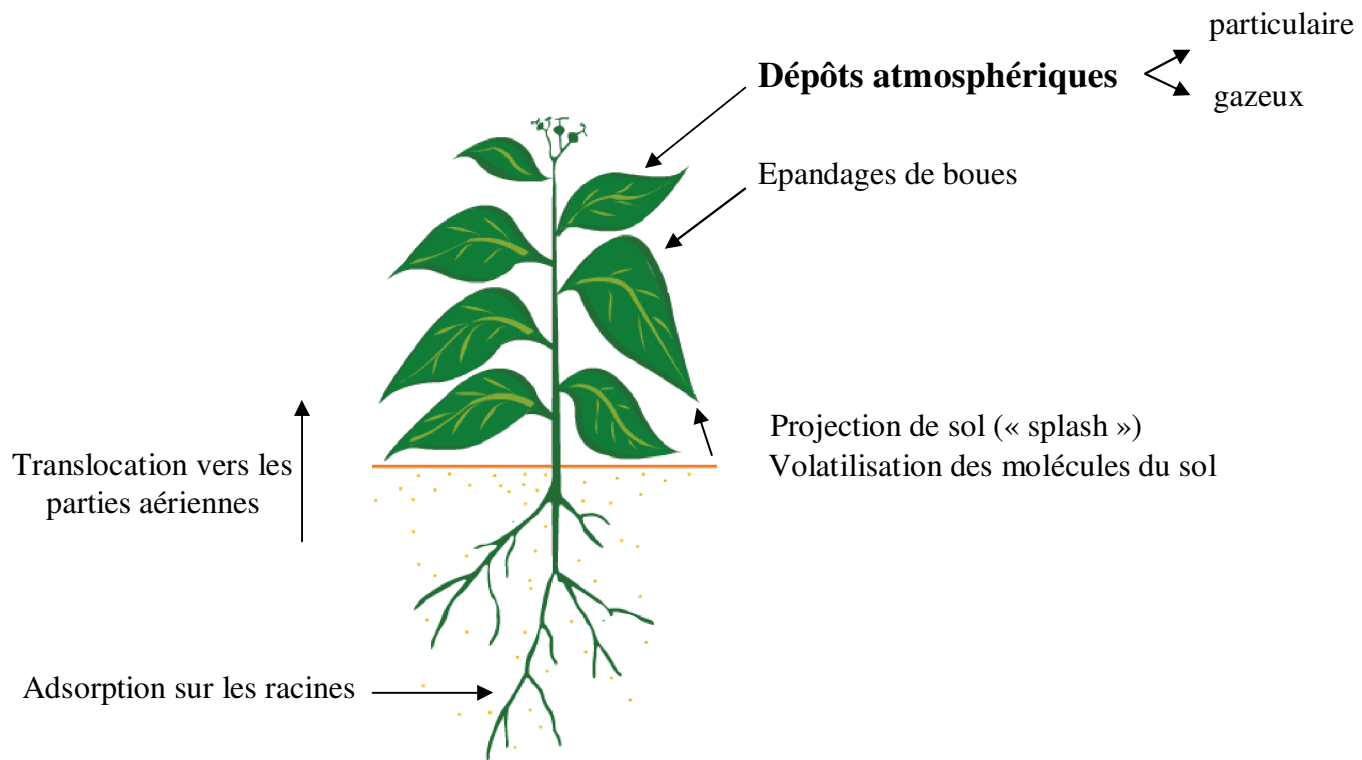
En zones exposées, les concentrations dans l'herbe fluctuent entre 0,1 et 2,4 µg/g MS selon les sources d'émission et les études de référence (tableau 3).

### 2.3. Profils en HAP dans l'herbe

Les concentrations totales en HAP dans l'herbe renseignent sur l'impact et l'étendue d'une source de pollution (Müller et al., 2001). Le profil en HAP des échantillons prélevés est cependant une donnée complémentaire et essentielle.

Les caractéristiques dues à la structure et à la surface des feuilles, à la morphologie de la plante ou à sa densité sur une surface donnée sont variables. Elles induisent ainsi des processus de dépôt et de rétention propre à chaque espèce (Smith et al., 2001). Les propriétés des feuilles (et de la cire principalement) joueraient un rôle déterminant dans la rétention des molécules présentes en phase gazeuse. Smith et al. (2001) mettent en évidence des différences entre profils selon les saisons : les composés à 3 et 4 cycles sont majoritaires en hiver (en particulier Phé, Fluo et Pyr). Les composés légers (2 et 3 cycles) sont en revanche dominants en période estivale (tableau 4). L'influence des événements météorologiques (action physique) sur les concentrations est une des hypothèses avancée.

Malgré ces quelques différences, le profil des HAP dans l'herbe est caractérisé par la prépondérance des molécules à faible poids moléculaire. Bakker et al (2001) ont comparé les concentrations en HAP dans des feuilles en zone urbaine en fonction de leur temps d'exposition. Bien que la concentration totale en HAP varie selon la durée d'exposition, le profil dans les feuilles est caractérisé par l'abondance des composés à poids moléculaire intermédiaire tels que le fluoranthène et le pyrène. Le lessivage des particules auxquelles sont liées les molécules à haut poids moléculaire serait à l'origine de cette perte des HAP dit lourds.



**Figure 3** : Principales voies de contamination du végétal par des molécules organiques (d'après Smith et Jones, 2000)



**Tableau 3 :** Concentrations en HAP (16 HAP) relevées dans l’herbe en fonction du lieu d’exposition (en µg/g MS)

Auteurs	Zone rurale	Zone semi-rurale	Bordure de route	Zone d’incendie
Bryselbout et al. (2000)			2m : 0,29 4m : 0,33 6m : 1,46	
Crépineau et al. (2003)			10m : 0,98 50m : 0,83 150m : 0,95	
Crépineau et al., (2004)			5 m : 0,13	
Grova et al. (2000) (hiver)	0,05	0,08		
Meharg et al. (1998)	0,15			2,36
Müller et al. (2001)			10m : 0,15	
Smith et al. (2001)		0,10 à 0, 94 (saisons et espèces confondues)		
Wild et al. (1992)	0,85			

**Tableau 4 :** Molécules majoritaires mesurées dans l’herbe

Saison	HAP majoritaires
Hiver	3 et 4 cycles : fluorène, phénanthrène, fluoranthène, pyrène
Eté	2 et 3 cycles : naphthalène majoritairement, fluorène, phénanthrène

### III. Devenir des HAP dans le sol

#### 1. Contamination du sol

Le caractère hydrophobe et la capacité de rétention font du sol un puits à HAP. L'accumulation des retombées atmosphériques au cours du temps est favorisée par le caractère non renouvelable du sol. Les molécules déposées vont alors se répartir dans les différents types de particules de sol.

Les concentrations en HAP sont très variables selon les zones de prélèvements. La proximité d'une source d'émission, le type de source ou encore la distance à la source peuvent en effet jouer de façon significative sur les teneurs en HAP et mener à des variations considérables. Dans le cadre de notre étude, la connaissance des niveaux de contamination du sol est essentielle. Le paragraphe suivant est consacré au comportement des HAP dans le sol.

L'exposition d'animaux aux HAP via l'inhalation étant faible, l'ingestion est la voie de contamination prépondérante.

#### 2. Niveaux de contamination du sol

Le sol est principalement contaminé via les dépôts atmosphériques (Shabad, 1980 ; Wilcke, 2000). Les concentrations sont très supérieures à celles mesurées dans l'herbe. Les propriétés (composition, hydrophobicité) du sol sont certes différentes de celles des végétaux. Le sol reçoit et accumule ces molécules au cours du temps contrairement aux végétaux qui ne sont exposés que sur une courte période (fauche, saison) correspondant à leur durée de vie (Bakker et al., 2000). Les niveaux de concentrations de HAP dans le sol sont essentiels pour estimer dans quelle mesure les organismes vivants (enfants, volailles en plein air, ruminants laitiers) sont exposés aux HAP via l'ingestion involontaire de sol.

##### 2.1. Zones rurales et semi-rurales

Divers auteurs ont caractérisé des contaminations de sols issus de zones à niveaux d'exposition variables. Les relevés de sol ont été faits sur la surface du sol (0-10 cm) soumise à la photo-dégradation et à la volatilisation mais exposée directement à la retombée des molécules.

Peu d'auteurs traitent simultanément des contaminations en HAP de l'herbe et du sol. Il n'existe pas de relation entre les concentrations dans l'herbe et le sol sur un lieu donné. La

teneur en HAP n'excéderait pas 0,001 à 0,01 µg/g MS par molécule dans les sols non exposés (contamination de bruit de fond due aux émanations naturelles ; tableau 5). Fluorène, phénanthrène, pyrène et B[a]P qui sont les HAP majoritaires dans les sols ont des concentrations ubiquitaires inférieures à 0,01 ; 0,01 ; 0,02 et 0,002 µg/g MS respectivement (INERIS).

Les concentrations en HAP dans les sols suivent l'ordre suivant :

Sol agricole < sol de forêt < prairie permanente < sol urbain < sol d'un site d'émission ponctuel (Wilcke, 2000).

Les sols agricoles dont la somme des 16 HAP avoisine en général 0,20 µg/g MS sont faiblement contaminés. Leur localisation en zone rurale (éloignés des sources d'émission) et le travail effectué sur ces sols restreignent l'accumulation des molécules déposées en surface (tableau 5). Le labour favorise en effet leur dilution avec la terre de profondeur. Les sols de prairie échappent à ces travaux de surface du sol ce qui favorise l'accumulation des molécules déposées (Wilke et al., 2000). Si les teneurs en HAP dans les sols urbains sont élevées (4400 ng/g MS), elles diminuent en fonction de la profondeur du sol et de la distance aux voies routières (Wilcke, 2000).

Naphtalène et phénanthrène se distinguent par leur forte teneur (respectivement 28 et 38%), les autres molécules n'étant représentées qu'à hauteur de 10% maximum. Cette empreinte est caractéristique des milieux éloignés de toute source de pollution. En effet, seuls les HAP les plus volatiles sont très mobiles et susceptibles d'être transportés sur de longues distances, vers les zones rurales (Wilcke et Amelung, 2000).

## 2.2. Sites urbains et industriels

Les données illustrent la diversité des niveaux de contamination particulièrement élevés à proximité de sites d'émission (tableau 6). Les sols les plus contaminés sont proches de sites industriels. Les distances de prélèvement n'étant pas précisées, il est possible que les échantillons proviennent de l'enceinte même du site. Les niveaux atteints restant anecdotiques, on peut raisonnablement penser que ces sols fortement contaminés ne sont pas à la portée d'organismes divers. La dénomination de sites industriels inclue également les sols de friches industriels, fortement contaminés pendant de nombreuses années d'exploitation et laissés à l'abandon suite à l'arrêt des activités.

**Tableau 5** : Concentrations en HAP dans le sol de zones rurales et semi-rurales ( $\mu\text{g/g MS}$ )

Auteurs	Type de site	Nb HAP	Localisation	Concentration $\mu\text{g/g MS}$
Wilcke et Amelung (2000)	Rural	20	Etats-Unis	0,06 à 0,32 entre 0 et 10 cm dont 28 % naphthalène 38 % Phé
Wong et al. (2004)	Rural	12	Tillsonburg, Etats-Unis	0,15
Nadal et al. (2004)	Rural	16	Espagne	0,11
Wild et Jones (1995)	Rural	10	Royaume Uni	0,19
Wilcke et al. (2000)	Rural	20	Amérique du Nord	0,06 à 0,32
Wilcke et al. (1999)	Rural	20	Brésil	0,07 à 0,09
Wild et Jones (1995)	Forêt de pin	10	Angleterre	4,81
Jones et al. (1989)	Semi-rural	14	40 km de Londres, Royaume Uni	1,04

**Tableau 6** : Somme des HAP mesurée dans différents sols prélevés en zone urbaine listée par la littérature ( $\mu\text{g/g MS}$ )

Auteurs	Type de site	Nb HA P	Localisation	Concentration $\mu\text{g/g MS}$
Wilcke et al. (1999)	Urbain	20	Bangkok, Thaïlande	0,13 (moyenne de 0,04 à 0,20 $\mu\text{g/g MS}$ selon les points de prélèvement)
Wild et Jones (1995)	Urbain	10	Angleterre	4,24
Wilcke et al. (1999)	Urbain	20	Brésil	0,01 à 0,39
Juhasz (1998), cité par Juhasz et Naidu (2000)	Sites industriels	16		Usine pétrochimique : 821 Usine de gaz : 7337
Bewley et al. (1989)				
Wilcke et al. (1996)	Sites industriels	16	Ziar, Slovaquie	Production d'aluminium : 35 à 73 Raffinerie : 300000 (7 HAP)
Meharg et al. (1998)	Incendie de produits chimiques	16	Royaume-Uni	2,7 à 18

La reconversion de ces sites à forte valeur foncière (localisation, surface) en zone résidentielle, cultures maraîchères ou pâturage, est une problématique émergente. Dans le cadre d'une reconversion en terrain agricole sans rémédiation préalable, une étude du risque de transfert des polluants du sol vers les produits animaux doit être mise en œuvre. Les concentrations rencontrées sur ce type de sites sont généralement comprises entre 50 et 2600 µg/g de sol sec (Fismes et al, 2002).

### 2.3. Bordures d'autoroutes

D'après le tableau 7, il est possible d'associer le niveau de contamination d'un sol de bordure d'autoroute avec la distance à la source.

Parmi toutes ces données, notons qu'il existe des variations liées aux méthodes de prélèvements, extractions et analyses. Ces fluctuations de valeurs sont le reflet de méthodes peu reproductibles dont les faibles rendements d'extraction ne sont pas répétables et d'approximations dans les prélèvements (la profondeur du prélèvement par exemple). Les concentrations des échantillons tendent à être sous estimées suite à des pertes de molécules durant la purification et la concentration de certains extraits. Comme dans le cas des végétaux, la diversité de méthodes de prélèvements, d'analyse, ainsi que le nombre de molécules recherchées ne permet d'obtenir que des estimations de contaminations existantes. La caractérisation de la pollution reste approximative (Baek et al., 1991 ; Edwards, 1983 ; Smith et al, 2001 ; Niederer et al., 1995).

### 3. Réglementation sur les teneurs limites en HAP dans les sols

La connaissance des concentrations en HAP est indispensable dans le cas de sols agricoles compte tenu de sa place en début de chaîne alimentaire. Afin d'éviter des répercussions éventuelles sur les productions agricoles à but alimentaire (la principale voie de contamination en HAP chez l'homme étant la voie alimentaire) ou sur les écosystèmes terrestres, il est impératif de connaître les concentrations en HAP d'un sol pour caractériser son degré de contamination (Maliszewska-Kordybach, 1996). Il n'existe pas, en France, de valeurs critiques de pollution au-delà desquelles une décontamination doit être envisagée. Maliszewska-Kordybach (1996) propose, à titre indicatif et tout en connaissant les limites d'une distribution des classes de contamination des sols (tableau 8). Il existe en France des

valeurs guides pour les sols. Ces Valeurs de Constat d'Impact (VCI) sont établies pour évaluer l'effet d'un sol sur l'homme pour un usage donné :

- l'usage sensible, où le sol est utilisé pour la culture d'un jardin potager en milieu résidentiel,

- l'usage non sensible, où l'usage du sol est exclusivement industriel ou commercial.

Les VCI tiennent compte des risques liés à une exposition chronique et à la toxicité d'une substance donnée sur la santé humaine (tableau 9).

Parallèlement à ces données guides, on peut citer des valeurs limites de pollutions au-delà desquelles une décontamination du sol est imposée par certains pays. C'est le cas par exemple de la Grande Bretagne et de l'Australie où un traitement du sol est préconisé lorsque la somme de 16 HAP dépasse 20 µg/g et 500 µg/g MS respectivement.

#### 4. Devenir des HAP du sol

##### *4.1. Pertes abiotiques des HAP du sol*

Les pertes abiotiques sont uniquement dues à des phénomènes d'ordre physique et chimique. Aucune action d'organismes vivants n'intervient. Elles seraient responsables de la perte de 2 à 20% des HAP à 2 et 3 cycles dans le sol (Park et al., 1990).

##### *4.1.1. Volatilisation*

La volatilisation est gouvernée par plusieurs phénomènes agissant directement sur les molécules via leurs propriétés physico-chimiques. Elle peut être conditionnée par les facteurs régissant le milieu : température du sol et de l'air ambiant, vent, humidité ou présence de couvert végétal. Ce dernier influe sur la température du sol, température qui régit la solubilité des composés, les coefficients et vitesse de diffusion (Cousins et al., 1999 ; Zngang et al., 1995).

La volatilité des HAP détermine également leur capacité à être emportés et mobilisés. Caractérisée par la constante de Henry, leur volatilité varie de  $4,89 \cdot 10^{-2}$  pour le naphthalène à  $3,4 \cdot 10^{-5}$  pour le B[a]P. Elle est fonction du poids moléculaire des polluants.

La volatilisation des molécules est souvent évoquée pour tenter d'expliquer des diminutions de concentrations en HAP dans les sols. Même si elle n'est pas négligeable pour certains d'entre eux, elle reste mineure pour les grosses molécules (4 et 5 cycles). Une étude rend compte d'une perte par volatilisation d'un sol enrichi en boue de station d'épuration de 24 à 100% selon les HAP, avec une dissipation totale du naphthalène (Wild et Jones, 1993). La

perte des composés dans un sol est fonction du poids moléculaire des HAP (Ginn et al., 1995 ; Cousins et al., 1998).

**Tableau 7** : Niveaux de contamination en HAP de sol à proximité d'autoroutes (en µg/g MS)

Auteurs	Type de site	Nb HAP	Localisation	Concentration µg/g MS
Bryselbout et al. (2000)	Autoroute (39000 v/j*)	16	Nord-est de la France	2m : 203 6m : 70
Crépineau et al. (2003)	Autoroute (70000 v/j)	16	Nord-est de la France	10m : 2,63 50m : 1,23 150m : 1,08
Pathirana et al. (1994)	Autoroute	16	Brisbane, Australie	0,47
Tuhackova et al. (2001)	Autoroute (90000 v/j)	10	Prague, Tchéquie	500 m : 0,11 0,5 m : 3,09

\* v/j : véhicules par jour)

**Tableau 8** : Classe de contamination d'un sol en fonction de sa concentration en somme des 16 HAP (Maliszewska-Kordybach)

Niveau de contamination du sol	Critère d'évaluation (µg/g MS)
Non contaminé	< 0,20
Faiblement contaminé	0,20-0,60
Contaminé	0,60-1
Très contaminé	> 1

**Tableau 9** : Valeurs de Constat d'Impact (VCI) françaises pour le sol (µg/g MS)

	VCI usage sensible	VCI usage non sensible
Anthracène	Pas de valeur limite	Pas de valeur limite
Benzo[a]anthracène	14	252
Benzo[k]fluoranthène	900	2520
Chrysène	10350	25200
Benzo[a]Pyr	7	25
Fluoranthène	6100	Pas de valeur limite
Indeno[1,2,3-c,d]Pyr	16	252
Naphtalène	46	Pas de valeur limite



Leduc et al. (1992) ont étudié l'évolution de 4 HAP (acenaphthylène, acenaphthène, Fluo et anthracène) en fonction de différentes modalités appliquées à un sol très humide : une volatilisation des composés est notée, d'autant plus forte que la molécule est légère (poids moléculaire). Tous les composés ont disparu du sol au terme de l'essai d'une centaine de jours. Notons que, dans des conditions d'oxydoréductions particulières, la perte par volatilisation peut être jusqu'à trois fois supérieure à celle par biodégradation (Leduc et al., 1992). En conditions confinées, 30% de naphthalène se volatilise en 48h (Sims et al., 1990 ; Park et al., 1990) mais les composés les plus lourds n'accusent pas de baisse notable de concentration. Tous les auteurs s'accordent cependant sur le fait que seules les molécules de 2 et 3 cycles sont sensibles à la volatilisation.

#### 4.1.2. Photodégradation

La photodégradation est considérée comme le principal facteur de dégradation des HAP dans l'atmosphère. De grandes variations existent cependant selon les molécules concernées et le substrat éventuel sur lesquels elles sont adsorbées (Baek et al., 1991 ; Wang et al., 1999). Dans le sol en revanche, les pertes par photodégradation sont assez faibles en raison de la luminosité limitée. Les HAP sont soumis à la photodégradation uniquement dans des conditions bien particulières : un ensoleillement important (production des radicaux OH impliqués dans la dégradation) et une localisation restreinte à la surface du sol. Matsuzawa et al. (2001) ont testé différentes modalités pour tenter d'évaluer la photodégradation de certains HAP. Les demi-vies de certains d'entre eux sous éclairage UV constant et selon les conditions sont données dans le tableau 10. La photodégradation paraît donc atténuée par la présence de sol. Elle ne serait pas prépondérante dans la perte des HAP dans un sol.

Des pertes en molécules dans le sol peuvent être dues à d'autres processus abiotiques (sorption, hydrolyse, réactions diverses) mais se révèlent négligeables comparés à la volatilisation d'une part (majoritaire) et à la photodégradation d'autre part (Leduc et al, 1992).

**Tableau 10** : Comparaison des durées de demi-vie de HAP dans un sol et dans un milieu liquide

Molécule	Phé	Pyr	B[a]P
Demi-vie (h) avec sol	9,1	10,22	6,22
Demi-vie (h) sans sol	4,3	9,2	1,6

#### 4.2. Dégradation des HAP par les microorganismes du sol

Particulièrement intéressantes dans le cadre de dépollution de sols contaminés en HAP (friches industrielles), la biorémédiation est considérée comme une façon écologique de diminuer la teneur en HAP des sols. C'est en vue d'exploiter la faculté de certains organismes à dégrader les HAP que des études s'attachent à caractériser, quantifier et comprendre ces mécanismes de dégradation. Il est important de souligner que la durée de demi-vie des HAP dans les sols est régie par différents mécanismes, dont les biodégradations. Les bactéries, champignons et algues peuvent en effet cataboliser les HAP. Le tableau 11 illustre les fortes différences de durée de demi-vie dans un sol.

La connaissance du devenir de ces molécules dans le sol est indispensable dans le cadre de notre étude. L'aptitude des microorganismes du sol à dégrader les HAP nous permet d'autre part de nous interroger sur la transposition de cette faculté aux bactéries présentes dans le tractus digestif des animaux, et particulièrement du rumen.

**Tableau 11** : Exemple de durée de demi-vie dans les sols (Berthelin et al., 1995)

Molécule	Naphtalène	Anthracène	Pyrène
Durée de demi-vie	16 à 48 jours	50 jours à 1,3 ans	210 jours à 5,5 ans

##### 4.2.1. Dégradation des HAP par la flore totale du sol

La capacité de biodégradation des microorganismes (bactéries et champignons) d'un sol est avérée. Plusieurs études démontrent cette dégradation biotique via le suivi de la minéralisation des HAP marqués radioactivement. Elles seraient préférentiellement localisées dans les agrégats de petite taille (argiles et limons, respectivement inférieurs à 2  $\mu\text{m}$  et compris entre 2 et 20  $\mu\text{m}$ ) par opposition au sable et aux fractions grossières (Amellal et al., 2001). La minéralisation de composés marqués est mesurée par le dégagement de  $^{14}\text{CO}_2$ . Une incubation de durée variable valide les phénomènes de biodégradation au sein du sol (Ginn et al., 1995 ; Smith et al., 1999).

Parallèlement à la capacité de dégradation des microorganismes, la disponibilité et la mobilité (la part de polluants mobile est située en phase vapeur et liquide) de ces molécules dans le sol sont des facteurs à étudier. Les concepts d'extractibilité et de disponibilité sont primordiaux puisque seules les molécules disponibles seront soumises à la biodégradation (Barriuso et al., 1996 ; Ginn et al., 1995). Des métabolites issus de la dégradation des HAP par la flore du sol peuvent exister. Leur part est variable selon les conditions environnementales, la concentration en polluants et les types de sol.

#### 4.2.2. Caractérisation de la flore totale du sol

Le sol est un milieu vivant. Il est le siège de nombreux phénomènes de dégradation auxquels participent des champignons, des bactéries, des protozoaires et des algues. Leur proportion dans un sol est donnée dans le tableau 12.

**Tableau 12** : Abondance des organismes du sol (Gobat et al., 1998)

	Nombre approximatif (par g de sol sec)	Biomasse moyenne (en %)
Bactéries	$10^6$ - $10^8$	25
Champignons	nd*	59
Algues	$10^3$ - $10^5$	Traces
Protozoaires	$10^4$ - $10^6$	4
Faunes du sol (sans protozoaires)	0,1-1000	12

\* nd : non déterminable

#### 4.2.3. Dégradation par les champignons

Les champignons ont la capacité de dégrader les HAP. Ils peuvent décomposer la lignine (à structure proche des HAP) et la cellulose. Cette aptitude a souvent été démontrée en milieu de culture, or dans ces conditions, le facteur « sol » n'est pas intégré. Ses répercussions sur l'efficacité de la dégradation par les champignons restent alors indéterminées (Canet et al., 1999 et 2001 ; Martens et al., 1999).

Les HAP peuvent être facilement dégradés par des enzymes extracellulaires (ligninase) produites par une espèce de champignon, les pourritures blanches (« White rot »). Ces enzymes bien que non spécifiques peuvent dégrader des HAP. Solubles ou non, ceux-ci sont incapables de pénétrer les membranes cellulaires en raison de leur poids moléculaire. Ce mécanisme d'attaque confère à ces champignons une accessibilité et une faculté de dégradation bien supérieure à ceux possédant des enzymes intracellulaires (Hammel et al., 1986). Des multitudes d'espèces sont étudiées (*P. chrysosporium*, *Pycnoporus cinnabarinus*...) et toutes sont capables de métaboliser et de minéraliser les HAP : entre 3 et 99% du B[a]P disparaît à l'issue d'expérimentation de quelques heures à plusieurs jours (Juhász et Naidu, 2000). Bien que ces résultats démontrent l'aptitude de diverses espèces de champignons à métaboliser et dégrader les HAP, ils doivent être nuancés en raison des conditions d'incubation très favorables en milieu complexe. La dégradation *in vivo* est en effet limitée du fait de la faible disponibilité des HAP. Des mois d'adsorption et d'intégration

des molécules à la matière organique ont contribué à diminuer considérablement leur disponibilité les rendant moins sensibles aux dégradations qu'en milieu de culture.

#### 4.2.4. Dégradation par les bactéries du sol

Outre la dégradation des HAP attribuable aux champignons, les bactéries présentent un potentiel important de métabolisation de ces molécules. Les conditions environnementales affectent le taux de dégradation des HAP : température, pH, taux d'oxygène, type de sol, population (espèce et densité) microbienne (tableau 13). La biodégradation peut se faire en aérobie et/ou en anaérobie, tant par métabolisme que par co-métabolisme.

La biodégradation en anaérobie peut se rencontrer dans les sédiments mais le processus est lent et les voies métaboliques restent peu décrites (Löser et al., 2002). Certaines études font cependant état de l'efficacité de cette dégradation, comme par exemple Rockne et Strand (2001) qui ont montré une minéralisation presque complète du Phé en milieu de culture.

La biodégradation aérobie est elle plus rapide. Le taux de dégradation est inversement proportionnel au nombre de cycle benzénique ce qui conduit à des temps de demi-vie qui augmentent avec la taille de la molécule

**Tableau 13** : Conditions environnementales favorisant l'activité des microorganismes impliqués dans les dégradations de molécules organiques (Wilson et Jones, 1993).

Paramètres	Conditions nécessaires pour l'activité microbienne	Conditions optimales pour la dégradation des HAP
Humidité du sol	25-90%	30-85%
pH du sol	de la capacité au champ	
Taux d'oxygène	5,5-8,5	7,5-7,8
Température (°C)	15-45	10-40 % d'O <sub>2</sub> 24-30

Kastner et al. (1999) ont montré que l'inhibition de l'action des bactéries dans un sol endigué la minéralisation de l'anthracène. Ce phénomène témoigne de l'implication des microorganismes dans le métabolisme de cette molécule. Parmi les articles relatant de la dégradation de polluants par les bactéries, certains ne s'attachent qu'à des souches ciblées par opposition aux études sur sol complet où le microcosme considéré est « naturel » c'est-à-dire initialement présent. La dégradation des HAP est toutefois inhibée par des trop fortes concentrations en polluants (supérieur à 200 µg/g MS) devenant alors toxiques pour la flore

totale du sol (Ginn et al., 1995). En incubant plusieurs HAP en présence d'un inoculum précis (souches connues pour leur faculté à dégrader les HAP), une réduction de l'ordre de 80 à 100% de phénanthrène, acenaphène, anthracène, fluorène et pyrène est observée (molécules citées de la dégradation la plus forte vers la plus faible). Ce constat est fait suite à 90 jours d'incubation du sol et par comparaison avec un témoin (sol stérile) où une disparition, bien que visible, est minime. Cette dégradation est fonction de l'anaérobiose, des changements de pH, de la température et de la source de carbone, facteurs qui conditionnent eux-mêmes la croissance des micro-organismes. Ainsi, dans un sol contaminé en HAP et riche en microorganismes, la présence de métabolites issus de la dégradation de molécules est probable.

Les études décrites ci-dessus, réalisées en condition idéales pour les microorganismes, négligent cependant l'effet du sol qui constitue une matrice très hétérogène. Les HAP logés dans les particules organiques ou dans les pores sont totalement inaccessibles aux bactéries, incapables de pénétrer dans des pores inférieurs à 0,2-0,8  $\mu\text{m}$  (Johnsen et al., 2005).

#### *4.3. Profils et localisation des HAP dans le sol*

##### *4.3.1. Profils et contamination en HAP des horizons de sol de surface*

La profondeur de sol affecte la concentration en HAP. Le sol de surface est désigné par une couche d'environ 30 cm partant de la surface (Jones et al., 1989 ; Martens et al., 1997). Les concentrations de cet horizon oscillent entre 46 et 154 ng/g MS (Martens et al., 1997), et 1000 ng/g MS (Jones et al., 1989). Une étude de Pathirana et al. (1994) met en évidence une relation exponentielle négative entre la concentration en HAP et la profondeur des échantillons de sol considérés.

Ainsi, il apparaît que la concentration en HAP diminue avec la profondeur selon l'équation :

$$\text{Log}[\text{HAP}] = m_d \times \text{profondeur} + b_d ,$$

où  $m$  et  $b$  sont respectivement la pente (taux de disparition inférieur à zéro) et l'ordonnée à l'origine de la courbe, spécifique de chaque molécule. Il en ressort que la concentration est la plus élevée entre 0 et 1 cm, et fluctue autour du seuil de détection dès 4 à 5 cm.

Les profils en HAP dans les horizons supérieurs de sols sont similaires, seuls les niveaux de contamination changent. Le sol est le siège de deux phénomènes opposés : il peut accumuler et stocker les HAP et se comporte comme un réservoir de polluants. D'autre part, il agit comme un milieu capable de dégrader certains HAP (molécules à faible poids moléculaire) sous l'action de microorganismes aptes à métaboliser les molécules à plusieurs cycles benzéniques. Ainsi, dans le sol, les composés majoritaires sont les composés à plus de 3

cycles qui ne sont pas dégradés par les micro-organismes (Shabad, 1980 ; Jones et al., 1989 ; Meharg et al., 1998 ; Bakker et al., 2000).

Niederer et al. (1995) ont mis en évidence une dominance du fluoranthène, Pyr, benzo[b] et benzo[k]fluoranthène, soit des composés lourds dans un sol de ville. Ces résultats sont en accord avec Martens et al. (1997), Wild et al. (1995) et Jones et al. (1989).

Les profils de sol en bordure de route sont ceux qui présentent la plus grande variété de molécules (Pathirana et al., 1994 ; Bryselbout et al., 2000). Seules les moins hydrophobes sont absentes, dégradées ou entraînées vers les horizons inférieurs (Niederer et al., 1995 ; Jones et al., 1989).

Préciser les molécules majoritaires dans un sol permettra de simuler au mieux les conditions *in situ*. Cette approche est indispensable pour appréhender le transfert des HAP du sol vers d'autres matrices et nécessite ainsi la caractérisation d'un sol et des molécules incriminées dans sa contamination.

#### 4.3.2. Profils en HAP dans les horizons inférieurs du sol

Si les concentrations en HAP dans les horizons inférieurs sont nettement moins élevées que les horizons de surface, elles restent cependant non négligeables et méritent d'être étudiées. Ces horizons ne sont certes pas en relation directe avec les animaux ou les hommes mais ils peuvent toutefois le devenir d'une manière indirecte. En effet, les pratiques agricoles (labour) opèrent un retournement des horizons inférieurs du sol susceptibles d'être projetés sur les cultures suite à des précipitations (« splash »).

Les concentrations pour les 16 HAP sont comprises entre 340 et 240 µg/g MS respectivement entre 23-31 et 31-46 cm (Jones et al., 1989 ; Wilcke et al. 1996). En zone rurale, les couches inférieures ont des concentrations qui avoisinent une dizaine de µg/g MS. Trois molécules sont prépondérantes dans ces strates inférieures: naphtalène, Fluo et Phé (Jones et al., 1989 ; Martens et al., 1997 ; Wilcke et al., 1996). Plusieurs hypothèses permettraient d'expliquer les concentrations et les profils dans les horizons inférieurs du sol.

Faible mobilité des molécules : les HAP peu solubles dans l'eau ont plus d'affinité pour la matière organique que pour l'eau. Ils ont ainsi tendance à stagner dans la couche supérieure du sol, riche en matière organique (Wilcke et al., 1996).

Dégradation par les microorganismes : Jones et al. (1989) rapportent la présence d'anthracène, de fluoranthène, de pyrène, de B[b]F et de B[a]P, expliquée par une activité réduite des microorganismes en milieu anaérobie.

Effet de la rhizosphère : une étude réalisée par Binet et al. (2000) démontre que la concentration en HAP dans la rhizosphère est significativement inférieure à la concentration en HAP dans des sols non-rhizosphériques. L'interaction des HAP avec les végétaux joue donc un rôle dans l'extractibilité des molécules du sol. Les liaisons générées par l'activité des microorganismes entre les molécules et la matière organique rendraient une part importante des HAP non extractibles du sol. Cette hypothèse, suggérée par les auteurs, comporte néanmoins quelques limites : pourquoi ces liaisons n'existent-elles pas dans le cas du sol non rhizosphérique, les microorganismes y étant également présents ?

Bien que les raisons exactes de diminution de la teneur en polluant dans la rhizosphère soient mal connues, il semblerait que cet environnement joue un rôle essentiel dans la dégradation des molécules.

#### *4.4. Localisation des HAP dans les particules de sol*

Il existe une relation entre la concentration en HAP et la granulométrie du sol qui conditionnerait la répartition des molécules. La concentration HAP est en effet supérieure dans les particules de sol les plus fines (entre 2 et 20  $\mu\text{m}$ ). Suite à une incubation de divers HAP dans du sol, les différentes fractions analysées présentent des concentrations supérieures dans les limons fins (2-20  $\mu\text{m}$ ) comparativement aux limons grossiers et au sable (20-50 et 50-2000  $\mu\text{m}$  respectivement). La part de HAP présente dans les particules d'argile (inférieur à 2  $\mu\text{m}$ ) est assez faible (Amellal et al., 2001). Selon Amellal et al. (2001), les gros agrégats (50-2000 $\mu\text{m}$ ) comportent majoritairement du sable et des limons grossiers de taille importante mais peu nombreux. Les surfaces de contact entre structures et molécules sont alors limitées comparées aux petits agrégats. Ces derniers, constitués d'argile et de limons, de plus petite taille et dont la densité est plus élevée au sein d'un même amas, rendent la surface de contact et d'échange plus grande. Le degré d'aromaticité de la matière organique serait toutefois à l'origine de ces répartitions

#### 5. Mode de liaison des HAP au sol

Les types de liaison des HAP au sol sont multiples. La force de ces liaisons est variable : elle peut aller de la simple adsorption à la liaison covalente (liaisons fortes). Ce sont ces forces de liaisons qui conditionnent l'extractibilité et donc la disponibilité des molécules.

### 5.1. Liaisons faibles

Les liaisons faibles sont de deux types.

- *l'adsorption.* Les molécules sont adsorbées sur la surface externe hydrophobe des particules de sol. Elles s'adsorbent sur la matière organique principalement par des liaisons faibles de type hydrogène ou de Van der Waals. Ce processus est rapide et réversible. Il est dépendant de l'hydrophobicité et de la concentration de la molécule dans la phase aqueuse. Dans le cas de l'adsorption, le polluant est facilement extractible. La remobilisation de la molécule se fait en moins d'une heure de contact avec un solvant hydrophobe. Les molécules dissoutes sont sensibles à la biodégradation, à la volatilisation ou la photodégradation (Verstraete et Devliegher, 1996 ; Northcott et Jones, 2001).
- *l'inclusion.* Les HAP vont être intégrés à l'intérieur même de l'agrégat et se trouver piégés dans les nanopores qui le constituent. Ce processus qui se façonne à long terme est consécutif à l'adsorption. Il n'est pas réversible. En milieu aqueux, les propriétés hydrophobes des HAP les conduisent à se regrouper à l'intérieur des structures et deviennent inaccessibles aux microorganismes. Le polluant se trouve alors moins facilement extractible, même par extraction au Soxhlet, pendant plusieurs heures et avec des solvants apolaires type toluène, acétonitrile ou butanol. Du fait de cette faible mobilisation, la molécule devient moins disponible (Barriuso et al., 1996 ; Verstraete et Devliegher, 1996 ; Kottler et Alexander, 2001).

### 5.2. Liaisons fortes

Les polluants liés chimiquement au sol sont fixés de façon définitive et non réversible. Ces liaisons fortes inhibent l'extractibilité et la biodisponibilité de ces composés alors qualifiés de « résidus liés ». Ces liaisons covalentes assemblent la molécule et la matière humique du sol. Les liaisons deviennent ainsi résistantes à l'hydrolyse et aux dégradations microbiennes (Verstraete et Devliegher, 1996). Notons que, même au terme d'une extraction rigoureuse à l'aide de solvants apolaires, ces résidus liés ne sont plus extractibles du sol. Ils ne sont alors identifiables que par des méthodes isotopiques (Barriuso et al., 1996 ; Johnson et al., 2002). Ces liaisons résulteraient de l'action d'enzymes diverses, dont les enzymes extracellulaires des champignons, ou de réactions d'oxydation s'accomplissant dans le sol (Kästner et al., 1999). Cette association d'intensité variable de HAP avec le sol influe directement sur le devenir des molécules. Une liaison forte rend le polluant peu disponible et son lessivage éventuel vers les nappes phréatiques modéré. Cependant, la liaison forte amoindrit les dégradations éventuelles et donc la rémediation par les microorganismes. Ces derniers



n'altèrent en effet que les composés libres en solution et deviennent inefficaces face aux composés adsorbés sur une matrice solide (Verstraete et Devliegher, 1996). Selon Eschenbach et al. (1998), les microorganismes ne sont pas capables de dégrader les HAP de cette fraction non extractible. Cette faible remobilisation des résidus liés fait de la matrice sol et en particulier de la matière humique un réservoir de polluants « inertes », sorte de piège à HAP dans la biosphère (Richnow et al., 1995).

### *5.3. Facteurs influençant la rétention des HAP dans le sol*

Le comportement des HAP dans le sol est conditionné par de nombreux paramètres :

#### *la matière organique*

Tous les auteurs admettent l'implication de la matière organique dans la rétention des HAP d'un sol. L'extractibilité des HAP d'un sol par un solvant, même très apolaire, est inversement proportionnel au taux de matière organique (Karimi-Loftabad, 1996 ; Conte et al., 2001 ; Bogan et Sullivan, 2003 ; Bogan et Trbovic, 2003). Les molécules présentes se concentrent sur les sites hydrophobes de la matière organique, s'adsorbent, pénètrent dans les différents pores et créent des liaisons les rendant ainsi moins accessibles. Plus le taux de matière organique est élevé, plus les surfaces hydrophobes dans un sol sont nombreuses (Conte et al., 2001). La disponibilité des HAP dépend donc de la richesse en composés organiques.

Les degrés d'extractibilité dépendent ainsi de la nature du sol, du temps de maturation et enfin de la nature du solvant dans le cadre d'extractions chimiques (tableau 14).

Le tableau 14 met clairement en évidence la diminution de l'extractibilité quand le taux de matière organique du sol et l'hydrophobicité de la molécule augmentent.

#### *le temps de contamination du sol (maturation)*

Outre la nature de la matrice, la disponibilité des HAP dépend également du temps de contact du polluant avec le sol (Figure 4 ; Conte et al., 2001 ; Johnson et al., 2001 ; Kelsey et al., 1997 ; Northcott et Jones, 2001). En effet, des HAP ajoutés à du sol et laissés à maturer pendant plusieurs jours évoluent dans les structures et s'y trouvent piégés. Cette part liée au sol devient alors non extractible (Karimi-Loftabad et al., 1996 ; Conte et al., 2001 ; Bogan et Sullivan, 2003 ; Macleod et Semple, 2003). En moins de 30 jours de contact, entre 50 et 70% des HAP apportés à un sol se lient fortement à la matrice jusqu'à ne plus pouvoir être extraits par un solvant peu apolaire comme le butanol (Kottler et Alexander, 2001). Dès 14 jours, les HAP fixés ne sont donc plus extractibles. Lorsque les temps de maturation des sols en

présence de HAP sont plus longs (jusqu'à 500 jours), près de 90% des molécules peuvent être figées dans la fraction non extractible (Kelsey et al., 1997, Northcott et Jones, 2001).

Le tableau 15 met en évidence l'influence du temps de maturation sur l'extractibilité des HAP qui diminue avec le temps pour ces 2 molécules. Le taux d'extractibilité des molécules est également fonction de la polarité du solvant utilisé ce qui reflète l'effet de l'hydrophobicité des HAP sur leur propension à rester liés au sol.

#### *les propriétés des HAP*

Les propriétés physicochimiques des HAP contribuent également à l'extractibilité des polluants. Conte et al. (2001) établissent une relation entre l'extractibilité et le Log  $K_{ow}$ , reflet de l'hydrophobicité des molécules organiques. Plus l'hydrophobicité est marquée, plus les molécules sont liées et retenues dans le sol à l'instar du B[a]P qui reste inaccessible lors d'extractions, même drastiques (solvants très apolaires). Ses propriétés hydrophobes lui confèrent une capacité d'adsorption sur les structures hydrophobes du sol beaucoup plus puissante que le Phé et le Pyr entre autres (Northcott et Jones, 2001 ; Smith et al., 1999).

#### *la métabolisation des HAP*

S'ajoutant à ces facteurs, le phénomène de métabolisation participe également à la diminution de la disponibilité des HAP. L'influence du microcosme sur la rétention des HAP a été démontrée par la mesure d'extractibilité entre deux modalités d'un sol de pâture à 24 jours de maturation (Macleod et Semple, 2003): stérilisé (30% de résidus de  $^{14}\text{C}$ -Pyr non extractibles) et non stérilisé (39 % de résidus de  $^{14}\text{C}$  Pyr non extractibles). L'activité biologique intense produit dans le sol plusieurs métabolites de HAP. Ces métabolites (quinones, intermédiaires hydroxylés et carboxylés) beaucoup plus réactifs que les molécules mères non substituées vont induire la formation de liaisons avec le sol. La fraction humique est la partie réactive du sol. Des liaisons covalentes de type éther, ester et carbone-carbone, catalysées par des enzymes ou issues de réactions d'oxydation vont se former entre le métabolite fonctionnalisé et la matrice. Ces métabolites incorporés dans les structures du sol représentent la majorité des résidus liés non extractibles par des solvants tels que le méthanol ou l'acétone (Eschenbach et al., 1998 ; Kästner et al., 1999 ; Richnow et al., 1997 ; Smith et al., 1999).

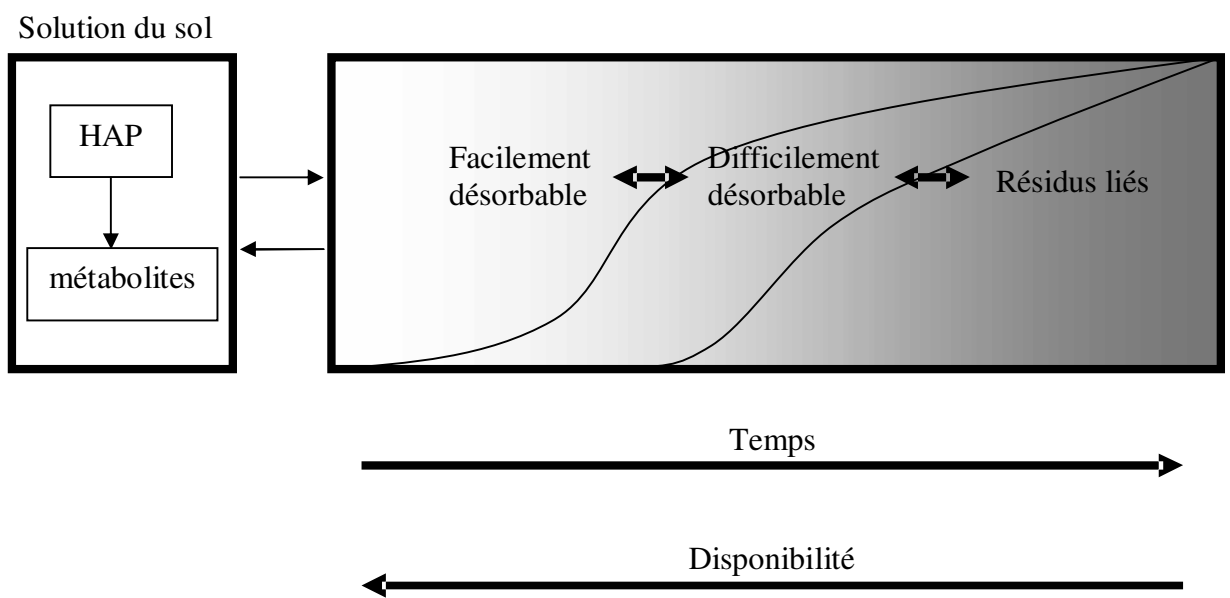
**Tableau 14** : Extractibilité de 4 HAP par du butanol après 120 jours de maturation dans des sols en fonction du taux de matière organique (Bogan et al., 2003)

Molécule	Log Kow	% MO du sol					
		2,32	3,58	5,78	9,13	11,16	24,28
Fluo	4,02	52	39	47	23	18	0,3
Phé	4,35	20	19	21	9	7	3
Pyr	4,93	25	20	24	10	10	6
B[a]P	6,11	39	23	22	16	16	13

**Tableau 15** : Extraction du  $^{14}\text{C}$ -Phé et  $^{14}\text{C}$ - B[a]P du sol avec deux solvants différents en fonction du temps de maturation (en jours) et du solvant (Northcott et Jones, 2001).

Molécules	Temps de maturation	Butanol	Dichlorométhane
Phé	10	99 <sup>aA</sup>	90 <sup>aB</sup>
	21	95 <sup>aA</sup>	94 <sup>bA</sup>
	53	97 <sup>aA</sup>	92 <sup>cB</sup>
	170	96 <sup>aA</sup>	92 <sup>cB</sup>
	259	92 <sup>bA</sup>	90 <sup>dB</sup>
B[a]P	10	90 <sup>aA</sup>	83 <sup>aB</sup>
	21	82 <sup>bA</sup>	83 <sup>aA</sup>
	53	80 <sup>bA</sup>	77 <sup>bA</sup>
	170	76 <sup>bA</sup>	73 <sup>cB</sup>
	259	73 <sup>bA</sup>	68 <sup>dB</sup>

*Les valeurs d'une colonne avec la même lettre minuscule ne sont pas significativement différentes ; les valeurs d'une même ligne avec une lettre majuscule identique ne sont pas significativement différentes à  $p < 0,05$ .*



**Figure 4** : Evolution des HAP dans un sol (d'après Bariuso et al., 1994)

La contamination de l'environnement résultant des activités humaines se reflète particulièrement dans les concentrations en HAP dans le sol. A l'issue de ce paragraphe, il est important de souligner que le sol est un réservoir de polluants dont les concentrations ont tendance à stagner ou à augmenter légèrement. Leur accumulation dans le sol se fait sur le long terme. Elle mène à des concentrations conséquentes en raison de leur faible dégradabilité et du dépôt atmosphérique continu.

Au-delà des inquiétudes sur la réhabilitation de sites pollués ou sur le lessivage des polluants vers les nappes phréatiques se pose le problème du sol comme vecteur potentiel dans la chaîne alimentaire. Par le biais des cultures, mais surtout par un autre maillon de la chaîne alimentaire qu'est le ruminant. Celui-ci ingère en effet en moyenne 15 kg de matière sèche par jour et l'équivalent de 2 à 4 % de sol par jour (Fries et al., 1982). Cette part de sol ingérée peut alors devenir une source non négligeable de polluants présente au cœur du système digestif de l'animal. Une fois potentiellement extraits du sol dans le tractus digestif, une absorption suivie de biotransformation, stockage et/ou excrétion de ces molécules est à envisager. Si une excrétion des HAP et de certains métabolites dans le lait venait à se faire, le ruminant laitier serait alors à considérer comme un point d'entrée non négligeable de molécules organiques dans la chaîne alimentaire. Cette succession d'étapes a déjà été suivie en France où une émission à forte dose de molécules hydrophobes (PCB, PCDD/F) a eu lieu à la fin des années 90. Dispersées dans l'environnement proche et absorbées par les ruminants laitiers de la région, la conséquence directe de l'exposition des animaux a été une très forte contamination du lait de la région sinistrée. Le lait et toutes ses formes de consommation ont ensuite été les vecteurs majeurs des polluants vers l'homme.

Suite à ces incidents et dans le contexte actuel de sécurité alimentaire, il est indispensable d'évaluer et d'anticiper les répercussions de l'exposition d'animaux à des terrains pollués sur les produits de consommation. Cette question du risque prend toute son ampleur lors de l'occupation de prairies proches de sites industriels ou de bordures de voies routières. Il pourrait également être envisagé, dans le cadre de la réhabilitation de sols pollués, de reconverter des friches industrielles en pâture pour animaux laitiers.

#### IV. Risque de transfert des HAP du sol dans la chaîne alimentaire

##### 1. Ingestion de sol par les vaches laitières

Les animaux au pâturage sont directement exposés à des polluants déposés sur les matrices environnementales telles que l'herbe et le sol. Malgré les quantités importantes d'herbe consommée, celle-ci ne constitue pas le vecteur majeur d'entrée de polluants dans l'organisme animal. Elle est en effet peu contaminée par rapport au sol.

La quantité de sol ingérée par les animaux au pâturage conditionne la quantité de HAP apportée à l'organisme. Deux marqueurs sont couramment utilisés : le titane (Ti) mesuré par fluorescence aux rayons X (Healy, 1968) ou la silice (SiO<sub>2</sub>) estimée par le dosage des cendres insolubles dans l'acide chlorhydrique (HCl) (Healy, 1973). La détermination des cendres insolubles dans les fèces pour l'estimation de la quantité de sol n'est pertinente que si elle est réalisée en parallèle dans l'herbe. En effet, Mayland et al. (1975) ont montré la présence de silice dans l'herbe ce qui n'en fait pas un marqueur spécifique du sol.

L'ingestion de sol peut être estimée grâce à la digestibilité du fourrage par l'équation suivante (Fries, 1996):

$$I_{\text{sol}} = I_{\text{DM}} \times (1-D) \times F_{\text{sol}} / (1-D \times F_{\text{sol}})$$

Où  $I_{\text{sol}}$  : quantité de sol ingérée par jour (kg/jour)

$I_{\text{DM}}$  : quantité de fourrage ingérée (kg MS /jour)

D : fraction de matière sèche digérée

$F_{\text{sol}}$  : fraction de sol dans les fèces.

Les vaches peuvent ingérer au pâturage jusqu'à 1,5 kg de sol mais ces ingestions sont très variables (tableau 16).

**Tableau 16** : Quantité de sol ingérée (g/jour) au pâturage

Référence	Quantité ingérée (g MS/jour)
Mayland et al., 1975	100 à 1500
Kirby et Stuth, 1980	280 à 840
Healy, 1968	500 à 1370

Ces données ont été obtenues dans des conditions expérimentales très différentes. La quantité ingérée est directement dépendante des conditions environnementales : conditions climatiques (aridité ou région pluvieuse), système d'élevage (abondance ou non de végétations, densité d'animaux) et conduite des animaux (logement, alimentation). Fries et al. (1982) considèrent que l'ingestion de sol est comprise entre 2 et 4 % de la MS ingérée totale (soit respectivement 400 et 800 g par jour pour une ingestion de 20 kg de MS) au printemps, quand 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 des pâtures qui représentent la seule source de nourriture pour des ruminants. La quantité de sol ingérée peut ainsi avoisiner les 18% de matière sèche ingérée quand la densité d'herbe est faible en automne ou en hiver.

Les origines de cette ingestion sont multiples. La présence de sol sur les racines de végétaux est toutefois la source prépondérante. Les poussières adsorbées sur les tiges et les feuilles, la couverture végétale et les cas de géophagie sont également des facteurs impliqués dans l'apport de sol aux animaux (Mayland et al., 1975).

## 2. Influence du tractus digestif sur l'extractibilité des HAP du sol

### 2.1. Caractérisation de l'extractibilité des HAP d'un sol

L'extractibilité d'un composé est fonction de ses forces de liaison avec le sol. Elle résulte des interactions chimiques et physiques entre le sol et la molécule et permet d'estimer la fraction d'un polluant qui est extraite du sol. Quand un composé est extractible, il migre dans la phase liquide et devient disponible pour les organismes (Northcott et Jones, 2001). L'extractibilité des HAP est fonction du temps de contact des molécules avec le sol, des propriétés des molécules ou encore du type de liaison existant entre le sol et les polluants (Conrad et al., 2002). Elle peut cependant être limitée par des processus physiques (Breedveld et Karlsen, 2000). L'extractibilité d'une molécule est déterminée par la mesure de sa concentration dans un milieu liquide suite à une mise en présence d'un sol contaminé et d'un milieu liquide (extractions par solvant, liquides biologiques). La quantité de ce polluant dans le milieu liquide rapportée à la quantité initiale de polluant dans le sol permet d'exprimer en pourcentage l'extractibilité d'un composé par un solvant donné. Calculée pour divers milieux liquides, l'extractibilité peut être comparée en fonction de la molécule considérée, du type de sol, de l'extractant ou encore de la présence d'autres éléments dans le milieu (matière organique).

Elle ne renseigne en aucun cas sur l'absorption éventuelle d'un polluant par un organisme. Néanmoins, pour qu'un polluant soit absorbé, une phase préalable d'extraction de ce polluant du sol et de solubilisation est indispensable.

Il existe différentes méthodes pour mesurer l'extractibilité d'un polluant. L'utilisation de solvants organiques rend compte de la concentration du polluant dans un sol et l'emploi de modèles *in vitro* visent à démontrer si un polluant est potentiellement extractible par un milieu aqueux. Ces modèles simulent les conditions gastro-intestinales de différents organismes et permettent d'évaluer la part extraite du sol dans des conditions physiologiques (pH, température, composition du milieu) susceptible d'être absorbée ultérieurement (Holman et al., 2002 ; Oomen et al., 2000 et 2002 ; Van de Wiele et al., 2004).

## 2.2. Extractibilité des HAP du sol par le tractus digestif humain

A ce jour, les approches *in vitro* d'extractibilité des HAP du sol traitent en majorité du modèle humain. Particulièrement exposés via l'alimentation, enfants et adultes ingèrent des quantités non négligeables de sol contaminé en HAP. Pour répondre à des préoccupations liées aux risques d'exposition, des modèles *in vitro* ont été développés dans le but d'évaluer la part de HAP desorbés du sol et donc potentiellement absorbable pour l'organisme.

Même si les méthodes utilisées varient selon les études, le dénominateur commun de tous les modèles est la mise en présence de sol contaminé avec un liquide digestif. Cette étape permet de simuler l'extraction des molécules dans un compartiment donné. Dans un tel contexte, plusieurs paramètres peuvent être étudiés : présence ou non de microorganismes, conditions acidifiantes, composition du milieu, rapport liquide/solide (spécifique du tractus digestif de chaque espèce). Diverses méthodes simulant ces paramètres dans l'estomac humain ont été développées. Les conditions changent cependant selon les expérimentations (tableau 17).



**Tableau 17** : Synthèse des modèles *in vitro* d'étude de l'extractibilité des HAP du sol chez l'homme (d'après Oomen et al., 2002).

	Méthode SBET, UK	Méthode DIN, Allemagne	Méthode TIM, Pays-Bas	Modèle de digestion in vitro, Pays-Bas	Méthode SHIME, Belgique
Qté de sol sec	1 g	2 g	10 g	0,6 g	10 g
Volume de solution gastrique	100 mL	100 mL	250 mL	13,5 mL	25 mL
Ratio V/M (Volume/Masse, mL/g)	100	50	25	22,5	2,5
pH	1,5	2	De 5 vers 2	1,1	4
Temps d'incubation	1h	2h		2h	3h
Sécrétions gastriques apportées	-	Pepsine, Mucine	Lipase, pepsine	Pepsine, mucine, BSA	Pectine, mucine, cellobiose, proteose peptone, amidon

Ce tableau illustre la diversité des protocoles utilisés dans l'étude de la biodisponibilité de polluants tels que les HAP ou des métaux. Dans tous les cas, le paramètre essentiel et commun est la valeur de pH bas obtenue par ajout d'HCl pour la simulation de l'estomac. Van de Wiele et al. (2005) ne prennent également en compte que la valeur du pH (1,5), la température et le temps d'incubation (3h à 37°C). D'après ces études, il semble que seule l'acidité ait un effet sur le sol et l'extractibilité des HAP lors du passage dans l'estomac.

L'intestin est également un compartiment largement étudié. A la sortie de l'estomac, le liquide gastrique est neutralisé (pH 6,9 à 8,6) par du bicarbonate et des sécrétions pancréatiques. Ces dernières sont additionnées dans les milieux d'étude *in vitro* pour compléter et ajuster le milieu à pH neutre. Estomac et intestins forment le système gastrointestinal où transitent le sol et les aliments ingérés. Dans les modèles décrits, l'effet des sels biliaires est davantage attendu sur le comportement et le devenir des HAP dans la phase liquide que sur leur extractibilité.

Le pH reste le paramètre primordial dans ce type d'étude. Ses effets sur le sol sont connus. La baisse du pH provoque une déstructuration du sol et favorise ainsi les surfaces de contact du sol avec des solvants d'extractions. La matière organique du sol est composée pour partie de matière humique sur lesquelles les HAP sont adsorbés. Cette matière humique est très réactive au pH en raison des groupements acides qui la composent. L'influence du pH seul dans les compartiments gastriques (variant de 1 à 7) est peu étudiée. En effet, les différentes études voient plusieurs paramètres varier en parallèle. Déterminer le rôle du pH seul dans ces conditions est difficile puisqu'un ensemble de paramètres varient. Les conséquences d'un changement de pH uniquement sur l'extractibilité des HAP du sol restent à approfondir. Va-t-il augmenter, diminuer ou ne pas affecter l'extractibilité (Jin et al., 1999) ?

### 2.3. Variation de l'extractibilité des HAP du sol

Différents paramètres régissent l'extractibilité des HAP du sol. Difficiles à mettre en évidence *in vivo*, ils ont clairement été déterminés *in vitro* et leur action est à extrapoler et transposer *in vivo*.

Ces paramètres conditionnent l'extractibilité des HAP du sol *in vitro* comme *in vivo* :

- **la matière organique du sol** : il a été vu précédemment le rôle fondamental de la matière organique du sol sur la mobilisation des HAP par différents solvants et organismes vivants. Son importance est démontrée par des essais *in vitro*: quand le taux de matière organique dans un sol augmente, l'extraction des HAP par un liquide gastrointestinal diminue (Holman et al., 2002).

- **action du pH** : une des hypothèses avancée pour tenter d'expliquer des variations d'extractibilité du sol est le pH des solutions biologiques étudiées. Le pH tendrait en effet à désagréger les structures, laissant ainsi plus de surface de contact entre les solutions et les HAP incrustés dans le sol. Il semble cependant que la seule action du pH soit nulle. De fait, diminuer le pH d'une solution aqueuse de 7 à 2 n'a pas d'influence sur l'extractibilité des HAP (Van de Wiele et al., 2004). L'extractibilité des polluants d'un sol ne peut donc pas être attribuée au pH seul mais à l'ensemble des constituants d'un compartiment donné dont la différence majeure semble être le pH.

- **présence de sels biliaires** : la présence de sels biliaires dans le milieu favoriserait l'extractibilité des HAP (Oomen et al., 2000 ; Holman et al., 2002 ; Van de Wiele et al., 2004). Une fois solubilisés, les HAP auraient tendance à s'adsorber sur ces molécules pour former des complexes alors absorbés facilement au niveau des barrières intestinales. Parallèlement, la formation de ces complexes peut engendrer une inhibition de l'absorption si leur taille est trop importante. Trop gros (supérieur à 0,5 µm), ils ne seront alors pas capables de traverser les microvillosités pour pénétrer dans la membrane intestinale.

- **Présence de matière organique dans le milieu sous la forme d'aliments** : la présence d'aliment traduite sous la forme d'ajout de protéines, d'aliments lyophilisés ou de carbone organique (cultures de *Bacillus subtilis*) participerait à une meilleure extraction des polluants du sol (Kögel-Knabner et al., 2000 ; Oomen et al., 2000 ; Van de Wiele et al., 2004). En effet, une fois extraits, les HAP s'adsorbent sur ces substrats organiques pour former des complexes de tailles variables. La formation de micelles par la combinaison de bile et de coproduits de digestion des lipides (acides gras et monoglycérides) favoriserait la solubilisation des HAP dans un milieu aqueux (Hack et Selenka, 1996). Inférieurs à 5 µm, ils sont considérés comme bioaccessibles c'est-à-dire potentiellement absorbables au niveau de l'intestin grêle. Il existe une relation entre la quantité de HAP dans le milieu et la matière organique dissoute dans le compartiment stomacal simulé :

$[HAP] (\mu g/L) = 15,35 \times C \text{ organique (g/L)} - 0,0486, R^2 = 0,97.$  (Van de Wiele et al., 2004).

- **Niveaux de contamination en HAP du sol** : le niveau de contamination initial du sol interviendrait dans la solubilisation des HAP. Il a été montré que plus le sol est contaminé, plus la solubilisation des molécules par le système gastrointestinal augmente (en pourcentage de la dose initiale ; Holman et al., 2002). Il est donc possible que le sol ait une capacité de fixation de polluants limitée.

- **ratio liquide/sol (L/S)** : ce paramètre doit être en adéquation avec les conditions du compartiment digestif d'une espèce donnée. Compris entre 10 et 1000, il

permet de simuler l'ingestion de sol par un être humain produisant de 40 à 250 mL de liquide gastrique par heure. Testée à des ratio L/S de 2, 10 et 40 (l'ingestion de 20 g de sol par un enfant conduit à un L/S de 16), l'extractibilité des HAP du sol semble très dépendante de ce ratio. Plus la quantité de liquide par rapport à la quantité de sol est grande, plus l'extractibilité augmente. Dans l'eau, l'extractibilité des HAP peut être prédite par l'équation : % extrait =  $-0,1454 + 0,2622 \ln(L/S)$ ,  $R^2 = 1$ . (Van de Wiele et al., 2004). L'effet du ratio est donc bien démontré ici.

La difficulté majeure rencontrée dans ce genre de mesures est la séparation des particules de sol du reste des constituants, particulièrement les bactéries ajoutées au milieu. Les séparations des fractions dans les modèles digestifs humains décrits (sol, liquide, composés divers) reposent donc sur des vitesses de centrifugations discriminantes (Tableau 18 ; Van de Wiele et al., 2004). Chaque palier de vitesse séduit spécifiquement un type de molécule et un type de complexe. La difficulté réside essentiellement dans le fait de séparer la part de HAP libres, adsorbés à des particules ou à des bactéries. Celles-ci ne sédimentent qu'à des vitesses de centrifugation élevée et sont des supports idéaux pour les HAP. L'adsorption des HAP sur les bactéries est un phénomène courant et reconnu, et, apparemment, dépendant du type de bactéries (Stringfellow et Alvarez-Cohen et al., 1999). Différents taux d'extractibilité des HAP du sol sont obtenus suite à des expérimentations *in vitro*. Le tableau 19 synthétise quelques valeurs d'extractibilité des HAP du sol dans des modèles de système digestif humain. Ces données illustrent le faible pouvoir d'extraction de l'estomac. Moins de 2 % des HAP du sol sont extraits malgré les conditions acides appliquées. La désorption des HAP d'un sol ne serait donc pas attribuable au passage dans ce compartiment.

La mobilisation des HAP du sol au cours du transit dans le tractus digestif ne dépasserait pas 3 % au total (6% pour le système gastro-intestinal)(Hack et Selenka, 1996 ; Van de Wiele et al., 2004). Ce taux rejoint celui de 0,5 à 2 % de HAP extraits d'un sol naturellement contaminé par le système gastro intestinal simulé dans l'étude de Holman et al. (2002). Complété par une phase simulant le système intestinal, l'extractibilité passe à 6 % et avoisine les 23 % quand ce milieu est additionné de lait écrémé. L'action des enzymes sur les lipides alimentaires et la capacité de la bile à former des micelles seraient à l'origine d'une mobilisation accrue des HAP.

L'extractibilité de HAP d'un sol naturellement contaminé par de l'eau serait comprise entre 1 à 3 % (Kögel-Knaber et al., 2000). La méthode développée par Hack et Selenka (1996) qui décrit un modèle digestif humain confirme la rétention des HAP par le sol en conditions digestives (liquides digestifs seuls). L'ajout de lait écrémé (soit de substance organique)

augmente la dissolution des HAP dans le milieu (jusqu'à 23% des molécules mobilisées dans le système gastrointestinal). Bien que les modalités utilisées ne soient pas aisément extrapolables à toutes les espèces, ce type d'expérimentation permet toutefois une estimation de l'extractibilité de polluants dans le système digestif.

Dans ces différentes approches, la participation des microorganismes est négligée. Ainsi, bien qu'ils soient parfois présents (comme c'est le cas dans le modèle de Van de Wiele et al., 2004, où sont apportés des microorganismes), l'éventualité d'une biodégradation n'est jamais évoquée. Les bactéries apportées ne sont considérées que comme source organique ou comme substrat éventuel permettant l'adsorption des HAP. Dans ces conditions, la part de molécules extraites du sol mais potentiellement biotransformée et non détectée est négligée. La part de HAP extraite est donc probablement sous estimée.

#### *2.4. Dégradation des HAP par les bactéries du tractus digestif*

Il est important de signaler que des microorganismes issus du colon humain auraient une capacité de dégradation des HAP (Van de Wiele et al., 2004). Au terme de 24 h d'incubation à 37°C, des métabolites ont été produits : le 1-OH Pyr se trouve en majorité et est présent sous les formes libre et conjuguée. Environ 10 % du Pyr initial aurait été métabolisé en 1-OH Pyr libre. Des traces (en dessous du seuil de détection) de 9-OH Fluo et 7-OH B[a]P ont également été détectées. Il en ressort ainsi que les microorganismes ont une capacité de dégradation des HAP non négligeable *in vitro*, en conditions idéales et sans perturbation par la présence de sol. Cette donnée paraît d'autant plus importante que certains métabolites hydroxylés, apportés par voie orale, peuvent être absorbés. En effet, des métabolites de HAP sont détectés dans les urines après apport par voie orale à des rats (Bouchard et Viau, 1996).

**Tableau 18** : Séparation des composés en fonction de leur densité (Van de Wiele et al., 2004).

Composés	Centrifugation	
	1500 x g	3000 x g
sédimentés	HAP adsorbés à des grosses particules de sol	HAP complexés avec des sels biliaires et/ou de la matière organique
présents dans le surnageant	HAP complexés avec des sels biliaires et/ou de la matière organique	HAP solubilisés ou adsorbés à des composés organiques dissous

**Tableau 19** : Extractibilité des HAP (somme de 16) du sol dans les différents compartiments digestifs de l'homme (exprimée en % de la dose initiale en HAP du sol)

	Eau (pH 7)	Estomac	Estomac avec aliments	Duodenum avec bile	Duodenum sans bile	Colon
Van de Wiele et al., 2004	0,5 ± 0,03 (L/S 10 <sup>1</sup> )	0,8 ± 0,03 (L/S 40 <sup>1</sup> )	1,4 ± 0,34 (L/S 40 <sup>1</sup> )	0,2 ± 0,07 (L/S 15 <sup>1</sup> )	0,1 ± 0,05 (L/S 15 <sup>1</sup> )	0,3 ± 0,01 (L/S 25 <sup>1</sup> )
Hack et Selenka, 1996		0,8 (L/S 100 <sup>1</sup> )	9			

<sup>1</sup>: ratio liquide sur solide (L/S)

### 3. Spécificité du rumen dans l'extraction et la dégradation des HAP du sol

Aucune information n'est disponible sur l'extraction des HAP du sol par le système gastro-intestinal du ruminant laitier. Connaissant les quantités de sol qu'il peut ingérer, il semble nécessaire de s'intéresser à l'extraction des HAP du sol par son système digestif.

#### 3.1. *Le rumen*

Le rumen et le réseau sont les deux premiers préestomacs des ruminants. Ils constituent le réticulo-rumen où les aliments ingérés arrivent pendant 5 à 10 h par jour. Ils y séjournent de 25 à 60 h en moyenne (Van Soest, 1982). Le volume du rumen est compris entre 90 et 150 L (Michel et al., 1987). Il compte trois classes de microorganismes indispensables à la vie des ruminants :

les bactéries : ce sont des anaérobies strictes essentiellement. Leur concentration avoisine les  $10^{11}$  cellules/mL mais peut varier en fonction de la localisation dans le rumen (Stewart et Bryant, 1988). Environ 200 espèces y cohabitent mais seules une trentaine sont spécifiques du rumen.

les protozoaires : ils représentent de 2 à 66 % de la biomasse microbienne, soit environ  $5 \cdot 10^6$  unités/mL (Demeyer, 1981).

les champignons : ils colonisent également le milieu ruminal à hauteur de  $10^3$  unités/mL (Orpin, 1981).

#### 3.2. *Dégradation de composés aromatiques dans le rumen*

La biomasse microbienne contribue à la digestion ruminale : 60 % des aliments sont digérés dans le rumen. La dégradation des aliments commence dès leur entrée dans le rumen où la digestion microbienne intervient. La batterie de microorganismes présents participe à la dégradation des aliments et des fibres végétales. Les bactéries du rumen sont en effet capables de dégrader l'amidon, la cellulose, l'hémicellulose ou encore la pectine (Van Soest, 1982). Ainsi, l'analogie de ces composés polyaromatiques avec la structure hétérocyclique des HAP et le potentiel de biotransformation des bactéries du tractus digestif humain laissent suggérer une dégradation des polluants par les bactéries du rumen. Van de Wiele et al. (2004) ont en effet démontré la capacité de biotransformation de HAP des bactéries du système gastro-intestinal humain. L'incubation de HAP dissous dans un milieu complet et enrichi en microorganismes aboutit à la formation de 1-OH Pyr (0,06% de la dose initialement apportée) au bout de 24h. Des traces non quantifiables de 9-OH Fluo sont détectées. Aucun métabolite des 8 autres HAP ajoutés n'a été détecté. Dans l'hypothèse d'une mobilisation des HAP du

sol par le milieu ruminal, une dégradation des HAP par des microorganismes adaptés à la métabolisation de substrats à structure cyclique pourrait survenir.

Des études antérieures ont tenté de mettre en évidence un pouvoir de dégradation des bactéries du rumen sur diverses molécules organiques. Les résultats sont assez peu probants puisque seul Khan et al. (1983) observent des traces de métabolites d'atrazine après plusieurs heures d'incubation dans du jus de rumen. La métabolisation de l'oxamyl dans des conditions similaires est en revanche élevée (Belasco et Harvey, 1980) mais cet insecticide n'a pas de structure cyclique ce qui favorise probablement sa dégradation.

Wszolek et al. (1982) et Willet et al. (1989) ont étudié respectivement un insecticide et des hydrocarbures halogénés. Malgré l'incubation *in vitro* dans du jus du rumen de ces deux molécules comportant au moins un cycle, aucune dégradation ou métabolisation n'a été constatée.

Au delà de ses caractéristiques digestives spécifiques, le ruminant est avant tout un animal lactant à l'origine de multiples produits laitiers. Il s'avère donc nécessaire de mener des études sur le ruminant laitier vu sa place dans la chaîne alimentaire et l'importance de la consommation de lait (74 kg/habitant en 1993 ; 66,2 L/habitant en 1996, Combris et al., 1997) et de ses produits dérivés.

#### 4. Concept de biodisponibilité

L'US-EPA définit la biodisponibilité comme la capacité d'un polluant à être absorbé et à interagir avec le métabolisme d'un organisme. Une définition plus précise de la biodisponibilité (NEPI, 2000) distingue deux notions :

- *la biodisponibilité absolue*, qui s'exprime par le rapport de la concentration en polluant dans la circulation sanguine suite à une exposition extravasculaire sur la concentration du même polluant dans le sang après l'administration d'une dose équivalente par voie intraveineuse,
- *la biodisponibilité relative*, qui compare les biodisponibilités absolues d'une molécule selon différents moyens d'exposition (biodisponibilité d'un polluant dans le sol comparée à l'eau ou d'autres vecteurs) (NEPI, 2000).

Il existe de nombreuses définitions de la disponibilité c'est pourquoi elle mérite d'être définie dans chaque cas d'étude.

Dans le cas d'invertébrés par exemple, la biodisponibilité peut être estimée indirectement par la mesure de la part de polluant non absorbée et rejetée dans les fèces. Rapportée à la



contamination initiale du vecteur (aliment ou sol), la biodisponibilité est considérée comme la différence entre ce qui a été ingéré et ce qui est excrété dans les fèces (Weston et Mayer, 1998).

Chez les mammifères, la biodisponibilité est définie comme la fraction d'un polluant absorbé au niveau du système gastrointestinal et stocké, métabolisé ou excrété par un animal (Fries, 1996). Elle peut être évaluée par l'étude de la concentration en polluant dans le foie, les poumons, la formation d'adduits d'ADN, l'induction d'enzymes ou encore l'excrétion d'un métabolite dans les urines (Bordelon et al., 2000 ; Billeret et al., 2000). La mesure d'un métabolite dans les urines assure l'absorption préalable des molécules parents. Cependant, cette approche nécessite des études complémentaires visant à relier la biodisponibilité de polluants avec la variation de paramètres intervenant sur l'absorption des HAP *in vivo* comme l'interférence avec du sol ou des matrices alimentaires (Koganti et al., 1998).

La biodisponibilité des HAP du sol peut être exprimée de plusieurs manières : par une extraction à l'aide de solvants ou de liquides biologiques réalisée directement sur un échantillon de sol, par des méthodes *in vitro* impliquant des systèmes bactériens ou encore par des méthodes *in vivo* mettant en œuvre des animaux aquatiques ou des mammifères.

Dans notre problématique liée à la sécurité alimentaire, la « biodisponibilité » est mesurée par une méthode mimant directement les conditions *in situ*. Elle est dans ce cas considérée comme le pourcentage de transfert d'un polluant du sol vers un seul compartiment cible, le lait. Utilisée pour évaluer l'impact d'une exposition prolongée à un polluant, cette méthode est fondée sur le calcul du ratio de la concentration d'un polluant dans le lait sur la contamination initiale du sol ingéré (Slobs et al., 1995 ; Beresfort et al., 2000). Il convient alors dans ce cas de parler de coefficient de transfert. Le calcul peut être basé sur un transfert de radioactivité vers le lait ou sur un transfert plus ciblé où seules les molécules mères et/ou certains de leurs métabolites sont recherchés. Concentré sur une préoccupation de sécurité alimentaire, notre approche est cantonnée à l'étude du transfert d'un polluant et d'un de ses métabolite dans le lait.

#### 4.1. Méthodes de mesure de la biodisponibilité

##### a) chez l'homme

*In vivo*, la mesure de l'exposition et de la biodisponibilité des HAP chez l'homme se fait fréquemment par le dosage dans l'urine du métabolite principal du Pyr, le 1-OH pyr (Jongeneelen et al., 1988 ; Viau et al., 1995). Aucune corrélation ne permet de relier la

quantité de 1-OH pyr excrétée dans les urines avec la quantité de HAP totale ingérée via l'alimentation (Jacob et Seidel, 2002 ; Viau et al., 2002).

#### b) chez l'animal

Les études de biodisponibilité de polluants présents dans le sol pour les mammifères sont essentielles. Au-delà de la prédiction d'éventuels risques de transfert au lait liés à l'exposition d'animaux sur des pâtures contaminées en HAP, elles permettent d'étudier les mécanismes régissant l'extraction des HAP du sol dans le tractus gastrointestinal. L'étude de la biodisponibilité est réalisée *in vivo* dans le but de connaître le devenir et l'éventuelle absorption des HAP dans l'organisme (Weston et al., 1998 ; Billeret et al., 2000 ; Bordelon et al., 2000).

#### *animaux monogastriques*

La majorité des chercheurs utilisent le rat comme modèle d'étude de la biodisponibilité des HAP. Les différentes études traitent simultanément de la biodisponibilité des HAP apportés sous forme de solution de HAP directement introduite dans la bouche de l'animal et de la biodisponibilité de HAP associés à du sol. Cette dernière méthode mime alors les conditions *in situ*. Les concentrations en molécules et métabolites ainsi que la répartition de ces molécules dans l'organisme sont étudiées puis comparées à des traitements différents. Ils correspondent à des modalités où les animaux (des rats sont utilisés comme modèles) reçoivent une dose de polluant équivalente mais intégrée dans du sol. Cette méthode permet d'estimer l'influence du sol sur la disponibilité des HAP dans l'organisme.

L'indicateur d'exposition est la quantité de 1-OH pyr excrétée. La biodisponibilité des HAP du sol pour les mammifères est avérée. Comparée à des témoins non exposés, la quantité d'OH Pyr excrétée dans les urines est supérieure chez des animaux ayant ingérés du sol contaminé en HAP (Koganti et al., 1998). De plus, l'activité des enzymes induites ainsi que la formation d'adduit d'ADN prouvent la disponibilité d'une part des HAP du sol (Bordelon et al., 1999 ; Fouchécourt et al., 1999 ; Billeret et al., 2000). Parallèlement, il est montré que le caractère hydrophobe des HAP, qui induit une forte affinité des molécules pour la matrice sol, diminue considérablement la disponibilité de ces molécules. La génotoxicité de ces polluants pour les organismes est alors réduite comparée à des matrices moins riches en matière organique (Bordelon et al., 2000).

L'absorption mesurée par la dose de radioactivité ( $^{14}\text{C}$ ) dans le plasma de rat est élevée chez des animaux ayant reçu une application dermale (poudre) de Phé. Cette mesure est 10 fois inférieure chez des animaux ayant reçu la même dose par apport oral de sol. L'excrétion dans

les fèces approche les 20 % de la dose initialement apportée dans les 48 heures, elle est négligeable (moins de 5%) dans le cas d'une application dermale. L'implication du sol dans la rétention des HAP est clairement mise en évidence : les molécules fixées de façon irréversible au sol ne sont pas extraites ni disponibles pour l'organisme et se trouvent excrétées dans les fèces. Par ailleurs, le faible recouvrement des HAP dans les fèces suite à une application dermale implique une métabolisation ainsi qu'une distribution des molécules et de leurs produits de dégradation dans différents organes (ileum et duodenum particulièrement) et tissus. La part de métabolites mesurée est équivalente dans les urines des 2 traitements appliqués aux rats (Kadry et al., 1995).

Si le sol rend les HAP moins disponibles pour l'animal, il n'en reste pas moins source de contamination. Dans des conditions proches de la réalité, Van Schooten et al. (1997) ont montré une réelle mobilisation des HAP du sol par le dosage de molécules mères et métabolites dans différents compartiments organiques. Suite à un apport unique de 0,5 g de sol contaminé en anthracène, Pyr et B[a]P à des rats, les molécules mères et leur métabolite principal ont été dosés dans le sang, l'urine et les fèces. Ces résultats ont alors été comparés à ceux obtenus chez des animaux ayant reçu la même dose de molécule apportée par voie orale diluée dans de l'huile. Les concentrations détectées dans les différentes matrices sur 24 h après apport sont données dans le tableau 20. Cette étude synthétise les observations faites sur la contamination en HAP via du sol. Les variations des concentrations plasmatiques sont attribuables à différents facteurs physiologiques : temps de séjour dans l'organisme, comportement des animaux face à la nourriture et effet individu. Toutefois, dans les fèces, si la proportion de molécules mères excrétées entre les modalités HAP apportés dans l'huile et HAP apportés par le sol n'est pas significativement différente, elle ne reste pas moins flagrante pour les métabolites dans le cas du Pyr.

Ainsi, il est important de souligner qu'une faible part des HAP apportée est retrouvée dans les fèces sous forme de molécule mère. Les taux de transfert dans les fèces sont différents entre les 2 modalités. Le sol favorise la rétention des molécules ce qui les rend moins disponibles pour l'organisme. Une part non négligeable des HAP présents dans le sol initial a toutefois été métabolisée ce qui implique une extractibilité suivie d'une métabolisation clairement mise en évidence ici pour le Pyr. L'étude de Pu et al.(2004) a montré une bonne corrélation entre les études de biodisponibilité des HAP du sol *in vivo* et *in vitro*. La comparaison des 2 types de méthode d'estimation est peu fréquente. Cette corrélation ( $r = 0,73$ ) souligne la complémentarité des deux types de méthode qui aboutissent à des résultats similaires. Dans les deux cas, il apparaît que le sol limite la biodisponibilité des HAP. Cette diminution de la disponibilité est toutefois variable selon les types de sol et les molécules considérées.

**Tableau 20** : Excrétion \* (en %) d'anthracène, Pyr et B[a]P dans le plasma et les fèces à la suite d'un apport unique via du sol ou via de l'huile.

	Compartiment	Traitement	Anthracène	Pyr	B[a]P
Van Schooten et al., 1997	Fèces	Avec sol	0,5	0,5 <sup>b*</sup>	1 <sup>b**</sup>
	Plasma	Avec sol	10 <sup>±16</sup>	2,4 <sup>±2</sup>	3,4 <sup>±4</sup>
Hecht et al., 1979	Fèces	Huile			5,6 à 13
Bouchard et al., 1998	Fèces	Intraveineuse		0,2	
	Fèces	Huile	0,4	0,2 <sup>a*</sup>	0,3 <sup>a*</sup>
Van Schooten et al., 1997	Plasma	Huile	3,5 <sup>±2,4</sup>	3,3 <sup>±2</sup>	1,6 <sup>±1,6</sup>

\* : L'excrétion dans les fèces est donnée en pourcentage de la dose initiale apportée. La part dans le plasma est donnée en pourcentage de la dose initiale/mL/h.

\* \*: les modalités avec sol et avec huile sont comparées dans l'étude de Van Schooten et al. (1997) ; les valeurs dans une même colonne avec une lettre différente sont significativement différentes pour une même molécule.

**Tableau 21** : Excrétion du 1-OH Pyr et du 3-OH B[a]P dans les fèces de rats ayant reçu par voie orale une dose de 17,5 µg de Pyr et 4,6 µg de B[a]P via du sol et 17,5µg de Pyr et 7,6 µg de B[a]P dilué dans de l'huile (Van Schooten et al., 1997).

Compartiment		1-OH Pyr	3-OH B[a]P
Fèces (% de la dose initiale)	Avec sol	5,1 <sup>b</sup>	8,8
	pur	17 <sup>a</sup>	8,8

Les lettres dans une même colonne montrent une différence significative au seuil de 5 % entre les traitements HAP avec sol et HAP dilués dans l'huile.

### *ruminants*

Les études disponibles sur le transfert des HAP et de leurs métabolites dans le lait ne traitent que d'apport unique par voie orale. Les HAP sont directement disponibles suite à la dilution des molécules dans de l'huile. Les voies d'entrée des HAP dans le ruminant sont multiples. Sol, ensilage et herbes sont les sources principales, eau et air représentent des voies minoritaires. Pour estimer la part de HAP et de métabolites éliminés via le lait par un ruminant laitier, les pourcentages de radioactivité transférés ont été déterminés à la suite d'un apport oral unique en  $^{14}\text{C}$ -Phé,  $^{14}\text{C}$ -Pyr et  $^{14}\text{C}$ - B[a]P à des chèvres en lactation (tableau 22). D'autres études rapportent également des transferts faibles de radioactivité dans le lait suite à un apport de molécules organiques (tableau 23). Ces résultats indiquent que le taux de transfert de la radioactivité vers le lait est faible, moins de 2 % pour les molécules étudiées. De plus, la forme sous laquelle la radioactivité est transférée est inconnue, la radioactivité englobant les formes natives et biotransformées. Notons également que l'élimination du Phé se fait majoritairement par la voie urinaire et celle du B[a]P par la voie fécale (Grova et al., 2002).

Parmi les molécules organiques étudiées, seules les dioxines, PCDD et PCDF, ont des taux de transfert vers le lait beaucoup plus important que les HAP. Le taux de transfert calculé *in situ* par la quantité excrétée par rapport à la quantité ingérée par jour varie de moins de 0,1 à 60 % selon les molécules (Noordam et al., 2002). Cette amplitude est due à la diversité des matrices (herbe, sol, cendres) ainsi qu'aux propriétés très différentes des congénères.

La mesure de la biodisponibilité des PCB du sol par apport contrôlé à des ruminants conduit à une estimation de 40 à 65% (Fries et al., 1985). Cette biodisponibilité est supérieure dans le cas d'une expérimentation similaire où les polluants sont administrés via de l'huile (Fries et al., 1989).

**Tableau 22** : Proportion cumulée de radioactivité excrétée dans le lait, l'urine et les fèces à 103h après apport unique de  $2,5 \cdot 10^6$  Bq par voie orale (dissout dans de l'huile), (Grova et al., 2002).

% cumulé à 103h	Phé (%)	Pyr (%)	B[a]P (%)
Lait	1,5	1,9	0,2
Urine	40,4	11,4	6,3
Fèces	21,7	25,5	88,2

**Tableau 23** : Pourcentage cumulé de radioactivité mesurée dans le lait après ingestion d'une molécule organique marquée

Type	Molécule	% cumulés	Animal modèle	Auteurs
HAP	$^{14}\text{C}$ -naphtalène	Moins de 0,0001% en 31 jours	Vache laitière Apport quotidien	Eisele (1985)
	$^{14}\text{C}$ -B[a]P	0,01 % en 7 jours	Brebis Apport unique	West et Horton (1976)
	$^{14}\text{C}$ -diquat	0,02 % en 7 jours	Chèvre Apport unique	Griggs et Davis (1975)
Pesticides	diquat	Non détecté	Vache laitière Apport chronique	Sipos (1973)
Dioxines	$^{14}\text{C}$ -diquat dibromide	0,001-0,015%	Vache laitière Apport unique	Stevens et Walley (1966)
	$^{13}\text{C}$ - PCDD,PCDF	1,3 à 36% en 90 jours	Vache laitière Apport unique IR*	Olling et al. (1991)

\* Intra-Ruminal

#### 4.2. Métabolisme des HAP chez les mammifères

Les HAP dans l'organisme animal sont considérés comme des xénobiotiques, c'est-à-dire des molécules de faible poids moléculaires étrangères à l'organisme (Beaune et Loriot, 2000). Les êtres vivants exposés à ces composés hydrophobes sont capables de les biotransformer dans le but de les rendre hydrophiles pour les éliminer via les différentes voies d'excrétion. Ces métabolites produits sont toutefois susceptibles de créer des liaisons covalentes et former des adduits sur l'ADN. Ces complexes sont considérés comme les inducteurs de tumeurs cancéreuses.

Les HAP pénètrent facilement dans les cellules où ils sont pris en charge par les enzymes de phase I (de fonctionnalisation). Les plus importants sont les cytochromes P450 qui catalysent des réactions de monooxygénation qui sont induites par les polluants eux-mêmes. A l'issue de la phase I, les polluants ont été rendus plus polaires par l'ajout de fonction hydroxy (phénols, dihydrodiols). La phase II conduit à la formation de composés conjugués avec un groupement glutathion, acide glucuronique, méthyl ou acétyl. La greffe de ce groupement favorise l'élimination du composé par l'urine ou les fèces et, s'ils retournent dans la circulation sanguine, peuvent être dirigés vers la glande mammaire. La majorité de ces réactions ont lieu dans le foie mais ce métabolisme peut également se faire dans l'œsophage ou l'intestin.

#### 5. Excrétion des HAP et de leurs produits de dégradation dans le lait

Peu de données existent sur les concentrations de HAP dans le lait. Grova et al. (2000) relatent des concentrations pour la somme de 8 HAP de l'ordre de 36 ng/g de matière grasse dans du lait de ferme située en zone rurale et 27 ng/g MG dans des laits prélevés en zone urbaine. On note cependant la présence majoritaire de phénanthrène et de pyrène comparée aux concentrations des autres molécules détectées dans ces laits (naphtalène, anthracène, et fluoranthène) dans les 2 cas et l'absence totale de B[a]P. D'autre part, la somme des concentrations de 16 HAP dans du lait de vache est de 63 ng/mL, avec la prépondérance de Pyr, chrysène et Phé (Husain et al., 1997). Lawrence et Weber (1984) relèvent quant à eux des concentrations dans du lait lyophilisé écrémé une concentration maximale de 2,7 ng/g MS pour 13 HAP carcinogènes. L'écrémage du lait pourrait être à l'origine de cette concentration relativement faible comparée à celles précédemment citées. Le caractère lipophile des HAP favorise en effet leur migration et rétention dans la matière grasse, totalement absente du lait écrémé. La concentration en HAP dans du lait pour bébés est cependant près de 4 fois

supérieure à celle mesurée dans des laits écrémés. L'ajout d'huile végétale dans ce type de produits pourrait être à l'origine d'une telle différence de concentration (Dennis et al., 1991). Si les concentrations en HAP sont mesurées dans divers produits alimentaires, les concentrations en métabolites dans le lait de ruminant, elles, ne font pas l'objet d'études suivies. Les travaux de Grova et al. (2005) sont novateurs dans ce domaine. Ils font état de concentration en métabolites conséquente dans le lait à la suite d'un apport unique en Phé. Trois monohydroxyphénanthrènes (9-, 3- et 2-OH Phé) sont détectés à hauteur de 157,4 ng/mL (somme des 3 métabolites) à 7 h après l'apport.

La consommation de produits laitiers en France augmente régulièrement depuis plusieurs décennies. Cette évolution constante associée à la consommation d'aliments de plus en plus contaminés en HAP (viande, fruits, légumes, céréales, huiles) font de la voie orale la source principale de contamination par les HAP. La voie respiratoire est négligeable puisqu'elle ne représente que 0,1% de la voie alimentaire (Lodovici et al., 1995). Pourtant, aucune réglementation ne prévoit de concentrations maximales en HAP dans les denrées alimentaires et aucune limite n'est imposée dans les produits de grande consommation. Dans un souci de sécurité alimentaire, seules des valeurs limites sont données pour le B[a]P dans les produits fumés et un décret fixe une limite maximale de 0,01 µg/L (somme de 4 HAP) dans l'eau (AFSSA, 2001).



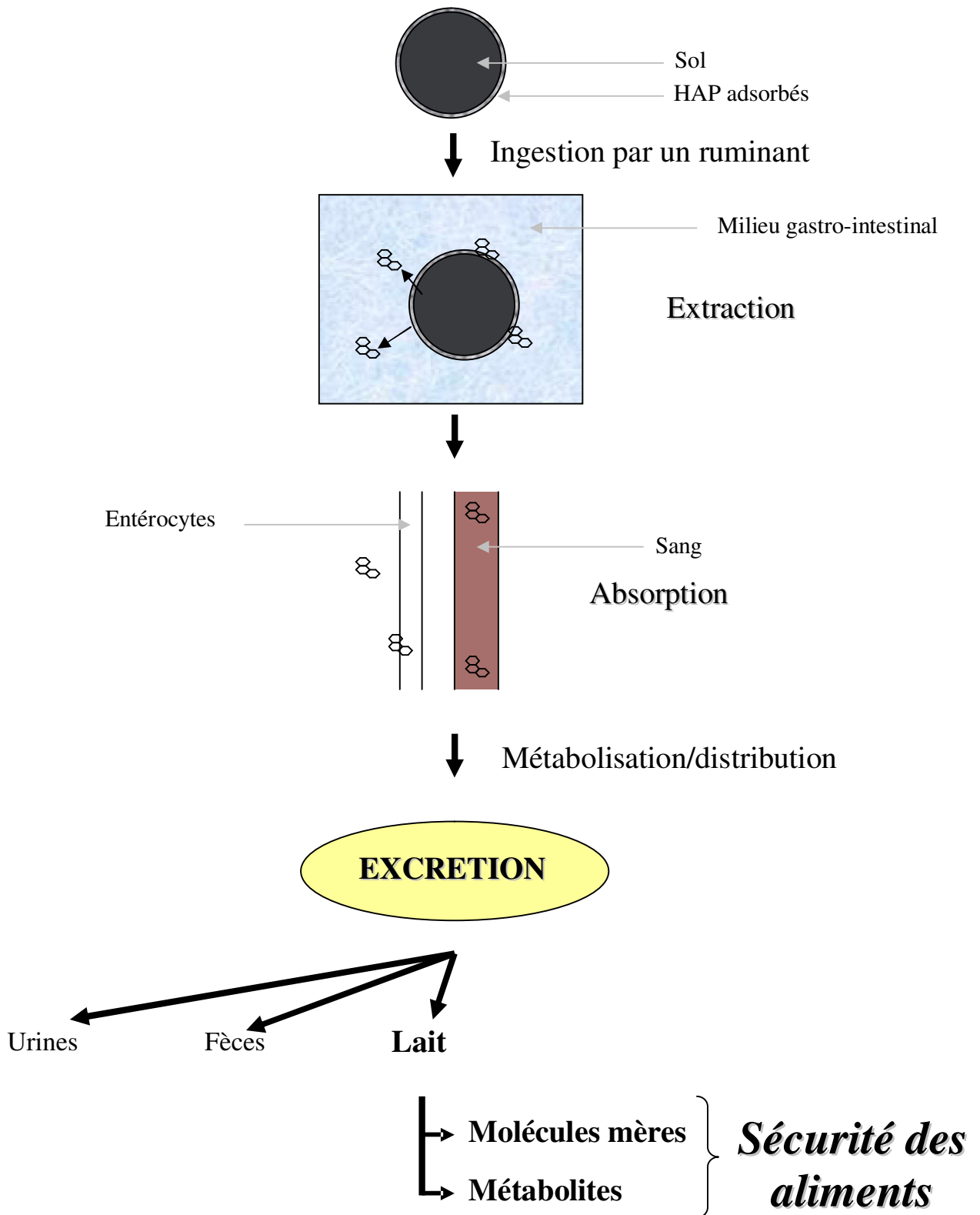
## Conclusion de la synthèse bibliographique

Le constat qui s'impose aux vues de ces données bibliographiques est le peu de données disponibles sur le transfert des HAP dans le lait. Il a été montré chez les monogastriques que la présence de sol diminue considérablement la disponibilité des HAP pour l'organisme résultant en des concentrations assez faibles dans les voies d'excrétion. Si les HAP sont fortement liés au sol lors de son ingestion par un animal, ils n'en restent pas moins extraits lors du passage dans le tractus digestif. En effet, moins de 10 % de molécules sont recouvrées dans les fèces (jusqu'à 88 % dans l'étude de Grova et al., 2003, mais en dosage de  $^{14}\text{C}$  total). L'étude du transfert des HAP a été réalisée chez des petits ruminants. Le manque de données sur des apports chroniques et en doses potentiellement mesurées dans l'atmosphère limite les conclusions possibles sur le risque de transfert de polluant dans le lait. De plus, l'apport d'une dose de HAP à des animaux n'est pas représentatif de la réalité : la présence du sol comme substrat des HAP pouvant avoir tendance à diminuer le transfert vers le lait. Les estimations de transfert sont donc surestimées et la mise en place d'expérience en conditions de terrain s'avère nécessaire pour conclure quand au taux de transfert vers le lait.

Ce constat conduit à une interrogation majeure : quel peut être le taux d'extraction des HAP du sol une fois dans le tractus digestif d'un mammifère puisque ce taux conditionne directement l'absorption et l'excrétion dans le lait ?

Les niveaux de contamination en HAP dans l'herbe et le sol sont très variables selon les auteurs et les lieux de prélèvement. Il n'existe pas de données précises sur l'historique des sols ainsi que sur les lieux de prélèvement. Dans le cadre de notre problématique, les concentrations, les profils, les distances à la source ainsi que l'origine du sol (prairie, sol agricole, friche industrielle...) méritent d'être signalés. Une fois ces données précisées en fonction des sites étudiés et de la pertinence des prélèvements (distance à la source, prairie) se pose la question de la disponibilité de polluants dans les matrices ingérées par l'animal. Concentrés sur des sols de prairie, les concentrations mesurées dans les matrices prélevées rendent compte du niveau d'exposition des animaux à ces molécules. Les vaches laitières au pâturage ne sont exposées qu'à des sols de prairie dont les contaminations et les caractéristiques (couvert végétal...) changent de celles apportées par la littérature. Il n'existe aucune donnée sur les possibilités de transfert des HAP des matrices environnementales. Or, il est essentiel d'évaluer les risques de transfert de polluants vers le lait d'un animal à la suite d'une exposition prolongée à des sols contaminés. Cette problématique soulève donc également la question de l'extractibilité des HAP du sol par les différents liquides biologiques du tractus digestif de l'animal. A l'issue de cette synthèse bibliographique, il nous est possible

d'envisager une éventuelle extractibilité des HAP du sol dans le tractus digestif par les liquides digestifs du ruminant laitier. En effet, des études prouvent l'extraction des HAP du sol dans des conditions similaires (être humain). Le modèle du ruminant ne peut cependant pas s'appuyer sur ces données puisque le rumen et ses spécificités (microorganismes) n'ont pas d'équivalent dans ces études. La présence de ces microorganismes « robustes » laisse présager une dégradation des molécules potentiellement extraites dans le tractus digestif. Les données disponibles dans la littérature ne s'intéressent qu'à des modèles humains qui ignorent la possible biodégradation par les micro-organismes, problématique qu'il est alors possible de transférer sur le modèle de la vache laitière. De plus, les capacités d'extraction des HAP par le tractus digestif du ruminant laitier sont inconnues ce qui semble pourtant pertinent quand on connaît les quantités quotidiennes de sol potentiellement ingéré. En plus de l'extractibilité demeure la question de la dégradation des HAP par les bactéries du rumen, ces dernières étant capables de dégrader des substrats résistants tels que la cellulose. Apporter quelques éléments de réponse à l'extractibilité et à la biodégradation des HAP du sol par l'animal permettrait d'expliquer le comportement des HAP ingérés via le sol et leur devenir dans l'animal. La problématique actuelle de sécurité des aliments nous amène à étudier particulièrement le transfert dans le lait dont les formes de consommation multiples et les quantités absorbées quotidiennement en font un vecteur majoritaire d'exposition de polluants chez l'homme (figure 5).



**Figure 5** : Schématisation du devenir des HAP liés au sol ingéré par un ruminant laitier

## **Chapitre 1 : Caractérisation des niveaux de HAP du sol à proximité de sources d'émission**

## **Introduction**

Dans un souci constant de qualité des produits agricoles, l'étude du transfert de polluants dans la chaîne alimentaire est essentielle. Le lait, qui est au cœur de notre problématique, est le compartiment cible et dernier maillon.

Exposés à ces polluants via l'ingestion de sol, les ruminants laitiers absorbent quotidiennement des quantités non négligeables de polluants qu'ils sont susceptibles de stocker ou d'évacuer par le lait. L'étude de la contamination en HAP du sol de pâtures semble alors déterminante pour connaître les teneurs auxquelles les animaux sont exposés.

Les concentrations en HAP dans l'herbe et le sol sont certes connues à proximité de sources de pollution avérées. L'ampleur des niveaux de contamination à proximité et au sein de friches industrielles, de zones d'incendie, de sols de cokeries ou encore de bordures d'autoroutes est aujourd'hui établie. Ces zones à concentrations en HAP très élevées sont néanmoins totalement inaccessibles à des animaux domestiques pour des raisons diverses (zones privées, accès impossible). La bibliographie est en revanche assez pauvre en articles relatant des niveaux de concentration en HAP dans des sols issus de prairies situées dans des zones « à risque » c'est-à-dire proches de sites d'émission.

Ce premier chapitre s'articule autour de la caractérisation de la contamination du sol et de l'herbe à proximité de sources d'émissions. Il met l'accent sur l'étude de la contamination de pâtures, très peu développée par ailleurs, situées dans l'environnement proche d'une source potentielle d'émission de HAP. L'étude de la contamination en HAP du sol et de l'herbe de pâture s'intègre dans notre préoccupation de transfert dans la chaîne alimentaire puisque, dans un cadre agronomique, l'ingestion de ces deux matrices est l'étape la plus en amont de la production de lait.

Dans ce chapitre, les pâtures sont définies comme des parcelles sur lesquels des animaux domestiques (vaches laitières particulièrement) évoluent au printemps et en été. Les parcelles choisies ont toujours été proches (moins de 500 m) d'une source d'émission de HAP caractéristique des activités lorraines. Dans ce chapitre, l'élément pris en compte dans l'étude des contaminations est le type de source étudié : celui-ci a-t-il un impact sur les niveaux de contaminations ?

Pour répondre à cette question, plusieurs sites (autoroute, centrale électrique et usine pétrochimique) ont été sélectionnés pour la nature et l'ampleur de leurs émissions (Khalili et al., 1995 ; Bakker et al., 2000 ; Khodadoust et al., 2000 ; Wilcke et al., 2000).

## I. Protocole expérimental

### 1. Conditions de prélèvements

La campagne de prélèvement s'est déroulée au mois de juin 2002, par temps ensoleillé et après plusieurs jours de beau temps. On s'affranchit ainsi d'éventuelles pertes de molécules par lessivage lors des épisodes pluvieux. Les parcelles cibles étaient couvertes de végétation abondante typique de prairies naturelles (graminées majoritairement). Les prélèvements ont pu être faits en quantité suffisante pour la réalisation des analyses (500 g de produit frais par prélèvement). Lors des campagnes de collecte, une attention particulière a été portée à l'abondance et à la densité des végétaux afin de prévenir leur éventuelle contamination par du sol. Le phénomène de « splash » (projection du sol par l'eau de pluie) est en effet susceptible de souiller l'herbe avec du sol.

### 2. Sites choisis

Dans le cadre de cette étude, différents sites ont été choisis en fonction de leur potentiel d'émission de HAP dans l'atmosphère. Ces activités humaines fondées sur la combustion de matériaux (essence, diesel, charbon) génèrent des HAP rejetés dans l'atmosphère comme l'ont démontré Khalili et al. (1995). Le caractère industriel de ces activités (excepté pour l'autoroute) implique une production à grande échelle associée avec le dégagement conséquent de polluants dans l'atmosphère. Les HAP émis par ces activités industrielles sont susceptibles de se déposer dans l'environnement plus ou moins proche, leur transport dépendant essentiellement de leur volatilité. Les échantillons prélevés étaient issus de prairies occupées par des animaux dès le mois d'avril. Les prélèvements ont été effectués aux endroits les plus proches et les plus accessibles de la source depuis la pâture. Ainsi, l'accès à quelques sites étant limité pour des raisons diverses (terrain privé, zone de sécurité), le point le plus proche était situé de 50 à 500 m selon les sources. Il n'aurait pas été opportun de prélever plus près : aucun herbivore domestique n'avait accès à ces zones délimitées.

Tous les prélèvements ont été réalisés sous le vent dominant et à une distance de 200m des sites ponctuels d'émission où la mesure de la distance était possible. Plusieurs sites ont été sélectionnés car l'influence du type de site d'émission sur la concentration en HAP dans l'herbe et le sol a été étudiée ici :

- une centrale pétrochimique située à Carling (57) produisant divers composés chimiques dont des hydrocarbures. La grande étendue de ce site ne permettait pas la réalisation d'un gradient de distance dans les concentrations en HAP dans l'herbe et le sol. Ces dernières sont donc le reflet d'une contamination moyenne représentative d'un site industriel pétrochimique.

- une centrale thermique située à Frouard (54) produisant de l'électricité par combustion de matière fossile (charbon). Son activité est réduite au complément d'une centrale nucléaire et n'est sollicitée que lors de fortes demandes en période hivernale. Les prélèvements de sol et d'herbe ont été faits dans une prairie sous le vent dominant à une distance de 200 m de l'usine. Un accès plus proche n'était envisageable du fait de la délimitation du site. En outre, la configuration du site exclue toute entrée d'un animal dans l'enceinte du site (clôtures).

- une autoroute, l'A31, reliant Nancy et Metz, dont la fréquentation avoisine les 70000 véhicules/jour. Son trafic est fortement dépendant des saisons : empruntée par les estivants des pays frontaliers, il atteint les 100000 véhicules/jour en été. Les échantillons de sol et d'herbe sont issus d'une pâture longeant l'autoroute. Un prélèvement a été réalisé à 200 m à l'est de l'autoroute sur un axe perpendiculaire à celle-ci. Les points de prélèvement étaient localisés sous le vent dominant (données météorologiques fournies par Météo France), (Figure 6).

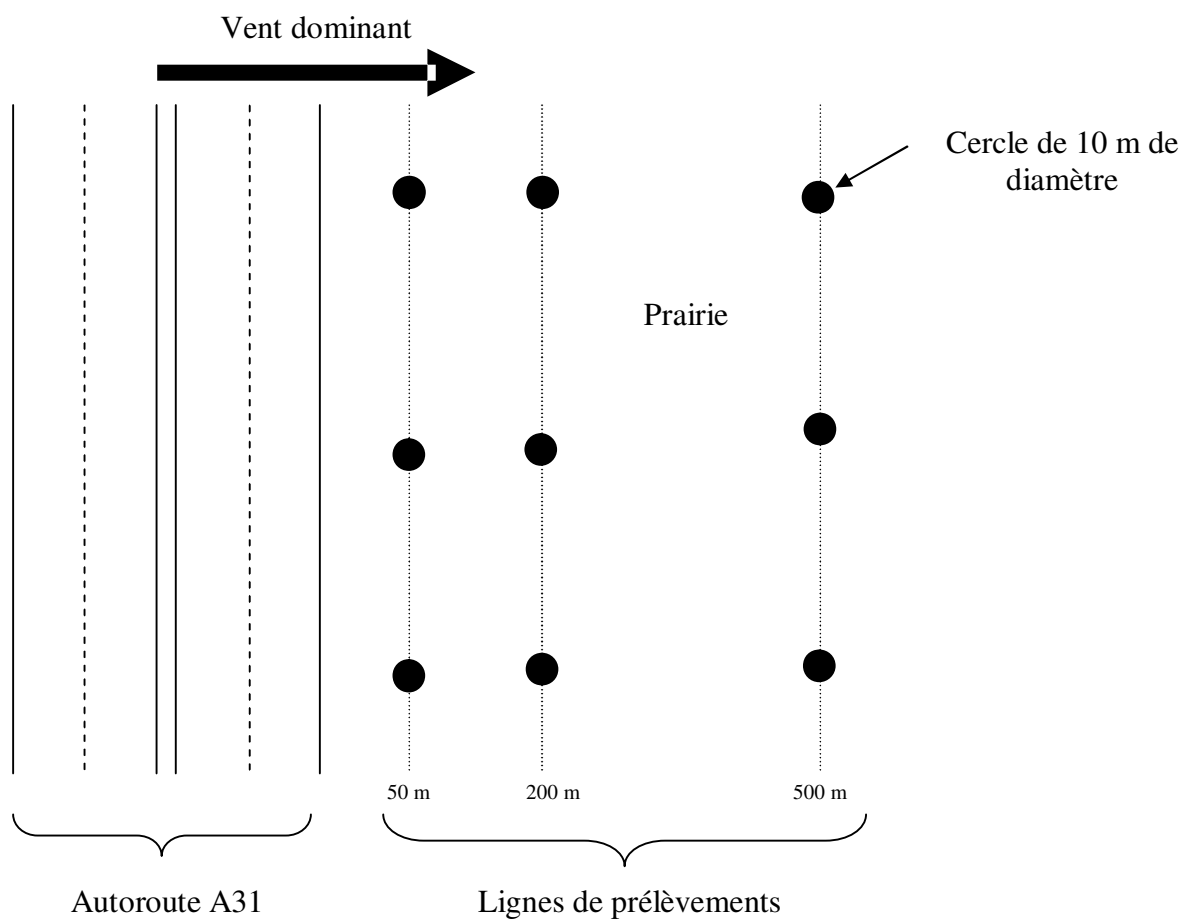
- un site témoin a également été intégré dans notre étude. Situé dans une prairie attenante à une ferme (proximité de Verdun, Meuse, France), ce site témoin a été choisi pour son éloignement de toute source de pollution majeure (autoroutes, industries). L'herbe et le sol prélevés sont issus des pâtures de l'exploitation laitière.

### 3. Protocoles de prélèvements

Les conditions de collecte des échantillons étaient identiques pour tous les sites. Plusieurs prélèvements ont été réalisés de manière à évaluer la contamination moyenne d'une zone donnée. Ils ont ensuite été regroupés sous forme d'un échantillon représentatif. Pour cela, sur une zone à étudier, un cercle de 10 m de diamètre a été schématisé. Trois cercles de 2 m de diamètre espacés de 120° y ont été distribués (figure 7). Trois échantillons de sol et d'herbe ont été prélevés au sein de ces cercles. Ces échantillons respectivement de sol et d'herbe ont été mis en commun (1 :1 :1).

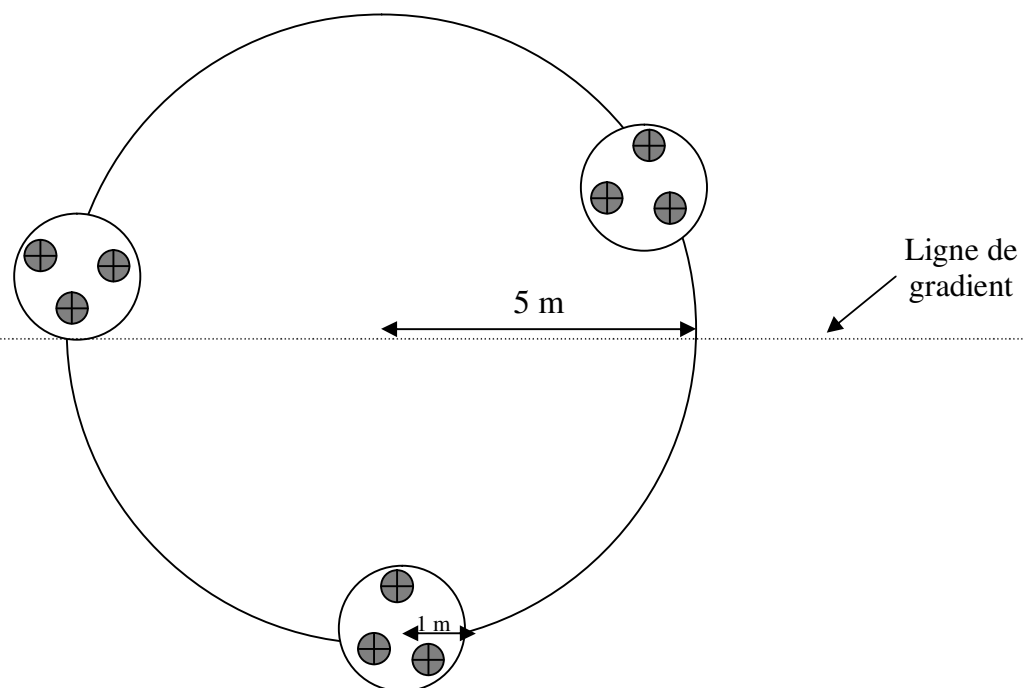
- L'herbe coupée à 15 cm du sol a été emballée dans du papier aluminium,

- Le sol dont la partie prélevée correspond à l'horizon H0 (5 premiers cm sous la surface du sol) a été regroupé dans des barquettes en aluminium d'une capacité de 1 L.



**Figure 6** : Méthode de prélèvement d'herbe et de sol au bord de l'autoroute





**Figure 7** : Schématisation de la méthode de prélèvement du sol et de l'herbe

#### 4. Préparation de l'herbe et du sol avant dosage

Le mode opératoire pour la préparation des matrices herbe et sol était commun à toutes les campagnes de prélèvement :

- L'herbe a été mise à sécher dans des phytotrons (18-20°C, 60-80 % d'hygrométrie) pendant 5 jours. Une fois séchée, elle a été broyée à l'aide d'un broyeur à fléaux (modèle SK 100 Retscht, Darmstadt, Allemagne) et conservée dans des pots en verre à -20°C avant analyse.
- Le sol a été mis à sécher dans des phytotrons dans les mêmes conditions que l'herbe, laissé dans les barquettes de prélèvement en aluminium. Sec, il a été écrasé avec un mortier et un pilon puis tamisé à 2 mm. Notons que chaque échantillon a préalablement été homogénéisé. Le sol ainsi traité a été conservé dans des pots en verre à -20°C jusqu'à analyse.

A chaque étape, le matériel utilisé a été rincé avec de l'acétone puis de l'hexane. De plus, les seuls matériaux utilisés pour ces phases de prélèvements étaient le verre et l'aluminium, reconnus pour leur faible affinité par les HAP.

#### 5. Analyse des échantillons

Les dosages de HAP dans les matrices herbe et sol ont été réalisés par le Laboratoire Micropolluants Technologie (Thionville, Moselle, France). Les échantillons préparés ont été analysés pour la détermination de la teneur en HAP des 16 congénères inscrits comme polluants prioritaires par l'Agence de Protection de l'Environnement américaine (EPA, 1976) citée par Keith et Teillard (1979). L'analyse des échantillons reposait sur la norme NF ISO 15302, adaptée par le Laboratoire Micropolluants Technologie. Les résultats des dosages recueillis ont été exprimés sous deux formes : somme des 16 HAP en ng/g de matière sèche et profil des molécules (%). La somme permet d'évaluer les niveaux de contamination en fonction des sites et des distances. Les profils, calculés en pourcentage d'une molécule par rapport à la somme des 16 HAP, permettent de distinguer les molécules majoritaires présentes dans un échantillon et de les comparer avec d'autres échantillons dont les sommes sont différentes.

## 6. Traitements statistiques

Les concentrations en HAP dans le sol et l'herbe ont été analysées statistiquement par la procédure GLM du logiciel SAS (version 9.1, SAS Institute, Cary, NC). La variable étudiée est la somme en HAP dans, respectivement, le sol et l'herbe. L'effet étudié est la nature du site (4 modalités).

## II. Résultats

### 1. Concentration en HAP dans le sol à 200 m des sites d'émissions retenus

Cette étude centrée sur la comparaison des sommes des 16 HAP mesurée à proximité de différents sites a mis en évidence un effet significatif du type de site sur les niveaux de contamination dans le sol. La forte variabilité intra-site n'altèrait pas la différence significative entre sites (figure 8).

Les échantillons prélevés au bord de la centrale pétrochimique étaient significativement plus contaminés que ceux prélevés sur le site témoin et à 200 m des deux autres sources d'émission. Ces derniers présentaient des contaminations qui n'excédaient pas 15 µg/g MS mais qui étaient cependant significativement différentes des concentrations du site témoin.

### 2. Comparaison des profils de HAP du sol prélevé à 200 m des sites étudiés

Ramenés en proportion relative, les résultats révélaient une certaine homogénéité des répartitions des molécules entre les sites. Il est cependant intéressant de souligner que, quels que soient les sites considérés, tous les profils étaient équivalents. Le site témoin, malgré son éloignement et sa faible contamination, présentait un profil de HAP similaire aux sols les plus contaminés. Les molécules détectées dans tous les échantillons de sol suivaient en effet la même répartition d'abondance pour les 16 molécules recherchées (figure 9). Ce profil homogène entre tous les sols, fortement contaminés ou non, est un résultat particulièrement intéressant. Parallèlement, dans les sols se distinguaient des composés majoritaires communs à tous les sites : les molécules à 3, 4 et 5 cycles étaient fortement représentées.

Les molécules présentes à plus de 8 % étaient les suivantes : phénanthrène, fluoranthène, pyrène, B[a]P, B[e]P, chrysène et benzo[b] et benzo[k]fluoranthène. Les molécules à 2 et 3 cycles dont la pression de vapeur est inférieure à  $1,3 \cdot 10^{-1}$  Pa (naphtalène, acénaphthène, acénaphthylène et fluorène) étaient très peu abondantes. On peut noter que, à poids moléculaire égale, le Phé était plus abondant que l'anthracène. Ces deux molécules se différenciaient

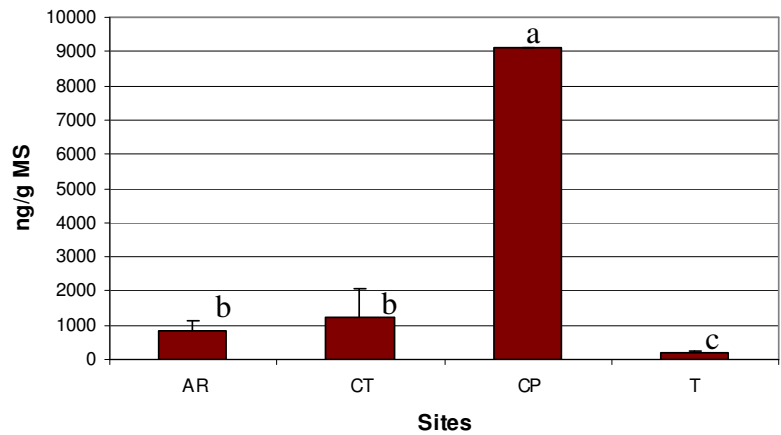
principalement par leur solubilité dans l'eau (le phénanthrène est 20 fois plus soluble que l'anthracène) et leur constante de Henry (l'anthracène est plus volatile que le Phé).

### 3. Concentration en HAP dans l'herbe à 200 m des sites d'émission retenus

Dans l'herbe, si la différence entre les niveaux de contamination était moins grande que dans le sol, elle était toutefois significative entre la centrale pétrochimique et les autres localisations (figure 10).

L'herbe à proximité de la centrale pétrochimique et de l'autoroute avait un niveau de contamination équivalent, mais significativement différent du site témoin. Les sommes de HAP du site témoin et de la centrale thermique n'étaient pas dissociables dans l'herbe.

Ces dosages mettaient clairement en évidence une contamination en HAP de l'herbe beaucoup moins prononcée que le sol, y compris les sols témoins dont la concentration en ng/g MS était supérieure à celle des végétaux pourtant exposés. Paradoxalement, le rapport des concentrations de près de 9 entre le sol proche de la centrale pétrochimique et les autres n'était pas vérifié dans l'herbe où ce rapport n'était que de 2. Les concentrations en HAP dans l'herbe ne fluctuaient pas de façon aussi importante que dans le sol.



**Figure 8 :** Moyenne des sommes des 16 HAP dans le sol à proximité de sites d'émission sélectionnés

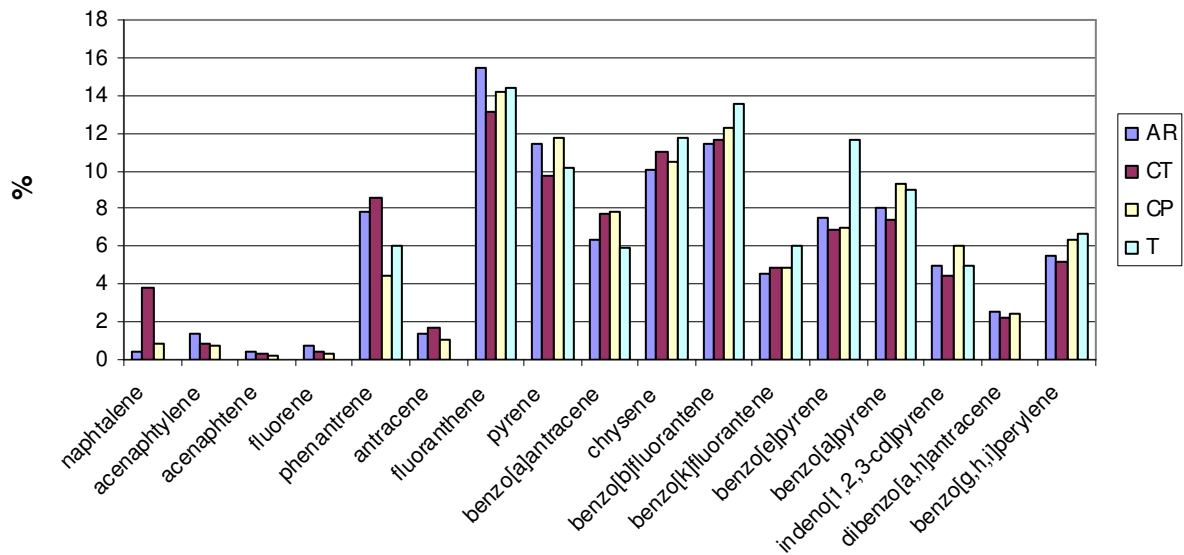
Les valeurs avec une lettre différente sont significativement différentes ( $p < 0,05$ )

AR : autoroute

CT : centrale thermique

CP : centrale pétrochimique

T : témoin



**Figure 9 :** Profils (exprimé en % de la somme totale) en HAP du sol à 200 m des sites étudiés

AR : autoroute

CT : centrale thermique

CP : centrale pétrochimique

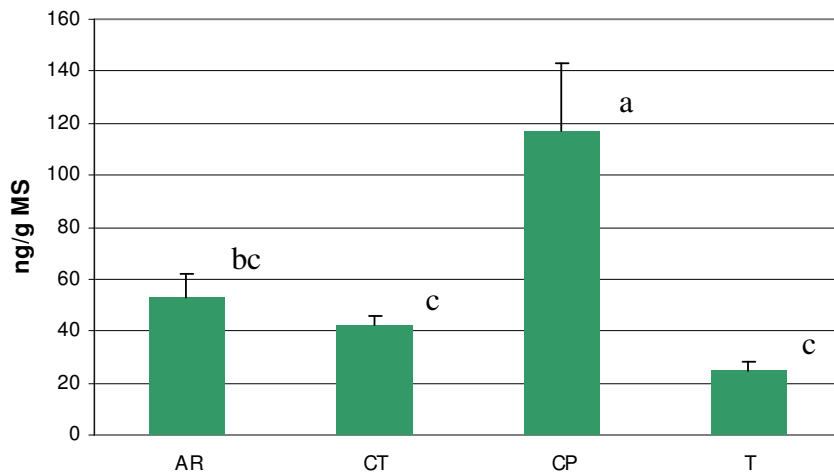
T : témoin.

#### 4. Comparaison des profils de HAP de l'herbe des sites étudiés

Dans l'herbe, contrairement au sol, les profils de molécules étaient divergents entre échantillons (figure 11). D'une part, les molécules à 3 et 4 cycles constituaient plus de 60 % de la somme dans les différents prélèvements. Phénanthrène, fluoranthène, pyrène et B[b]F y étaient principalement représentés. Les molécules dites « lourdes », à 5 et 6 cycles, étaient minoritaires dans l'herbe contaminée. Quel que soit le site, elles représentaient moins de 10 % de la totalité.

Dans le sol, cette classe de molécule correspondait à un tiers de la charge totale. Si la répartition par molécule est assez homogène dans le sol, il n'en était pas de même dans l'herbe où les concentrations en HAP étaient spécifiques de chaque site. Les profils ne sont pas superposables entre les échantillons où les disparités de concentration sont importantes. Trois molécules se distinguaient particulièrement : le phénanthrène et le pyrène étaient 2 fois plus abondants dans les échantillons témoins. Le Benzo[b]fluoranthène était très représenté dans les échantillons d'herbe issus de la centrale thermique. Enfin, certaines molécules étaient absentes des prélèvements d'herbe. C'était le cas par exemple du benzo[k]fluoranthène qui était absent des échantillons témoins. Dibenz[a,h]anthracène et benzo[a]pyrène n'étaient jamais détectés dans l'herbe, quelque soit le site considéré. Cette distribution de molécules s'oppose à celle observée dans le sol où les 16 molécules étaient représentées dans tous les sites, même en faible proportion. L'herbe est globalement peu contaminée par les molécules lourdes (à 5 cycles) parmi lesquelles certaines sont totalement inexistantes dans les échantillons prélevés.

Le profil du site près de l'autoroute était caractérisé par une dominance du fluoranthène, du pyrène, du benzo[b]fluoranthène et du phénanthrène. Les alentours des centrales thermique et pétrochimique étaient plus contaminés en benzo[b]fluoranthène, phénanthrène, fluoranthène et pyrène. Le profil de l'herbe du site témoin se distinguait par la présence majoritaire de phénanthrène (plus de 35 %) et pyrène (30 %) qui représentaient à eux deux plus de 60 % de la charge totale.



**Figure 10** : Moyenne des sommes des 16 HAP dans l'herbe à 200 m de sites d'émission sélectionnés

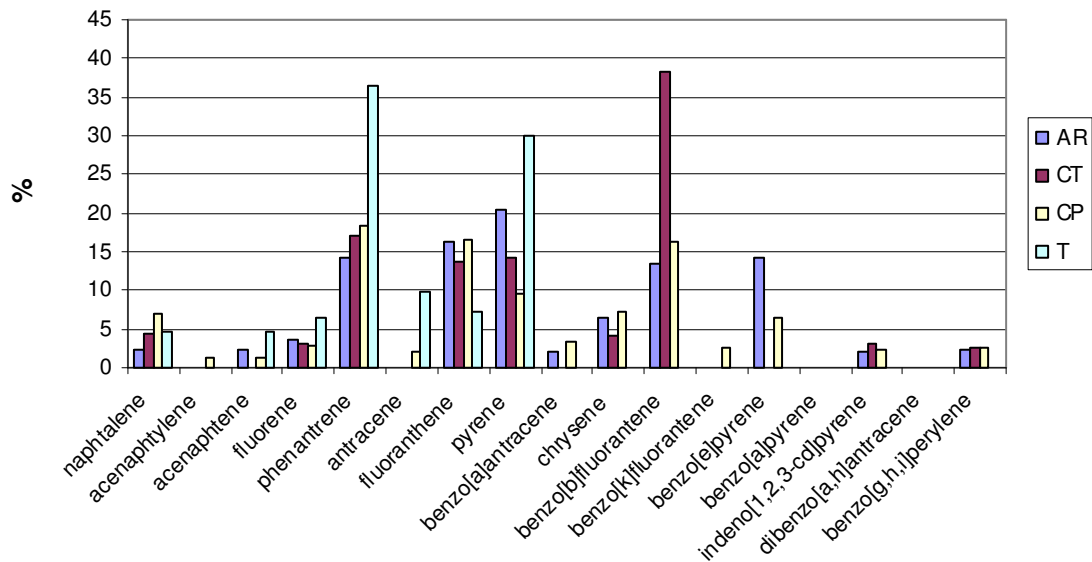
Les valeurs avec une lettre différente sont significativement différentes ( $p < 0,05$ )

AR : autoroute

CT : centrale thermique

CP : centrale pétrochimique

T : témoin



**Figure 11** : Profils en HAP (% de la somme totale) de l'herbe à 200 m des sites étudiés

AR : autoroute

CT : centrale thermique

CP : centrale pétrochimique

T : témoin.

### III. Discussion

Les résultats obtenus suite aux prélèvements réalisés dans des pâtures exposées ont mis en exergue des concentrations dans le sol beaucoup plus élevées que dans l'herbe : il est, selon les localisations, de 10 à 100 fois plus contaminé que l'herbe.

Les concentrations du sol détectées à 200 m d'une autoroute étaient équivalentes aux teneurs en HAP dans les sols citées par différentes études. Les concentrations mentionnées étaient en effet comprises entre 1078 (Crépineau et al., 2003) et 3095 ng/g MS (Tuhackova et al., 2001) à moins de 150 m d'une route. Elles pouvaient atteindre 70000 ng/g MS à 6 m de la voie (Bryselbout et al., 2000) mais ces niveaux exceptionnels n'ont jamais été corroborés par d'autres études. Les écarts types non négligeables entre répétitions méritent d'être signalés : probablement dus à des irrégularités de terrain (matière organique du sol, variation du relief) où à des événements non contrôlés (labour), ils diminuent la signification des différences entre sites et ne permettent pas une caractérisation précise des sols pollués selon les sources d'émission.

Dans le sol, les concentrations variaient néanmoins de 200 à 9000 ng/g MS. Pour les plus chargés, ils appartenaient, selon la classification de Maliszewska-Kordybach et al. (1996), à la catégorie des sols très contaminés.

Les concentrations dans l'herbe étaient très largement inférieures à celles du sol. Les cycles saisonniers impliquent une durée de vie de l'herbe inférieure à un an et ne permettent pas de la considérer comme indicateur d'exposition à des HAP fiable. Sa contamination est en effet dépendante des sources d'émissions voisines mais également du temps d'exposition directement lié à son historique (croissance, coupes). Il a cependant été montré que des temps d'exposition de 30 et 75 jours ne modifiaient pas de façon significative la concentration en HAP dans de l'herbe exposée à une route (Crépineau-Ducoulombier et al., 2004). Les modalités de dépôt des molécules ainsi que les cinétiques de contamination restent inconnues du fait de la longue période d'exposition (30 jours au minimum) avant les premiers prélèvements. Parallèlement, notons que le choix de certains auteurs (Tuhackova et al., 2001) de prélever des témoins négatifs localisés à 500 m de la source d'émission témoigne de la mobilité limitée des HAP sur de longues distances. Les variations de concentrations dans le sol et l'herbe illustrent la difficulté de l'établissement de distance optimale de prélèvement dans le cadre de la caractérisation d'un site ainsi que la pertinence du choix de localisation de points témoins. Conjointement aux niveaux de contamination, le profil de chaque matrice est à étudier avec attention. Différents entre sol et herbe, ils apportent des informations essentielles sur le devenir des HAP dans chaque matrice et sur le type de molécule émises par



les sites incriminés. Le sol avait un profil particulier où les molécules à 3 et 4 cycles étaient prépondérantes. Cette répartition était commune aux 4 types de sol étudiés ainsi qu'à des sols décrits par d'autres auteurs (Crépineau et al., 2003). Il se dégageait une homogénéité des profils dans le sol entre les sites, ce qui a déjà été relevé par d'autres auteurs (Bakker et al., 2000). La proportion de chaque HAP était équivalente dans tous les sols. La faible proportion d'anthracène (parmi les molécules à 3 et 4 cycles) était commune à tous les profils de sol décrits dans la littérature (Wilcke et al., 1995 ; Bryselbout et al., 2000 ; Crépineau et al., 2003, 2004 ; Mielke et al., 2004). Elle peut en partie être expliquée par la composition des émissions qui, quelque que soit leur nature (pots d'échappement, diesel, usine à charbon), sont pauvres en anthracène (Khalili et al., 1995 ; Tavares et al., 2004). De plus, l'anthracène a une volatilité proche des molécules à 2 cycles (naphtalène particulièrement) : cette caractéristique pourrait, en partie, expliquer sa faible proportion dans les sols.

Ce « lissage » des profils est le fruit des dégradations des divers microorganismes présents dans le sol (bactéries, champignons). Ces derniers sont en effet capables de dégrader ou de lier irréversiblement des HAP accumulés sur le long terme au sol. Mais le sol est aussi un puits à molécules : celles-ci y persistent pendant de nombreuses années ce qui favorise à terme les biotransformations et les dégradations. Dans l'herbe, en revanche, les HAP ne peuvent pas être façonnés comme ils le sont dans le sol. Présents de quelques jours à la durée d'un cycle végétatif et soumises aux conditions climatiques, les molécules exposées sont susceptibles de se volatiliser et de se désorber de ce support. Le profil des HAP dans l'herbe, plus éphémère, est le reflet de la contamination ambiante. Il est possible de déterminer quelles molécules sont majoritairement émises par un site potentiellement émetteur, information que le sol ne donne pas, les profils entre sites étant homogènes.

Curieusement, des relevés d'air fait à proximité de sites d'émission soulignent la prédominance des composés à 2 et 3 cycles émis (Khalili et al., 1994). Naphtalène, acenaphthylène, acenaphène, fluorène et phénanthrène représentent à eux seuls 60 à 98 % des composés émis selon les sources : pots d'échappement, combustion de bois, tunnel. Excepté le phénanthrène, ces HAP sont les moins représentés dans les profils de l'herbe et du sol. Toutefois, comme développé dans la partie bibliographique, ces composés ont une forte susceptibilité à la biodégradation ce qui les rend moins présents dans le sol. Dans l'herbe, c'est leur faible poids moléculaire favorisant leur volatilité qui pourrait être à l'origine de leur faible représentativité.

## Conclusion du chapitre 1

Suite à ces caractérisations en teneur et profils des HAP, il a été possible de distinguer les molécules majoritaires dans le sol et l'herbe : les HAP à 3, 4 et 5 cycles. Les niveaux de contaminations mesurés ont mis en évidence une forte disparité en fonction des échantillons et des localisations, particulièrement dans le sol. Les sources d'émission de HAP, qu'elles soient fixes ou mobiles, sont fréquemment jouxtées de pâtures où évoluent de nombreux animaux domestiques. Les prélèvements effectués rendent compte au travers de ces quelques échantillons de l'ampleur des contaminations de l'herbe et du sol en HAP des pâtures voisines de sources d'émission.

Ainsi, au vu des concentrations dans le sol ingéré en quantité conséquente, la question du devenir des polluants lors de l'occupation des terrains par des animaux se profile, particulièrement dans le cas de ruminants laitiers. L'exposition de l'animal via l'ingestion peut être conséquente et les effets de cette exposition sur les produits de consommation sont inconnus. Dans un cadre agronomique, il semble donc pertinent de s'intéresser aux effets d'une ingestion de sol contaminé par des animaux au pâturage sur la qualité des produits agricoles, le lait en particulier.

Suite à cette étude, il ressort que les sols contaminés par des HAP sont relativement homogènes dans les profils. Les animaux évoluant sur ces pâtures sont enclin à être toujours exposés aux mêmes molécules, quelque soit le sol et le site sur lesquels ils sont. Les molécules majoritaires dans le sol et donc largement ingérés par les animaux sont à 3, 4 et 5 cycles, notamment phénanthrène, fluoranthène, pyrène, benzo[a]anthracène, chrysène, benzo[b]fluoranthène et benzo[a]pyrène.

Les répercussions d'exposition à répétition de ces molécules sur les produits de consommation sont inconnues. Le caractère chronique et conséquent (concentration de polluants élevée) de ces expositions renforce les inquiétudes par rapport au devenir de ces molécules une fois ingérées.

Fort de ces résultats, le sol retient particulièrement notre attention puisqu'il est, via son transit par les ruminants, le vecteur principal de polluants vers la chaîne alimentaire. Cependant, si l'implication du sol dans l'exposition des animaux aux HAP est indéniable, son rôle ainsi que les effets de son ingestion sur les contaminations en polluants les produits animaux sont inconnus.

Pour tenter d'apporter des éléments de réponse sur le devenir des HAP après ingestion, leur transfert vers le lait a été étudié suite à une exposition chronique. La caractérisation de ce transfert vers le lait de vache a été suivit sous la forme native et biotransformée.

**Chapitre 2 : Etude du transfert de HAP et de leur métabolite  
majoritaire vers le lait de vache suite à une exposition chronique  
à du sol contaminé**

## Introduction

Les résultats présentés dans le chapitre précédent illustrent le risque potentiel que peuvent représenter des pâtures contaminées sur le transfert de polluants dans la chaîne alimentaire. La présence d'animaux laitiers exposés aux HAP via les matrices environnementales contaminées est en effet un point d'entrée de polluants dans la chaîne alimentaire (Crépineau et al., 2003). Peu d'information sont disponibles sur les conséquences de la présence de ruminants laitiers sur des sols contaminés en HAP. Des essais ayant pour but de caractériser les coefficients de transfert et la distribution des molécules dans l'organisme ont certes été réalisés (McLachlan, 1994). Cependant, aucune étude *in situ* n'a décrit les effets d'une exposition de ruminants à des HAP par des voies naturelles et en apport chronique.

Une conduite d'élevage reposant sur l'utilisation des prairies mène à une double exposition. Les sources principales de contamination des animaux par la voie alimentaire sont d'une part les végétaux, dont les parties aériennes peuvent être contaminées (tiges et feuilles), et d'autre part le sol (Fries, 1995). Ce dernier est cependant un compartiment où les concentrations en HAP sont particulièrement élevées du fait des propriétés du sol. Si la quantité de matière sèche végétale ingérée est de 25 à 50 fois supérieure à celle du sol, la concentration en HAP dans le sol, elle, est de 10 à 1000 fois plus élevée que dans l'herbe. Il apparaît ainsi que, même si l'ingestion de sol est moindre, elle ne reste pas moins une source considérable d'exposition à ces molécules. Une vache laitière dans une pâture proche d'une autoroute peut en effet ingérer près de 2 mg par jour de HAP (somme des 16) via les fourrages (Müller et al., 2001 ; Crépineau et al., 2004) . Le sol étant plus contaminé, son ingestion peut mener à un apport de plus de 50 mg par jour quand sa concentration avoisine 100 µg/g MS (Youngblood et Blumer, 1975; Bryselbout et al., 2000).

Les recherches entreprises dans le cadre de notre travail s'orientent donc vers un mode d'administration des HAP proche des conditions réelles. C'est en effet l'alimentation qui constitue le vecteur des polluants étudiés et, parallèlement, c'est le caractère chronique de l'administration qui rend cette expérimentation originale. L'apport réalisé via une fistule ruminale permet de s'affranchir de pertes éventuelles et garantit un caractère chronique et contrôlé de l'apport. Cette voie d'introduction du sol assure donc l'apport de la totalité du sol envisagé : l'absence de pertes liées au refus d'ingestion assure une exposition totale et contrôlée de l'animal aux HAP préalablement ajoutés au sol.

L'objectif principal de cette étude est la caractérisation du transfert des HAP **du sol** vers le lait chez la vache laitière. Ainsi, dans le but d'évaluer l'effet de la présence d'animaux sur des sols contaminés, deux expérimentations ont été mises en œuvre. Celles-ci reposent sur

l'administration quotidienne à des vaches laitières, pendant 28 jours, d'un sol contaminé par 4 HAP.

Les molécules retenues (Fluo, Phé, Pyr et B[a]P) sont majoritaires et omniprésentes dans les sols ; on les retrouve en effet quel que soit le sol prélevé, indifféremment du lieu, de l'exposition ou de la saison. Ces HAP sont par ailleurs les seuls qui aient été détectés dans le lait, à l'exception du B[a]P. Ce dernier est cependant employé dans cet essai pour son caractère hydrophobe et son nombre de cycles, et par le fait que le B[a]P soit considéré comme la molécule la plus toxique parmi les HAP.

Cet essai réalisé au Laboratoire des Sciences Animales a pour but d'estimer le transfert des HAP et d'un de leur métabolite vers le lait grâce au suivi de leur concentration pendant la période de l'essai. Il a en effet été montré (Grova et al., 2005) qu'une administration de HAP par voie orale à des chèvres en lactation entraînait l'apparition de métabolites dans le lait. Une désorption éventuelle des HAP du sol pourra donc être démontrée *in vivo* selon la fraction de polluants et de métabolites mesurée dans les fèces et le lait.

Ce deuxième chapitre débute par l'estimation de la quantité de sol ingérée par des vaches laitières au pâturage. Les essais s'appuyant sur un apport de sol simulant les conditions réelles, il paraît nécessaire de distribuer des quantités les plus justes possibles.

## I. Mesure de l'ingestion de sol

### 1. Protocole expérimental

Cette mesure de l'ingestion de sol a été réalisée dans le but d'estimer la quantité de sol absorbée par des animaux au pâturage. Cette évaluation a été entreprise de façon à appréhender cette ingestion de sol dans les conditions d'élevage propres à la région Lorraine. Les conditions décrites dans les différentes études traitant de l'ingestion de sol sont souvent éloignées et les résultats obtenus ne peuvent pas être représentatifs de toutes les conduites d'élevage et des zones géographiques.

La mesure de l'ingestion de sol a été évaluée par la mesure des cendres insolubles dans l'HCl 2N dans le sol, l'herbe et les fèces. Le dosage de ce marqueur spécifique de la fraction indigestible des aliments associé à l'équation de Fries et al. (1996) permet le calcul de la quantité de sol ingérée.

$$I_{\text{sol}} = I_{\text{DM}} \times (1-D) \times F_{\text{sol}} / (1-D \times F_{\text{sol}})$$

Où  $I_{\text{sol}}$  : quantité de sol ingérée par jour (kg MS/jour)  
 $I_{\text{DM}}$  : quantité de fourrage ingérée par jour (kg MS/jour)  
D : fraction de matière sèche digérée  
 $F_{\text{sol}}$  : fraction de sol dans les fèces.

Des prélèvements de sol, d'herbe et de fèces ont été effectués en mai dans une pâture occupée par des vaches laitières.

#### *1.1. Prélèvement de sol*

Les échantillons de sol ont été prélevés dans une pâture de vaches laitières au mois de mai. Dix prélèvements de sol (horizon H0, environ 100g) ont été réalisés dans le parc du domaine expérimental de la Bouzule (Champenuoux). Après séchage (10 jours, 20°C) et broyage à l'aide d'un pilon et d'un mortier, tous les échantillons de sol ont été mélangés et homogénéisés.

#### *1.2. Prélèvement d'herbe*

Les échantillons d'herbe prélevés étaient issus de 10 pots de ray-grass cultivé en phytotron (22°C, hygrométrie 60%) et âgé de 2 mois. Cette herbe exempte de toute trace de sol a été coupée à 10 cm de la base, mise à sécher (10 jours, 20°C) et broyée à l'aide d'un broyeur à fléaux (modèle SK 100 Retsch, Darmstadt, Allemagne).

### 1.3. Prélèvements des fèces

Des échantillons de fèces fraîches ont été prélevés dans la pâture des animaux. Une dizaine de prélèvements d'une centaine de grammes ont été réalisés à travers tout le parc. Ces échantillons ont été congelés à  $-20^{\circ}\text{C}$ , lyophilisés, broyés puis mis en commun et homogénéisés.

### 1.4. Dosages

Le dosage en cendres insolubles dans l'HCl 2N de ces 3 matrices a été accompli selon la méthode décrite par Van Keulen et Young (1977). Trois répétitions par matrice ont été faites.

## 2. Résultats

La fraction de cendres insolubles dans les fèces ( $F_{\text{sol}}$ ) égale à 9% (tableau 24) correspond théoriquement à la somme des insolubles chlorhydriques provenant à la fois du sol et de l'herbe. On transforme ainsi, dans la formule donnée ci-dessus, la fraction de sol dans les fèces par la somme des cendres dans l'herbe et le sol pondérées par les quantités respectivement ingérées.

Seul 0,7% de matière indigestible sont présentes dans l'herbe ; cette quantité est négligeable en comparaison du sol qui en renferme 83%. La digestibilité de l'herbe en mai étant de 77%, on aboutit, à l'issue de ce calcul, à une estimation de 270g de sol ingéré par ces vaches laitières au pâturage. Cette valeur correspond à une mise à l'herbe des animaux en mai, soit à une période où l'herbe est abondante.

**Tableau 24** : Part de cendres insolubles (en %) dans les échantillons prélevés

Echantillon	Cendres HCl (%)
Herbe	$0,7^{\pm 0,05}$
Sol	$82,5^{\pm 0,70}$
Fèces	$9,25^{\pm 0,77}$

### 3. Discussion

La part de sol ingérée sera en effet différente en fonction du climat, de la présence de couvert végétal ou encore des conduites d'élevage. Il est ainsi délicat de situer une ingestion de sol en Lorraine d'après les données existantes. L'estimation de la quantité de sol ingérée dans des conditions climatiques identiques aux nôtres n'a pas été réellement étudiée c'est pourquoi nous avons cherché à l'évaluer. Les 270 g ingérés paraissent faibles en comparaison des données révélées par d'autres études où les ingestions varient entre 100 et 1500 g, avec une moyenne située entre 400 et 800 g par jour (Mayland et al., 1975 ; Healy, 1968 ; Kirby et Stuth, 1980 ; Fries, 1982). Aussi, les modalités de l'estimation de la quantité de sol ingérée méritent d'être précisées. Le mois de mai, mois du prélèvement, correspond au début de la mise à l'herbe des animaux qui coïncide avec une densité de végétaux élevée. A cette saison, peu de racines bordées de sol sont arrachées par les animaux la quantité d'herbe étant suffisante. De plus, les végétaux broutés ne sont pas souillés par les projections de sol, la densité et la hauteur de végétation empêchant le phénomène de « splasch » : la quantité de sol ingérée estimée dans cet essai peut ainsi être considérée comme un minimum. Cette détermination ne peut être appliquée que pour une période de l'année : les ingestions de sol ont tendance à augmenter en fonction de l'avancement dans la saison qui implique une raréfaction de l'herbe.

Comparée aux données bibliographiques, l'estimation d'une ingestion moyenne de 500g de sol par jour serait en définitive un bon compromis. Les valeurs supérieures à 1000 g de sol sont peu probables dans notre situation : les conditions extrêmes décrites dans les expérimentations (aridité, troupeau à l'herbe toute l'année) ne sont pas rencontrées en France. Fries et al. (1982) considèrent la prise de sol variant du simple au double. Cet écart qui trouve sa source dans les erreurs de mesure, les multiples estimations possibles et les pratiques d'élevage nous autorise à penser que la quantité de sol ingérée par les animaux de notre étude atteint 500g en fin de mise à l'herbe.



## **II. Etude du transfert des HAP vers le lait suite à une exposition chronique de sol contaminé**

### 1. Protocole expérimental

#### *1.1. Choix des molécules*

Le choix de molécules s'est fait en fonction des données bibliographiques et des résultats obtenus dans le chapitre 1. Il s'est porté sur 4 molécules sélectionnées pour leurs propriétés physicochimiques d'une part et pour leur forte concentration dans les sols d'autre part. Cet éventail de molécules englobe des HAP de 3 à 5 cycles différant par leur lipophilie et par leur volatilité (tableau 25).

Notre étude englobe le transfert des molécules mères comme l'apparition potentielle de molécules biotransformées. Il est donc nécessaire d'avoir recours à des HAP ayant des métabolites identifiables et disponibles sur le marché afin de permettre leur dépistage dans les différentes matrices. Les composés biotransformés retenus sont les métabolites majoritaires des HAP étudiés utilisés par d'autres auteurs (Van Schooten et al., 1997). Le 2-OH Fluo est rarement étudié du fait de la faible présence du Fluo dans l'environnement et de son caractère dégradé, volatile et non toxique. Le 3-OH Phé est en revanche souvent cité comme métabolite majoritaire du Phé (Grimmer et al., 1991 ; Grova et al., 2005). Enfin, le 1-OH Pyr est très présent dans l'urine. Sa concentration de 200 à 2500 fois supérieure aux autres métabolites facilite sa détection et en fait le métabolite indicateur de l'exposition aux HAP. Enfin, le 3-OH B[a]P, bien que peu concentré, est un métabolite du B[a]P représentatif d'une exposition prononcée à des HAP. Il est le métabolite monohydroxylé majoritaire du B[a]P dans les urines (Van de Wiel, 1993).

Au-delà de leurs caractéristiques, ces molécules sont avant tout des polluants persistants dans le sol relevé (chapitre 1) dont le profil est marqué par la prépondérance de ces 4 HAP.

#### *1.2. Préparation du sol*

Le sol utilisé (2,9 % de matière organique, 34 % d'argile, 52 % de limons, 14 % de sable) a été prélevé au domaine expérimental de la Bouzule. Environ 150 kg ont été prélevés sur une épaisseur de 10 cm. Le sol était issu d'une prairie permanente non labourée avec un couvert végétal dégagé pour le prélèvement. Il a été mis à sécher à température ambiante (20°C) pendant 15 jours. Les mottes ont été émiettées pour permettre un séchage plus rapide et un traitement facilité du sol. Celui-ci a ensuite été broyé (broyeur à mâchoires) et tamisé à 5 mm

afin d'éliminer les éléments caillouteux ou métalliques les plus grossiers. Une fois ces étapes achevées, 500 grammes de sol ont été distribués dans des barquettes en aluminium.

### 1.3. Contamination du sol

La phase de contamination du sol s'est effectuée par étapes successives. Le mode de contamination retenu dérivait de différents tests préalables mettant en évidence le meilleur protocole de contamination. La difficulté de la contamination résidait dans la répartition homogène des molécules dissoutes dans les solvants sur l'ensemble des unités de sol.

A l'issue de la contamination, le sol devait être humidifié pour favoriser la vie et l'activité des divers microorganismes impliqués dans les transformations des HAP. L'apport d'eau distillée correspond à 80 % de la capacité au champ comme préconisé par Liste et Alexander (2002).

Trois modes de contamination ont été expérimentés au préalable:

- contamination en surface du sol sec par une solution d'acétonitrile, homogénéisation et humidification à 80 % de la capacité au champ,
- mélange de la solution de contamination composée d'acétonitrile et des molécules choisies avec la quantité d'eau utile puis ajout du sol dans ce mélange,
- humidification du sol à 40 % de sa capacité au champ, contamination puis ajustement à 80 % de la capacité au champ par complément d'eau.

Les deux premières démarches mettent en exergue une extraction rapide des molécules introduites reflétant une adsorption superficielle. La troisième modalité de contamination entraîne une intégration profonde des contaminants dans les agrégats de sol conformément à la réalité *in vivo* (Le Masson, 2003). Cette méthode de contamination a donc été retenue pour les préparations de sol nécessaires aux expérimentations.

#### Répartition du sol

La quantité de sol apportée quotidiennement a été arrêtée à 500 g. Cette quantité est en effet un bon compromis entre les données disponibles dans la bibliographie et l'estimation obtenue au début du chapitre 2. Le sol préparé a été réparti en portion de 500 g de matière sèche par barquette. Le nombre de barquettes était préalablement défini en fonction du nombre d'animaux et du nombre de jours d'expérimentation.

### Préparation des solutions de contamination

Les solutions ont été faites à base d'acétonitrile, solvant choisi sur deux critères :

- sa volatilité importante (taux d'évaporation : 5,79, référence acétate de butyle : 1) lui confère un temps de séjour court dans le sol,
- sa capacité de solubilisation des HAP due à son caractère hydrophobe (polarité  $E^{\circ}$  Al203 : 0,65).

Après introduction des molécules dans le solvant, la solution a été agitée pendant 30 min jusqu'à dissolution complète des HAP, y compris les plus hydrophobes (B[a]P particulièrement).

### Distribution des molécules sur le sol

La distribution des molécules sur le sol s'est faite après humidification du sol. De l'eau distillée a été apportée à chaque barquette avant contamination de façon à atteindre une capacité au champ de 40 % (soit 84 mL d'eau/barquette) puis le volume de solvant approprié y a été réparti de façon homogène sur toute la surface de la barquette occupée par le sol. Les barquettes ont été laissées à température ambiante afin de permettre l'évaporation du solvant avant de compléter avec de l'eau distillée pour atteindre une capacité au champ de 80 %.

### Maturation

Les barquettes de sol ainsi contaminées ont été stockées à température ambiante (20°C) pour favoriser l'activité des microorganismes. La volatilisation et la photodégradation étaient limitées par une couverture de papier aluminium non hermétique. Une période de maturation de 30 jours a été observée pour favoriser la liaison et la séquestration des HAP dans le sol et reproduire les mécanismes produits dans la réalité (Kottler et Alexander, 2001). De l'eau distillée a été apportée de façon hebdomadaire si une perte d'eau a été notée (pesée des barquettes). L'humidité restait ainsi optimale. A l'issue de la période de maturation de 30 jours, toutes les barquettes de sol ont été placées à -20°C. Ce stockage a permis une conservation des HAP dans le sol sans qu'ils ne soient altérés (Rost et al., 2002).

### Dosage

Des échantillons de sol ont été analysés avant contamination et après maturation. Le dosage du sol non contaminé a permis le contrôle des concentrations initiales. Le sol employé doit en effet être peu ou pas contaminé. Les résultats découlant de cette expérimentation sont directement liés au sol et à son degré de contamination. Une présence préalable de HAP ne doit donc pas interférer avec les modalités obtenues suite à la préparation en conditions

contrôlées de ce sol alors caractérisé. Après maturation, la teneur en HAP mesurée tient compte des pertes effectives (dégradation, volatilisation) et resitue les niveaux de contamination par rapport aux valeurs initiales. Le dosage par GCMS a été effectué au Laboratoire Micropolluants Technologie (Thionville, France). Cette analyse repose sur la norme NF ISO 15302, adaptée à la préparation de matrices diverses. L'analyse a été réalisée par couplage GCMS avec un four de chromatographie HP et un détecteur de masse HP 5793. La détection a été réalisée en mode SIM.

#### *1.4. Animaux*

Les animaux sélectionnés pour cette étude étaient des vaches Prim'Holstein équipées d'une fistule (Bar Diamond, ID, USA) permettant un accès direct au rumen et appartenant au Domaine Expérimental de la Bouzule (Champenoux, France). Trois animaux (multipares et à des stades de lactation différents (tableau 26)) ont été utilisés : ils évoluaient en stabulation libre avec accès à l'eau à volonté.

#### *1.5. Apport du sol aux animaux*

L'introduction du sol dans la fistule a eu lieu après la traite du matin : ce procédé exclut les pertes de sol par refus ou prise incomplète. Le sol a été apporté via la fistule des animaux bloqués juste après la traite. Ce protocole a été répété quotidiennement durant la période d'apport.

#### *1.6. Suivi des paramètres d'ingestion*

##### *a) Mesures*

la quantité d'eau ingérée a été déterminée par les relevés de consommation quotidiens,

la quantité de matière sèche ingérée a été établie par la pesée journalière des refus dans les auges, la ration apportée chaque jour à un animal étant invariable,

la production laitière a été relevée à chaque traite par animal (Isalait system 2045, Bou-Matic, France) durant toute la période des essais.

## *b) Echantillonnage*

Un volume de 500 mL d'eau de boisson des vaches laitières a été prélevé à l'arrivée de la canalisation dans l'abreuvoir au premier jour des deux essais et stocké à -20°C. Trois échantillons de la ration distribuée aux animaux durant toute l'expérimentation ont été prélevés directement dans la réserve, homogénéisés et stockés à -20° dans des barquettes en aluminium.

Un échantillon de lait correspondait à la mise en commun d'aliquotes homogénéisés de même volume des traites du soir et du matin consécutif (v :v ; 50 :50). Le prélèvement du matin a eu lieu avant l'apport de sol. Les échantillons ont été conservés dans des bouteilles en verre à -20°C jusqu'à utilisation.

Les fèces ont été prélevées dans le rectum le soir et le lendemain matin après la traite mais avant l'apport de sol. Après congélation à -20°C, les échantillons ont été lyophilisés, broyés et homogénéisés. Les échantillons du soir et du matin ont été mis en commun à poids égal.

Le sang a été prélevé dans la veine caudale le soir puis le lendemain matin, après la traite. Le sang entier a été conservé à -20°C dans des tubes héparinés jusqu'à utilisation. Les échantillons ont été poolés à volume égal (soir et matin) juste avant les dosages.

Le calendrier des prélèvements des différentes matrices est présenté dans le tableau 27.

### *1.7. Analyse et dosage des échantillons*

#### *a- eau et sol*

Les HAP des matrices eau et sol ont été dosés par GCMS au Laboratoire Micropolluants Technologie (Thionville, France) selon la norme NF ISO 15302.

Les échantillons de sang, lait et fèces ont été extraits puis dosés par GCMS au LABERCA (Laboratoire d'Etude des Résidus et Contaminants dans les Aliments, Nantes) comme décrit ci-dessous.

#### *b- fèces, ration et sang*

Les fèces et la ration ont été traitées après broyage et homogénéisation. A 2 g de fèces ou de ration broyés, ou 10 mL de sang, sont ajoutées 20 µL des étalons internes à 10 ng/mL (d10-Phé, d10-Pyr, d12-perylène). Après une agitation de 30 min, une centrifugation (1000 g 15 mn) permet la récupération des solvants. Evaporés à sec, les molécules sont dissoutes dans 3 mL de cyclohexane puis appliqués sur une colonne Envi-ChromP préalablement conditionnée dans les mêmes conditions que ci-dessus. Après élution des composés interférents avec 3 mL

de cyclohexane, les HAP sont décrochés de la colonne par le passage de 12 mL d'acétate d'éthyle/cyclohexane (50:50, v/v). Les extraits sont alors évaporés sous flux d'azote. Le résidu est transféré dans un vial d'injection, complété par un étalon externe (d12-chrysene) puis évaporé à sec. Le tout est repris dans 20 µL de toluène pour injection.

Compte tenu de l'excrétion moyenne de 5,8 kg de MS sèche fécale d'une vache en lactation (Jurjanz et al., 2002), les quantités de HAP excrétées par jour sont obtenues par une multiplication des concentrations fécales analysées par cette quantité moyenne.

### *c- lait*

A 10 mL de lait sont ajoutés 10 µL des étalons internes à 1 ng/mL (d10-Phé, d10-Pyr, d12-perylène). 150 µL de suc d'*Helix Pomatia* (Biosepra, Villeneuve la Garenne, France; préparation contenant 25 unités de β-glucuronidase-arylsulfatase/µL) et 100 µL d'acide acétique glacial sont additionnés de façon à hydrolyser les métabolites conjugués à l'acide glucuronique et aux sulfates. Des échantillons supplémentés (ajouts) ainsi que des blancs sont préparés de la même façon. En plus des étalons internes cités ci-dessus, les molécules recherchées sont additionnées dans les ajouts : Fluo, Phé, Pyr, B[a]P, 2-OH Fluo, 3-OH Phé, 1-OH pyr et 3-OH B[a]P). Au terme de l'incubation de 16 h à 37 °C permettant l'obtention de métabolites libres (déconjugaison), le lait est agité pendant 30 mn avec 20 mL d'acétate d'éthyle/cyclohexane (50:50, v/v). Après agitation, la solution est centrifugée à 1000 g 15 mn. Le surnageant constitué des solvants contenant les molécules mères et les métabolites est évaporé à sec sous flux d'azote. Récupéré avec 3 mL de cyclohexane, les composés sont purifiés sur une colonne Envi-ChromP (Styrene-divinylbenzene copolymer resin, Envi Chrom P: 0.5 g) conditionné avec successivement 3 mL d'eau, de méthanol et de cyclohexane. Après passage de l'échantillon sur la colonne, l'ajout de 3 mL de cyclohexane permet l'élimination des composés interférents avant l'élution des molécules avec 12 mL d'un mélange d'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) sont ajoutés dans le tube et agités 30 sec. Les deux phases ont ensuite été séparées par centrifugation (1000 g, 5 min). La phase méthanol/eau est lavée avec 2 mL de cyclohexane et centrifugée à nouveau (1000 g, 5 min) ; le surnageant est ajouté à la première phase de cyclohexane.

**Tableau 25** : HAP utilisés pour la contamination du sol

Molécules	Nombre de cycles	Poids moléculaire (g/mol)	Log K <sub>ow</sub>	Métabolites recherchés dans le lait
Fluo	3	166	4,18	2-OH Fluo
Phé	3	178	4,46	3-OH Phé
Pyr	4	202	5,32	1-OH Pyr
B[a]P	5	252	6,04	3-OH B[a]P

**Tableau 26** : Caractéristiques physiologiques des vaches laitières utilisées

Vaches laitières	Production laitière (L)		Matière grasse (g/L)		Poids (kg)
	Avant l'essai	Pendant l'essai	Avant l'essai	Pendant l'essai	
A	6,9	6,6	53,8	52,3	550
B	9,2	9	39,8	41,3	825
C	12,1	11,1	44,3	46,7	610

**Tableau 27** : Calendrier des prélèvements au cours de l'essai

Matrices	J0	J3	J7	J14	J16	J19	J21	J28
Lait	Oui	Oui	Oui	Oui	Non	Non	Oui	Oui
Sang	Oui	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Oui
Fèces	Oui	Non	Oui	Oui	Non	Non	Oui	Oui

La phase cyclohexane contenant les HAP est évaporée puis saponifiée avec 5 mL de KOH 10 % pendant 1h20 à 90°C pour éliminer la matière grasse. A l'issue de la saponification, 3 mL d'eau et 5 mL de cyclohexane sont ajoutés au mélange puis centrifugés (1000 g, 5 min). Le surnageant est évaporé, l'étalon externe (D-12 chrysène) est ajouté. Le mélange est transféré dans des vials d'injection, évaporé et repris dans 20 µL de toluène. Les fractions méthanol/eau mises en commun sont évaporées puis lavées avec 4 mL d'un mélange acétate d'éthyle/eau (50 :50, v/v), vortexées et centrifugées (1000 g, 5 min). Le surnageant est évaporé, complété d'un étalon externe (1-OH chrysène), transféré dans un vial d'injection et repris dans 20 µL N-methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide (MSTFA, Fluka, Buchs, Switzerland) pour dérivation.

#### *d- conditions chromatographiques*

Les dosages ont été réalisés par chromatographie gazeuse (Hewlett-Packard 6890, Palo Alto, CA, USA) couplée à un détecteur de masse (quadrupole HP-5973). L'injecteur split/splitless est maintenu à 250°C, la durée du mode splitless est de 1,5 min et le volume injecté de 2 µL. La colonne utilisée pour la séparation des HAP comme des métabolites est une OV-1 (Ohio-Valley) type (30 m x 0.25 mm I.D., film thickness: 0.25 µm). Les paramètres du GC appliqués sur la colonne sont 110°C (4 min), 10°C min<sup>-1</sup> jusqu'à 160°C, 5°C min<sup>-1</sup> jusqu'à 300°C, puis 15°C min<sup>-1</sup> jusqu'à 300°C (10 min) pour les HAP et leur métabolites. Les extraits contenant respectivement les HAP et les métabolites issus du lait ont été injectés séparément, le solvant d'injection étant différent. Toutes les analyses ont été réalisées en mode Impact Electronique (70 eV) et mode d'acquisition SIM (Single Ion Monitoring). Les limites de détection des différentes matrices reposent sur un rapport signal/bruit de 3/1.

#### *e- calcul des coefficients de transfert des HAP du sol en métabolites vers le lait*

Les coefficients de transfert des HAP du sol en métabolites dans le lait ont été calculés sur les apports et les excréctions durant 24h. Ils sont considérés comme le rapport de la quantité d'un métabolite excrété dans le lait sur la quantité de molécule mère associée apportée via le sol. Ce coefficient a été calculé en fin d'expérimentation, à partir de la 3<sup>e</sup> semaine, de façon à être à l'état d'équilibre.



## *1.8. Traitement statistique*

Les concentrations en HAP et métabolites dans le lait, les fèces et le sang ont été analysées statistiquement par la procédure MIXED en mesures répétées du logiciel SAS (version 9.1, SAS Institute, Cary, NC). Le modèle prend en compte le jour de prélèvement comme facteur fixe et les vaches laitières comme facteur randomisé. La covariance entre les différents temps de prélèvements est définie comme autorégressive après vérification des critères de Akaike et Scharz-Baysan (Littell et al., 1996). Les valeurs données ont été comparées aux moindres carrés par l'utilisation du test t de Tuckey à un seuil de 0,05.

## 2. Résultats

### *2.1 Seuils de détections des HAP et de leur métabolite majoritaire dans les matrices étudiées*

Les seuils de détection ont été calculés sur la base d'un signal sur bruit de 3 (tableau 28).

Le seuil de détection du Pyr, quelque soit la matrice considérée, est toujours le plus bas. Il peut être jusqu'à 9 fois inférieur au B[a]P dans les fèces. Le B[a]P a le seuil de détection le plus haut ; de même, son métabolite, le 3-OH B[a]P est détecté à un seuil particulièrement élevé comparé aux autres métabolites monohydroxylés. Il ressort également que le sang est le milieu dans lequel les HAP sont les plus facilement détectables. Leur seuil de détection dans le sang est en effet le plus faible de toutes les matrices analysées malgré la composition du sang et le caractère hydrophobe des HAP.

### *2.2. Apport en HAP par les différentes matrices alimentaires*

Les concentrations dans le sol avant maturation sont inférieures à 100 ng/g MS par molécule (tableau 19). Après maturation, la concentration effective est inférieure à la concentration théorique apportée initialement comme peut le montrer la perte de 50 % du Phé. En revanche, la quantité de B[a]P dans le sol est fidèle à celle amenée initialement. Les dosages de HAP effectués dans l'eau de boisson garantissent l'implication négligeable de l'eau dans l'apport éventuel de molécules aux animaux. Cet apport représente en effet moins de 1% de la dose apportée via le sol et ne constitue donc pas une source de contamination incontrôlée en HAP durant l'essai.

Dans la ration, les 4 molécules considérées dans l'étude ont été détectées. Bien que leurs concentrations ne soient pas négligeables (tableau 30), ces molécules ne représentent en aucun cas une source de contamination externe pour les animaux. La part de HAP ingérée imputable à la ration représente en effet moins de 0,5% de la dose apportée via le sol. Phé et Pyr

représentent la majorité des molécules administrées. Leurs apports via l'ingestion d'eau et de ration étant négligeables, la source largement majoritaire de HAP durant la période de l'essai est donc bien le sol.

### *2.3. Niveaux de contamination des HAP dans le lait*

La concentration en molécules mères ne varie pas de façon significative dans le lait même si les concentrations augmentent au cours du temps (tableau 31). La concentration initiale n'est en effet jamais significativement différente de celle d'un point de l'essai. Les écart-types dus à de fortes variabilités interindividuelles empêchent la signification de la variation des concentrations en HAP dans le lait au cours de l'essai. Il est important de souligner que Phé et Pyr étaient initialement présents dans le lait témoin avant expérimentation et restent les composés majoritaires quelque soit le jour d'expérimentation considéré. De même, les quantités de HAP excrétés, malgré leurs variations au cours du temps, ne sont pas significatives ce qui confirme que l'effet de l'apport du sol sur la quantité de HAP excrétée dans le lait est nul.

### *2.4. Niveaux de contamination en métabolites dans le lait*

Aucun métabolite n'a été détecté dans les laits témoins prélevés avant le début de l'exposition au sol. Le 3-OH B[a]P est le seul métabolite qui n'ait jamais été détecté dans le lait, quelque soit l'essai et le point de prélèvement. Les concentrations en métabolites varient de façon significative (tableau 32 et 33) en fonction du temps. Les courbes présentent en effet une augmentation régulière pendant les 15 premiers jours suivie d'une diminution persistant jusqu'à la fin de l'essai. Après un pic à 7 jours, les concentrations ont tendance à diminuer malgré la continuation de l'exposition durant encore 15 jours : cette baisse des concentrations est significative. L'apparition des métabolites ne se fait qu'à partir du 3<sup>e</sup> jour d'apport. Les variations de concentrations interindividuelles dans le lait sont considérables ; elles sont traduites ici par les valeurs conséquentes de l'écart type résiduel. L'apport de sol contaminé à ces animaux a un effet significatif sur la concentration de ces 3 métabolites dans le lait ( $P < 0,05$ ) mais n'a toutefois aucun effet sur la présence des métabolites du B[a]P.

**Tableau 28** : Seuils de détection en GCMS des différents HAP et métabolites dans les matrices étudiées

Molécules	Ration (ng/g MS)	Lait (ng/mL)	Fèces (ng/g MS)	Sang (ng/mL)
Fluo	5	0,4		0,12
2-OH fluo		0,05		
Phé	2,8	0,75	0,5	0,03
3-OH phé		0,03		
Pyr	1,4	1,5	0,5	0,03
1-OH pyr		0,08		
B[a]P	6	3	4,5	0,43
3-OH B[a]P		0,38		

**Tableau 29** : Concentration en HAP dans le sol avant contamination, après maturation et concentration théorique apportée au sol lors de la contamination (en ng/g de sol sec)

Molécules	[HAP] avant contamination (ng/g MS)	Contamination théorique (ng/g MS)	[HAP] après maturation (ng/g MS)
Fluo	104	170000	103610
Phé	82	145000	81540
Pyr	78	122000	78000
B[a]P	33	50000	33360

**Tableau 30** : Apport de HAP par les différentes matrices au cours de l'essai

	Concentration en HAP par matrice	Quantité ingérée	Quantité de HAP ingérée par matrice (µg)
Eau	0,04 µg/L (Σ de 4 HAP)	75 L	3
Ration	0,01 µg/g MS (Σ de 4 HAP)	18 kg	180
Sol	487 µg/g MS (Σ de 4 HAP)	0,5 kg	243500

### *2.5. Coefficient de transfert des HAP du sol vers le lait*

Le coefficient de transfert de HAP du sol en métabolites vers le lait est le reflet de la mobilisation des HAP du sol, de leur absorption et de leur métabolisation. Il varie dans le temps mais reste faible quelle que soit la molécule considérée (inférieur à 1,5 %). Le métabolite le plus abondant est le 1-OH Pyr. Il a également les plus forts coefficients de transfert qui augmentent parallèlement aux concentrations jusqu'à J14 pour diminuer ensuite (tableau 34). Aucune relation n'est à relever entre les caractéristiques physicochimiques des molécules et le coefficient de transfert vers le lait. Il ne semble pas y avoir de corrélation évidente entre le coefficient de transfert d'un métabolite recherché dans notre étude vers le lait et la lipophilie de sa molécule mère associée ingérée.

### *2.6. Niveau de contamination en HAP dans les fèces*

Les concentrations mesurées dans les fèces au cours de l'essai sont très variables (variabilité inter et intra individuelle) au cours de la période considérée mais restent toutefois proches des concentrations initiales (tableau 35). Une légère tendance à l'augmentation est mentionnée pour les 4 molécules recherchées. Pyr et B[a]P ne sont pas détectés dans les fèces avant apport de sol. Dans un objectif de stabilisation des variances, les concentrations sont transformées en Log 10 comme préconisé par Frontier et al. (2001). Il apparaît dans ce cas des différences significatives dans les valeurs en fonction du temps : les concentrations par molécule sont significativement différentes de la valeur à J0 au cours de l'essai. L'apport de sol contaminé augmente donc significativement la concentration en HAP dans les bouses ( $P < 0,05$ ). Celles-ci ne varient cependant pas significativement entre J14 et J28 en raison des fortes variations interindividuelles. Seule la concentration de Fluo est stable au cours de l'essai et ne semble pas être influencée par l'apport de sol contaminé. Les coefficients de transfert des HAP du sol vers les fèces sont respectivement de 0,74%, 2,3%, 3,1% et 3,4% respectivement de Fluo, Phe, Pyr et B[a]P à 28 jours.

**Tableau 31** : Concentration en HAP dans le lait (ng/mL) suite à un apport chronique de sol contaminé

HAP (ng/g mL)	J0	J3	J7	J14	J21	J28	ETR*	Effet
Fluo	ND**	ND	ND	ND	ND	ND		
Phe	4,3ab	2,8b	3,0b	2,8b	4,0a	5,1a	0,5	P<0,05
Pyr	2,1	1,5	1,4	2,0	2,7ab	3,1a	0,4	NS***
B[a]P	ND	ND	ND	ND	ND	ND		NS

\* Ecart Type Résiduel

\*\* Non Détecté

\*\*\* Non Significatif

**Tableau 32** : Concentration en métabolites dans le lait (ng/mL) suite à un apport chronique de sol contaminé

Métabolites	Concentration (ng/mL)							
	J0	J3	J7	J14	J21	J28	ETR*	Effet
2-OH Fluo	ND <sup>b</sup> **	1,7 <sup>ab</sup> **	2,8 <sup>a</sup>	2,7 <sup>a</sup>	2,3 <sup>a</sup>	1,0 <sup>ab</sup>	0,79	P<0,05
3-OH Phe	ND <sup>b</sup>	0,6 <sup>a</sup>	0,7 <sup>a</sup>	0,7 <sup>a</sup>	0,4 <sup>a</sup>	0,2 <sup>ab</sup>	0,17	P<0,05
1-OH Pyr	ND <sup>b</sup>	18,4 <sup>a</sup>	38,5 <sup>a</sup>	30,5 <sup>a</sup>	7,2 <sup>b</sup>	1,3 <sup>b</sup>	7,3	P<0,05
3-OH B[a]P	ND	ND	ND	ND	ND	ND		NS

\* Ecart Type Résiduel

\*\* Non Détecté

\*\*\* a,b : les données d'une même colonne avec des lettres différentes sont significativement différentes (p<0,05)

**Tableau 33** : Quantité de métabolites excrétés dans le lait en 24h

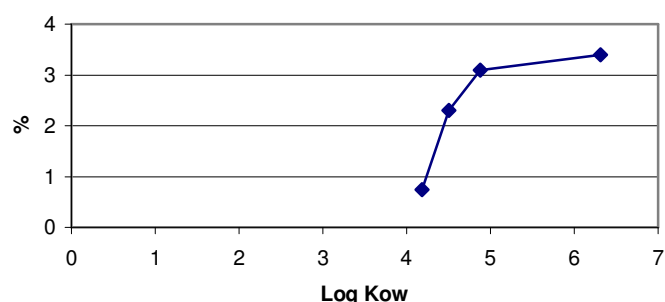
Métabolites	Quantités excrétées (µg/jour)							ETR*	Effet
	J0	J2	J7	J14	J21	J28			
2-OH Fluo	ND**	32.5	46.7	43.0	40.3	17.8	15.8	NS	
3-OH Phe	ND**	10.9 <sup>a</sup>	11.4 <sup>a</sup>	10.4 <sup>a</sup>	6.6 <sup>ab</sup>	2.2 <sup>b</sup>	2.3	P<0.01	
1-OH Pyr	ND**	344 <sup>ab</sup>	633 <sup>a</sup>	478 <sup>a</sup>	126 <sup>bc</sup>	24 <sup>c</sup>	10.4	P<0.01	
3-OH B[a]P	ND**	ND	ND	ND	ND	ND			

\* Ecart Type Résiduel

\*\* Non Détecté

\*\*\* Non Significatif

Le coefficient de transfert des HAP du sol vers les fèces peut être facilement lié au log  $K_{ow}$  des molécules (figure 12). Il apparaît ainsi que plus les molécules sont hydrophobes, plus elles ont tendance à être excrétées dans les fèces.



**Figure 12** : Représentation du coefficient de transfert des HAP du sol vers les fèces en fonction de leur Log  $K_{ow}$  à J28

### 2.7. Concentration en HAP dans le sang

Les concentrations en HAP dans le sang sont significativement différentes entre J0 et J28 pour le Phé et le Pyr. La présence du Phé et du Pyr à J28 confirme l'absorption de ces composés. Fluo et B[a]P ne sont détectés ni à J0 ni à J28 (tableau 36). L'absence de B[a]P dans le sang a été confirmée par le passage des extraits en GCMS-HR dont les seuils de détection sont 10 fois inférieurs à ceux obtenus en GCMS (figure 13).

Des traces de Fluo sont détectées, elles restent cependant sous le seuil de détection du GCMS-HR ce qui confirme la présence du Fluo dans le sang à l'état de trace.

**Tableau 34** : Coefficient de transfert des HAP du sol vers son métabolite principal dans le lait (%)

Molécules	Jour de prélèvement	Coefficient
2-OH Fluo	J3	0,06
	J7	0,09
	J14	0,08
	J28	0,03
3-OH Phé	J3	0,03
	J7	0,03
	J14	0,03
	J28	0,01
1-OH Pyr	J3	0,88
	J7	1,62
	J14	1,23
	J28	0,06

**Tableau 35** : Concentrations fécale en HAP (Log 10) pendant un apport chronique en sol contaminé

HAP (ng/g MS)	J0	J14	J21	J28	ETR*	Effet
Fluo	1.48	1.60	1.67	1.86	0.21	NS**
Phe	1.57 <sup>b</sup>	2.17 <sup>a</sup>	2.06 <sup>a</sup>	2.30 <sup>a</sup>	0.15	P<0.05
Pyr	0.84 <sup>b</sup>	2.24 <sup>a</sup>	2.09 <sup>a</sup>	2.32 <sup>a</sup>	0.14	P<0.05
B[a]P	ND <sup>b***</sup>	1.94 <sup>a</sup>	1.93 <sup>a</sup>	1.99 <sup>a</sup>	0.15	P<0.05

\* Ecart Type Résiduel

\*\* Non Significatif

\*\*\* a,b : les données d'une même colonne avec des lettres différentes sont significativement différentes (p<0,05)

\*\*\*\* Non détecté

**Tableau 36**: Concentration en HAP (ng/mL) dans le sang témoin et contaminé suite à un apport de sol

	J0	J28	ETR*	Effet
Fluo	ND**	ND		NS
Phe	0,11 <sup>b***</sup>	0,15 <sup>a</sup>	0,02	P<0,05
Pyr	<SD <sup>b****</sup>	0,3 <sup>a</sup>	0,003	P<0,05
B[a]P	ND	ND		NS

\* Ecart Type Résiduel

\*\* non détecté

\*\*\* a,b : les données d'une même colonne avec des lettres différentes sont significativement différentes (p<0,05)

\*\*\*\* < seuil de détection

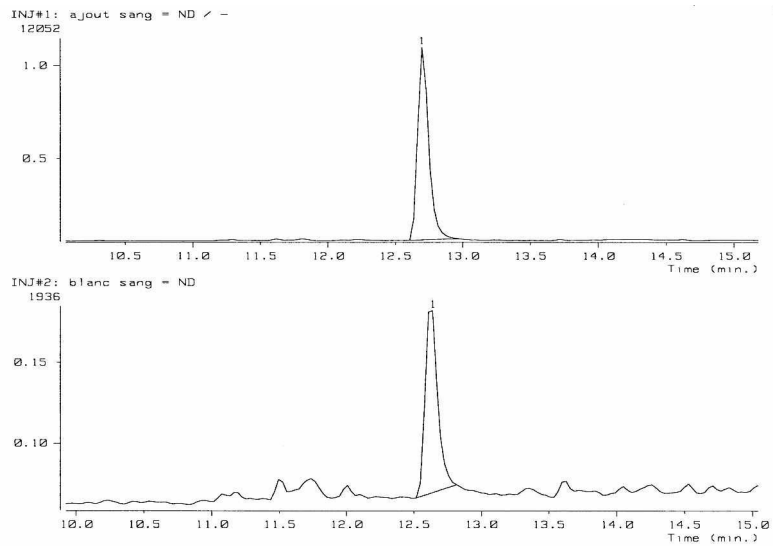


Figure 13a: Spectre du Fluo en GCMS-HR (échantillon supplémenté et témoin J0)

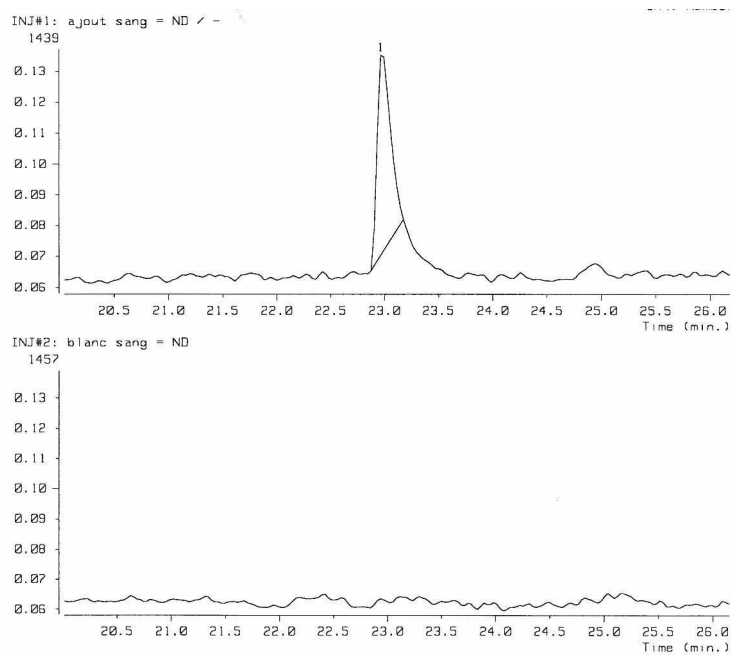


Figure 13b: Spectre du B[a]P en GCMS-HR (échantillon supplémenté et témoin J0)

**Figure 13** : Spectre de 2 HAP en GCMS-HR dans le sang (échantillon supplémenté et échantillon à J0)



### 3. Discussion

#### *3.1. Effet de l'exposition de vaches laitières à du sol contaminé sur la concentration en HAP et métabolites dans le lait*

Cette expérimentation a permis de mettre en évidence un des résultats clef de ce travail : l'apport chronique de sol contaminé en HAP ne modifie pas les teneurs en HAP du lait. Un essai antérieur (Lutz et al., 2003) effectué selon le même principe avait déjà montré un tel résultat. Celui-ci est confirmé ici.

Phé et Pyr étaient présents dans les laits témoins. Ces molécules, par ailleurs communément citées dans la bibliographie comme contaminants résiduels dans le lait de ruminants (Husain et al., 1997 ; Grova et al., 2000 et 2002 ; Kishikawa et al., 2003), traduisent une contamination environnementale en HAP (bruit de fond). Dispersées dans l'alimentation et l'environnement (air, herbe et sol), ces molécules sont transférées vers le lait après ingestion (Ramesh et al., 2004).

Des différences significatives dans les concentrations sont à noter au cours du temps entre les 3<sup>ème</sup> et 28<sup>ème</sup> jour ; en revanche, ces concentrations ne sont pas significativement différentes de celles de J0. Rapportées en quantité de HAP excrétée par traite, les différences ne sont plus significatives ce qui laisse supposer un rôle déterminant de la production laitière sur les concentrations. En effet, pour une charge de HAP à excréter quotidiennement, les productions laitières fluctuent ce qui tendrait à concentrer ou à diluer ces molécules.

Il n'y aurait donc aucun transfert des HAP du sol vers le lait durant une exposition chronique. L'apparition des métabolites et le faible recouvrement des HAP dans les fèces attestent toutefois bien du fait que ces molécules ont été extraites du sol. Aucun métabolite n'est détecté à J0 dans le lait et leur présence ne survient qu'après apport de sol. Plusieurs hypothèses peuvent être à l'origine de cette excrétion de métabolite.

La première hypothèse consiste en l'absorption, par l'organisme, de métabolites générés durant la maturation du sol. En effet, les pertes en molécules mères étant conséquentes (près de 50 % du Phé perdu lors de la maturation), une biotransformation des polluants au cours de la maturation pourrait être le fruit de l'activité des microorganismes du sol comme cela est évoqué dans la bibliographie. Ce processus semble toutefois limité puisqu'au terme d'un mois de maturation d'un sol contrôle (sans ajout de microorganismes), seuls 2 % de métabolites ont été produits à partir de Phé incorporé (Amellal, 2004). Arrivés dans le tractus gastrointestinal suite à l'ingestion de sol, ces métabolites néoformés seraient susceptibles d'être absorbés au niveau des villosités des cellules intestinales. Une telle absorption de métabolites de HAP a été montrée chez le rat : l'administration orale de 1-OH Pyr et 3-OH B[a]P et la détection de

ces métabolites dans les urines supposent l'absorption des molécules et donc leur capacité à passer les barrières intestinales (Bouchard et Viau, 1996).

La deuxième hypothèse présume la métabolisation des HAP ingérés via le sol par les bactéries du rumen. Ces microorganismes, capables de dégrader des substrats tels que la cellulose, seraient susceptibles de biotransformer ces molécules avant une absorption potentielle. Des dégradations de HAP par des microorganismes issus du colon humain ont déjà été mises en évidence *in vitro* (Van de Wiele et al., 2005). Ce résultat suggère l'aptitude des bactéries du système gastrointestinal à la métabolisation. Ce phénomène pourrait être transposé aux ruminants.

La dernière hypothèse suppose l'absorption des HAP par l'organisme animal suivi de la métabolisation de ceux-ci dans le foie. La présence de Phé et de Pyr dans le sang confirme en effet l'absorption préalable de ces deux molécules. Hydroxylés et rendus hydrophiles par les mécanismes de détoxification de l'organisme, les métabolites de HAP seraient évacués et éliminés, entre autres, via le lait. Le 1-OH Pyr est le métabolite le plus abondant dans le lait au cours de l'essai, comme il l'était lors de la précédente expérimentation (Lutz et al., 2003). Il est en effet le métabolite monohydroxylé majoritaire du Pyr. Très abondant dans les urines, il est employé comme biomarqueur d'exposition à des HAP (Levin, 1995). Le Phé, en revanche, peut être biotransformé en 5 métabolites monohydroxylés différents. Ils sont tous présents dans le lait après exposition d'un animal à ce composé (Grova et al, 2005). Ces métabolites sont également détectés dans les urines de rats traités avec du Phé (Jacob et Grimmer, 1996). La proportion de 3-OH Phé qui n'est pas le métabolite majoritaire est équivalente aux autres OH-Phé dans le lait des vaches exposées au sol contaminé (figure 14). Le Fluo est également biotransformé en d'autres métabolites monohydroxylés que le 2-OH Fluo dans le lait mais ce dernier reste toutefois majoritaire.

Dans le lait, une diminution des concentrations en 1-OH Pyr et 3-OH Phé semble s'amorcer au 16<sup>e</sup> jour de l'essai malgré l'apport continu de sol. Malgré cette inflexion de courbe, les concentrations suivantes ne sont pas significativement inférieures. Excepté les travaux de Grova (2003), il n'existe aucune donnée sur le comportement des HAP dans l'organisme en apport chronique. Des essais sur 28 jours menés sur des chèvres en lactation indiquent également un pic de concentration marqué en 1-OH Pyr dans le lait à 15 jours à la suite d'un apport chronique en Pyr. L'effet du temps n'atteint cependant pas le seuil de signification en raison de la forte variabilité inter-individuelle.

Confirmé par la répétition de 2 expérimentations, cette évolution des métabolites dans le lait semble donc généralisée. Un changement de type de métabolites pourrait être la cause de la diminution de concentration : des hypothèses d'adaptation ou de saturation des processus

physiologiques impliqués dans la métabolisation ne sont pas à exclure (Withey et al., 1991). Une saturation des cytochromes amènerait les HAP à ne plus être métabolisés mais directement stockés et accumulés dans le tissu adipeux menant à une diminution de leur excrétion dans le lait. Parallèlement, la relation dose/réponse entre l'activité des cytochromes et la teneur en HAP est largement prouvée (Withey et al., 1991 ; Fauchécourt et al., 1999). Ainsi, la quantité de métabolites dans le lait devrait augmenter au cours de l'essai jusqu'à arriver à un plateau, pourtant, une diminution de la concentration est observée. On peut alors supposer une augmentation de la métabolisation menant à l'élimination des produits biotransformés par d'autres voies d'excrétion tels que l'urine ou les fèces. Une modification du métabolisme donnant lieu à d'autres formes que celles recherchées peut également être envisagée. Au cours de notre étude, seuls les métabolites majoritaires monohydroxylés et conjugués (à l'acide glucuronique et aux sulfates) étaient recherchés. Il est donc possible qu'une autre forme de métabolites, non identifiée, soit excrétée au cours de l'essai. Le manque de données en apport chronique chez des animaux reste une limite importante dans l'interprétation de nos résultats, mais il est évident que l'élimination des HAP et de leur métabolite passe par la voie urinaire et la voie fécale (Viau et al., 1995 ; Grova et al., 2002). Au-delà de l'absorption et de la métabolisation, un stockage dans l'organisme (Kotin et al., 1959 ; Withey et al., 1991) ainsi qu'une excrétion de métabolites via l'urine ou les fèces doit être envisagée. Une vérification de la contamination de ces voies d'excrétion suite à une exposition chronique apporterait des éléments de réponse sur les faibles coefficients de transfert dans les matrices étudiées.

En définitive, les seules données obtenues dans le lait ne permettent pas d'expliquer la diminution de concentration des métabolites. Les coefficients de transfert faibles (inférieurs à 1%) sont indentiques aux résultats de Grova et al. (2003) qui, cumulé sur 103 h après apport oral de Phé et de Pyr marqué, ne comptaient que 1,5 % et 1,9 % de radioactivité dans le lait.

Il est difficile de parler de réelle différence, la part d'incertitude due aux analyses et dosage n'étant pas négligeable. Des études antérieures montraient également un transfert faible. Eisele et al., (1976) ne mesure qu'un transfert de  $20 \cdot 10^{-6}$  à  $25 \cdot 10^{-6}$  % en 31 jours dans le lait suite à un apport quotidien de  $^{14}\text{C}$ -naphtalène à des vaches laitières. West et Horton (1976) n'obtiennent que 0,01% de transfert de radioactivité dans le lait cumulé pendant 7 jours après un apport unique de  $^{14}\text{C}$  B[a]P à des brebis.

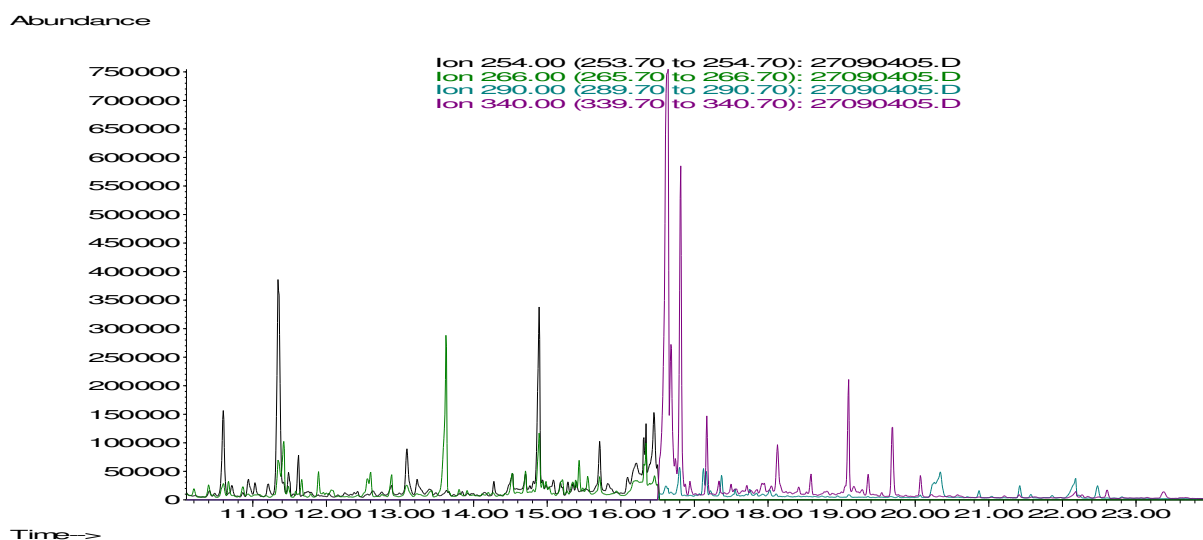


Figure 14 a: Chromatogramme des métabolites recherchés dans le lait témoin (MW: 2-OH Fluo 254, 3-OH Phe 266, 1-OH Pyr 290, 3-OH B[a]P 340)

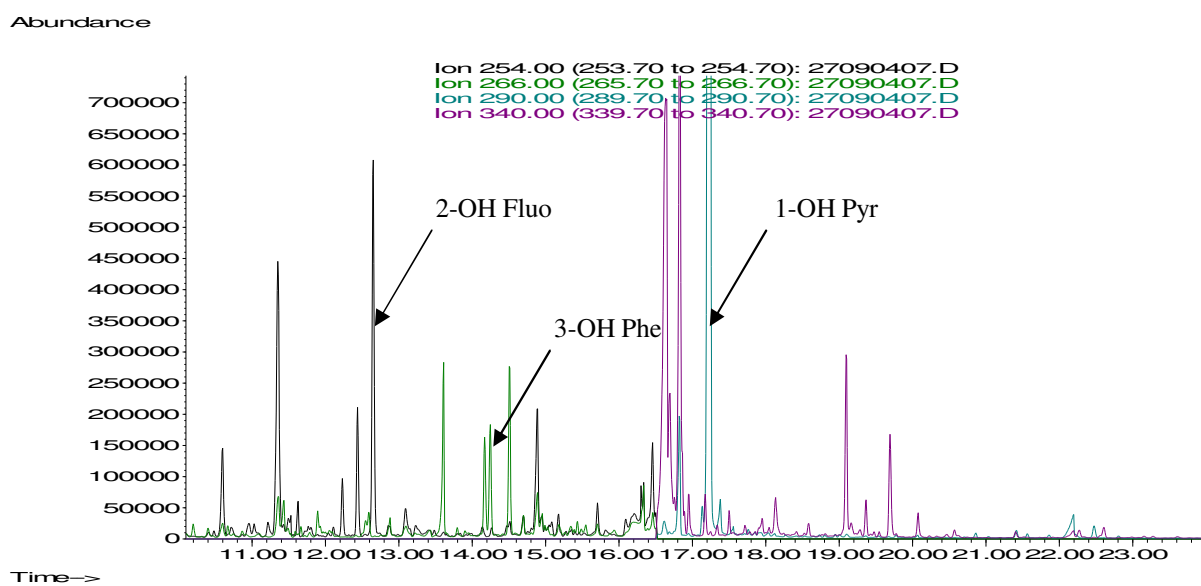


Figure 14b: Chromatogramme des métabolites recherchés dans le lait à J7 (MW: 2-OH Fluo 254, 3-OH Phe 266, 1-OH Pyr 290, 3-OH B[a]P 340)

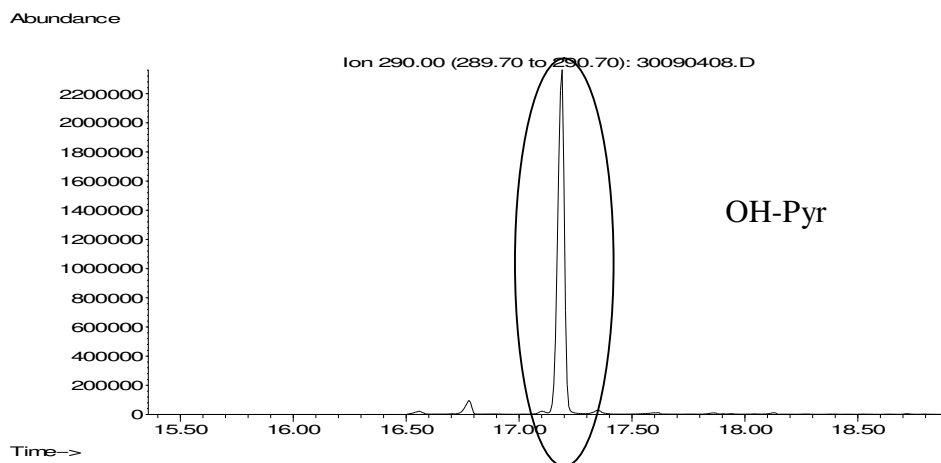
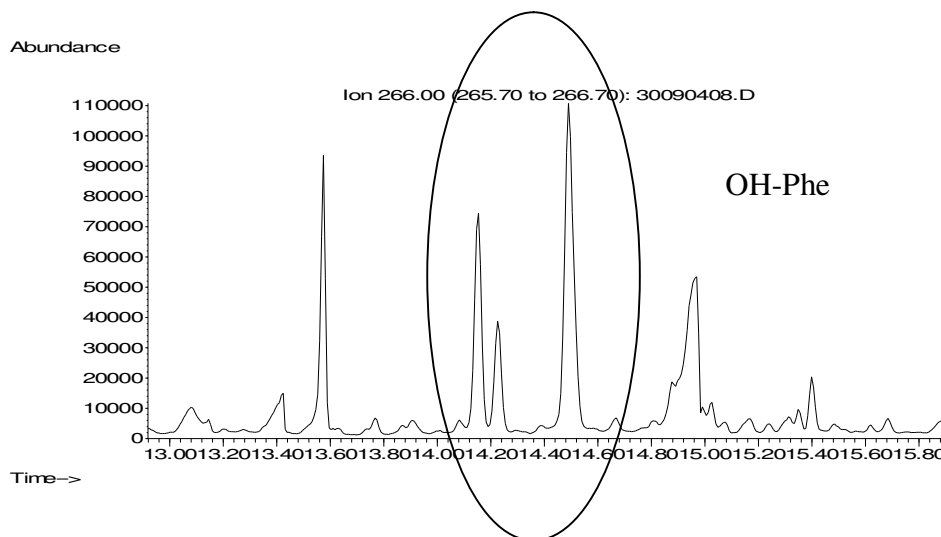
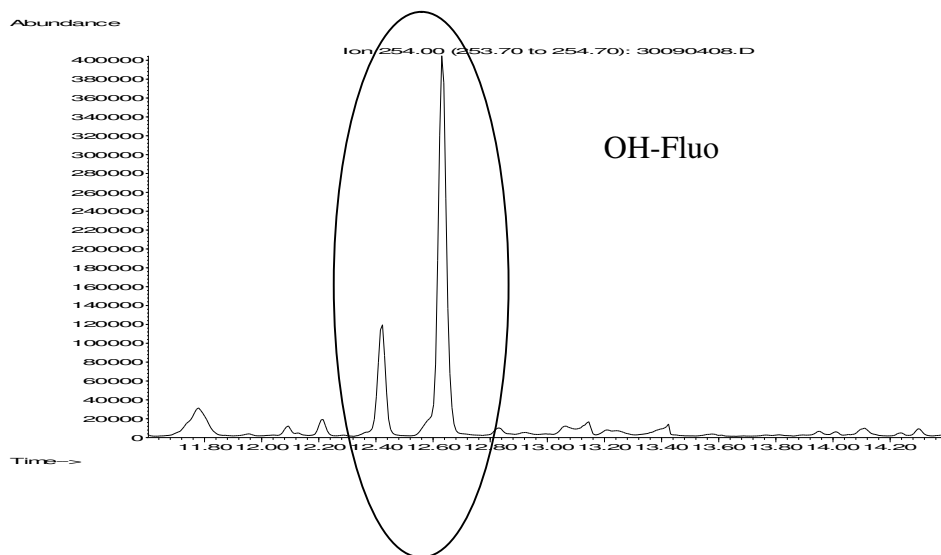


Figure 14c: Chromatogrammes des métabolites d'un extrait de lait à J3 centré sur les monohydroxyFluo, -Phé et -Pyr

**Figure 14 :** Chromatogrammes en GCMS des métabolites d'un extrait de lait à J3

Quoique faibles dans toutes les études considérées, les transferts de radioactivité vers le lait existent et sont à replacer dans un contexte de consommation quotidienne de produits laitiers, toutes formes confondues. Les quantités de polluants ainsi générés sont considérables, particulièrement sous la forme des métabolites qui sont excrétés quotidiennement par l'animal. Il est nécessaire de souligner que les normes préconisées dans une optique de sécurité alimentaire sont systématiquement exprimées et restreintes en concentration de molécules mères. Ces expérimentations illustrent la limite de cette caractérisation et la nécessité de redéfinir des recommandations sanitaires fondées sur la présence des produits de transformation des HAP. En effet, le seul fait d'exposer des animaux à du sol contaminé n'influence en aucun cas la concentration en HAP mais agit directement sur les concentrations en métabolites dans le lait. Ces concentrations sont par ailleurs largement sous-estimées dans le lait puisque seuls les monohydroxylés étaient recherchés dans cette étude. La part totale implique en réalité une batterie d'autres métabolites non identifiés ici et qui augmente considérablement la proportion supposée de métabolites. On peut par exemple citer les autres métabolites monohydroxylés, les dihydroxylés ou encore les métabolites conjugués à d'autres groupements que les glucuronides et les sulfates.

### *3.2. Transfert des HAP du sol ingéré vers les fèces*

Dans les fèces, les concentrations en HAP sont très variables entre les individus. L'homogénéité des échantillons est un facteur clef dans le dosage de cette matrice, l'analyse ne se faisant que sur une prise de 2 g. Les teneurs obtenues dans les échantillons témoins font état d'une contamination environnementale ubiquiste (le B[a]P mis à part) reflétée également par la présence de HAP dans le lait à J0. Il est important de souligner que moins de 4 % des molécules mères sont détectées dans les fèces suite à l'apport de sol. Même si les quantités excrétées ne sont qu'estimées (les variations d'excrétion fécale entre individus peuvent varier de façon considérable), le taux de recouvrement faible implique une désorption des molécules du sol qui ne sont plus mesurées dans les fèces. La voie fécale permet en effet l'élimination du sol de l'organisme. Ce faible pourcentage excrété signifie donc bien une disparition des HAP du sol par désorption suivie d'une absorption/métabolisation dans l'organisme ou d'une métabolisation dans le système gastrointestinal. Le devenir des HAP dans l'organisme reste méconnu et suscite de nombreuses hypothèses. Les teneurs initiales en HAP dans les fèces des animaux d'expérimentation ne sont que rarement rapportées ce qui restreint les comparaisons avec nos résultats. Les études menées relatent directement les coefficients de transfert ou emploient la radioactivité comme outil de mesure ce qui nous confronte à un

manque de données sur les concentrations en HAP dans les fèces d'animaux hors exposition élevée.

- monogastriques : Dans une problématique comparable à la notre, des coefficients de transfert similaires montrent une excrétion des HAP dans les fèces faibles (Van Schooten et al., 1997). Les coefficients de transfert obtenus dans notre étude vont dans le même sens puisque moins de 3,5% de HAP apportés sont excrétés via les fèces. Cette faible part des molécules natives recouverte dans les fèces atteste de leur disparition. Il est incontestable qu'une portion majeure des HAP présents dans le sol a été biotransformée. La seule désorption des HAP du sol sans biotransformation mènerait en effet à une part beaucoup plus importante de molécules natives dans les fèces. Dans l'étude de Van Schooten et al. (1997), le dosage des métabolites majoritaires (1-OH Pyr et 3-OH B[a]P) dans les fèces permet de calculer un transfert de 5 et 9 % respectivement, et met effectivement en évidence une excrétion fécale non négligeable de formes biotransformées.

- polygastriques : cumulée sur 103 h après administration de B[a]P et de Pyr marqués, 88% et 25 % respectivement de la radioactivité totale sont comptés après administration chez des chèvres (Grova et al., 2003). Les coefficients de transfert dans notre étude sont faibles (moins de 4 %) et traduisent un passage quasi nul des molécules mères du sol vers les fèces. Associés à cette expérimentation, nos résultats permettent de préjuger d'une métabolisation accrue (et donc indétectable hormis dans le lait selon nos modalités de dosage) ou d'une distribution des polluants dans les différents compartiments des animaux (tissus adipeux, organes ; Kotin et al., 1959 ; McLachlan, 1994 ; Bouchard et al., 1998).

Il est important d'insister sur la différence majeure entre mono et polygastrique. La présence d'un rumen et d'une batterie de microorganismes associés sont en effet susceptibles de jouer un rôle déterminant dans la dégradation des HAP. La transformation rapide de molécules organiques (pesticides cycliques et non cycliques) par du jus de rumen a été en effet démontrée *in vitro* prouvant la faculté de métabolisation des microorganismes du rumen. Parallèlement à cette biotransformation, la réincorporation des métabolites de ces molécules dans les bactéries du rumen est suggérée. Ce phénomène suppose alors une absorption ultérieure de ces métabolites, via les microorganismes, dans le système gastrointestinal (Belasco et Harvey, 1980). A structure proche, les HAP sont également susceptibles d'être dégradés et incorporés dans les cellules favorisant leur absorption.

## Conclusion du chapitre 2

Tous les auteurs s'accordent sur le fait que l'incorporation des HAP au sol diminue fortement leur disponibilité pour l'organisme (Van Schooten et al., 1997 ; Fauchécourt et al., 1999 ; Billeret et al., 2000 ; Bordelon et al., 2000 ; Reeves et al., 2001). Dans notre étude, les HAP distribués sont liés à la matrice sol ce qui diminue la disponibilité des molécules comme l'indique le faible taux de transfert. Ces études soulignent également la part importante de molécules excrétées via les fèces sous forme biotransformées, la proportion de molécules natives étant faible. L'excrétion fécale semble être une voie essentielle d'élimination des produits de transformation de HAP. La recherche des métabolites dans les fèces n'a toutefois pas été réalisée dans cette étude. Il est cependant évident que la majorité des HAP ont été désorbés du sol et biotransformés puisque ceux-ci ne sont pas retrouvés dans les fèces. Après l'extraction du sol, l'issue des HAP dans l'organisme est ambiguë. Ils peuvent en effet être d'une part extraits du sol avant d'être absorbés, métabolisés et/ou stockés. Il se peut également que, vue l'activité des microorganismes du rumen, les HAP extraits aient été biotransformés par ceux-ci avant d'être excrétés.

Notre étude étant principalement axée sur le lait, il manque la caractérisation des autres voies d'élimination ainsi que des compartiments impliqués dans le stockage et la biotransformation des HAP. L'urine, qui est une des voies principale d'élimination des polluants (Grova et al., 2003), aurait mérité une analyse en HAP et molécules mères pour tenter d'expliquer les faibles recouvrements obtenus. Notons que ces faibles coefficients pourraient être imputés aux méthodes d'extraction et de dosage, particulièrement pour les fèces : les liaisons qui peuvent se former entre le sol et les molécules suite à un passage de plusieurs heures dans le tractus gastro-intestinal limitent l'extraction.

Néanmoins, malgré la diminution des risques d'exposition liés aux caractéristiques du sol et à ses propriétés de rétention des HAP, l'extraction des HAP et leur passage des barrières intestinales sont établies. Dans notre étude, la présence de métabolites dans le lait atteste de la mobilisation et de l'absorption des HAP, c'est-à-dire leur biodisponibilité dans le sol. On a cependant démontré, suite à cet essai, que l'exposition d'animaux à des sols contaminés en HAP n'a pas d'influence sur la concentration en HAP dans le lait. Ce résultat, dans le contexte de sécurité alimentaire actuel, est essentiel puisqu'il autorise la présence de ruminants laitiers sur des pâtures contaminées sans risques avérés pour le consommateur de produits laitiers. Ainsi, bien que peu de HAP soient décelés dans le lait de consommation analysé, il est possible qu'il soit contaminé en d'autres composés, probablement plus toxiques que les molécules mères elles-mêmes. La génotoxicité du 1-OH Pyr a par exemple été établie



pour des populations bactériennes (Hauser et al., 1997). Il est alors possible d'extrapoler et de considérer cette molécule toxique à un degré variable pour d'autres organismes.

**Chapitre 3 : Extractibilité et dégradation du Phé et du B[a]P du  
sol par un milieu synthétique enrichi en bactéries ruminales**

## Introduction

Les résultats du chapitre 2 confortent l'hypothèse selon laquelle les HAP sont extraits du sol au cours de leur passage dans le tube digestif des ruminants : la présence de métabolites dans le lait suppose en effet une absorption préalable de HAP dissous. Cependant, l'absence de molécules mères constatée dans les fèces des animaux exposés à des HAP via du sol présume l'extraction quasi-totale et/ou la métabolisation des polluants dans l'organisme. Ce faible pourcentage de HAP excrété dans les fèces est fréquemment observé chez des ruminants laitiers comme chez des monogastriques exposés à des HAP administrés liés à du sol (Hecht et al., 1979 ; Van Schooten et al., 1997 ; Bouchard et al., 1998). Dans l'hypothèse d'une association irréversible des molécules avec du sol, ce dernier aurait été le vecteur d'élimination des HAP non extraits par les fèces. Le sol est en effet totalement indigestible et éliminé via les fèces : il parcourt plusieurs compartiments digestifs, du rumen à l'intestin, tous différents dans leur rôle et leurs propriétés biochimiques. Le temps de séjour du sol, de quelques minutes à plusieurs heures, est également très variable selon le compartiment traversé.

Etant donné le faible recouvrement de HAP dans les fèces, on peut penser à des phénomènes de mobilisation, d'absorption ou encore de métabolisation qui, en modifiant la forme des molécules, rendraient les HAP indécélables dans cette matrice. C'est pourquoi, dans ce travail, nous avons été amenés à considérer le devenir du sol et des HAP qui lui sont liés dans le tractus digestif du ruminant. Cette question de l'extractibilité des HAP du sol par le tractus digestif est posée à plusieurs reprises dans la bibliographie mais aucune donnée n'existe sur le rôle spécifique du rumen, pré-estomac caractéristique des ruminants. C'est ce milieu complexe dans lequel les aliments et le sol progressent pendant plusieurs heures et qui se distingue par une microflore majeure qui est au centre de nos préoccupations *in vitro*.

Dans ces conditions, et étant donnés les résultats du chapitre 2, la suite de ce travail nous a amené à nous interroger sur plusieurs points :

- *Le taux d'extraction des HAP du sol par le tractus digestif des ruminants* : des études antérieures simulant le tractus gastrointestinal chez l'homme mettent en évidence des taux d'extractions des HAP du sol de 0,8 à 23 %. Malgré ces variations imputables à la qualité du sol, au temps de maturation et à la présence ou non de carbone organique dans le milieu digestif (Hack et Selenka, 1996 ; Knöbel-Knaber et al., 2000; Holman et al., 2002; Van de Wiele et al., 2004), ces taux révèlent une mobilisation non négligeable des molécules devenant alors directement disponibles pour l'organisme. Ces observations attestent bien de la

capacité de certains liquides digestifs à extraire les HAP du sol et il est donc envisageable de transposer ces approches au modèle du ruminant. Ce dernier, effectivement exposé à de grandes quantités de sol potentiellement contaminé, impose au sol lors de son passage dans le tractus digestif des conditions physiologiques et bactériologiques particulières et fondamentalement différentes des modèles humains.

- *L'influence de la présence de bactéries ruminales sur les taux d'extraction* : certaines études précédemment citées ont démontré le rôle avéré de la matière organique du sol sur l'extractibilité des HAP. Parallèlement à la matière organique propre du sol, la part de matière organique dissoute est à prendre en considération. Les microorganismes présents dans le rumen à forte concentration sont donc également à prendre en compte quant à leur effet potentiel sur l'extractibilité et la disponibilité des HAP du sol. Leur interaction avec les HAP est à étudier, particulièrement du fait du caractère particulier du rumen, de ses microorganismes et des conditions difficiles qui y règnent (contact et agitation pendant de nombreuses heures) auxquelles sont soumis les aliments. Vont-ils tenir lieu de support d'adsorption ? Faciliter la solubilisation via leurs propriétés ?

- *La capacité des bactéries du rumen à biotransformer les HAP* : une étude (Van de Wiele et al., 2005) a révélé la capacité des bactéries issues du colon humain à biotransformer des HAP. Etant donnée la concentration des bactéries dans le rumen et leur aptitude à dégrader des substrats cycliques, il est possible de présumer d'une action éventuelle des bactéries sur les HAP au cours de leur séjour dans le rumen.

Pour répondre à ces questions et clarifier le rôle du tractus gastrointestinal sur l'extractibilité des HAP du sol, un modèle inspiré de celui de Russell et al. (1982) a été mis au point. Cette technique *in vitro* repose sur l'utilisation de jus de rumen synthétique reproduit par l'ajout de divers composants et permettant la vie des microorganismes. Le jus de rumen naturel est en effet un milieu complexe dont l'opacité et la viscosité empêchent tout dosage par la méthode retenue qu'est la radioactivité. Le suivi de HAP radioactifs présente l'avantage de permettre la mesure de constituants marqués sans extraction préalable et contribue au dosage de toutes les formes des molécules impliquées (formes natives et biotransformées).

## I. Protocole expérimental

Ces essais ont pour but de mettre au point une méthode d'évaluation de la disponibilité des HAP du sol par le jus de rumen synthétique. Au-delà du rumen, la caillette serait également susceptible d'influer sur l'extractibilité des HAP du sol. L'acidité de ce compartiment (pH 2) pourrait être un paramètre clef dans l'extraction des HAP du sol. Ce dernier est en effet particulièrement sensible aux pH bas qui entraînent la déstructuration du sol.

### 1. Préparation du sol

La radioactivité a été utilisée pour mener ces essais à bien. Peu contraignante et permettant un suivi des molécules sous toutes les formes (molécules mères et métabolites), elle permet la détection des molécules dans de nombreux compartiments tout en s'affranchissant d'extraction lourdes à rendements faibles. De plus, cette dernière permet de combiner la mesure de constituants marqués sans extraction préalable et contribue au dosage de toutes les formes des molécules impliquées (formes natives et biotransformées).

#### 1.1. Sol

Le sol utilisé a été prélevé au domaine expérimental de La Bouzule (Champenois, France) et correspond à celui utilisé *in vivo* (2,9 % de matière organique, 34 % d'argile, 52 % de limons, 14 % de sable). Séché pendant 2 semaines à 20°C, broyé et tamisé à 2 mm, il a ensuite été distribué dans 2 barquettes en aluminium à hauteur de 50 g par barquette.

#### 1.2. Choix des HAP

Deux molécules ont été retenues pour la contamination du sol : Phé et B[a]P. Les données bibliographiques mettent l'accent sur le rôle important des propriétés physicochimiques des HAP dans leur transfert différentiel au niveau de l'intestin et du lait. Ces 2 HAP ont été choisis selon 2 critères :

- leurs propriétés physicochimiques
- leur présence dans le lait.

Le Phé est un composé majeur dans l'environnement. Il est omniprésent dans le lait et se trouve sous forme métabolisée suite à l'exposition de sol contaminé (chapitre 2, Grova et al., 2005). Le B[a]P, plus hydrophobe, n'est en revanche jamais détecté dans le lait, quelle que soit la forme considérée (tableau 37). L'intérêt de simuler son passage dans le rumen est de tenter d'expliquer son faible transfert dans le lait, directement conditionné par son extraction du sol.

**Tableau 37** : Propriétés physicochimiques du Phé et du B[a]P (INERIS 2005)

HAP	Masse Moléculaire (g/mol)	Solubilité dans l'eau à 25°C (ng/mL)	Log Kow
Phé	178,2	1000-1300	4,5
Benzo[a]Pyr	252,3	3,8	5,7

### 1.3. Solutions de contamination

- Le sol a été respectivement contaminé à hauteur de 100000 dpm de <sup>14</sup>C-Phé (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) et 160000 dpm de <sup>14</sup>C-B[a]P (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, Angleterre) par gramme de sol sec. Les molécules natives marquées ont été diluées dans de l'acétonitrile. Ces deux HAP sont bien dissouts dans ce solvant apolaire qui est également très volatile : après son évaporation du sol, seules les molécules y persisteront.

- La contamination du sol a été complétée par l'ajout de Phé et de B[a]P froid de façon à limiter les concentrations fortes en éléments radioactifs tout en conservant les phénomènes et mécanismes survenant durant l'extraction (comme préconisé par Northcott et Jones, 2001). Les solutions apportées sont telles que la concentration en chaque molécule est 9 fois celle de sa molécule marquée associée. Le sol est ainsi contaminé par un HAP marqué dont la concentration correspond à 10% de la charge totale du sol. Cette contamination totale est équivalente à la concentration par HAP dans le sol utilisé pour le chapitre 2. Elle est représentative d'un sol fortement contaminé comme on pourrait en trouver en bordure d'autoroute.

### 1.4. Contamination du sol

Le sol a préalablement été humidifié à 40 % de la capacité de rétention (CR). Chaque solution a été dispersée de façon homogène dans chacune des barquettes. Après évaporation du solvant, le sol a été amené à 80 % de sa CR par complément d'eau distillée (Tang et al., 1998).

Les sols ont été laissés au repos pendant un mois à l'abri de la lumière afin de permettre une interaction des molécules et du sol et favoriser les liaisons. La pesée régulière des deux barquettes et l'apport d'eau distillée ont permis d'endiguer une sécheresse du sol néfaste à l'activité des microorganismes.

Cette maturation a mené à une liaison des agrégats du sol avec les HAP les rendant ainsi moins extractibles (Kottler et Alexander, 2001) et représentatifs des conditions *in situ*. A l'issue de la maturation, les barquettes de sol ont été stockées à -20°C avant utilisation.

## 2. Mesure de la radioactivité du sol après maturation

La mesure de la radioactivité dans le sol après maturation est une étape essentielle dans cette expérimentation : un mois de maturation, associé à des phénomènes de volatilisation et de dégradation, peut en effet modifier la concentration en HAP initiale dans le sol. La radioactivité finale dans le sol a donc été déterminée par combustion dans le but de connaître la concentration après maturation. Pour cela, le sol séché et homogénéisé a été broyé au mortier puis soumis à combustion (300 mg de sol mélangé à 150 mg de cellulose) à l'aide d'un oxidiser 307 (Packard) de façon à mesurer la radioactivité résiduelle. Le  $^{14}\text{CO}_2$  produit par combustion sous courant d'oxygène a été piégé par 10 mL de carbosorb. Après addition de 10 mL de liquide scintillant (Permafluor, Perkin Elmer), la radioactivité a été comptée par scintillation liquide. Un échantillon de sol préparé juste avant la combustion et contaminé avec une concentration connue a également été dosé de façon à étalonner l'appareil.

## 3. Préparation de la solution de jus de rumen synthétique

Le choix s'est porté sur une solution de jus de rumen artificielle pour des raisons analytiques. Il faut en effet préciser que la limite majeure de la radioactivité est le quenching coloré. La couleur ou l'opacité d'échantillons peuvent être à l'origine d'erreur de comptage, particulièrement dans le cas du jus de rumen naturel qui est un milieu complexe dont l'opacité et la viscosité empêchent tout dosage fiable par cette technique. C'est cette contrainte qui a orienté le choix de l'utilisation de jus de rumen synthétique, beaucoup moins teinté et visqueux que le jus naturel. Des tests préliminaires réalisés avec du jus de rumen naturel ont montré une trop forte baisse de rendement de comptage due à la coloration naturelle des échantillons de jus de rumen (Le Masson, 2003). Ces résultats ont abouti à l'abandon de l'utilisation de jus naturel dans les essais d'extraction. L'alternative de jus de rumen synthétique a été retenue : le jus utilisé est certes synthétique mais représentatif, dans sa composition, d'un jus naturel. Il correspond au milieu de Russell et al. (1989) modifié selon Salès-Duval (2000, annexe 1). La présence de minéraux, sucres, acides gras volatiles et vitamines favorise la vie et l'activité des microorganismes additionnés en second lieu. Ce milieu de culture doit être maintenu sous anaérobiose et à 37°C (figure 15).

La technique d'obtention de l'anaérobiose dans ce milieu était réalisée avant utilisation par chauffage sous reflux pendant 20 min. Lorsque sa température a atteint 60°C environ, 0,4 % (p/v) de Na<sub>2</sub>HCO<sub>3</sub> ont été ajoutés afin de tamponner le milieu à pH 6,5. Le maintien de l'anaérobiose s'est fait grâce au flux continu de CO<sub>2</sub> dans le milieu.

#### 4. Extraction

La durée de l'incubation dans le jus de rumen a été fixée à 6h. Le choix de cette durée est essentiellement dépendant de la durée de vie des microorganismes dans les conditions *in vitro*. Au-delà de 6h, le milieu deviendrait en effet saturé en déchets et appauvri en nutriments ce qui conduirait à la disparition des microorganismes. Dans un souci d'homogénéité, tous les temps d'incubation ont été établis à 6h, malgré l'absence de bactéries dans certaines modalités.

Le ratio liquide/solide employé est de 180. Le ratio arrêté simule une ingestion moyenne de 0,5 kg de sol par animal dont le volume moyen de liquide ruminal est de 90 L (Ellenberger et al., 1950). Un gramme de sol a été mis en présence de 180 mL de liquide, volume invariable quelles que soient les modalités testées. Sol, liquides et bactéries sont mis en présence dans des bouteilles à vis fermées hermétiquement.

#### 5. Mesure de la radioactivité dans les surnageants

Au terme des 6 h d'incubation avec du sol contaminé, le contenu de chaque flacon (quelque soit la modalité et le liquide testés) a été centrifugé à 10000 g (30 min, 20°C). Les phases ont été séparées : le surnageant récupéré englobe les HAP et métabolites éventuels extraits du sol en suspension dans la phase aqueuse ou adsorbés à des particules fines qui ne sédimentent pas à 10000 g (argiles).

Un aliquote de 1 mL de chaque surnageant a été distribué dans les flacons de comptage (3 répétitions par échantillon). Dix mL de liquide de scintillation (Ultima Gold, Perkin-Elmer, France) ont été additionnés pour permettre le comptage en scintillation liquide. Toutes les valeurs d'opacité (exprimées par le tSIE) étant favorables, aucune courbe d'étalonnage n'a été nécessaire.



## 6. Incubation des bactéries dans le jus de rumen synthétique

### 6.1. Préparation des bactéries

Les bactéries étaient issues du jus de rumen des vaches laitières. Ce jus composé de liquide, de fibres et de microorganismes divers a été prélevé après la traite au niveau d'une fistule ruminale. Transvasé dans un bidon bouché hermétiquement, le contenu a été rapatrié au laboratoire rapidement puis filtré sur nylon. Un litre du jus récolté a été mis à centrifuger à 150g (10 min, 37°C) sous atmosphère de CO<sub>2</sub>. Le surnageant, débarrassé des grosses particules alimentaires, des protozoaires et des champignons, a été remis à centrifuger à 10000g (30 mn, 37°C) et sous anaérobiose. A l'issue de la centrifugation, les bactéries ont sédimenté dans le culot.

### 6.2. Mélange du jus artificiel et des bactéries

Le jus de rumen artificiel a été distribué dans des flacons en verre à hauteur de 180 mL, sous atmosphère de CO<sub>2</sub>. Les culots bactériens ont été recueillis et dilués dans 50 mL de jus de rumen synthétique. Les flacons ont alors été enrichis en bactéries par addition de 9 mL du mélange jus de rumen synthétique/bactéries. Cette dernière opération visait à atteindre les concentrations bactériennes ruminales *in vivo* dans le flacon d'incubation (soit 10<sup>11</sup> cellules/mL). Toutes ces manipulations ont été effectuées sous flux de CO<sub>2</sub> pour le maintien de l'anaérobiose.

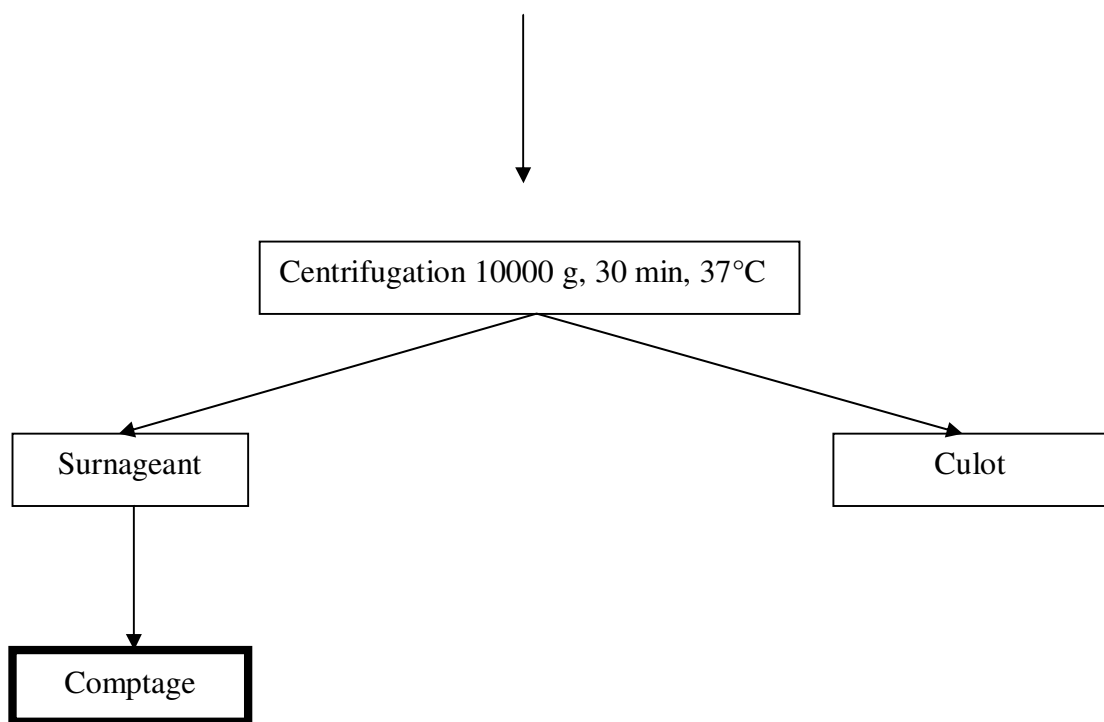
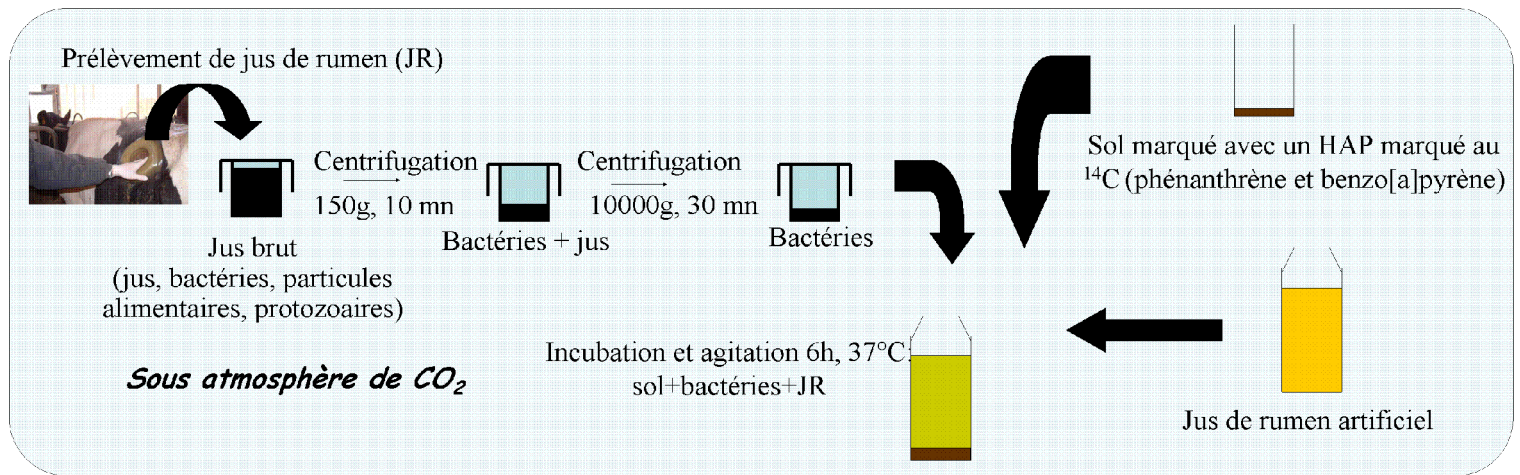
## 7. Calcul du pourcentage d'extraction

Le pourcentage de radioactivité extrait a été calculé et comparé à la radioactivité mesurée dans le sol après maturation (comptage combustion). La radioactivité (dpm/mL) comptée dans les surnageants résultant des extractions est ajustée au volume d'incubation (180 mL) de façon à connaître la quantité totale extraite par le liquide. La quantité extraite par l'ensemble du milieu ruminal est ensuite rapportée à la contamination initiale du sol dans les flacons.

## 8. Calcul de la quantité (en ng) de molécule solubilisée dans le surnageant

Il est possible, à partir de l'activité spécifique des molécules mères marquées et de la concentration (en dpm dans le volume total), de déterminer une quantité de molécule dissoute dans le milieu.

- L'activité spécifique du Phé est de 55,7 mCi/mmol, soit une conversion de 695 dpm/ng,
- L'activité spécifique du B[a]P est 54 mCi/mmol, soit 477 dpm/ng.



**Figure 15** : Schéma du protocole d'extractibilité des HAP du sol par du jus de rumen synthétique enrichi en bactéries

## 9. Modalités testées

Les modalités testées avaient pour but de situer l'extractibilité du jus de rumen avec celle de l'eau, du jus de rumen additionné de composés ou encore de jus de rumen naturel (tableau 38). L'objectif de ces modalités est d'évaluer et de comparer l'influence du type de solvant sur l'extractibilité des HAP du sol. Trois liquides ont été expérimentés: eau, jus de rumen synthétique sans bactéries et jus de rumen synthétique supplémenté en bactéries. Ces 3 modalités ont été testées dans des conditions similaires : à 37°C, sous anaérobiose, sous agitation (180 rpm) et dans le même ratio solide/liquide. L'effet du ratio sol/liquide sur l'extractibilité a par ailleurs été testé avec du sol contaminé en Phé. Une des inconnues persistant dans ce modèle est en effet l'influence de la quantité de sol ingérée sur l'extractibilité des polluants. Pouvant ingérer de 100 à 1500 g de sol par jour, on ignore le comportement des molécules adsorbées et le pouvoir extractant du jus lorsque le ratio solide/liquide augmente chez des vaches laitières. Pour cerner l'effet de ce ratio, des quantités croissantes de sol sont ajoutés à un volume fixe de jus de rumen synthétique sans ajout de bactéries (180 mL) de façon à simuler différentes quantités ingérées.

Les protocoles d'extraction et de comptage étaient communs à toutes les modalités et les essais ont été réalisés avec du sol respectivement contaminé en Phé ou en B[a]P, avec 3 répétitions et la présence d'un blanc de comptage par modalité.

Enfin, la détection de métabolites dans le lait (chapitre 2) sous-entend la biotransformation consécutive à l'extraction des molécules mères du sol. L'hypothèse de dégradation des HAP dans le rumen, a été testée par l'ajout des HAP marqués et dilués dans du méthanol (on s'affranchit de l'effet du sol) dans du jus de rumen synthétique enrichi en bactéries. Le jus de rumen utilisé est semblable aux autres expérimentations, sans modification particulière. Les sources de carbone sont présentes dans le milieu de façon à simuler au mieux les conditions réelles, sans carence en éléments essentiels.

<i>Modalités</i>		<i>Eau</i>	<i>Jus de Rumen (JR)</i>	<i>JR + Bactéries (B)<sup>(1)</sup></i>	<i>JR + herbe</i>	<i>JR clarifié<sup>(2)</sup></i>
<b>Volumes (mL)</b>		180	180	180	180 JR + 5g d'herbe	180
<b>Quantité (g) de sol</b>	<b>Phé</b>	1	0,25 ; 0,5 ; 1 ; 1,5 ; 2	1 et 2		
	<b>B[a]P</b>	1		1 et 2	1	1
<b>Temps d'incubation (h)</b>		6	6	6	6	6
<b>Pyr et B[a]P apportés pur (µL)</b>				Phé <sup>(5)</sup> : 180 B[a]P <sup>(6)</sup> : 180		Phé <sup>(5)</sup> : 30 B[a]P <sup>(6)</sup> : 30
<b>Objectifs</b>		Référence avec un extractant polaire	Evaluation de l'effet de la quantité de sol ingérée sur l'extractibilité	- Estimation de l'extractibilité des HAP du sol dans le rumen - Evaluation de l'effet de la présence de bactéries sur l'extractibilité et la solubilisation des HAP du sol	Effet de la présence d'un aliment sur la solubilisation des HAP du sol dans un milieu aqueux	Etude de la biotransformation éventuelle par les enzymes extracellulaires des bactéries du rumen

<sup>(1)</sup> : ajout de 50 mL de bactéries à 10<sup>11</sup> cellules/mL

<sup>(2)</sup> : surnageant d'un jus de rumen naturel centrifugé à 10000g

<sup>(3)</sup> : solution constituée d'eau à pH ajusté à 2 par ajout d'une solution d'HCl 10%

<sup>(4)</sup> : solution constituée d'eau distillée contenant 0,25 mL de suc pancréatique de porc à 0,4 g/L, 0,25 mL de bile bovine à 4 g/L ajustée à pH 8 par ajout de NaOH 10%

<sup>(5)</sup> : à 1,11.10<sup>7</sup> dpm/mL

<sup>(6)</sup> : 1,11.10<sup>8</sup> dpm/mL

**Tableau 38** : Modalités testées sur l'extractibilité des HAP du sol par différents solvants

## 10. Comptage

### 10.1. *Mesure de la radioactivité dans les milieux liquides*

Trois aliquotes de 1 mL du milieu considéré ont été prélevés et transvasés dans trois vials de comptage (flacons vissés de 20 mL, Perkin Elmer, Courtaboeuf, France). Dix mL de cocktail de scintillation (Ultima Gold, Perkin Elmer, Courtaboeuf, France) ont été ajoutés pour le comptage.

L'appareil utilisé était un compteur Tri-Carb modèle 2100 TR (Packard, Rungis, France). Le temps de comptage était de 10 min. Le passage de blancs froids avant les échantillons a permis de s'affranchir du bruit de fond de l'appareil. Tous les milieux liquides ont été comptés selon cette méthode.

### 10.3. *Extraction des HAP/métabolites et conditions chromatographiques*

Extraction : le surnageant récolté a été extrait avec un mélange acétate d'éthyle/cyclohexane (50:50, v:v) à hauteur d'un volume de surnageant pour deux volumes de solvants. Le mélange de ces 2 solvants à polarité différente assure l'extraction des molécules mères et des métabolites. Après agitation de 30 min (agitateur rotatif), une centrifugation (1000 g, 10 min, 15°C) a permis la séparation des composés du jus synthétique et des solvants. Le surnageant a été récupérée dans des ballons et évaporée à sec. La radioactivité reprise dans 1,5 mL d'acétonitrile a été placée dans des vials en verre à -20°C avant utilisation et passage de l'extrait sur HPLC.

La séparation des molécules mères et des métabolites s'est faite par HPLC. La radioactivité mesurée était composée, au terme de l'incubation, d'une part de molécules mères inchangées et d'autre part de métabolites éventuels formés durant à l'incubation. Les extraits concentrés dans l'acétonitrile ont été analysés par HPLC (Waters) équipée d'un détecteur de radioactivité (Flo-one  $\beta$ , Packard). Les extraits ont été filtrés à 2  $\mu$ m et 100  $\mu$ L ont été injectés dans la colonne. Les conditions chromatographiques étaient les suivantes :

- colonne C18,
- éluant : acétonitrile/eau dans un rapport 60/40 de 0 à 12 min puis 90/10 pendant 18 min puis retour à 60/40 et stabilisation de la colonne pendant 15 min,
- débit de l'éluant : 0,8 mL/min
- la cellule du détecteur Flo-one (500  $\mu$ L) était alimentée en scintillant Ultima Flo (Perkin Elmer) au régime de 1,2 mL/min.

## 11. Traitements statistiques

L'extractibilité de la radioactivité issue du  $^{14}\text{C}$ -Phé et du  $^{14}\text{C}$ -B[a]P ont été comparées par analyse de variance en randomisation totale à 2 facteurs (type de molécule et type de milieu). L'extractibilité du  $^{14}\text{C}$ -B[a]P a été comparée avec tous les types d'extractant par analyse de variance en randomisation totale à 1 facteur (type d'extractant) au seuil de 5%.

## II. Résultats

### 1. Concentration en radioactivité (issue du $^{14}\text{C}$ -Phé et du $^{14}\text{C}$ -B[a]P) dans le sol après maturation

Après maturation, les concentrations mesurées dans les sols sont différentes des doses initiales apportées. Les variations de concentration sont opposées. La radioactivité du  $^{14}\text{C}$ -Phé a en effet une concentration 20% supérieure à celle attendue ; celle du  $^{14}\text{C}$ -B[a]P a en revanche subi une perte de 43% par rapport à la concentration apportée avant la maturation (tableau 39).

### 2. Mobilisation de la radioactivité du sol par les différents liquides testés

La mobilisation des HAP par l'eau, le jus de rumen et le jus de rumen + bactéries est toujours inférieure à 10% (tableau 40). Seul la radioactivité du Phé est extrait à près de 17% par du jus de rumen seul ce qui peut être l'effet d'une prise d'échantillon non homogène et particulièrement contaminé.

Ces taux, si l'on considère que 100 % de la radioactivité comptée est sous forme de molécules natives, sont ainsi équivalents à une solubilisation de 15 ng et 14 ng de  $^{14}\text{C}$ -Phé et de  $^{14}\text{C}$ -B[a]P respectivement pour l'extraction par du jus de rumen additionné de bactéries. Ces valeurs sont très en dessous du seuil de solubilité de ces 2 molécules (tableau 37).

Les effets du type de liquide ( $P < 0,05$ ) ainsi que du type de molécules ( $P < 0,05$ ) sur l'extractibilité sont significatifs. Il existe par ailleurs une interaction molécules/extractants ce qui induit une réaction différente des molécules en fonction des extractants (annexe 2).

L'extractibilité de la radioactivité du  $^{14}\text{C}$ -B[a]P est directement dépendante du type de liquide mis en contact (tableau 41). Le jus de rumen synthétique additionné de bactéries extrait significativement mieux les HAP que les autres milieux. Notons que la présence de l'herbe réduit cette valeur de moitié.

**Tableau 39** : Concentration (en dpm/g de sol sec) en  $^{14}\text{C}$ -Phé et  $^{14}\text{C}$ -B[a]P avant et après maturation

Concentration dans le sol (dpm/g sol sec)	Avant maturation (théorique)	Après maturation (réelle)
$^{14}\text{C}$ -Phé	100000	120600
$^{14}\text{C}$ -B[a]P	166000	94400

**Tableau 40** : Extractibilité de la radioactivité issue du  $^{14}\text{C}$ -Phé et du  $^{14}\text{C}$ -B[a]P (en %) par différents liquides

<i>Modalités</i>	<i>Eau</i> *	<i>JR</i> *	<i>JR + B</i> *
<b>Phé</b>	6,3	16,7	8,2
<b>B[a]P</b>	1,3	3,3	7,6

\* : JR : Jus de Rumen ; JR + B : Jus de Rumen + Bactéries

**Tableau 41** : Pourcentage de la radioactivité du  $^{14}\text{C}$ -B[a]P extraits selon les modalités appliquées

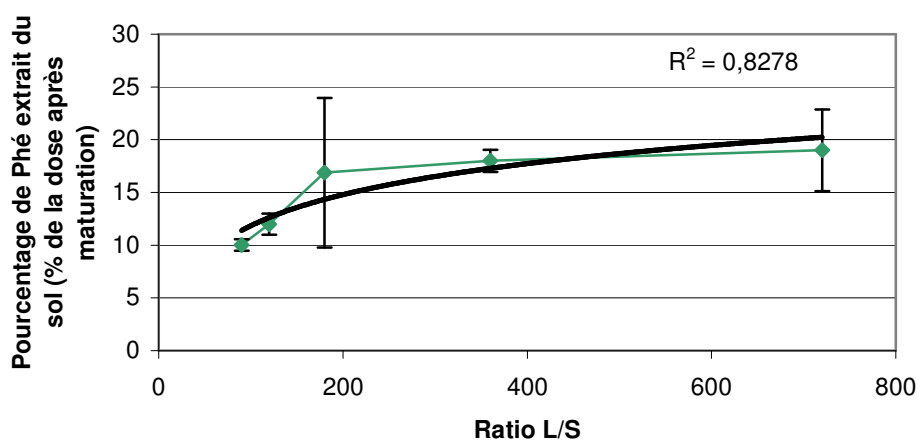
Milieu utilisé	Eau	JR	JR+B	JR + B + herbe	JR naturel filtré	ETR	Effet
Extractibilité (%)	1,3 <sup>b</sup>	3,3 <sup>ab</sup>	7,6 <sup>a</sup>	3,2 <sup>ab</sup>	4,7 <sup>ab</sup>	1,9	P < 0,05

### 3. Effet de la quantité de sol sur l'extractibilité de la radioactivité issue du $^{14}\text{C}$ -Phé et du $^{14}\text{C}$ -B[a]P du sol par du jus de rumen enrichi en microorganismes

La quantité de sol (et donc la radioactivité initiale) influe sur le pourcentage de radioactivité extrait du sol contaminé en  $^{14}\text{C}$ -Phé : 8 et 13 % de  $^{14}\text{C}$  sont mesurés dans la phase liquide quand respectivement 1 et 2 g de sol marqués sont apportés. Ainsi, dans le cas de sol contaminé en Phé, il semblerait que, plus la concentration est élevée, plus l'animal serait exposé. Le constat n'est pas le même pour le B[a]P. La part extraite n'est pas différente selon la quantité de sol introduite et les dpm/mL mesurés dans le liquide sont équivalents selon que l'on apporte un ou 2 g de sol. Ces résultats tendraient à montrer le faible pouvoir extractant du jus de rumen en présence de bactéries, mais surtout la faible extraction/mobilisation/dissolution de la radioactivité regroupant le  $^{14}\text{C}$ -B[a]P et les éventuels métabolites formés marqués.

### 4. Influence du ratio solide/liquide sur l'extractibilité de la radioactivité issue du $^{14}\text{C}$ -Phé du sol par du jus de rumen synthétique

La quantité de radioactivité extraite à l'issue de l'agitation est fonction de la quantité de sol ajoutée. En effet, plus le ratio liquide/solide augmente, plus la part de molécule extraite est importante. Au-delà du ratio L/S (liquide/solide) de 500, un plateau dans l'extraction semble être atteint (figure 16). Une solubilisation importante de la molécule mère et de ses métabolites éventuels dans le milieu ne semble pas à l'origine de la limite d'une plus grande extraction du  $^{14}\text{C}$ . La quantité de molécule présente dans un mL de solution est en effet toujours très inférieure au seuil de solubilité du Phé.



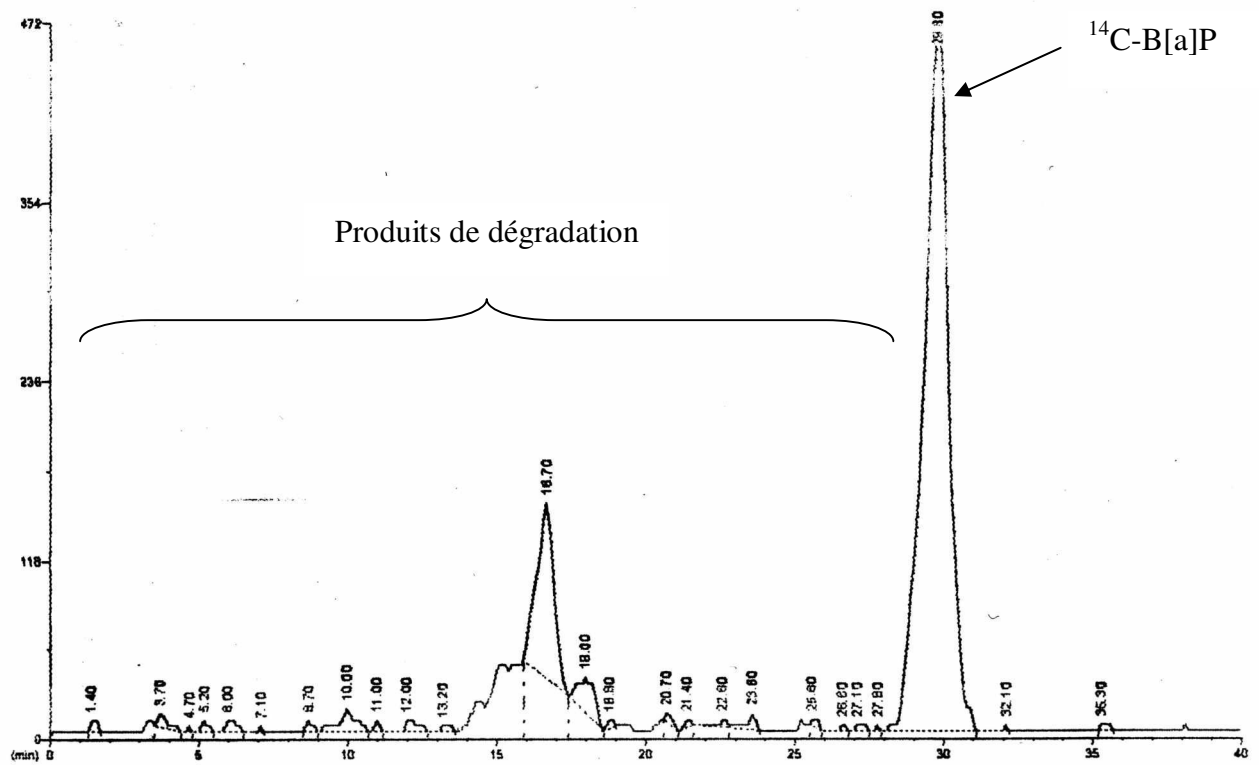
**Figure 16** : extraction du Phé du sol en fonction du ratio solide/liquide (S/L) de sol et de jus de rumen synthétique suite à une incubation 6h à 37°C



## 5. Dégradation in vitro des HAP par les bactéries du rumen

- Suite à l'incubation des HAP isolés (non associés à du sol) avec du jus de rumen synthétique enrichi en microorganismes du rumen, aucune dégradation n'a été constatée pour le  $^{14}\text{C}$ -Phé. En effet, après extraction et passage des échantillons sur HPLC/Flo-one, aucun pic secondaire conséquent n'a été détecté. Des petits pics pouvant être considérés comme des produits de dégradation sont visibles. Ils restent cependant à des valeurs faibles et trop proches du bruit de fond pour être réellement assimilés à des métabolites. Le seul pic présent et identifié correspond à la molécule mère (90% de la radioactivité totale). Les résultats sont en revanche différents pour le  $^{14}\text{C}$ -B[a]P où un pic secondaire majoritaire a été détecté (figure 17). Il représente environ 15% de la radioactivité totale. La molécule mère, elle, compose 75% de la charge totale. Des petits pics annexes sont apparents. La totalité de ces interférences constituent des produits de dégradations mineurs.

- Le passage des extraits issus de l'incubation avec du jus de rumen naturel clarifié ne mettait aucun produit de dégradation en évidence. Les enzymes extracellulaires peuvent donc être écartées d'un éventuel rôle dans la dégradation des HAP.



**Figure 17** : Chromatogramme d'un extrait de  $^{14}\text{C-B[a]P}$  et des métabolites issus de l'incubation de  $^{14}\text{C-B[a]P}$  pendant 6h en présence de bactéries ruminales

### III. Discussion

#### 1. Extractibilité *in vitro* des HAP du sol par du jus de rumen synthétique

L'étude de l'extractibilité des HAP du sol par du jus de rumen synthétique apporte des informations complémentaires aux données *in vivo* sur le comportement des molécules ingérées par un ruminant. Ces résultats montrent que, contrairement à l'hypothèse initiale, seule une faible part de HAP et de métabolites potentiellement formés est extraite du sol par le jus de rumen. Quelles que soient les modalités testées, moins de 10% de la totalité de la radioactivité initiale appliquée est libérée dans le milieu liquide considéré. Ce résultat ne suffit cependant pas à expliquer l'absence de HAP dans les fèces d'animaux exposés (cf chapitre 2). Une étude réalisée dans les mêmes conditions, mais à concentrations beaucoup plus élevées dans le sol, mène à des résultats d'extractibilité similaires. En effet, 10,6% du  $^{14}\text{C}$ -Phé et 8,3% du  $^{14}\text{C}$ -B[a]P sont extraits par du jus de rumen synthétique supplémenté en bactéries (Mouriou, 2005). Cette concordance dans les résultats précise la tendance selon laquelle entre 5 et 10% des HAP sont mobilisés dans la phase liquide.

Dans nos essais, une légère différence est à noter entre l'extractibilité du Phé et du B[a]P. Il a effectivement été montré par Tang et al., (2006) que le nombre de cycles influait sur l'extraction. Cette dernière est favorisée par la diminution du nombre de cycles des molécules, donc de l'hydrophobicité, mais la différence entre molécules n'est pas notable. Les molécules à faible poids moléculaire engendrent en effet des liaisons moins fortes avec le sol ce qui facilite leur solubilisation dans l'eau (Northcott et Jones, 2001 ; Smith et al., 1999).

Ces observations ne sont valables que pour les résultats issus d'une extraction à l'eau et au jus de rumen synthétique sans bactéries. Dans les essais jus de rumen + bactéries, aucune différence n'est à noter. La présence de microorganismes servant de support d'adsorption pour les HAP tend à diminuer la proportion de molécules solubles : la centrifugation de 10000g a probablement sédimenté les bactéries ruminales au préalable. Elles ne sont alors plus dénombrées dans les surnageants. La différence observée dans la quantité de  $^{14}\text{C}$ -Phé dissout dans le milieu entre les deux modalités jus de rumen synthétique (avec et sans bactéries) tend à montrer que la radioactivité est adsorbée à ces microorganismes. Ces derniers, ultérieurement absorbés par l'organisme, peuvent alors être considérés comme vecteurs de HAP, rendant la part extraite du sol potentiellement disponible pour l'animal. L'extractibilité du jus de rumen seul refléterait alors mieux la quantité de molécule à laquelle l'animal est exposé. Peu d'études tiennent compte de l'action éventuelle des microorganismes présents dans le système digestif, et ils ne sont donc pas additionnés dans le milieu. La voie que nous avons choisie d'exploiter inclut cet élément qui semble un facteur clef dans la

mobilisation des HAP, particulièrement dans le rumen qui en est doté en quantité considérable. Bien que les conditions soient quasi-identiques à celles de l'eau, l'extractibilité supérieure du jus de rumen pourrait être expliquée par les éléments (minéraux, acides gras volatiles) qui le constituent. Ces derniers sont susceptibles d'intervenir sur la structure du sol en favorisant sa désorganisation, propice à la mobilisation des HAP.

## 2. Extractibilité des HAP du sol par la caillette et l'intestin

Des expérimentations complémentaires (Mouriot, 2005, Jurjanz et al., 2005) réalisées à l'aide de ces modèles et dans la continuité de ce travail donnent des résultats mitigés puisque de grandes disparités existent entre les extractibilités de HAP du sol mesurées. A titre d'exemple, la mobilisation des HAP est supérieure dans le compartiment gastrique comparé au compartiment intestinal (Hack et Selenka, 1996 ; Tang et al., 2006). Cette tendance n'a pas été vérifiée dans nos expérimentations. La caillette ne participe que de façon négligeable à l'extraction des HAP du sol : l'acidité de ce compartiment ne semble pas contribuer à une augmentation de l'extractibilité des HAP. Van de Wiele et al. (2004) ont en effet démontré que l'acidification du milieu n'a aucune incidence sur l'extractibilité des HAP du sol. Les effets d'une destructuration du sol consécutive à la baisse du pH seraient neutralisés par les propriétés de la matière organique du sol. Celle-ci voit en effet son hydrophobicité accentuée par la baisse de pH ce qui lui confère un caractère hydrophobe marqué aux pH très acides. La structure du sol peut ainsi prendre la forme d'agrégats sphériques, caractéristiques des milieux hydrophobes, particulièrement propice à la rétention des HAP et expliquant cette mobilisation négligeable.

L'acidité de l'estomac ne jouerait donc pas de rôle décisif dans l'extraction des HAP du sol, contrairement à ce qui avait été suggéré :

- les composés resteraient indifférents au changement de pH, à l'inverse des métaux par exemple, dont l'extractibilité du sol en conditions digestives est régie par les variations de pH (Ruby et al., 1993 ; Oomen et al., 2002).
- le seul changement de structure du sol consécutif à une baisse du pH (estomac) ne contribuerait pas à l'augmentation de l'extractibilité des HAP du sol.

L'implication du pH a en revanche été démontrée de façon significative sur l'extractibilité des HAP du sol en présence d'éléments représentatifs des milieux gastrique (NaCl, HCl, pH 1) et intestinal (NaCl, pH 6,7). La neutralité entraîne en effet une extractibilité plus forte des HAP lorsque ces derniers sont dissous dans un milieu enrichi (Jin et al., 1999) ce qui révèle le rôle

primordial des constituants des milieux digestifs (minéraux). L'effet direct du pH sur le sol (structure, protonation des acides faibles de la matière humique à pH bas) est donc secondaire : la constitution de chaque milieu exige donc l'ensemble des constituants où chacun des composés est susceptible de jouer un rôle clef dans l'extractibilité des HAP.

Cette faible mobilisation coïncide avec des études traitant de cette même problématique où une infime partie de la dose initialement présente dans le sol est mobilisée par la phase liquide simulant le suc gastrique humain (Hack et Selenka, 1996 ; Holman et al., 2002 ; Oomen et al., 2000 ; Van de Wiele et al., 2004 ). Dans ces modèles, les résultats sont erronés lorsque des aliments ou des composants du système digestifs sont ajoutés. L'extractibilité des HAP est alors multipliée par un facteur variant de 2 à plus de 30 dans l'estomac et l'intestin. Ce sont ces modifications de facteurs qui mettent en évidence un rôle prononcé des lipides alimentaires dans l'extractibilité des HAP. Conjointement aux aliments, un effet marqué de la bile a été démontré par la bibliographie sur l'extractibilité des HAP du sol dans l'intestin. Au-delà de son implication dans l'adsorption des HAP en suspension, c'est avant tout son rôle de tensioactif qui prédomine. Elle participe à la diminution de la tension superficielle des HAP ce qui favorise leur solubilisation dans la phase aqueuse. Des études démontrent en effet la capacité des surfactants (chimiques) à augmenter la solubilité des HAP dans les milieux aqueux (Chang et al., 2000 ; Chun et al., 2002). L'ajout de bile dans un tel milieu augmente considérablement (près de 45 fois) la solubilité des HAP (Pu et al., 2004). La formation de micelles entre les molécules et la bile produirait des complexes hydrophiles dissous dans les liquides digestifs ; ce sont ces micelles qui stimuleraient l'absorption intestinale (Tang et al., 2006). La solubilisation des HAP dans le milieu digestif est en effet un pré requis pour leur absorption. L'ajout de bile n'est cependant pas systématiquement synonyme d'une augmentation de l'extractibilité. Un essai réalisé par Mouriot (2005) relate une extractibilité inférieure à 0,5% pour 2 molécules, à savoir et  $^{14}\text{C}$ -Phé  $^{14}\text{C}$ -B[a]P, lors d'une simulation d'intestin de vache laitière. Les résultats obtenus sont divergents des données bibliographiques où les extractibilités déterminées pour l'intestin sont supérieures et comprises entre 6 et 60%. Seuls Van de Wiele et al. (2004) font état d'une extractibilité de 0,1% par l'intestin sans bile et 0,2% avec bile. La distinction principale dans les protocoles de ces deux tendances de résultats est emploi de ratio L/S très hétérogènes probablement à l'origine de cette nuance.

Cette forte mobilisation des HAP par les liquides digestifs a également été mise en évidence par d'autres tests. A titre d'exemple, Pu et al. (2004) et Tang et al. (2006) rapportent une mobilisation de 17 à 88 %, variabilité imputable à la différence de caractéristiques des sols

utilisés, des HAP du sol au cours d'une simulation du tractus gastro-intestinal. Ces études ont en commun la très forte concentration en HAP dans les sols et il a été montré que l'augmentation de la concentration en polluants dans un sol conduisait à l'augmentation de son extractibilité (Holman et al., 2002 ; Pu et al., 2004). Le sol utilisé dans notre essai était très peu contaminé comparé à ces études ce qui peut en partie expliquer une telle différence de mobilisation par le tractus digestif.

Il est important de souligner la démarche adoptée dans les études *in vitro* qui consiste à ne jouer que sur une solution de base, agrémentée de composés divers et adaptée aux pH des compartiments simulés. La solution ainsi élaborée est façonnée afin de simuler les conditions gastro-intestinales sans toutefois transférer le sol qui reste suspendu dans cette solution. Notre approche était différente puisqu'elle consistait à ne récupérer que le culot de sol mêlé à la population bactérienne. Ce culot ensuite soumis aux conditions gastro-intestinales successives était transféré à chaque étape. *In vivo*, le sol seul traverse les différents compartiments, aussi nous paraissait-il approcher au mieux son cheminement réel en le séparant des milieux précédents.

### 3. Effet du ratio sol/liquide sur l'extractibilité du Phé du sol

Le test d'extractibilité du Phé dans du jus de rumen synthétique dépourvu de bactéries souligne l'implication de la quantité de sol sur le taux d'extractibilité. Ce dernier a en effet tendance à diminuer lorsque la quantité de sol augmente ; cette relation logarithmique ( $Y = 4,246 \ln(L/S) - 7,7$ ) est du même type que celle obtenue par Van de Wiele et al. (2004) dans un liquide digestif humain simulé *in vitro*. Les conditions étaient similaires mais les ratios plus faibles. Il semblerait que la solubilité du Phé ne soit pas en cause puisque la quantité de Phé mesurée par mL est très inférieure à son seuil de solubilité.

### 4. Effet de l'ajout d'herbe

Les essais comparatifs réalisés avec du jus de rumen additionné d'herbe montrent que la mobilisation est inférieure à celle obtenue avec la modalité « sans herbe ». Ainsi, l'herbe apportée semble servir de substrat d'adsorption pour les HAP. Cette part adsorbée peut toutefois être considérée comme biodisponible, l'herbe étant digérée à plus de 90%. L'apport d'aliment dans les modèles humains favorise largement l'extractibilité qui se voit doublée voir décuplée selon la nature de la nourriture incorporée. C'est le taux de matière grasse de l'aliment qui est impliqué dans cette augmentation de mobilisation. Il contribue en effet à la formation de micelles en se réagissant avec la bile favorisant la solubilisation des

contaminants dans le milieu aqueux (Hack et Selenka, 1996 ; Tang et al., 2006). Mais cet enchaînement n'est pas applicable dans le cas de l'herbe puisque celle-ci ne contient qu'une infime part de matière grasse comparée à des aliments. C'est donc uniquement un rôle de substrat d'adsorption que l'herbe peut jouer au cours des extractions.

Le jus de rumen naturel clarifié extrait quand à lui moins que le jus de rumen synthétique + bactéries, mais cette différence est peu significative. Dans tous les cas, la mobilisation du  $^{14}\text{C}$  (issue de l'administration de  $^{14}\text{C}$ -B[a]P dans le sol) est inférieure à 6% ce qui reste faible.

## 5. Dégradation du Phé et du B[a]P par les bactéries ruminales

Les essais précédents n'ont pas permis d'estimer la biotransformation potentielle d'une molécule issue du sol ni de quantifier la part de métabolites éventuellement formés dans le milieu ruminal. La contamination en HAP marqués était en effet inappropriée dans un tel cadre puisque le passage d'extrait sur HPLC exige des concentrations particulièrement élevées. L'expérimentation suivie de l'extraction engendre de telles pertes dans le rendement que la concentration en radioactivité passait largement en deçà du seuil de détection. Par ailleurs, si ce protocole avait été retenu, aucun procédé n'aurait permis la discrimination entre des métabolites probablement produits durant la maturation du sol par l'activité des microorganismes et les métabolites issus d'une biotransformation effectuée par les bactéries ruminales.

C'est pourquoi, pour éviter ces biais, une deuxième expérimentation a été mise au point de façon à n'estimer que la biotransformation des HAP. La métabolisation observée du B[a]P est inattendue du fait de son nombre de cycle supérieur à celui du Phé. Ce dernier ne semble pas être dégradé par les bactéries ruminales qui sont cependant capables de s'attaquer à des molécules plus complexes.

Les bactéries ruminales se sont révélées capables de métaboliser des molécules organiques lors d'incubation suffisamment longues et dans des conditions favorables. A titre d'exemple, l'oxamyl, un insecticide non cyclique, est métabolisé *in vitro* à hauteur de 40% en 1h et à 99% en 24h (Belasco et harvey, 1980). Le DDT est converti en DDE par les microorganismes du rumen (Fries et al., 1969b). Cependant, ces résultats sont contrastés par des études qui démontrent l'inaptitude du milieu ruminal à dégrader d'autres molécules du même type (Willett et al., 1989 ; Wszolek et al., 1981 ; Khan et Akhtar, 1983). Il est ainsi délicat de s'avancer sur le potentiel de métabolisation de ce milieu, les deux cas de figures ayant été mis en évidence. Plusieurs auteurs s'accordent toutefois sur l'effet toxique et donc néfaste de l'exposition des bactéries ruminales à ces polluants organiques, particulièrement à

des concentrations élevées. Des conséquences directes sur la croissance et la production laitière des animaux seraient envisageables (Yokoyama et al., 1988 ; Willett et al., 1989), mais cet aspect n'a pas été développé dans nos essais. C'est cependant une voie qu'il serait intéressant d'explorer afin de connaître l'effet potentiellement nuisible des HAP sur l'activité des microorganismes.

Quand à leur métabolisation éventuelle, seuls Van de Wiele et al. (2004) ont relevé une hydroxylation de certains HAP dans une suspension intestinale (simulation du côlon). Parmi les 8 HAP concernés, seuls 2 ont subi une modification notable : le Pyr et le B[a]P. Le Phé, qui pourtant était incorporé dans le mélange, n'a visiblement pas été hydroxylé. Ce résultat commun semble donc évoquer une métabolisation facilitée du B[a]P par des microorganismes issus du tractus gastrointestinal. La résistance du Phé à la biotransformation démontrée dans ces deux études reste à déterminer, d'autant que des résultats similaires ont été relevés *in vivo*. L'incubation d'un sol enrichi en microorganismes et contaminé en plusieurs HAP confirme en effet également que le Phé est moins métabolisé que le B[a]P (Canet et al., 2001).

L'hypothèse selon laquelle la métabolisation des HAP serait directement liée à leur nombre de cycles semble donc réductrice, d'autres facteurs seraient apparemment impliqués. La structure des molécules détermine directement leur activité biologique et pourrait, réciproquement, conditionner les sites d'attaque des microorganismes.

La métabolisation du B[a]P pourrait en partie expliquer sa faible concentration dans les fèces : pour être effective, la métabolisation ne requiert pas la mobilisation des HAP du sol, comme ce doit être le cas pour l'absorption. La formation de liaisons de ces molécules avec le sol via l'action des microorganismes et la métabolisation de molécules liées montrent effectivement que cette condition n'est pas nécessaire. Pour connaître la part de HAP métabolisés dans le système gastrointestinal et non absorbé, il aurait été intéressant de doser les métabolites de HAP solidaires du sol dans les fèces. La difficulté de cette mesure rend cependant cette application difficilement envisageable. Un modèle *in vivo* a par ailleurs mis en évidence que près de 90% de <sup>14</sup>C-B[a]P administré par voie orale est recouvré dans les fèces, alors même que nos résultats appuyés par d'autres études n'y révèlent qu'une infime part de molécules mères dans les fèces. Il a par ailleurs été démontré le faible passage du B[a]P à travers la barrière intestinale (Cavret et al., 2004, 2005) : son absence dans les fèces tendrait à être la résultante de métabolisations successives au cours de son passage dans le tractus digestif.

Les variations observées dans les études mimant le système humain montrent la difficulté de représenter au mieux les conditions *in vivo*. Lors de la réalisation de nos tests, nous nous sommes également heurtés à la perte conséquente de radioactivité durant la période



d'incubation/extraction. Elle avoisinait, au maximum, 60% pour le Phé et 40% pour le B[a]P au long de toute l'expérimentation. Cette perte, bien que connue, ne nous permet pas de considérer les résultats obtenus comme infaillibles. Faut-il en effet considérer cette perte comme des HAP extraits du sol, qui, bien qu'adsorbés à des parois, correspondent à des molécules potentiellement disponibles pour l'animal ? C'est là toute la difficulté de ces essais *in vitro* où une part d'incertitude réside dans les mesures et où la quantité de radioactivité engagée est limitante pour assurer des dosages fidèles.

Face à des taux d'extractibilité peut conséquents, il est probable qu'un ensemble de paramètres agissent successivement sur l'extractibilité des HAP du sol et mesurer chaque effet un à un ne permet pas une vue globale du phénomène. Il semble cependant établi que le Phé est plus extrait que le B[a]P ce qui permet en partie d'expliquer la présence de métabolites hydroxylés du Phé dans le lait. Plus facilement extrait du sol, le Phé est également absorbé en quantité plus importante. La légère prédominance du B[a]P dans les fèces pourrait trouver son origine dans cette extractibilité moindre qui tend à montrer que le sol et les HAP sont irrémédiablement liés.

Dans les modèles humains, les variations entre extractibilité des HAP du sol montrent la difficulté de représentativité des conditions *in vivo*, expérimentée et vérifiée également pour d'autres molécules (dioxines et furanes par exemple, Wittsiepe et al., 2001). Ils donnent néanmoins une tendance sur la mobilisation éventuelle des molécules dans le tractus digestif. L'étude de ces 2 compartiments, malgré les pertes liées à l'expérimentation, concourt à la connaissance de l'extractibilité des HAP du sol dans le tractus gastrointestinal d'une vache laitière. La mobilisation de ces molécules et de leur métabolites éventuels marqués serait d'environ 15% pour le sol contaminé en  $^{14}\text{C}$ -Phé et moins de 10% pour le sol contaminé en  $^{14}\text{C}$ -B[a]P. L'association au sol rendrait les HAP beaucoup moins disponible pour l'animal. De ce fait, la quantité de molécules réellement ingérée ne seraient donc pas biodisponibles à 100% biodisponibles. Ce taux n'explique cependant pas l'absence des molécules mères dans les fèces d'animaux exposés. Elles seraient probablement mobilisées à la hauteur d'autres compartiments en aval du rumen dont les conditions physicochimiques et les actions mécaniques contribueraient davantage à leur extraction.

Les HAP extraits du sol et dissous dans le milieu liquide ruminal peuvent suivre plusieurs voies :

- Les HAP mobilisés peuvent être soumis à une dégradation par les bactéries ruminales comme le suggèrent les essais *in vitro* (particulièrement pour le B[a]P) et les travaux de Wan de Wiele et al., (2005).
- Les composés en suspension peuvent se réadsorber au sol pour ensuite transiter vers les compartiments digestifs suivants où ils redeviennent potentiellement extractibles.

Étant donné le caractère hydrophobe des HAP, le long contact de ces molécules avec les aliments a tendance à favoriser leur adsorption sur les fibres issues de la ration ou de l'herbe ingérée simultanément avec le sol. Dans nos essais, la part de radioactivité mesurée dans le surnageant était en effet très variable selon la présence de microorganismes ou d'herbe laissant présager une adsorption des molécules sur ces supports (stringfellow et al., 1999; Van de Wiele et al., 2004). La radioactivité associée aux bactéries n'a pas été mesurée, celles-ci étant sédimentées dans le culot après les centrifugations à 10000g. Van de Wiele et al. (2004) ont cependant caractérisé la distribution des HAP dans le surnageant suite à une expérimentation mimant l'estomac humain comprenant l'ajout de bactéries (*Bacillus subtilis*) dans le milieu. Après centrifugation à 1500g pour sédimenter le sol, 73% des molécules se révèlent adsorbées à des particules dissoutes et 11% des HAP du surnageant se trouvent adsorbés aux bactéries libres. Ces bactéries, dans le cas du rumen, deviennent des vecteurs de HAP lorsque ces dernières sont absorbées en aval du rumen, transférant alors directement les molécules dans la circulation sanguine.

### Conclusion du chapitre 3

Il a été montré que moins de 10% des HAP associés à du sol étaient extractibles et mobilisables dans la phase liquide. Des pertes inhérentes à l'expérimentation peuvent potentiellement augmenter ce chiffre puisque d'éventuelles molécules adsorbées aux parois des divers contenants peuvent être considérées comme biodisponibles.

Le rumen, par son volume important et son action mécanique (brassage) sur le sol, a probablement une plus forte capacité d'extraction que celle que nous avons tenté d'évaluer. Cette approche permet cependant de jauger l'influence de ce compartiment sur l'extractibilité des HAP du sol et il semble donc que le sol ait un effet décisif sur la biodisponibilité de ces molécules. Il limite en effet leur mobilisation par les milieux du fait de l'affinité particulière des HAP pour le sol : les polluants restent préférentiellement liés à cette matrice diminuant ainsi les risques d'exposition d'un animal pâturant sur un sol contaminé. Bien que cette méthode mérite d'être améliorée, elle a permis de déterminer qu'une partie des HAP quittent le sol pour se mobiliser dans le jus de rumen. Bien que probablement sous-estimée, la proportion de molécules extraites avoisine les 10%. Elle pourrait cependant doubler si les pertes et les conditions liées à l'expérimentation étaient revues. Les mouvements, le temps de passage et les contraintes sont en effet plus marqués *in vivo*. L'application de ce modèle à des fins de simulation et d'évaluation du risque d'exposition d'un animal est encore un peu précoce. La liaison entre ce modèle et la réalité *in vivo* reste en effet à appréhender. L'utilisation pour des raisons techniques de 2 HAP seulement limite la comparaison avec les essais *in vivo*. La relation entre des paramètres physiologiques, comme par exemple la quantité de métabolites monohydroxylés présents dans le lait, et la fraction de HAP disponible par du jus de rumen synthétique nécessite un jeu de données plus complet ainsi que l'utilisation de plusieurs molécules. Cette méthode n'a cependant pas été suffisamment éprouvée et la mise au point mérite d'être poursuivie pour dépasser la phase expérimentale. Les résultats de Pu et al. (2004) qui montrent une bonne corrélation entre des résultats *in vitro* et des paramètres *in vivo* (essais sur le Phé) encouragent à persévérer de façon à développer un modèle fiable. Celui-ci doit être extrapolable à la réalité de façon à devenir une alternative aux approches *in vivo* pour l'évaluation de la biodisponibilité des HAP du sol par le ruminant laitier, limiter les risques d'exposition et par là même le transfert vers la chaîne alimentaire.

## **Discussion générale**

C'est dans le contexte de sécurité alimentaire actuel que nous nous sommes penchés sur les conséquences d'une exposition d'animaux aux HAP. La concentration en molécules mères et métabolites dans le lait est, dans ce travail, le reflet du degré d'exposition. La réhabilitation de sols pollués et le pâturage d'animaux sur des prairies potentiellement contaminées (bordure de routes, d'industries) a motivé l'étude du transfert de polluant de l'environnement vers le lait : cet aliment qui est avant tout un produit de grande consommation est par ailleurs l'objet d'études de prédilection du laboratoire des Sciences Animales depuis de nombreuses années. C'est dans une optique de qualité et sécurité des aliments que l'on comprend bien l'importance de la détermination du transfert des polluants vers les produits animaux. Le choix du sol contaminé en HAP se justifie par les concentrations élevées mesurées dans cette matrice. Les quantités ingérées par des animaux au pâturage sont par ailleurs significatives et représentent une source conséquente en polluants. Bien qu'il soit considéré comme un piège à HAP dans l'environnement, le sol ne semble pas « retenir » les molécules lors de leur passage dans l'organisme. Ces dernières sont potentiellement mobilisées dans le tractus digestif et se trouvent alors disponibles pour l'absorption. Mon travail de thèse a contribué à préciser ce rôle du sol dans la libération des HAP dans l'organisme afin d'anticiper les risques éventuels consécutifs à une exposition.

## **I. Le sol, vecteur de polluants**

### ***- Le sol, élément clef dans l'exposition des animaux d'élevage aux polluants***

L'approche développée dans ce travail, axée sur les conséquences d'une exposition à du sol contaminé sur la qualité du lait, a confirmé la nécessité de s'intéresser à cette matrice : le sol est en effet le vecteur principal de HAP vers les organismes. Appliquée et limitée aux ruminants dans notre étude, cette problématique serait valable pour tous les animaux d'élevage évoluant en plein air et exposés aux divers polluants par l'intermédiaire du sol. Les ruminants, les porcs (ingestion quotidienne de 200 g de sol en moyenne) ainsi que les volailles (exposés via l'ingestion directe de sol mais également par l'ingestion d'organismes contaminés, Zhao et al., 2006) sont directement concernés par ce mode d'exposition aux HAP. Des études antérieures ont déjà mis en évidence l'implication de ce type d'exposition dans la contamination de produits animaux pour d'autres molécules. A titre d'exemple, le transfert de PCDD/F vers les œufs a été établi chez des volailles exposées à du sol contaminé. La distribution dans les tissus et la biodisponibilité est fonction des molécules : 80% des tétrachlorés et seulement 10 % des octachlorés du sol sont biodisponibles. La distribution est par ailleurs différente de celle observée chez les mammifères ; de 7 à 54 % sont détectés dans le tissu adipeux alors que moins de 1 % sont retrouvés dans le foie. Les œufs, qui sont le seul moyen d'excrétion de la graisse chez les volailles, tendent à accumuler les polluants : de 5 à 30 % des molécules apportés par le sol y sont transférés (Stephens et al., 1995 ; Schuler et al., 1997 ; Zhao et al., 2006). L'estimation du transfert de polluants du sol vers le lait a été réalisée chez la vache laitière pour les PCB (La Rocca et al., 2004), les dioxines (Fries et al., 1985), ou encore les métaux (Licata et al., 2004). A notre connaissance, aucune donnée n'est disponible sur les HAP dans ce domaine.

L'objectif principal des études conduites sur les risques d'exposition liés à l'ingestion involontaire de sol est l'évaluation du transfert de polluants et des métabolites éventuels vers les produits animaux. Ce taux de transfert est gouverné par plusieurs facteurs dont les degrés d'implication varient en fonction des organismes et des molécules considérées :

- la quantité de sol ingérée par les animaux,
- la densité d'animaux sur le terrain et les pratiques d'élevage,
- l'animal (sexe, âge, poids, stade de lactation),
- le temps de contact sol/tube digestif,
- la concentration en polluants du sol, le type de sol (matière organique), paramètre clef dans la propension du sol à retenir ou non les composés transitant dans l'organisme.

- **Rôle du sol dans la disponibilité des HAP pour l'organisme**

*Effet du sol sur la concentration en HAP et métabolites dans le lait*

L'essai *in vivo* dont la particularité réside dans le mode d'administration chronique des HAP via du sol (chapitre 2) a contribué à préciser le devenir des HAP ingérés par des vaches laitières. Cette approche n'avait été que peu abordée chez des ruminants laitiers, et ce, en dépit de la contamination élevée et de l'ingestion importante qui font du sol le vecteur principal de polluants pour des animaux au pâturage. L'apparition de métabolites dans le lait et le faible recouvrement dans les fèces observés à l'issue de nos expérimentations tendent à montrer que les composés parents ont bel et bien été extraits du sol chez les ruminants. De plus, si l'on compare les taux de transfert des HAP et de leurs métabolites principaux vers le lait en fonction des modes d'administration (Grova 2003 et chapitre 2), aucune différence n'est à noter dans les coefficients de transfert calculés : l'excrétion de 2-OH Fluo et 3-OH Phé est même globalement supérieure quand les molécules mères sont apportées via du sol (tableau 42). Le phénomène de rétention des HAP par le sol ne semblerait donc pas contribuer à une diminution du coefficient de transfert de composés vers le lait : la matrice sol ne limiterait donc pas la disponibilité des HAP pour l'organisme. Les faibles valeurs de transfert (inférieurs à 1,5%) et les disparités des conditions initiales (concentration, mode d'administration) rendent cependant la comparaison entre les coefficients de transfert délicate et ne permettent pas de conclure avec certitude sur le rôle avéré du sol dans le passage de HAP et des métabolites vers le lait suite à une exposition prolongée.

*Effet du sol sur la concentration en HAP dans les fèces*

S'il ne semble pas se dégager d'effet notable du sol sur les transferts dans le lait, la concentration des HAP dans les fèces révèle en revanche une disponibilité réduite des HAP liés à cette matrice pour l'organisme (tableau 43). L'excrétion du Phé est en effet légèrement supérieure lors de l'administration de ce composé via du sol (2,3 %) comparée à celle via de l'huile (0,36 %). Ces observations attestent bien du fait que le sol diminue la biodisponibilité des polluants qui sont alors éliminés par les fèces. Les résultats obtenus sont en accord avec les tendances relevées *in vivo* pour d'autres composés : métaux (Cooke et al., 1996), pesticides, dioxines (Bonaccorsi et al., 1984 ; Umbreit et al., 1988) et HAP (Roos et al., 1996 ; Van Schooten et al., 1997 ; Koganti et al., 1998 ; Fauchécourt et al., 1999 ; Billeret et al., 2000 ; Bordelon et al., 2000 ; Reeves et al., 2001). L'association de ces polluants au sol diminue la disponibilité et donc leur transfert dans les différentes matrices étudiées (fèces, urine, lait, sang, muscle et foie). Le faible recouvrement de composés parents dans les fèces combinée à l'excrétion des métabolites dans le lait représente moins de 10 % de la quantité

initiale appliquée. Cependant, associés aux travaux de Grova et al. (2002) qui montrent une excrétion de 22 à 88 % de radioactivité dans les fèces (tableau 43), nos résultats confirment l'élimination des composés sous forme métabolisée par la voie fécale. L'étude du transfert de HAP marqués avait déjà établie une excrétion prononcée des composés sous leurs formes métabolisées chez le rat (Kotin et al., 1959 ; Hecht et al., 1979 ; Van Schooten et al., 1997). Cette hypothèse n'est cependant valable que pour les molécules très lipophiles. A titre d'exemple, le Phé est préférentiellement éliminé par l'urine alors que le Pyr semble subsister dans l'organisme. Les molécules les plus hydrophobes semblent en effet moins facilement extraites du sol (Van de Wiele et al., 2004 ; Tang et al., 2006) et sont parallèlement moins absorbées au niveau de la barrière intestinale (Laurent et al., 2002 ; Cavret et al., 2005). Le recouvrement supérieur de ces molécules dans les fèces de notre essai *in vivo* pourrait être expliqué par ces propriétés qui régissent à elles seules tous les mécanismes se mettant en place suite à une ingestion de sol contaminé.

#### *Effet du compartiment digestif sur l'extractibilité des HAP du sol*

Une des interrogations majeures qui subsiste est la participation des compartiments digestifs sur l'extractibilité (conditionnant directement la biodisponibilité) des HAP. Elle nous a amené à décomposer le cheminement des HAP du sol dans le tractus digestif de ruminant afin d'évaluer l'impact de chacun d'entre eux sur l'extractibilité de chaque molécule dans les conditions physico-chimiques et microbiennes rencontrées. Une des difficultés majeures consistait à suivre le sol au cours de son parcours du rumen aux fèces. Le modèle *in vitro* développé a ainsi permis de façon simple et répétable d'évaluer le pouvoir extractant du milieu ruminal. Tous les résultats obtenus et corroborés par les travaux de Mouriot (2005) mettent en évidence une extractibilité limitée des HAP (moins de 10%) du sol par les compartiments successifs. L'implication de la caillette et l'intestin grêle dans l'extractibilité des HAP du sol a également été estimée à l'aide de ce modèle *in vitro* : ces deux compartiments ne semblent participer que de façon minimale à l'extraction des HAP. Le pH et la présence de bile ne joueraient pas sur l'extractibilité. La bile a pourtant des propriétés de surfactant augmentant la solubilité des HAP (Laher et Barrowman, 1983), mais cette caractéristique ne semble pas intervenir ici. Pourtant, malgré l'attention portée à la mise au point de la méthode, une sédimentation des complexes bile/HAP consécutifs à une centrifugation trop forte (10000g) n'est pas à exclure. Ces complexes, alors présents dans le culot de sol et de bactéries, n'auraient jamais été comptés dans le surnageant expliquant ainsi de si faibles pourcentages de mobilisation dans l'intestin.



**Tableau 42** : Coefficients de transfert des métabolites vers le lait suite à des administrations unique et chronique de HAP

Apport	Produits mesurés	Quantités administrées (mg)			Transferts dans le lait (%)		
		<sup>14</sup> C-Phé	<sup>14</sup> C-Pyr	<sup>14</sup> C-B[a]P	<sup>14</sup> C-Phé	<sup>14</sup> C-Pyr	<sup>14</sup> C-B[a]P
Unique <b>via de l'huile</b> <i>Chèvres</i> (Grova, 2003)	Excrétion totale sur 103h, pic entre 7 et 22h	0,22	0,25	0,32	1,5	1,9	0,2
	Phé, monohydroxy et dihydroxyPhé Pics entre 7 et 22h	Phé : 200			0,25 (0,015 de Phé et 0,235 de métabolites)		
		<i>Fluo</i>	<i>Phé</i>	<i>Pyr</i>	<i>2-OH Fluo</i>	<i>3-OH Phé</i>	<i>1-OH Pyr</i>
Chronique <b>via de l'huile</b> <i>Chèvres</i> (Grova, 2003)	Apport quotidien de 28 jours, Pic de métabolites au 14 <sup>e</sup> jour	1	1	1	0,23	0,24	0,16
Chronique <b>via du sol</b> <i>Vaches</i> (Chapitre 2)	Apport quotidien de 21 jours, Pic de métabolites au 19 <sup>e</sup> jour	1,4	2,7	3,9	0,49	0,05	0,73
	Apport quotidien de 28 jours, Pic de métabolites au 7 <sup>e</sup> jour	52	41	39	0,09	0,03	1,62

**Tableau 43** : Part des HAP retrouvés dans les fèces suite à des administrations uniques et chroniques

Apport	Produits mesurés	Quantités administrées (mg)	Transferts vers les fèces (%)
Unique <b>via de l'huile</b> <i>Chèvres</i> (Grova, 2003)	Radioactivité totale (molécules mères et métabolites) sur 103h, pic entre à 31h	<sup>14</sup> C-Phé : 0,22 <sup>14</sup> C-Pyr : 0,25 <sup>14</sup> C-B[a]P : 0,32	<sup>14</sup> C-Phé : 22 <sup>14</sup> C-Pyr : 26 <sup>14</sup> C-B[a]P : 88
	Phé, monohydroxy et dihydroxyPhé Pics entre 7 et 31h	Phé : 200	1,1 dont 33% de Phé (soit 0,36%)
Chronique <b>via du sol</b> (fistule ruminale) <i>Vaches</i> (Chapitre 2)	Molécules mères et métabolite majoritaire du Fluo, Phé, Pyr et B[a]P, Apport quotidien pendant 28 jours, Plateau de concentration à J28	Fluo : 52 Phé : 41 Pyr : 39 B[a]P : 17	Fluo : 0,74 Phé : 2,3 Pyr : 3,1 B[a]P : 3,4

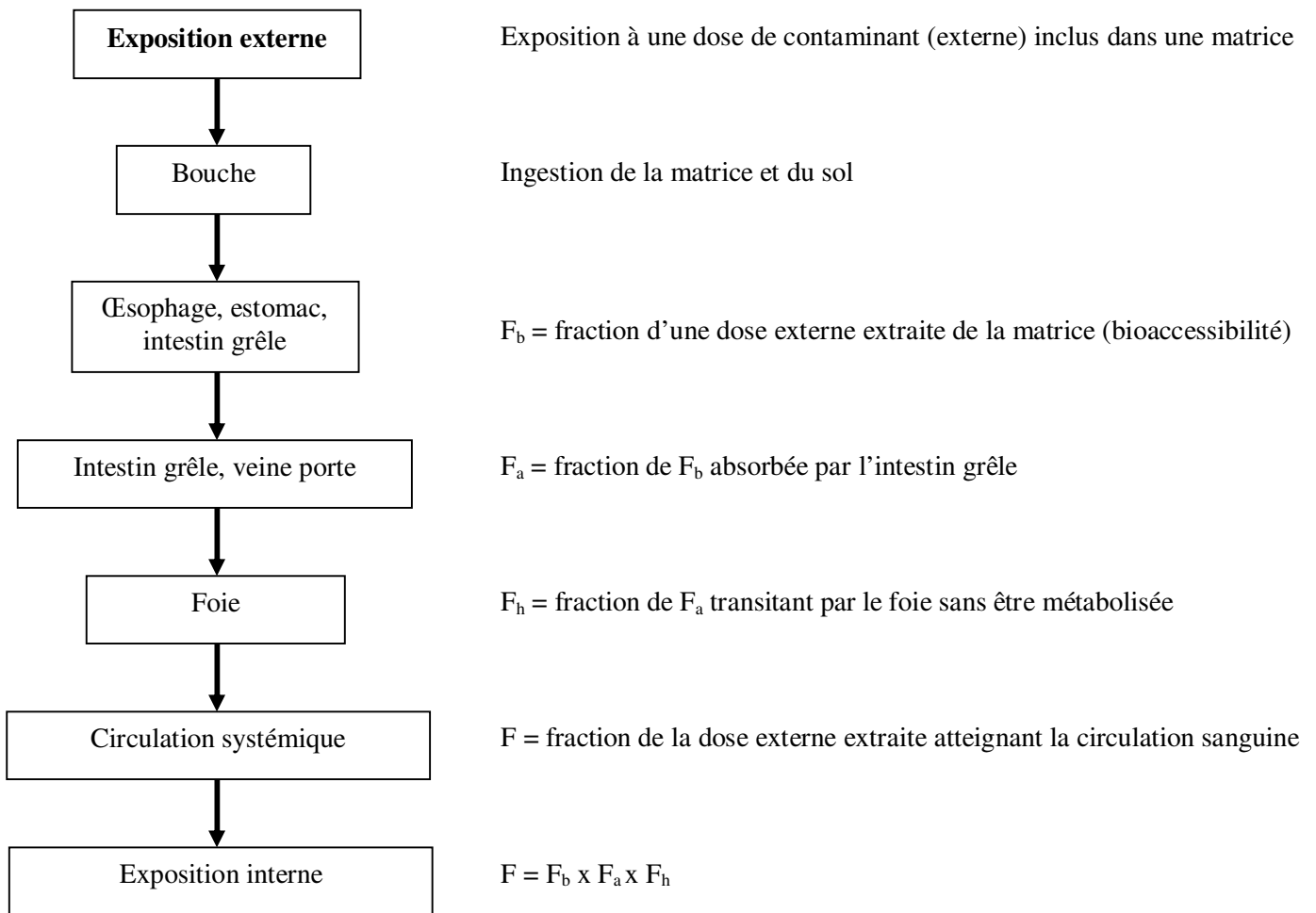
Les études portant sur la même problématique mettent en effet en œuvre des centrifugations qui n'excèdent pas 7000g pour séparer le sol du milieu simulant l'intestin et incluant la bile (Hack et Selenka, 1996 ; Jin et al., 1999 ; Oomen et al., 2000 ; Oomen et al., 2002 ; Tang et al., 2006). Ce modèle indique toutefois que l'extraction principale des HAP du sol ne semble pas se faire au niveau des compartiments simulés (rumen, caillette et intestin grêle).

#### *Estimation de la biodisponibilité des HAP du sol*

L'estimation de la biodisponibilité des HAP d'un sol se fait en général par la mesure du composé recherché dans différents compartiments cibles comme le sang ou les organes. Le schéma proposé par Oomen et al., 2002 (figure 18) pour estimer la biodisponibilité des métaux illustre les différentes étapes de mobilisations possibles pour des polluants dans les compartiments d'absorption. On se propose, à partir de ce cheminement, de tenter d'évaluer la disponibilité des HAP d'un sol pour le ruminant telle qu'elle est calculée pour les métaux. Ce calcul, établi pour l'homme, peut être transposé au ruminant mais doit tenir compte de l'extractibilité se produisant dans tous les compartiments digestifs. L'exposition interne est évaluée de façon grossière pour le B[a]P à l'aide de plusieurs modèles *in vitro* (modèle d'extractibilité, modèle intestinal) et *in vivo* (injection de HAP dans la veine porte) tirés de la bibliographie et de nos essais antérieurs :

- $F_b$  : cette fraction est considérée comme la somme des extractibilités obtenue dans nos expérimentations *in vitro* (soit environ 10 %),
- $F_a$  : cette fraction est tirée de l'étude de Cavret et al. (2004) où un passage de 0,4 % du B[a]P à travers la barrière intestinale (Caco2) a été relevé,
- $F_h$  : également issue de la bibliographie, on considère que 60% de  $^{14}\text{C}$ -B[a]P injecté à un rat par voie intraveineuse est excrété dans la bile (Chipman, et al., 1981) : 40% de la dose serait donc passée dans le sang.

L'exposition interne évaluée pour le B[a]P chez le ruminant est ainsi de l'ordre de 0,017 % ce qui est assez faible au regard des concentrations en métabolites mesurées dans le lait par exemple. Cette valeur, malgré son approximation (du fait, par exemple, de l'absence de la mesure  $F_h$ ), ne reflète qu'en partie la disponibilité des HAP du sol. En effet, elle ne tient pas compte de la métabolisation importante de ces composés dans l'organisme animal ce qui a pour conséquence de masquer une grande part des composés : ces derniers ont été absorbés et sont présents sous des formes biotransformées dans le sang ou dans un autre compartiment.



**Figure 18** : Etapes majeures dans la définition de la biodisponibilité suite à une exposition orale via du sol contaminé. La part de contaminants atteignant la circulation sanguine est considérée comme biodisponible (Oomen et al., 2002).

La biodisponibilité des HAP du sol est fréquemment calculée sur la base des composés parents ce qui la sous estime largement : l'essai du chapitre 2 et l'étude de Grova et al. (2005) suggèreraient ainsi l'utilisation de métabolites plutôt que des molécules parents dans les calculs de biodisponibilité.

## **II. Sécurité des aliments**

Aucune répercussion n'a été notée sur la concentration en molécules parents dans le lait des ruminants suite à une exposition prolongée à des HAP. Les concentrations en métabolites ont en revanche varié lors de l'apport du sol contaminé : l'induction des monooxygénases serait probablement responsable de cette variation et résulterait entre autre en un changement du profil de métabolites produits lors des biotransformations. Ce profil serait changeant au cours de l'exposition d'un animal (Jacob et al., 1981 ; Schmoldt et al., 1981 ; Jacob et al., 1983) ce qui ne permet pas de préconiser l'emploi d'un métabolite unique dans le lait comme indicateur d'exposition. C'est à l'issue de ces observations et de nombreuses études effectuées chez des monogastriques qu'il s'avère nécessaire de s'interroger sur la pertinence des normes fondées sur la teneur en une molécule représentative comme indicateur d'exposition. L'altération de la qualité du lait, exprimée par la mesure de la concentration croissante de métabolites monohydroxylés dans notre cas, est imperceptible si le dosage se limite aux seules molécules mères. Leur dosage est certes moins contraignant et moins complexe que celui des métabolites, mais l'emploi des composés parents comme indicateur est-il fidèle ?

L'utilisation de métabolites du Fluo, du Phé et du Pyr semblerait alors recommandée comme témoin d'exposition ; l'évolution de leurs concentrations au cours du temps est cependant aléatoire et ne semble pas indiquée pour cette application. Le 1-OH Pyr qui paraît être le seul métabolite dont l'apparition dans le lait au pic de concentration est régi par les concentrations initiales d'exposition est considéré comme un indicateur fiable d'exposition à des HAP dans l'urine (Levin, 1995 ; Bouchard et al., 1998 ; Viau 2002 ; Ferrari et al., 2002). Il ne semble cependant pas se prêter à l'évaluation de la qualité d'un lait : la diminution de sa concentration au cours du temps d'exposition dessert en effet son utilisation dans un tel cadre, d'autant qu'aucune corrélation entre sa concentration et les différents teneurs en HAP et métabolites n'a été établie.

Notons par ailleurs que l'utilisation d'une molécule comme biomarqueur d'exposition dans l'urine doit répondre à 5 critères indispensables tels que les commodités d'analyse, de détection ou encore de représentativité (Jacob et Seidel, 2002). Si l'on transpose ces

conditions au lait, et excepté le fait que le lait n'est pas la voie majeure d'élimination, le 1-OH Pyr rassemble ces multiples critères mais ne répond cependant pas à la condition intrinsèque de stabilité dans le temps.

#### *Concentrations en HAP dans le lait*

Même si l'animal se révèle être un filtre qui ne restitue dans le lait qu'une infime partie de la dose d'exposition, il est intéressant de noter que la concentration en HAP dans le lait est très largement supérieure aux normes européennes préconisées pour l'eau (0,1 µg/L). La quantité moyenne de composés parents ingérée par un humain quotidiennement se situerait entre 3 (dont 1,4 µg de molécules cancérigènes) et 17 µg selon le pays d'origine des personnes (De Vos et al., 1990 ; Waldman et al., 1991 ; Lodovici et al., 1995 ; Phillips, 1999 ; Ibanez et al., 2005 ; Sinha et al., 2005). Pourtant, et malgré la consommation quotidienne de 0,5 à 1 kg de produits laitiers, aucune valeur limite n'est donnée pour les HAP dans les denrées alimentaires non transformées même si aucun HAP classé cancérigène ou génotoxique n'est présent dans le lait. Les seuls produits concernés par l'établissement de normes sont les viandes et poissons fumés dans lesquels l'exposition à la fumée est contrôlée. Ceci permet donc un suivi précis de la teneur en polluants dans les aliments finis. La teneur en B[a]P dans les produits fumés est par exemple fixée à 0,03 µg/kg. A l'heure actuelle, il n'existe aucune recommandation sur les concentrations maximales d'exposition au-delà desquelles il y aurait un risque notable pour la santé comme c'est par exemple le cas pour les dioxines où une exposition à long terme inférieure à 1 pg/kg/jour exclu, a priori, tout risque pour la santé.

#### *Toxicité des HAP et des métabolites*

Certaines conditions d'exposition particulières ne concernant qu'une partie de la population (tabagisme, exposition sur le lieu de travail ou encore évolution dans des zones urbaines polluées) sont des sources connues. Leur participation à l'exposition totale aux HAP est conséquente. Hormis ces cas de figure, l'ingestion reste la voie majeure d'exposition (Waldman et al., 1991). Malgré le caractère quotidien et général de ce type d'exposition, aucune donnée sur la toxicité des HAP à long terme, en quantité faibles et via l'ingestion n'est disponible. La toxicologie aiguë a été bien étudiée chez l'animal, mais c'est la toxicologie chronique, reflet de la réalité, qui aide à la connaissance des effets sur le long terme d'une exposition à ces molécules. L'administration quotidienne d'une molécule aurait des répercussions sur les cellules lymphoïdes, le foie, les reins ou encore le cerveau. Des effets

sont également à déplorer sur la reproduction et l'embryogenèse, sachant que plusieurs de ces séquelles ont pour origine le caractère mutagène des HAP (IPCS, 1998).

Parallèlement à la toxicité avérée des molécules mères, plusieurs travaux se sont intéressés au caractère nocif des métabolites issus des biotransformations et présents dans de nombreuses denrées alimentaires. La caractéristique principale des métabolites hydroxylés est la formation d'adduits avec l'ADN ce qui génère alors des tumeurs dans différents tissus (la mesure de ces adduits d'ADN dans les cellules sanguines a par ailleurs été proposé comme indicateur d'exposition à des HAP). L'application dermale de 7,8- diOH B[a]P chez des souris entraîne par exemple la formation de tumeurs sur la peau et la mutagénicité des métabolites sur les cellules bactériennes et les cellules animales n'est plus à démontrer. Les conséquences d'une exposition aiguë restent difficiles à évaluer du fait de la nature de l'exposition : les métabolites qui sont produits dans l'organisme ne sont pas administrés, ingérés ou inhalés comme les molécules parents. C'est pourquoi, chez l'être humain, aucune donnée n'est disponible sur les effets d'une exposition orale à des métabolites sur la santé. La mesure de différents paramètres tels que la concentration en métabolites, la quantité d'adduits, de métabolites secondaires, semblent de bons indicateurs même si rien n'assure que les réponses à une exposition à des métabolites soit similaire à celle faisant suite à une exposition à des molécules parents.

### **III. Limites des expérimentations réalisées**

#### *Expérimentations sur l'animal*

Même si de nombreux éléments ont été apportés dans le chapitre 2, la mesure des HAP et de leurs métabolites dans l'urine, le sang et les fèces aurait pu aider à la compréhension de certains mécanismes d'excrétion. La répartition des HAP et métabolites dans les différentes voies d'élimination aurait par exemple permis d'appuyer l'hypothèse de rétention des composés par le sol si de faibles concentrations de molécules avaient été mesurées dans l'urine.

Cet essai pose par ailleurs la question de la métabolisation des composés parents dans le sol : les métabolites mesurés dans le lait ne seraient-ils pas issus d'une transformation des molécules mères durant la phase de maturation du sol ? Aucun dosage des métabolites n'a en effet été réalisé dans le sol : les concentrations en HAP dans le sol sont pourtant largement inférieures à la concentration initiale après un mois de maturation. Il semble cependant que

cette métabolisation dans le sol soit faible (Amellal 2004) et les produits de transformation en résultant n'engendreraient probablement pas de telles concentrations dans le lait.

*Expérimentations in vitro : Estimation de l'extractibilité par le tube digestif du ruminant*

Cette approche, bien que légèrement réductrice chez le ruminant du fait de la complexité de son tractus gastrointestinal, a permis une estimation de la biodisponibilité des HAP d'un sol. Si l'on considère qu'environ 10% des HAP sont extraits, la quantité de polluants libérés dans le rumen est de l'ordre de 55 à 100000 µg, selon le niveau de contamination rencontré et la quantité de sol ingérée. La méthode utilisée sous estimant la part effectivement extraite (choix de la méthode de calcul, adsorption aux parois), la quantité de polluants réellement solubilisés dans le rumen peut s'avérer supérieure. C'est pourquoi, pour affiner ces résultats, une amélioration de la méthode peut s'avérer nécessaire. Un matériel plus adapté (consommables en verre pour limiter l'adsorption des composés) ainsi que des contaminations beaucoup plus élevées aboutiraient à des résultats plus fiables ; une trop forte concentration est cependant à proscrire, la concentration en HAP dans le sol étant un élément déterminant dans le taux d'extraction (Holman et al., 2002). Il est donc essentiel que le modèle utilisé reste représentatif des conditions réelles. Dans le cas contraire, le taux mesuré n'aurait plus de signification en cas de concentration en HAP excessive dans le sol. Par ailleurs, le manque de suivi du maintien de l'anaérobiose dans les flacons d'incubation soulève quelques interrogations, notamment sur la survie et l'activité des bactéries. L'effet de leur présence est cependant pris en compte (rôle de support d'adsorption). L'amélioration de la méthode pourrait, à terme, pallier à cette limite principalement due à la coloration du milieu incompatible avec l'utilisation du compteur  $\beta$ .

## **Conclusion générale**



Nos travaux avaient pour objectif principal d'évaluer la disponibilité des HAP du sol pour le ruminant laitier. Nos expériences ont été menées à plusieurs échelles, de l'animal soumis à une contamination en conditions réelles (in vivo) aux compartiments digestifs simulés in vitro.

La première partie de ce travail consistait à spécifier les conséquences d'une exposition de vaches laitières à du sol contaminé en HAP sur la concentration en composés parents et métabolites dans le lait. Elle englobait toutes les étapes suivies par le sol une fois ingéré par l'animal : il avait en effet été montré, en amont de cette étude, le rôle décisif du sol dont les concentrations élevées en HAP en font le vecteur principal dans l'exposition d'animaux à des polluants. Ce travail a permis de montrer que seule la concentration en métabolites recherchés (monohydroxylés) était affectée par une exposition chronique à une dose élevée de polluant intégrés dans du sol. La quantité de 1-OH Pyr excrétée dans le lait est supérieure aux 2 autres métabolites recherchés ; ce métabolite qui est par ailleurs utilisé comme indicateur d'exposition aux HAP est celui qui répond le mieux à une exposition.

Parallèlement à ces résultats à perspectives très appliquées, notre étude s'est également attachée à décrire les niveaux d'extraction des HAP du sol au niveau de chaque compartiment digestif du ruminant. L'utilisation d'enceintes d'incubation a notamment montré l'extractibilité limitée des composés au niveau du rumen, de la caillette et de l'intestin grêle ce qui ne fait que renforcer la propriété de rétention des HAP du sol. Cette affinité des molécules organiques pour le sol serait donc un biais efficace pour limiter la libération des composés dans le tractus digestif alors propice pour une absorption ultérieure. La métabolisation des HAP au niveau ruminal (15 % du B[a]P métabolisé dans notre essai), sans extraction préalable du sol, pourrait par ailleurs expliquer les concentrations en composés parents faibles dans les fèces.

La figure 19 symbolise les flux d'entrées et de sorties des polluants et de leurs formes biotransformées obtenus dans ce travail. C'est suite à ces résultats que se dégagent plusieurs voies de recherche qui démontrent qu'il est essentiel de continuer à s'intéresser au sol :

- Afin de préciser le rôle du sol dans le transfert des métabolites dans le lait, une expérimentation similaire pourrait être envisagée, mais où une dose équivalente de HAP serait apportée directement dans le rumen et dilué dans de l'huile. L'élimination du facteur sol permettrait dans ce cas d'évaluer son implication dans le transfert des composés biotransformés vers le lait en comparant les données des deux expérimentations.

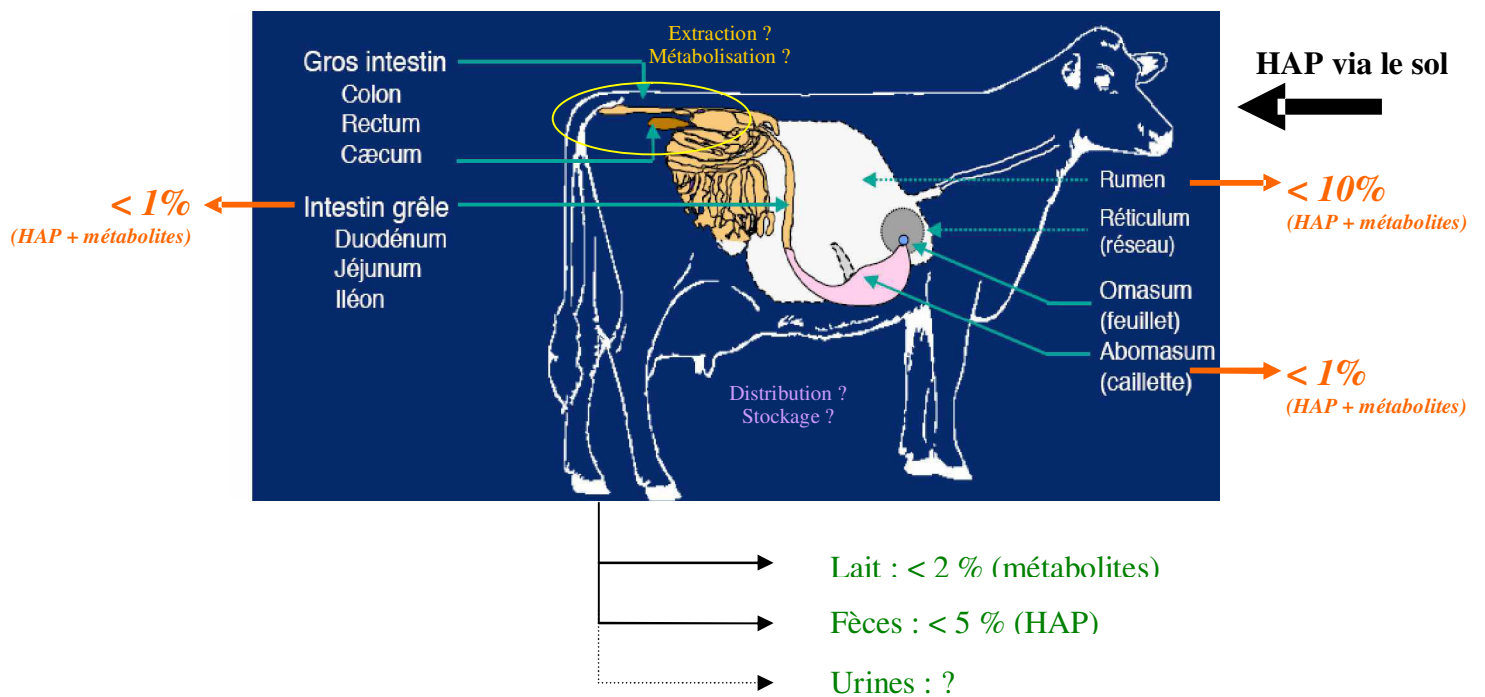
- L'étude de la cinétique d'apparition et de disparition des différentes formes au cours d'un apport chronique permettrait d'établir le « profil » métabolique tout au long de l'exposition. Les concentrations en métabolites monohydroxylés ont effectivement tendance à diminuer au cours de l'apport ce qui sous entend la biotransformation d'éventuels nouveaux composés, non détectés dans l'essai réalisé, mais potentiellement présents dans le lait.

- La mesure des HAP et de leurs métabolites dans les fèces et l'urine apporterait des éléments de réponse sur le devenir des HAP.

- La simulation des compartiments digestifs *in vitro* étant particulièrement complexe, la réalisation d'un essai visant à déterminer l'extractibilité des HAP du sol en conditions réelles pourrait compléter les résultats obtenus. Le travail à l'aide de sachets introduits directement dans le rumen rendrait également compte de la dégradation des composés par les bactéries ruminales, même si on reste dans ce cas très fortement tributaire des outils de mesures utilisés et des dosages réalisés (chromatographie).

- La corrélation des données *in vitro/in vivo* proposée comme une alternative peu coûteuse pour prédire un risque d'exposition pourrait également être envisagée. Cette transposition *in vitro/in vivo* semble validée dans le cas des métaux (Ruby et al., 1993 ; Hamel et al., 1999) mais la métabolisation des composés entrave cette démarche dans le cas des HAP. Des essais concluants chez le rat (Pu et al., 2004) incitent à suivre cette voie, même si, dans ce cas, la relation devrait se faire avec des mesures réalisées dans le sang ou les fèces. Le transfert vers le lait inclue en effet une étape supplémentaire par rapport à l'entrée simple dans l'organisme.

- Enfin, pour compléter ce travail, l'étude de sols multiples différant par leurs propriétés (MO) permettrait d'envisager plus précisément la fonction de rétention du sol lors de son passage dans l'organisme. De plus, l'utilisation d'un sol à pollution multiple (friches industrielles par exemple) est également préconisé : un sol est généralement contaminé par plusieurs composés (métaux, pesticides, dioxines...) et il a été montré que la présence conjointe de polluants modifiait le comportement et particulièrement l'extractibilité des HAP (Saison et al., 2004).



**Figure 19 :** Synthèse des entrées et sorties des HAP et de leur métabolites suite à une exposition chronique de sol contaminé.

## **Références bibliographiques**

Afssa, 2001. Avis de l'Agence française de sécurité des aliments relatif à la toxicité de la créosote et de sels métalliques et du risque pour la santé publique lié à la consommation de produits animaux ayant été exposés via une pâture contaminée par ces substances. Afssa, Saisis n°2001-SA-0143.

Amellal N., Portal J.M., Berthelin J., 2001. Effect of soil structure on the bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons within aggregates of a contaminated soil. *Applied Geochemistry* 16, 1611-1619.

Amellal N., Portal J.M., Vogel T., Berthelin J., 2001. Distribution and location of polycyclic aromatic hydrocarbons and PAH-degrading bacteria within polluted soil aggregates. *Biodegradation* 12, 49-57.

Amellal S., 2004. Biodégradation, mobilité et stabilisation du phénanthrène dans deux sols agricoles. Doctorat Sciences Agronomiques de l'INPL, Nancy, France.

Artursson P., Palm K., Luthman K., 1996. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Adv. Drug Delivery Rev.*, 22, 67-84.

Baek S.O., Field R.A., Goldstone M.E., Kirk P.W., Lester J.N., Perry R., 1991. A review of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: sources, fate and behavior. *Water Air Soil Pollut.* 60, 279-300.

Bakker I.M., Koerselman J.W., Tolls J., Kollöffel C., 2001. Localization of deposited polycyclic aromatic hydrocarbons in leaves of *Plantago*. *Environ. Toxicol. Chem* 20, 1112-1116.

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. *Sci. Total Environ.* 263, 91-100.

Barriuso E., Calvet R., Schiavon M., Soulas G., 1996. Les pesticides et les polluants organiques des sols. *Etude et Gestion des Sols*, 3,4, 279-295.

Basta N., Rodriguez R., Casteel S.W., 1999. In vitro gastrointestinal method to estimate bioavailable arsenic in contaminated soils. Proceedings of the 5th international conference on the biogeochemistry of trace elements. Vienna.

Beaune P.H., Lorient M.A., 2000. Bases moléculaires de la susceptibilité aux xénobiotiques: aspects métaboliques. *Médecine/Sciences* 16, 1051-1056.

Belasco I.J., Harvey J., 1980. In vitro rumen metabolism of <sup>14</sup>C-labeled oxamyl and selected metabolites of oxamyl. *J. Agric. Food Chem.* 28, 689-692.

- Beresford N.A., Gashchak S., Lasarev N., Arkhipov A., Chyorny Y., Astasheva N., Arkhipov N., Mayes R.W., Howard B.J., Baglay G., 2000. The transfer of  $^{137}\text{Cs}$  and  $^{90}\text{Sr}$  to dairy cattle fed fresh herbage collected 3.5 km from the Chernobyl nuclear power. *J Environ. Radioact.* 47, 157- 170
- Berthelin J., Block J.C., Dutartre Ph., Ferard J.F., Henry A.L., Leyval C., Morel J.L., Munier-Lamy C. et Sinaj S., 1995. Traitement biologique des sols pollués au cours d'activités industrielles: réflexions sur une grille méthodologique permettant de définir la faisabilité d'un objectif de dépollution appliqué à la qualité des eaux. Agence de l'Eau Rhin Meuse.
- Bewley R., Ellis B., Theile P., Viney I., Rees J., 1989. Microbial clean up of contaminated soil. *Chem Ind* 23, 778-783.
- Biesalski H.K., Grimm P., 2001. *Nutrition*. Edition Maloine.
- 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. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 2614-2620.
- Binet P., Portal J.M., Leyval C., 2000. Dissipation of 3-6 ring polycyclic aromatic hydrocarbons in the rhizosphere of ryegrass. *Soil Biol. Biochem* 32, 2011-2017.
- Bogan B.W., Sullivan W.R., 2003. Physicochemical soil parameters affecting sequestration and mycobacterial biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. *Chemosphere* 52, 1717-1726.
- Bogan B.W., Trbovic V., 2003. Effect of sequestration on PAH degradability with Fenton's reagent: roles of total organic carbon, humin and soil porosity. *J Hazard Mater.* 100, 285-300.
- Bonaccorsi A., di Domenico A., Fanelli R., Merli F., Motta R., Vanzati R., Zapponi G.A., 1984. The influence of soil particle adsorption on 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin biological uptake in the rabbit. *Arch. Toxicol.*, Suppl.7, 431-434.
- Bordelon N.R., Donnelly K.C., King L.C., Wolf D.C., Reeves W.R., George S.E., 2000. Bioavailability of the genotoxic components in coal tar contaminated soils in fischer 344 rats. *Toxicol. Sci.* 56, 37-48.
- Bouchard M., Krishnan K., Viau C., 1998. Kinetics of tissue distribution and elimination of pyrene and 1-hydroxypyrene following intravenous administration of [ $^{14}\text{C}$ ]pyrene in rats. *Toxicol. Sci.* 46, 11-20.
- Bouchard M., Viau C., 1996. Urinary excretion kinetics of pyrene and benzo[a]pyrene metabolites following intravenous administration of the parent compounds or the metabolites. *Toxicol Appl Pharmacol.* 139, 301-309

- Breedveld G.D., Karlson D.A., 2000. Estimating the availability of polycyclic aromatic hydrocarbons for bioremediation of creosote contaminated soil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54, 255-261.
- Briggs G.G., Bromilow R.H., Evans A.A., 1982. Relationships between lipophilicity and root uptake and translocation of non-ionised chemicals by barley. *Pestic. Sci.* 13, 495-504.
- Bryselbout C., Henner P., Carsignol J., Lichtfouse E., 2000. Polycyclic aromatic hydrocarbons in highway plants and soil. Evidence for a local distillation effect. *Analisis* 28, 32-35.
- Canet R., Birnstingl J.G., Malcolm D.G., Lopez-Real J.M., Beck A.J., 2001. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by native microflora and combinations of white-rot fungi in a coal-tar contaminated soil. *Bioresour Technol.* 76, 113-117.
- Cavret S., Feidt C., Le Roux Y., Laurent F., 2005. Study of Mammary Epithelial Role in PAH Transfer to Milk. *J Dairy Sci.* 88, 4246
- Cavret S., Rychen G., Feidt C., 2004. In vitro intestinal transfer and metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Polycyclic aromatic hydrocarbons* 24, 513-525.
- Chang B.V., Shiung L.C., Yuan S.Y., 2002. Anaerobic biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon in soil. *Chemosphere* 48, 717-724.
- Chang M.C., Huang C.R., Shu H.Y., 2000. Effects of surfactants on extraction of phenanthrene in spiked sand. *Chemosphere* 41, 1295-1300.
- Chiou C.T., Mac Groddy S.E., Kile D.E., 1998. Partition characteristics of polycyclic aromatic hydrocarbons on soil and sediments. *Environ Sci Technol* 32, 855-860.
- Chun C.L., Lee J.J., Park J.W., 2002. Solubilization of PAH mixtures by three different anionic surfactants. *Environ.Poll.* 118, 307-313.
- Combris P., 1997. La consommation des produits animaux en France : tendances et perspectives d'évolution. *INRA Prod. Anim.* 10 (4), 267-274.
- Conrad A.U., Comber S.D., Simkiss K., 2002. Pyrene bioavailability; effect of sediment-chemical contact time on routes of uptake in an oligochaete worm. *Chemosphere* 49, 447-454.
- Conte P., Zena A., Pilidis G., Piccolo A., 2001. Increased retention of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil induced by soil treatment with humic substances. *Environ.Poll.* 112, 27-31.

Cooke A.I., Green N., Rimmer D.L., Weekes T.E.C., Wilkins B.T., Beresford N.A., Fenwick J.D., 1996. Absorption of radiocesium by sheep after ingestion of contaminated soil. *Sci Total Environ.* 192, 21-29.

Cousins I.T., Beck A.J., Jones K.C., 1999. A review of the processes involved in the exchange of semi-volatile organic compounds (SVOC) across the air-soil interface. *Sci Total Environ.* 228, 5-24.

Cousins I.T., Jones K.C., 1998. Air-soil exchange of semi-volatile organic compounds (SOCs) in the UK. *Environ.Poll.* 102, 105-118.

Crépineau 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. *J. Agric. Food Chem.* 51, 4841-4845.

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., Rychen G., 2003. Assessment of soil and grass polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) contamination levels in agricultural fields located near a motorway and an airport. *Agronomie* 23, 345-348.

De Vos R.H., Van Dokkum W., Schouten A., Jong-Berkhout P., 1990. Polycyclic aromatic hydrocarbons in dutch total diet samples (1984-1986). *Fd Chem. Toxic.* 28, 263-268.

Dean-Ross D., Moody D., Cerniglia C.E., 2002. Utilization of mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria isolated from contaminated sediment. *FEMS Microbiol Ecol* 41, 1-7.

Demeyer D.I., 1981. Rumen microbes and digestion of plant cell walls. *Agric. Envir.* 6, 295-337.

Dennis M.J., Massey R.C., Cripps G., Venn I., Howarth N., Lee G., 1991. Factors affecting the polycyclic aromatic hydrocarbons content of cereals, fats and other food products. *Food Addit Contam* 8 (4), 517-530.

Dennis M.J., Massey R.C., McWeeny D.J., Knowles M.E., 1983. Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in UK total diet. *Food Chem Toxicol* 21, 569-574.

Dreicer M., Hakonson T.E., White G.C., 1984. Rainsplash as a mechanism for soil contamination of plant surfaces. *Health Physics* 46, 177-187.

Edwards N.T., 1983. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the terrestrial environment, a review. *J. Environ. Qual.* 12, 427-440.



Eisele G.R., 1985. Naphtalene distribution in tissues of laying pullets, swine and dairy cattle. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 34, 549-556.

Ellenberger J.A., Newlander J.A., Jones C.H., 1950. Composition of the bodies of dairy cattle. *Univ Vt Agric Stn Bull* 558, 1-66.

Eschenbach A., Wienberg R., Mahro B., 1998. Fate and stability of nonextractable residues of [<sup>14</sup>C]PAH in contaminated soils under environmental stress conditions. *Environ. Sci. Technol.* 32, 2585-2590.

Ferrari S., Mandel F., Berset J.D., 2002. Quantitative determination of 1-hydroxypyrene in bovine urine samples using high-performance liquid chromatography with fluorescence and mass spectrometric detection. *Chemosphere* 47, 173-182.

Fismes J., Schwartz C., Bispo A., Caussanel J.P., Empereur-Bissonet P., Hulot C., Jager C., Jourdain M.J., Marot F., Morel J.L., Perrin-Ganier C., 2002. Contaminatio des végétaux exposés à des sites pollués par des substances organiques. Première rencontre nationale de la recherche sur les sites et sols pollués. Décembre 2002, Maison de la Chimie, Paris, France.

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 Section 1* 80, 330-339.

Fries G.F., 1985. Bioavailability of soil-borne polybrominated biphenyls ingested by farm animals. *J. Toxicol. Environ. Health* 16, 565-579.

Fries G.F., 1996. Ingestion of sludge applied organic chemicals by animals. *Sci Total Environ* 185, 93-108.

Fries G.F., Marrow G.S., Snow P.A. (1982a). Soil ingestion by dairy cattle. *J Dairy Sci.*, 65, 611-618

Fries G.F., Marrow G.S., Somich C.J., 1989. Oral bioavailability of aged polychlorinated biphenyl residues contained in soil. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 43, 683-690.

Frontier S. ; Davoult D. ; Gentilhomme V. and Lagadeuc Y. Statistique pour les sciences de la vie et de l'environnement. Partie 4 : traitement des variables éloignées des conditions de la statistique paramétrique. Ed. Dunod, 2001, Paris, 249-278.

Gao Y., Zhu L., 2004. Plant uptake, accumulation and translocation of phenanthrene and pyrene in soils. *Chemosphere* 55, 1169-1178

Garban B., Blanchoud H., Motelay-Massei A., Chevreuil M., Ollivon D., 2002. Atmospheric bulk deposition of PAHs onto France: trends from urban to remote sites. *Atmos Environ.* 36, 5395-5403.

Ginn J.S., Sims R.C., Murarka I.P., 1995. Evaluation of biological Treatability of soil contaminated with manufactured gas plant waste. *Hazardous Waste & Hasardous Materials* 12, 221-232.

Gobat J.M., Aragno M., et Matthey. 1998. Le sol vivant-base de pédologie, biologie des sols.

Griggs R.E., Davis J.A.. Diquat excretion and metabolis in goat. ICI Plant Protection Ltd. Report No. AR2585A.

Grimmer G., Dettbarn G., Naujack K.W., Jacob J., 1991. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* 43, 177.

Grossi G., Lichtig J., Krauss P., 1998. PCDD/F, PCB and PAH content of Brazilian compost. *Chemosphere*, 37, 2153-2160.

Grova N., 2003. Rapport d'activité ADEME. Evaluation du transfert des HAP vers le lait en conditions de terrain. Données non publiées.

Grova N., Feidt C., Crépineau C., Laurent C., Lafargue P.E., Hachimi A., Rychen G., 2002. Detection of polycyclic aromatic hydrocarbons levels in milk collected near potential contamination sources. *J. Agric. Food Chem.* 50, 4640-4642.

Grova N., Feidt C., Laurent C., Rychen G., 2003. [14C] Milk, urine and feces excretion kinetics in lactating goats after an oral administration of [14C] polycyclic aromatic hydrocarbons. *International Dairy Journal* 12, 1025-1031.

Grova N., Laurent C., Feidt C., Rychen G., Laurent F., 2000. Gas chromatography-mass spectroscopy study of polycyclic aromatic hydrocarbons in grass and milk from urban and rural farms. *Eur.J.Mass Spectrom.* 6, 457-460.

Grova N., Monteau F., Le Bizec B., Feidt C., André F., Rychen G., 2005. Determination of phenanthrene and hydroxyphenanthrenes in various biological matrices at trace levels using gas Chromatography and mass spectrometry. *J Anal Toxicol.* 29, 175 - 181.

Hack A., Selenka F., 1996. Mobilization of PAH and PCB from contaminated soil using a digestive tract model. *Toxicol Lett* 88, 199-210.

Hamel S.C., Ellickson K.M., Lioy P.J., 1999. The estimation of the bioaccessibility of heavy metals in soils using artificial biofluids by two novel methods: mass-balance and soil recapture. *Sci Total Environ.* 243/244, 273-283.

Hammel K.E., Kalyanaraman B., Kent-Kirk T, 1986. Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons and dibenzo(p)dioxin by *Phanerochaete chrysosporium* lignase. *J Biol Chem.* 261, 16948-16952

Hatzinger P.B., Alexander M., 1997. Biodegradation of organic compounds sequestered in organic solids or in nanopores within silica particles. *Environmental Chemistry* 16, 2215-2221.

Hauser B., Schrader G., Bahadir M., 1997. Comparaison of acute toxicity and genotoxic concentrations of single compounds and waste elutriates using the Microtox/Mutatox test system. *Ecotoxicol Environ Saf* 38, 227-231.

Healy G.B. (1968). Ingestion of soil by dairy cows, New Zealand. *J. Agric. Res.*, 11, 487-499

Healy W.B., 1973. Nutritional aspects of soil ingestion by grazing animals, 567-588. In : Butler G.W. et Bailey R.W. (ed), chemistry and biochemistry of herbage. Academic press, New York.

Hecht S.S., Grabowski W., Groth K., 1979. Analysis of faeces for benzo[a]pyrene after consumption of charcoal-broiled beef by rats and humans. *Fd Cosmet. Toxicol.* 17, 223-227.

Hembrock-Heger A. Persistent organic contaminant in soils, plants and food. Proceedings of a seminar held at Braunschweig (D). June 1990.

Hewitt C.N., Rashed M.B., 1991. The deposition of selected pollutants adjacent to a major rural highway. *Atmos Environ* 25A, 979-983.

Holman H.N., Goth-Goldstein R., Aston D., Yun M., Kengsoontra J., 2002. Evaluation of the gastrointestinal solubilization of petroleum hydrocarbon residues in soil using an *in vitro* physiologically based model. *Environ. Sci. Technol.* 36, 1281-1286.

Hund-Rinke K., Kördel W., 2003. Underlying issues in bioaccessibility and bioavailability: experimental methods. *Ecotoxicol Environ Saf* 56, 52-62.

Husain A., Naeemi E., Dashti B., Al-Omirah H., Al-Zenki S., 1997. Polycyclic aromatic hydrocarbons in food products originating from locally reared animals in Kuwait. *Food Addit. Contam.* 14, 295-299.

Ibanez R., Agudo A., Berenguer A., Jakszyn P., Tormo M.J., Sanchez M.J., Quiros J.R., Pera G., Navarro C., Martinez C., Larranaga N., Dorransoro M., Chirlaque M.D., Barricarte A., Ardanaz E., Amiano P., Gonzalez C.A., 2005. Dietary intake of polycyclic aromatic hydrocarbons in a Spanish population. *J. Food Prot.* 68, 2190-2195.

INERIS (2005). "Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques". <http://www.ineris.fr>

Jacob J., Grimmer G., 1996. Metabolism and excretion of polycyclic aromatic hydrocarbons in rat and in human. *Centr. Eur. J. Publ. Hlth* 4, 33-39.

Jacob J., Schmoldt A., Grimmer G., 1983. Benzo[e]pyrene metabolism in rat liver microsomes: dependence of the metabolite profile on the pretreatment of rats with various monooxygenase inducers. *Carcinogenesis* 4, 905-910.

Jacob J., Seidel A., 2002. Biomonitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons in human urine. *J Chromatogr B* 778, 31-47.

Jin Z., Simkins S., Xing B., 1999. Bioavailability of freshly added and aged naphthalene in soils under gastric pH conditions. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 2751-2758.

Johnsen A.R., Wick L.Y., Harms H., 2005. Principles of microbial PAH-degradation. *Environ.Poll.* 133, 71-84.

Johnson D.L., Jones K.C., Langdon C.J., Pearce T.G., Semple K.T., 2002. Temporal changes in earthworm availability and extractibility of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. *Soil and Biology & Biochemistry* 34, 1363-1370.

Joner E.J., Corgié S.C., Amellal N., Leyval C., 2002. Nutritional constraints to degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in a simulated rhizosphere. *Soil Biology&Biochemistry* 34, 859-864.

Jones K.C., de Voogt P., 1999. Persistent organic pollutants: state of science. *Environ.Poll.* 100, 209-221.

Jones K.C., Stratford J.A., Tidridge P., Waterhouse K.S., Johnston A.E., 1989. Polynuclear Aromatic Hydrocarbons in an agricultural soil: long term changes in profile distribution. *Environ.Poll.* 56, 337-351.

Jongeneelen F.J., Anzion R.B.M., Scheepers P.T.J., Bos R.P., Henderson P.T., Nijenhuis E.H., Veenstra S.J., Brouns R.M.E., Winkes A., 1988. 1-hydroxypyrene in urine as a biological indicator of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in several work environments. *Ann. Occ. Hyg.* 32, 35-43.

Juhasz A.L., 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., Lutz S., Mouriot J., Rychen G., 2005. Extraction *in vitro* of soil-bound PAH in the rumen. The Sixth European Meeting on Environmental Chemistry, Belgrade, Serbia et Montenegro.

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. *Toxicol Lett.* 78, 153-163.

Karimi-Lotfabad S., Pickard M.A., Gray M.R., 1996. Reaction of polycyclic aromatic hydrocarbons on soil. *Environ.Sci.Technol.* 30, 1145-1151.

Kästner M., Streibich S., Beyrer M., Richnow H.H., Fritsche W., 1999. Formation of bound residues during microbial degradation of [<sup>14</sup>C]anthracene in soil. *Appl Environ Microbiol.* 65, 1834-1842.

Keith L. Et Teillard, 1979. Priority pollutants. I. A perspective view. *Environ. Sci. Technol.* 13, 416- 423.

Kelsey J.W., Kottler B.D., Alexander M., 1997. Selective chemical extractants to predict bioavailability of soil-aged organic chemicals. *Environ. Sci. Technol.* 31, 214-217.

Khalili N.R., Scheff P.A., Holsen T.M., 1995. PAH source fingerprints for coke ovens, diesel and gasoline engines, highway tunnels and wood combustion emissions. *Atmos Environ.* 29, 533, 542.

Khan S.U., Akhtar H., 1983. In vitro release of bound (nonextractable) atrazine residues from corn plants by chicken liver homogenate and bovine rumen liquor. *J. Agric. Food Chem.* 31, 641-644.

Khodadoust A.P., Bagchi R., Suidan M.T., Brenner R.C., Sellers N.G., 2000. Removal of PAHs from highly contaminated soils found at prior manufactured gas operation. *J Hazard Mater B80*, 159-174.

Kipopoulou A.M., Manoli E., Samara C., 1999. Bioconcentration of polycyclic aromatic hydrocarbons in vegetables grown in an industrial area. *Environ Poll* 106, 369-380.

Kirby D.R. et Stuth J.W. (1980). Soil-ingestion rates of steers following brush management in Central Texas. *Journal of Range Management*, 33, 207-209.

Kishikawa N., Wada M., Akiyama S., Nakashima K., 2003. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in milk by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr B*, 789, 257-264.

Kiss G., Varga-Puchony Z., Tolnai B, Varga B., Gelencser A., Krivacsy Z., Hlavay J., 2001. The seasonal changes in the precipitation and aerosol near Lake Balaton, Hungary. *Environ Poll* 114, 55-61.

Koganti A., Spina D.A., Rozet K., Ma B.L., Weyand E.H., 1998. Studies of the applicability of biomarkers in estimating the systemic bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons from manufactured gas plant tar-contaminated soil. *Environ. Sci. Technol.* 32, 3104-3112.

Kögel-Knabner I., Totsche K.U., Raber B., 2000. Desorption of polycyclic aromatic hydrocarbons from soil in the presence of dissolved organic matter: effect of solution composition and aging. *J. Environ. Qual.* 29, 906-916.

Kotin P., Falk H.L., Busser R., 1959. Distribution, retention and elimination of C<sup>14</sup>-3,4-benzopyrene after administration to mice and rats. *J Natl Cancer Inst.* 23, 541-555.

Kottler B.D., Alexander M., 2001. Relationship of properties of polycyclic aromatic hydrocarbons to sequestration in soil. *Environ Poll* 113, 293-298.

Krauss M., Wilcke W., Zech W., 2000. Availability of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) to earthworms in urban soils. *Environ. Sci. Technol.* 34, 4335-4340.

Krul C., Luiten-Schuite A., Verhagen H., Mohn G., Feron V., Havenaar R., 2000. Application of a dynamic in vitro gastrointestinal tract model to study the availability of food mutagens, using heterocyclic aromatic amines as model compounds. *Food Chem Toxicol.* 38, 783-792.

La Rocca S., Alivernini S., Battistelli C., 2004. A study on PCB, PCDD/PCDF industrial contamination in an urban/agricultural area. Part II: animal matrices. *Organohalogen Compounds* 66, 2016-2022.

Laher J.M., Barrowman J.A., 1983. Polycyclic hydrocarbon and polychlorinated biphenyl solubilization in aqueous solutions of mixed micelles. *Lipids* 18, 216-222.

Laurent C., Feidt C., Grova N., Mpassi D., Lichtfouse E., Laurent F., Rychen G., 2002. Portal absorption of  $^{14}\text{C}$  after ingestion of spiked milk with  $^{14}\text{C}$ -phenanthrene,  $^{14}\text{C}$ -benzo[a]pyrene or  $^{14}\text{C}$ -TCDD in growing pigs. *Chemosphere* 48, 843-848.

Lawrence J.F., Weber D.F., 1984. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in Canadian samples of processed vegetable and dairy products by liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Agric. Food Chem* 32, 794-797.

Lazzari L., Sperti L., Salizzato M., Pavoni B., 1999. Gas chromatographic determination of organic micropollutants in samples of sewage sludge and compost: behaviour of PCB and PAH during composting. *Chemosphere* 38, 1925-1935.

Le Masson, P., 2003. Mise au point d'une approche *in vitro* de la disponibilité des HAP du sol pour les ruminants. Stage de DEA.

Leduc R., Samson R., Al-Bashir B., Al-Hawari J., Cseh T., 1992. Biotic and abiotic disappearance of four PAH compounds from flooded soil under various redox conditions. *Wat. Sci. Tech.* 26, 51-60.

Levin J.O., 1995. First international workshop on hydroxypyrene as a biomarker for PAH exposure in man- summary and conclusions. *Sci. Total Environ.* 163, 165-168.

Licata P., Trombetta D., Cristani M., Giofre F., Martino D., Calo T., Naccari F., 2004. Levels of "toxic" and "essential" metals in samples of bovine milk from various dairy farms in Calabria, Italy. *Environment International* 30, 1-6.

Liste H.H., Alexander M., 2002. Butanol extraction to predict bioavailability of PAHs in soil. *Chemosphere* 46, 1011-1017.

- Littell C.R., Milliken G.A., Stroup W.W., Wolfinger R.D., 1996. SAS system for Mixed Models. Chapter 3: Analysis of Repeated Measures Data. Cary, NC, SAS Institute Inc., 633p.
- Lodovici M., Dolora P., Casalini C., Ciappellano S., Testolin G., 1995. Polycyclic aromatic hydrocarbons contamination in the Italian diet. *Food Addit Contam* 12 (5), 703-713.
- Loehr R.C., Webster M.T., 1996. Performance of long-term, field-scale bioremediation processes. *Journal of Hazardous Materials* 50, 105-128.
- Löser C., Seidel H., Zehnsdorf A., Stottmeister U. 2000. Microbiol degradation of hydrocarbons in soil during aerobic/anaerobic changes and under purely aerobic conditions. *Applied Microbiological Methods*, 49, 631-636.
- Lutz S., Feidt C., Jurjanz S., Rychen G., 2003. Etude de la biodisponibilité des HAP du sol chez le ruminant laitier. *Rencontre Ruminant Recherche*, Paris.
- Mac Elroy A., Farrington J., Teal J, 1989. Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment. Ed. U. Vanarasi, CRC Press, Inc, Boca Raton, Floride, USA. 1-39.
- MacKay D., Shin W.Y., 1991. Illustrated handbook of physical-chemical properties and environmental fate of organics chemicals, II, Lewis, Chelsea, Mich Publishers.
- Macleod C.J.A., 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&Biochemistry* 35, 1443-1450.
- Maliszewska-Kordybach B., 1996. Polycyclic aromatic hydrocarbons in agricultural soils in Poland: preliminary proposals for criteria to evaluate the level of soil contamination. *Applied Geochemistry* 11, 121-127.
- Martens D., Maguhn J., Spitzauer, Kettrup A., 1997. Occurrence and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in an agricultural ecosystem. *Fresenius J. Anal. Chem.* 359, 546-554.
- Martens R., Wolter M., Bahadir M., Zadrazil F., 1999. Mineralization of <sup>14</sup>C-labelled highly-condensed polycyclic aromatic hydrocarbons in soils by *Pleurotus* sp. Florida. *Soil Biology and Biochemistry* 31, 1893-1899.
- Mastral A.M., López J.M., Callén M.S., García T., Murillo R., Navarro M., 2003. Spatial and temporal PAH concentrations in Zaragoza, Spain. *Sci Total Environ* 307, 111-124
- Matsuzawa S., Nasser-Ali L., Garrigues P., 2001. Photolytic of polycyclic aromatic hydrocarbons in diesel particulate matter deposited on the ground. *Environ. Sci.Technol.* 35, 3139-3143.
- Mayland H.F., Florence A.R., Rosenau R.C., Lazar V.A., Turner H.A., 1975. Soil ingestion by cattle on semiarid range as reflected by titanium analysis of feces. *J. Range Manag.*, 28, 448-452

- McLachlan M.S., 1994. Model of the fate hydrophobic contaminants in cows. *Environ. Sci. Technol.* 28, 2407-2414.
- Meharg A.A., Wright J., Dyke H., Osborn D., 1998. Polycyclic aromatic hydrocarbons dispersion and deposition to vegetation and soil following a large scale chemical fire. *Environ Poll* 99, 29-36.
- Mes J., Davies D.J., Lau P.Y., 1980. The effect of extraction technique on the fat content, polychlorinated biphenyl level and tri-to octaphenyl Polycyclic aromatic hydrocarbons distribution in human milk. *Chemosphere* 9 (12), 763-769.
- Michel G., Salomon F.V., Gutte G., 1987. Morphologie Landwirtschaftlicher Nutztiere. VEB Deutscher Landwirtschaftsverlag.
- Mielke H.W., Wang G., Gonzales C.R., Powell E.T., B. Le, Quach V.N., 2004. PAH and metals in the soils of inner-city and suburban New Orleans, Louisiana, USA. *Environ. Toxicol. Pharmacol* 18, 243-247.
- Moeini-Nombel L., Matsuzawa S., 1998. Effect of solvents and a substituent group on photooxidation of fluorene. *J Photochem Photobiol A: Chemistry* 119, 15-23.
- Mouriot J., 2005. Extractibilité du phénanthrène et du benzo[a]pyrène par du jus de rumen synthétique. Stage de DEA.
- Müller J.F., Hawker D.W., McLachlan M.S., Connell D.W., 2001. PAHs, PCDD/Fs, PCBs and HCB in leaves from Brisbane, Australia. *Chemosphere* 43, 507-515.
- Niederer M., Maschka-Selig A., Hohl C., 1995. Monitoring polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metals in urban soil, compost and vegetation. *Environ. Sci. & Pollut. Res.* 2, 83-89.
- Noordam M.Y., Boon P.E., van Raamsdonk L.W.D., Mengelers M.J.B., van Klaveren J.D., 2002. A probabilistic model to calculate the effect of policy measurements in animal feed on human exposure to dioxins. Rikilt, Institute of Food Safety, Report 2002.021.
- Northcott G.L., Jones K.C., 2000. Experimental approaches and analytical techniques for determining organic compound bound residues in soil and sediment. *Environ Poll* 108, 19-43.
- Northcott G.L., Jones K.C., 2001. Partitioning, extractibility and formation of nonextractable PAH residues in soil. Compound differences in aging and sequestration. *Environ. Sci. Technol.* 35, 1103-1110.
- Olling M., Derks H.J.G.M., Berende P.L.M., Liem A.K.D., de Jong A.P.J.M, 1991. Toxicokinetics of eight 13-labelled polychlorinated dibenzo-p-dioxins and -furans in lactating cows. *Chemosphere* 23, 1377-1385.



Oomen A., Sips A.J.A.M., Grotn 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. *Environ. Sci. Technol.* 34, 297-303.

Oomen A.G., Hack A., Minekus M., Zeijdner E., Cornelis C., Schoeters G., Verstraete W., Van de Wiele T., Wragg J., Rempelberg C.J.M., Sips A.J.A.M., Van Wijnen J.H., 2002. Comparison of five in vitro digestion models to study the bioaccessibility of soil contaminants. *Environ. Sci. Technol.* 36, 3326-3334.

Orpin C.G. 1981. Fungi in ruminant degradation. In Agricultural Science Seminar: Degradation of plant cell wall material, 129-150, Agricultural Research Council, London, England.

Ortage-Calvo J.J., Marchenko A.I., Vorobyov A.V., Borovick R.V., 2003. Chemotaxis in polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria isolated from coal-tar- and oil-polluted rhizospheres. *FEMS Microbiol Ecol* 44, 373-381.

Palayer J., 1997. Le point sur les hydrocarbures aromatiques polycycliques. Agence de l'eau Seine Normandie, 63 p.

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. *Enviro. Toxicol. Chem.* 9, 187-195.

Pathirana S., Connell D.W., Vowles D., 1994. Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in an urban roadway system. *Ecotoxicol Environ Saf.* 28, 256-269.

Phillips D.H., 1999. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the diet. *Mutat Res* 443, 139-147.

Pu X., Lee L.S., Galinsky R.E., Carlson G.P., 2004. Evaluation of a rat model versus a physiologically extraction test for assessing phenanthrene bioavailability from soils. *Toxicol Sci* 79, 10-17.

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. *Int J Toxicol* 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. *Environ. Sci. Technol.* 35, 1637-1643.

Richnow H.H., Seifert R., Hefter J., Link M., Francke W., Schaefer G., Michaelis W., 1997. Organic pollutants associated with macromolecular soil organic matter: mode of binding. *Org. Geochem.* 26, 745-758.

Richnow H.H., Seifert R., Kästner M., Mahro B., Horsfiel B., Tiedgen U., Böhm S., Michaelis W., 1995. Rapid screening of PAH-residues in bioremediation soils. *Chemosphere* 31, 3991-3999.

Rockne K., Strand S., 2001. Anaerobic biodegradation of naphthalene, phenanthrene, and biphenyl by a denitrifying enrichment culture. *Water Res* 35,291-299.

Roos P.H., Van Afferden M., Strotkamp D., Pfeifer F., Hanstein W.G., 1996. Liver microsomal levels of cytochrome P450IA1 as biomarker for exposure and bioavailability of soil-bound polycyclic aromatic hydrocarbons. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 30, 107-113.

Rost H., Loibner A.P., Hasinger M., Braun R. and Szolar O.H.J., 2002. Behavior of PAHs during cold storage of historically contaminated soil samples. *Chemosphere* 49, 1239-1246.

Ruby M.V., Davis A., Link T.E., Schoof R., Chaney R.L., Freeman G.B., Bergstrom P., 1993. Development of an *in vitro* screening test to evaluate the *in vivo* bioaccessibility of ingested mine-waste lead. *Environ. Sci. Technol.* 27, 2870-2877.

Russell J.B., Sniffen C.J., Van Soest P.J., 1983. Effect of carbohydrate limitation on degradation and utilization of casein by mixed rumen bacteria. *J. Dairy Sci.* 66 (4), 763-775.

Saison C., Perrin-Ganier C., Amellal S., Morel J.L., Schiavon M., 2004. Effect of metals on the adsorption and extractability of <sup>14</sup>C-phenanthrene in soils. *Chemosphere* 55(3):477-85.

Samanta S.K., Singh O.V., Jain R.J., 2002. Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. *Trends Biotechnol* 20, 243-248.

Sarkar D., Datta R., 2003. A modified *in vitro* method to assess bioavailable arsenic in pesticide-applied soils. *Environ Poll* 126, 363-366.

Schomldt A., Jacob J., Grimmer G., 1981. Dose-dependent induction of rat liver microsomal aryl hydrocarbon monooxygenase by benzo[k]fluoranthene. *Cancer Letter* 13, 249-257.

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, 711-8.

Shabad L.M., 1980. Circulation of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in the human environment and cancer prevention. *JNCI* 64, 405-409.

Sims R.S., 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. *Environ Toxicol Chem* 9, 187-195.

Skupinska K., Misiewicz I., Kasprzycka-Guttman T., 2004. Polycyclic aromatic hydrocarbons: physicochemical properties, environmental appearance and impact on living organisms. *Drug Research* 61, 233-240.

Slobs W., Olling 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., Jones K.C., 2000. Particles and vegetation: implications for the transfer of particle-bound organic contaminants to vegetation. *Sci Total Environ* 246, 207-236.

Smith K.E.C., Thomas G.O., Jones K.C., 2001. Seasonal and species differences in the air-pasture transfer of PAHs, *Environ.Sci.Technol.* 35, 2156-2165.

Smith M.J., Lethbridge G., Burns R.G., 1999. Fate of phenanthrene, pyrene and benzo[a]pyrene during biodegradation of crude oil added to two soils. *FEMS Microbiol Lett* 173, 445-452.

Stavric B. et Klassen R., 1994. Dietary effects on the uptake of benzo[a]pyrene. *Fd Chem Toxic* 32, 727-734.

Stevens G., Walley I., 1966. Tissue and milk residues arising from the ingestion of single dose of diquat and paraquat by cattle. *J. Sci. Food Agric.* 17, 472-475.

Stewart C.S., Bryant M.P., 1988. The rumen bacteria. The rumen microbial ecosystem. Edition P.N.Hobson, Elsevier Applied Science.

Stringfellow W.T., Alvarez-Cohen L., 1999. Evaluating the relationship between the sorption of PAHs to bacterial biomass and biodegradation. *Wat. Res.* 33, 2535-2544.

Sweetman A.J., Thomas G.O., Jones K.C., 1999. Modelling the fate and behaviour of lipophilic contaminants in lactating dairy cows. *Environ Poll* 104, 261-270.

Tang J., Carroquino M.J., Robertson B.K., Alexander M., 1998. Combined effect of sequestration and bioremediation in reducing the bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. *Environ. Sci. Technol.* 32, 3586-3590.

Tang J., Liste H.H., Alexander M., 2002. Chemical essays of bioavailability to earthworms of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. *Chemosphere* 48, 35-42.

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 in vitro test. *Environ Poll* 140, 279-285.

Tavares M., Pinto J.P., Souza A.L., Scarmínio I.S., Solci M.C., 2004. Emission of polycyclic aromatic hydrocarbons from diesel engine in a bus station, Londrina, Brazil Atmospheric Environment, Volume 38, Issue 30, September 2004, Pages 5039-5044

The influence of polycyclic aromatic hydrocarbons as inducers of monooxygenase on the metabolite profile of benz[a]anthracene in rat liver microsomes. *Cancer Letters* 14, 175-185.

Thiele S., Brümmer G.W., 2002. Bioformation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil under oxygen deficient conditions. *Soil Biology&Biochemistry* 34, 733-735.

Tuhackova J., Cajthaml T., Novak K., Novotny C., Mertelik J., Sasek V., 2001. Hydrocarbon deposition and soil microflora as affected by highway traffic. *Environ Poll* 113, 255-262.

Umbreit T.H., Hesse E.J., Gallo M.A., 1988. Bioavailability and cytochrome P-450 induction from 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin contaminated soils from times beach, Missouri, and Newark, New Jersey. *Drug Chem Toxicol* 11 (4), 405-418.

Van de Wiel J.A.G., Fijneman P.H.S., Duijf C.M.P., Anzion R.B.M., Theuws J.L.G., Bos R.P., 1993. Excretion of benzo[a]pyrene and metabolites in urine and feces of rats: influence of route of administration, sex and long-term ethanol treatment. *Toxicology* 80, 103-115.

Van de Wiele T., Vanhaecke L., Boeckert C., Peru K., Headley J., Verstraete W., Siciliano S., 2005. Human colon microbiota transform polycyclic aromatic hydrocarbons to estrogenic metabolites. *Environ Health Perspect* 113 (1), 6- 10.

Van de Wiele T.R., Peru K.M., Verstraete W., Siciliano S.D., Headley J.H., 2004. Liquid chromatography-mass spectrometry analysis of hydroxylated polycyclic aromatic hydrocarbons formed in a simulator of the human gastrointestinal tract. *J Chromatogr B* 806, 245-253.

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. *J.Environ. Qual.* 33, 1343-1353.

Van Schooten F.J., Moonen E.J.C., van der Wal L., Levels P., Kleinjans J.C.S., 1997. Determination of the polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and their metabolites in blood, feces and urine of rats orally exposed to PAH contaminated soils. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 33, 317-322.

Van Soest P.J., 1982. Nutritional ecology of the ruminant. O&B Books. Corvallis, Oregon.

Verstraete W., Devliegher W., 1996. Formation of non-bioavailable organic residues in soil: perspectives for site remediation. *Biodegradation* 7, 471-485.

Viau C., 2002. Biological monitoring of exposure to mixtures. *Toxicol Letters* 134, 9-16.

Viau C., Carrier G., Vyskočil A., Dodd C., 1995. Urinary excretion kinetics of 1-hydroxypyrene in volunteers exposed to pyrene by the oral and dermal route. *The Science of Total Environment* 163, 179-186.

Viau C., Diakité A., Ruzgýté A., Tuchweber B., Blais C., Bouchard M., Vyskocil A., 2002. Is 1-hydroxypyrene a reliable bioindicator of measured dietary polycyclic aromatic hydrocarbon under normal conditions? *J Chromatogr B* 778, 165-177.

Waldman J.M., Liroy P.J., Grennberg A., Butler J.P., 1991. Analysis of human exposure to benzo[a]pyrene via inhalation and food ingestion in the total human environmental exposure study. *J.Exposure Anal. Environ.Epidemiol.* 1:193-225.

- Wang Y., Fengkai L., Zhulu L., Zheng X., Yubin T., 1999. Photolysis of anthracene and chrysene in aquatic systems. *Chemosphere* 38, 1273-1278.
- West C.E., Horton B.J., 1976. Transfer of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons from diet to milk in rats, rabbits and sheep. *Life Sci.* 19, 543-551.
- Weston D.P., Mayer L.M., 1998. Comparison of in vitro digestive fluid extraction and traditional in vivo approaches as measures of polycyclic aromatic hydrocarbon bioavailability from sediment. *Environ Toxicol Chem* 17, 830-840.
- Wilcke W., 2000. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in soil, a review. *J.Plant Nutr.Soil Sci.* 163, 229-248.
- Wilcke W., Amelung W., 2000. Persistent organic pollutants in native grassland soils along a climosequence in north America. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 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., Jones K.C., 1993. Biological and abiotic losses of polynuclear aromatic hydrocarbons from soil freshly amended with sewage sludge. *Environ. Toxicol. Chem.* 12, 5-12.
- Wild S.R., Jones K.C., 1995. Polynuclear aromatic hydrocarbons in the united kingdom environment: a preliminary source inventory and budget. *Environ Poll* 88, 91-108.
- Wild S.R., Jones K.C., Johnston A.E., 1992. The polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) content of herbage from a long-term grassland experiment. *Atmos Environ* 26A, 1299-1307.
- Willet K.L., Loerch S.C., Willeett L.B., 1989. Effects of halogenated hydrocarbons on rumen microorganisms. *J Vet Diagn Invest* 1, 120-123.
- Wilson S.C., Jones K.C., 1993. Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *Environ Poll* 81, 229-249.
- Withey J.R., Law F.C.P., Endrenyi L., 1991. Pharmacokinetics and bioavailability of pyrene in the rat. *J Toxicol Environ Health* 32, 429-447.
- Wittsiepe J., Schrey P., Hack A., Selenk F., 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". *Int. J. Hyg. Environ. Health* 203, 263-273.
- Wong F., Harner T., Liu Q.T., Diamond M.L., 2004. Using experimental and forest soils to investigate the uptake of polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs) along a urban-rural gradient. *Environ Poll* 129, 387-398.

Wszolek P.C., LaFaunce N.A., Wachs T., Lisk D.J., 1981. Studies of possible bovine urinary excretion and rumen decomposition of fenvalerate insecticide and a metabolite. *Bull. Environm. Contam. Toxicol.* 26, 262-266.

[www.sante.gouv.fr/htm/actu/nutri2000/sommaire.htm#12](http://www.sante.gouv.fr/htm/actu/nutri2000/sommaire.htm#12)

Yokoyama M.T., Johnson K.A., Gierzak J., 1988. Sensitivity of ruminal microorganisms to pentachlorophenol. *Appl Environ Microbiol* 54 (11), 2619-2624.

Yoshitomi K.J., Shann J.R., 2001. Corn (*Zea mays* L.) root exudates and their impact on <sup>14</sup>C-pyrene mineralization. *Soil Biology&Biochemistry* 33, 1769-1776.

Youngblood W.W.; Blumer. M. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the environment: homologous series in soils and recent marine sediments. *Geochim. Cosmochim. Acta.* **1975**, 39, 1303-1315.

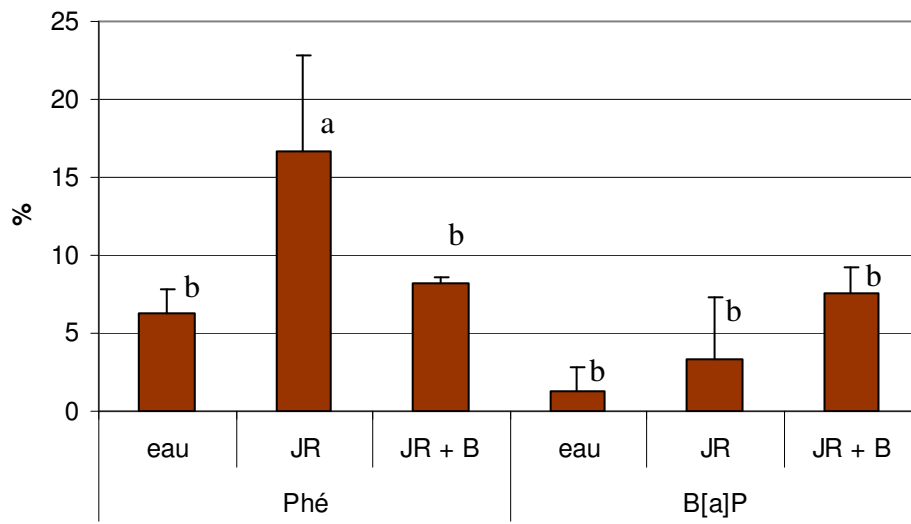
Zhao X., Zheng M., Zhang B., Zhang Q., Liu W., 2006. Evidence for the transfer of polychlorinated biphenyls, polychlorinated dibenzo-p-dioxins, and polychlorinated dibenzofurans from soil into biota. *Sci. Total Environ, sous presse.*

## **Annexes**

**Annexe 1** : Composition du jus de rumen artificiel (Russell et al., 1983)

<b>Composés</b>	<b>Quantités</b>	
<b>Glucides (g)</b>	Glucose	<b>2</b>
	cellobiose	
	amidon soluble	
	Caséine	<b>1</b>
<b>Minéraux (g)</b>	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	<b>6</b>
	NaCl	<b>12</b>
	CaCl <sub>2</sub>	<b>1,2</b>
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	<b>2,5</b>
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	<b>6</b>
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	<b>12</b>
<b>Micro-Minéraux (mg)</b>	Na <sub>4</sub> EDTA	<b>500</b>
	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	<b>200</b>
	MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	<b>200</b>
	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	<b>10</b>
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	<b>30</b>
	CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	<b>20</b>
	CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	<b>2</b>
	NiCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	<b>2</b>
	NaMoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	<b>3</b>
	<b>acides gras volatils (mg)</b>	acide acétique
acide propionique		<b>0,6ml</b>
acide butyrique		<b>0,315ml</b>
acide isobutyrique		<b>0,105ml</b>
acide 2méthylbutyrique		<b>0,105ml</b>
acide valérique		<b>0,105ml</b>
acide isovalérique		<b>0,105ml</b>
<b>Vitamines (mg)</b>	pyridoxamine	<b>2</b>
	riboflavine	<b>2</b>
	thiamine	<b>2</b>
	nicotinamide	
	Ca-Panthophténate	<b>2</b>
	acide lipoïque	<b>1</b>
	acide paraminobenzoïque	<b>0,1</b>
	acide folique	<b>0,05</b>
	coenzyme B12	<b>0,05</b>
	biotine	<b>0,05</b>
<b>Hémine (mg)</b>	hémine	<b>1</b>





**Annexe 2** : Extractibilité du 14C-Phé et du 14C-B[a]P par les différents milieux testés

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

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

**Monsieur Eric LICHTFOUSE, Chargé de Recherche, INRA-CSME-PME, Dijon**

**Monsieur Carlos SIMOES NUNES, Adjoint à la Direction, CRNA, DSM, Saint-Louis**

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

**Madame LUTZ Sophie Epouse GELEY**

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

**"Evaluation du risque de transfert des HAP du sol vers le lait chez le ruminant laitier"**

en vue de l'obtention du titre de :

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : « **Sciences agronomiques** »

Fait à Vandoeuvre, le 26 juin 2006

Le Président de l'I.N.P.L.

L. SCHUFFENECKER



NANCY BRABOIS  
2, AVENUE DE LA  
FORET-DE-HAYE  
BOITE POSTALE 3  
F - 5 4 5 0 1  
VANDŒUVRE CEDEX