



**HAL**  
open science

# Transfert des polluants organiques persistants (POP) du fourrage vers le lait chez le ruminant

Adrian Costera Pastor

## ► To cite this version:

Adrian Costera Pastor. Transfert des polluants organiques persistants (POP) du fourrage vers le lait chez le ruminant. Sciences agricoles. Institut National Polytechnique de Lorraine, 2007. Français. NNT : 2007INPL028N . tel-01752948

**HAL Id: tel-01752948**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01752948v1>**

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**

Unité de Recherche Animal et Fonctionnalités des Produits Animaux (UR AFPA)

Ecole Doctorale

Sciences et Ingénierie des Ressources, Procédés, Produits et Environnement

(RP2E)

**THESE**

présentée en vue de l'obtention du grade de

**Docteur de l'Institut National Polytechnique de Lorraine**

Spécialité : **Sciences Agronomiques**

par **Adrián COSTERA PASTOR**

le 11/06/2007 devant la commission d'examen

**Transfert des Polluants Organiques Persistants (POP) du fourrage vers le  
lait chez le ruminant**

Membres du jury :

<b>A. ANADON</b> , Professeur, FV-UC Madrid	<b>Rapporteur</b>
<b>I. DEPORTES</b> , Ingénieur ADEME, Angers	<b>Examinatrice</b>
<b>C. FEIDT</b> , Maître de Conférences HDR, ENSAIA-INPL, Vandoeuvre lès Nancy	<b>Codirecteur</b>
<b>F. LAURENT</b> , Professeur INPL, Vandoeuvre lès Nancy	<b>Président</b>
<b>P. MARCHAND</b> , Ingénieur LABERCA, EV Nantes	<b>Examineur</b>
<b>P. NOZIERE</b> , Chargé de Recherches, HDR, INRA, Clermont-Ferrand/Theix	<b>Rapporteur</b>
<b>G. RYCHEN</b> , Professeur, ENSAIA-INPL	<b>Directeur</b>

*à  
ma  
famille*

## PREFACE

*Croyez-vous qu'il faille, pour être agronome, avoir soi-même labouré la terre ou engraisé des volailles ? Mais il faut connaître plutôt la constitution des substances dont il s'agit, les gisements géologiques, les actions atmosphériques, la qualité des terrains, des minéraux, des eaux, la densité des différents corps et leur capillarité ! que sais-je ? Et il faut posséder à fond tous ses principes d'hygiène, pour diriger, critiquer la construction des bâtiments, le régime des animaux, l'alimentation des domestiques ! il faut encore, madame Lefrançois, posséder la botanique ; pouvoir discerner les plantes, entendez-vous, quelles sont les salutaires d'avec les délétères, quelles les improductives et quelles les nutritives, s'il est bon de les arracher par-ci et de les ressemer par-là, de propager les unes, de détruire les autres ; bref, il faut se tenir au courant de la science par les brochures et papiers publics, être toujours en haleine, afin d'indiquer les améliorations. . .*

---

Extrait du roman « Madame Bovary, Mœurs de provence »

Gustave Flaubert, 1856

## **REMERCIEMENTS**

Mes premiers remerciements s'adressent à Monsieur le Professeur François LAURENT pour m'avoir accueilli au sein du Laboratoire de Sciences Animales (LSA), actuelle Unité de Recherche Animal et Fonctionnalités des Produits Animaux (UR AFPA). Un grand merci pour avoir trouvé le temps de présider le jury de la soutenance.

Je remercie très sincèrement Monsieur le Professeur Guido RYCHEN de m'avoir proposé un sujet de thèse si intéressant. Sa direction et sa disponibilité m'ont beaucoup enrichi dans le domaine scientifique et personnel. Je remercie Monsieur le Maître de Conférences Cyril FEIDT (HDR), codirecteur de la thèse, pour l'apport constant de ses connaissances et pour sa disponibilité. Ma reconnaissance va également à Monsieur le Maître de Conférences Stefan JURJANZ pour la disponibilité dédiée tout au long de ce travail. Le concours de ces trois enseignants-chercheurs a permis un bon travail en équipe.

Ce travail n'aurait pas été possible sans le soutien financier de l'Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie (ADEME) ainsi que de l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA). La convention établie entre ces deux institutions et l'Institut National Polytechnique de Lorraine (INPL) m'a donné l'occasion de travailler en France.

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur François ANDRE, Monsieur le Professeur Bruno LE BIZEC, Monsieur Philippe MARCHAND et Monsieur Fabrice MONTEAU pour leur accueil et leur disponibilité au LABERCA. Un nouveau merci pour M. MARCHAND pour avoir trouvé la disponibilité de juger cette thèse en tant qu'examinateur.

Il m'est agréable d'exprimer toute ma gratitude à Monsieur le Professeur Arturo ANADON et Monsieur le Docteur Pierre NOZIERE pour avoir accepté de juger mon travail en tant que rapporteurs. De la même façon je remercie Madame le Docteur Isabelle DEPORTES de m'avoir fourni un suivi critique au cours de la thèse et de juger mon travail en tant qu'examinatrice.

Une personne spéciale comme Catherine LARRIERE mérite une mention spéciale : merci pour ta patience, ta bonne humeur, ton efficacité et pour la joie que tu dégages. Merci pour tout !

Toutes les personnes citées ici, collègues, amis etc. n'ont pas seulement contribué à l'avancement de mon travail, mais aussi à mon enrichissement dans la culture et la langue françaises, et pour cela je les remercie énormément. Chacun se souviendra, comme moi, de l'aide apportée à l'un au l'autre moment : ABOU CHAKRA Oussama, Dr. AMIAUD Bernard, AMOUSSU, Balbine, BALANDRAS Frédérique, BAYARD Karine, BECHE Christophe, BEGIN Marie, Pr. BLANCHART Gérard, BOUDET Benjamin, BRICE Jean-Claude, BROSSEAUD Aline, Dr. CAMPAGNA Sylvie, DESALME Dorine, Dr. DUCOULOMBIER Cécile, DUGNY François, Dr. DZIURLA Marie-Antoinette, GADEHILDEVERT Christelle, Dr. GARREC Jean-Pierre, GRANDCLAUDON Christine, Dr. GROVA Nathalie, Dr. GUIAVARC'H Yann, GUIMONT Philippe, Dr. HADDADI Kahina, HAILOUA BLANCO David, HYARDIN Aude, Dr. JOUBES Jérôme, Pr. KEROMNES Yvon, KLEIN Céline, KONCHYKOWSKA Mariana, LAPOLE David, LAZARTIGUES Angélique, Dr. LE ROUX Yves, LECOQ Cyrielle, Dr. LUTZ Sophie, MOURIOT Julien, Dr. MOUSSAOUI Fatima, OUNNAS Fayçal, PINEAU Valérie, RAKOTONAIVO Rivoravaka, Dr. RANDRIANARIVELOSEHENO Arsène, SIRIANNI Stéphane, SOLIGOT-HOGNON Claire, STEFANOV Jordan, Dr. TANKARI DAN-BADJO Abdourrahmane, TFAILI Walid, TOGNELLA Olivier, TOUSSAINT Hervé, VENISSEAU Anaïs, Dr. VESSIGAUD Sandrine et VEYRAND Bruno.

Que pourrais-je dire de ma chère Cyntia Elda PEREZ JIMENEZ et de mon cher Matthias ROTHE... ?

A mes parents et mes frères : un grand merci, surtout pour leur compréhension, tout en étant loin.

Je remercie aussi ceux que j'oublie et pourquoi pas Gustave FLAUBERT pour ses éloges envers les Agronomes...

## RESUME

Le ruminant laitier est exposé aux POP déposés par voie atmosphérique sur les fourrages ou le sol. L'objectif de cette thèse est de préciser le transfert des POP du fourrage vers le lait. Les POP étudiés figurent dans le protocole d'Aarhus et dans la convention de Stockholm : il s'agit des PCDD/F, PCB et HAP. Dans un premier temps, une étude sur le rôle du rumen dans l'extraction des HAP de l'herbe à partir d'une approche *in sacco* a été effectuée. Pour cela, de l'herbe contaminée en 3 HAP modèles (PHE, PYR et B[a]P) a été incubée dans le rumen des vaches fistulées afin de déterminer les cinétiques de disparition des HAP, des alcanes cuticulaires et de la matière sèche. La disparition *in sacco* des 3 HAP s'est avérée très rapide (83% au bout d'1h d'incubation). Les alcanes cuticulaires et la matière sèche ont présenté une dynamique de disparition plus lente suggérant une adsorption superficielle des HAP. Une deuxième étude expérimentale *in vivo* a consisté à étudier le transfert de HAP de l'herbe et du sol, à des niveaux équivalents, vers le lait chez la chèvre. Il a été conclu que les HAP natifs sont très faiblement transférés vers le lait quelle que soit la matrice d'apport. L'étude du transfert de PCDD/F et PCB du foin contaminé vers le lait a fait l'objet d'une troisième expérimentation. A la différence des HAP, toutes les molécules chlorées étudiées ont été transférées vers le lait à des niveaux importants. Pour les PCB, les facteurs de transfert ont varié de 5 à 90% selon les molécules, et pour les PCDD/F de 1 à 40%. Les résultats révèlent donc un risque d'exposition de l'homme *via* le lait, notamment pour les molécules organochlorées. Pour ce qui est des HAP, la toxicité du 1-OH-pyrène ainsi que les normes actuelles sur les teneurs de HAP dans le lait devront être précisées.

**Mots clés** : transfert, POP, métabolites, fourrage, lait, ruminant.



## TABLE DE MATIERES

	Page
Production scientifique.....	10
Liste d'abréviations.....	11
Liste de tableaux.....	13
Liste de figures.....	15
Liste de schémas.....	17
Liste des annexes.....	18
<b>INTRODUCTION GENERALE.....</b>	<b>19</b>
<b>SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>22</b>
1. Introduction.....	23
2. Contamination des fourrages en POP.....	30
2.1. Facteurs de variation de la partition des POP entre l'air ambiant et les végétaux..	32
2.1.1. Facteurs de variation de la partition des PCDD/F et PCB entre l'air et les végétaux.....	33
2.1.2. Facteurs de variation de la partition des HAP entre l'air ambiant et les végétaux.....	35
2.2. Importance de la cuticule et des alcanes cuticulaires.....	36
2.3. Méthodes analytiques d'identification et quantification des POP sur des matrices végétales contaminées.....	38
2.3.1. Collecte et préparation.....	38
2.3.2. Extraction.....	38
2.3.3. Purification.....	39
2.3.4. Méthodes séparatives.....	39
2.3.5. Détection-Identification.....	39
2.3.6. Principe de fluorescence.....	40
2.3.7. Principe de la spectrométrie de masse.....	40
2.4. Conclusions.....	42
3. Le ruminant et son rôle sur la biodisponibilité des POP.....	43
4. Absorption, Distribution, Métabolisme et Excrétion des POP chez le ruminant.....	45
4.1. Absorption des POP.....	45
4.1.1. Absorption des PCDD/F et PCB.....	45
4.1.2. Absorption des HAP.....	46
4.2. Distribution des POP.....	47
4.3. Métabolisme des POP.....	48
4.3.1. Métabolisme des PCDD/F et PCB.....	48
4.3.2. Métabolisme des HAP.....	50
4.4. Excrétion des POP.....	54
4.4.1. Excrétion des PCDD/F et PCB.....	54
4.4.2. Excrétion des HAP.....	57
5. Caractérisation du transfert « herbe-produits d'excrétion » des POP.....	60
5.1. Transfert des PCDD/F et PCB.....	61
5.2. Transfert des HAP.....	62

6. Conclusions de la synthèse bibliographique.....	64
<b>PARTIE EXPERIMENTALE</b>	66
<b>CHAPITRE 1 : Etude <i>in sacco</i> sur l'extraction des HAP de l'herbe dans le rumen</b>	66
1. Introduction.....	67
2. Matériel et méthodes.....	68
2.1. Herbe utilisée.....	68
2.2. Incubation dans le rumen.....	68
2.3. Détermination de la teneur en HAP.....	70
2.4. Détermination de la teneur en alcanes.....	73
2.5. Traitement de données.....	74
2.6. Analyse statistique.....	74
3. Résultats.....	75
3.1. Teneurs de HAP dans l'herbe.....	75
3.2. Disparition <i>in sacco</i> des HAP, d'alcanes et de la MS.....	75
3.3. Modélisation et comparaison de la disparition des HAP, des alcanes et de la MS..	77
4. Discussion.....	78
5. Conclusions.....	79
<b>CHAPITRE 2 : Transfert de HAP et métabolites du foin et du sol vers le lait chez la chèvre.....</b>	80
1. Introduction .....	81
2. Matériel et méthodes.....	82
2.1. Animaux, schéma expérimental et alimentation.....	82
2.2. Contamination des matrices.....	83
2.2.1. Solution huileuse.....	83
2.2.2. Foin.....	83
2.2.3. Sol.....	84
2.3. Echantillonnage et traitements.....	85
2.4. Analyses.....	85
2.4.1. Détermination des HAP des matrices cremophor, foin et sol.....	85
2.4.2. Détermination des HAP et des métabolites dans le lait.....	86
2.4.3. Détermination des HAP et des métabolites dans les urines.....	88
2.5. Calculs et gestion des données.....	90
3. Résultats.....	90
3.1. Contamination en HAP des matrices cremophor, foin et sol. Ingestion de HAP...	90
3.2. Excrétion de HAP et métabolites dans le lait.....	92
3.3. Excrétion de HAP et métabolites dans les urines.....	94
3.4. Transfert des molécules étudiées vers le lait et les urines.....	95
4. Discussion.....	97

4.1. Dynamique des excréctions.....	97
4.2. Transfert.....	101
5. Conclusions.....	102
<b>CHAPITRE 3 : Transfert de PCDD/F et PCB du foin vers le lait chez la chèvre.....</b>	<b>104</b>
1. Introduction.....	105
2. Matériel et méthodes.....	106
2.1. Animaux et alimentation.....	106
2.2. Mesures et traitement des échantillons.....	106
2.3. Analyses.....	107
2.3.1. Extraction.....	107
2.3.2. Purification.....	107
2.3.3. Quantification.....	108
2.4. Paramètres calculés.....	109
2.5. Analyse statistique.....	110
3. Résultats.....	110
3.1. PCDD/F et PCB dans les aliments.....	110
3.2. Excrétion de PCDD/F et PCB dans le lait.....	113
3.3. Taux de transfert.....	114
4. Discussion.....	116
5. Conclusions.....	118
<b>DISCUSSION GENERALE.....</b>	<b>119</b>
1. Extraction ruminale des POP de matrices fourragères ou du sol.....	120
2. Variation de la biodisponibilité des POP selon le composé.....	121
3. Transfert de POP vers le lait et conséquences en termes de sécurité alimentaire.....	124
4. Pertinence et limites des méthodes utilisées.....	125
<b>CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>127</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>130</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>152</b>

## PRODUCTION SCIENTIFIQUE

### PUBLICATIONS

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

### COMMUNICATIONS

Le Bizec B., Marchand P., **Costera A.**, Venisseau A., Brosseaud A., Gadé-Hildevert C., André F. and Rychen G. 2005. Levels of PCDD/Fs and PCBs in goat's milk exposed to a chronic intake of contaminated hay. *25<sup>th</sup> International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs*. August 21-26, **Toronto** (Canada).

**Costera A.**, Feidt C. Jurjanz S. et Rychen G. 2005. Evaluation du transfert des PCDD/F et PCB du foin naturellement contaminé vers le lait. *Séminaire de l'Ecole Doctorale RP2E*, 13 janvier 2005, **Nancy** (France).

---

**Costera A.**, Feidt C., Dziurla M.A., Monteau F., Toussaint H and Rychen G. 2007. PAHs transfer to milk in exposed lactating ruminants. *10th European Nutrition Conference*. July 5-6. **Paris** (France). **Accepted for poster communication.**

**Costera A.**, Feidt C., Rychen G. et Jurjanz S. Extraction dans le rumen des hydrocarbures aromatiques polycycliques de l'herbe. *14<sup>e</sup> journées 3R (Rencontres Recherches Ruminants)*. 5-6 décembre 2007. **Paris** (France). **Accepté pour communication poster.**

## LISTE DES ABREVIATIONS

$^{13}\text{C}$  : Ion Carbon 13  
 $^{14}\text{C}$  : Ion Carbon 14  
ACN : Acénaphthène  
ANL : Acénaphtylène  
ANT : Anthracène  
ASE : Extracteur de Solvants Accéléré  
B(a)PMO : benzo(a)pyrène monooxygénase  
B[a]A : Benzo[a]anthracène  
B[a]P : Benzo[a]pyrène  
B[b]F : Benzo[b]fluoranthène  
B[g,h,i]P : Benzo[g,h,i]perylène  
B[k]F : Benzo[k]fluoranthène  
C21-C35 : Alcanes  
CEE-NU : Commission Economique des Nations Unies pour l'Europe  
CG : Chromatographie Gazeuse  
CG-SM : Chromatographie Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masses  
CHRY : Chrysène  
COOH : groupe carboxyle  
COR : « Carry-Over Rate »  
CYP, CYP450 : Cytochrome P450  
D[a,h]A : Dibenzo[a,h]anthracène  
DDT : dichlorodiphényltrichloroéthane  
DL : Dioxin Like  
ECOD : Ethoxycoumarine O-dééthylase  
ENSAIA : Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires  
EROD : Ethoxyrésosfurine-O-dééthylase  
FLUO : Fluorène  
FLUOT : Fluoranthène  
FT : Facteur de Transfert  
GC-HRMS : Chromatographie Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masses d'Haute Résolution  
GST : glutathion-S-transferases  
HAP : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques  
HCB : Hexachlorobenzène  
HpCDD : Heptachlorodibenzo-*p*-dioxine  
HpCDF : Heptachlorodibenzofurane  
HPLC : Chromatographie Liquide à Haute Pression  
HxCDD : Hexachlorodibenzo-*p*-dioxine  
HxCDF : Hexachlorodibenzofurane  
I : Indicateurs  
I[1,2,3-cd]P : Indeno[1,2,3-cd]pyrène  
JOCE : Journal Officiel de la Communauté Européenne  
 $K_{ow}$  : Coefficient de partage octanol-eau  
LABERCA : LABoratoire d'Etudes sur les Résidus et Contaminants des Aliments  
m/z : rapport masse/charge d'ions moléculaires  
MFO : Oxydase à Fonctions Multiples  
MG : Matière Grasse  
MS : Matière Sèche

NA : Naphtalène  
NH<sub>2</sub> : groupe amino  
OCDD : Octachlorodibenzo-*p*-dioxine  
OCDF : Octachlorodibenzofurane  
OH : groupe hydroxyle  
OMS : Organisation Mondiale de la Santé  
PCB : Polychlorobiphényles  
PCB-DL : Polychlorobiphényles-Dioxin Like  
PCB-I : Polychlorobiphényles-Indicateurs  
PCDD : Polychlorodibenzo-*p*-Dioxines  
PCDF : Polychlorodibenzofuranes  
PeCDD : Pentachlorodibenzo-*p*-dioxine  
PeCDF : Pentachlorodibenzofurane  
PHE : Phenanthrène  
PNUE : Programme des Nations Unies pour l'Environnement  
POP : Polluants Organiques Persistants  
PYR : Pyrène  
SIM : Single Ion Monitoring  
SULT : sulfotransferases  
TCDD : Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxine  
TCDF : Tetrachlorodibenzofurane  
TEF : Facteur d'Equivalence Toxique  
TEQ : Quantité d'Equivalence Toxique  
UDPGA : UDP-acide glucuronique  
UV : UltraViolet  
v : *verso*

## LISTE DES TABLEAUX

	Page
Tableau 1 : Liste des POP établie dans le cadre du Protocole d'Aarhus et de la Convention de Stockholm.....	24
Tableau 2 : Structure chimique des PCDD, PCDDF et PCB.....	26
Tableau 3 : Teneurs en PCDD/F et PCB dans des fourrages produits à proximité d'une cimenterie et d'un incinérateur.....	31
Tableau 4 : Teneurs en HAP dans des fourrages produits à proximité de sources potentiellement polluantes.....	31
Tableau 5 : Valeurs des coefficients de transfert aliment-lait des PCDD/F chez la vache cités dans la bibliographie.....	61
Tableau 6 : Profil d'alcane présents dans les différentes graminées utilisées.....	69
Tableau 7 : Temps de rétention des HAP déterminés par HPLC et longueurs d'onde d'excitation et d'émission fluorimétrique pour leur identification.....	72
Tableau 8 : Rendement d'extraction des HAP de l'herbe.....	73
Tableau 9 : Limites de détection et quantification (GC-MS) des HAP dans le lait ( $\mu\text{g/L}$ ).....	88
Tableau 10 : Limites de détection et quantification en GC-MS des HAP dans les urines ( $\mu\text{g/L}$ ).....	89
Tableau 11 : Concentrations de HAP dans les matrices étudiées suite à leur contamination.....	91
Tableau 12 : Quantités moyennes de HAP ingérés par les chèvres à partir des matrices contaminées.....	91
Tableau 13 : Facteurs de transfert (%) cumulés dans le lait selon la matrice d'apport....	96
Tableau 14 : Facteurs de transfert (%) cumulés des métabolites dans les urines selon la matrice d'apport.....	97
Tableau 15 : Concentrations moyennes ( $\text{ng kg}^{-1}$ matière sèche, MS) de PCDD/F et de PCB dans les aliments.....	112
Tableau 16 : Concentrations moyennes ( $\text{ng kg}^{-1}$ MG du lait) de PCDD/F et de PCB au plateau d'équilibre et temps nécessaire pour l'obtention de ce plateau (jours).....	113

	Page
Tableau 17 : Evolution des valeurs WHO-I-TEQ* des PCDD/F et PCB dans la MG du lait (ng kg <sup>-1</sup> ) suite à l'ingestion chronique de foin contaminé.....	114
Tableau 18 : Concentration moyenne en HAP (n=5) dans l'herbe naturellement contaminée (témoin) et concentration moyenne après incubation dans l'eau et dans le jus de rumen.....	159



## LISTE DE FIGURES

	Page
Figure 1 : Structure des 16 HAP prioritaires proposés par l'U.S.-E.P.A. ....	28
Figure 2 : Liste de HAP prioritaires établie par la Commission Européenne.....	29
Figure 3 : Principales voies de contamination du végétal par des molécules organiques (d'après Smith et Jones, 2000).....	33
Figure 4 : Représentation générale des composants cuticulaires, la paroi cellulaire et la cellule non photosynthétique des plantes (Kunst et Samuels, 2003).....	37
Figure 5 : Cinétiques de disparition <i>in sacco</i> des HAP de l'herbe.....	75
Figure 6 : Cinétiques de disparition <i>in sacco</i> d'alcane cuticulaires.....	76
Figure 7 : Cinétique de disparition <i>in sacco</i> de la MS de l'herbe.....	76
Figure 8 : Modèles de disparition <i>in sacco</i> dans le rumen des HAP, du C <sub>31</sub> et de la MS..	77
Figure 9 : Dépôt des HAP sur une feuille et localisation du C <sub>31</sub> dans la cuticule.....	79
Figure 10 : Cinétiques d'excrétion du PYR dans le lait suite à l'ingestion des matrices étudiées.....	92
Figure 11 : Cinétiques d'excrétion du 1-OH-Pyrène dans le lait suite à l'ingestion de différentes matrices étudiées.....	93
Figure 12 : Cinétiques d'excrétion du 3-OH-phénanthrène dans le lait suite à l'ingestion des matrices étudiées.....	93
Figure 13 : Cinétiques d'excrétion du 2-OH-phénanthrène dans le lait suite à l'ingestion des matrices étudiées.....	94
Figure 14 : Cinétiques d'excrétion du 1-OH-Pyrène dans les urines suite à l'ingestion des matrices étudiées.....	95
Figure 15 : Cinétiques d'excrétion du 3-OH-phénanthrène dans les urines suite à l'ingestion des matrices étudiées.....	95
Figure 16 : Cinétiques corrigées de 1-OH-pyrène dans le lait à partir d'une ingestion équivalente en pyrène par les trois matrices.....	99
Figure 17 : Cinétiques corrigées de 1-OH-pyrène dans les urines à partir d'une ingestion équivalente en pyrène par les trois matrices.....	99
Figure 18 : Cinétiques corrigées du 3-OH-phénanthrène dans le lait à partir d'une ingestion égale en phénanthrène par les trois matrices.....	100
Figure 19 : Cinétiques corrigées du 3-OH-phénanthrène dans les urines à partir d'une ingestion égale en phénanthrène par les trois matrices.....	100

	Page
Figure 20 : Facteurs de transfert (%) des PCDD/F du foin contaminé vers le lait chez la chèvre.....	115
Figure 21 : Facteurs de transfert (%) des PCB du foin contaminé vers le lait chez la chèvre.....	116
Figure 22 : Comparaison des profils des PCDD/F entre le foin contaminé et le lait de chèvre ayant consommé ce foin.....	122
Figure 23 : Comparaison des profils des PCB indicateurs entre le foin contaminé et le lait de chèvre ayant consommé ce foin.....	123
Figure 24 : Comparaison des contaminations de l'herbe en HAP avant et après rinçage.	158
Figure 25 : Comparaison entre traitements de la concentration dans l'herbe artificiellement contaminée pour une molécule donnée.....	160

## LISTE DE SCHEMAS

	Page
Schéma 1 : Méthode d'extraction des HAP de l'herbe (Dugay <i>et al.</i> , 2002) adaptée.....	71
Schéma 2 : Apport de HAP aux chèvres à partir des matrices contaminées.....	83
Schéma 3 : Détermination du pouvoir d'extraction des HAP de l'herbe par l'eau et le jus de rumen.....	154
Schéma 4 : Extraction des HAP de l'herbe <i>in vitro</i> par incubation dans l'eau.....	155
Schéma 5 : Procédure d'extraction des HAP de l'herbe <i>in vitro</i> par le jus du rumen.....	156

## LISTE DES ANNEXES

	Page
Annexe 1 : Procédures et résultats principaux de l'essai préliminaire <i>in vitro</i> sur l'extraction des HAP de l'herbe.....	153
Annexe 2 : Certificat d'analyse du mélange commercial de HAP (Interchim) .....	161

# **INTRODUCTION GENERALE**

## **INTRODUCTION GENERALE**

Les activités humaines sont à l'origine d'émissions de Polluants Organiques Persistants (POP) vers l'atmosphère et engendrent des dépôts sur l'ensemble de la surface terrestre. Ces dépôts affectent les zones de culture et de pâturages situées à proximité ou même à distance des zones émettrices. La limitation des rejets a nécessité une entente à l'échelle mondiale et a fait l'objet de 2 textes internationaux :

- Le protocole d'Aarhus, signé en juin 1998 dans le cadre de la Convention de Genève sur la Pollution Transfrontalière Longue Distance, sous l'égide de la Commission Economique des Nations Unies pour l'Europe (CEE-NU). L'objet de ce protocole est de contrôler, de réduire ou d'éliminer les émissions de 16 de ces substances dans l'environnement. Les POP visés par ce texte autres les pesticides sont les dioxines/furannes, les polychlorobiphényles (PCB) et les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP). Ce protocole a été ratifié par la France le 25 juillet 2003 et est entré en vigueur le 23 octobre 2003.
- La convention de Stockholm, signée en mai 2001 dans le cadre du Programme des Nations Unies pour l'Environnement (PNUE). L'objet de cette convention est de contrôler, de réduire ou d'éliminer les émissions de 12 de ces substances dans l'environnement. Les POP d'origine industrielle visés par ce texte sont les dioxines / furannes, les PCB et l'hexachlorobenzène (HCB). Cette convention a été ratifiée par la France le 16 février 2004 et est entrée en vigueur le 17 mai 2004.

L'évaluation des niveaux de contamination du lait et la compréhension des mécanismes du transfert des POP du fourrage vers le lait sont des enjeux majeurs en terme de sécurité des aliments. Ainsi, l'objectif de nos recherches est de contribuer à une meilleure connaissance du transfert des POP du fourrage au lait. Le ruminant laitier, qui ingère des quantités de fourrage conséquentes, peut en effet excréter les micropolluants dans la matière grasse du lait (Fries, 1995 ; Grova *et al.*, 2000).

Ce travail de recherche se compose de trois parties principales :

- 1- Une synthèse bibliographique qui fera le point des connaissances actuelles sur le transfert des contaminants organiques du fourrage vers le lait.

- 2- Une approche expérimentale qui comprend trois expérimentations sur le devenir des HAP, des PCDD/F et des PCB du fourrage. Les études présentées consistent à :
  - \* Préciser le rôle du compartiment ruminal sur la biodisponibilité des HAP à partir d'une approche *in sacco*
  - \* Caractériser le transfert des HAP de l'herbe et du sol vers le lait
  - \* Préciser le transfert de PCDD/F et PCB du foin vers le lait
  
- 3- Une discussion générale qui situe l'apport de nos travaux dans le contexte scientifique de la sécurité des aliments. Cette dernière partie de la thèse présentera également les perspectives de recherche.

# **SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**



## SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

### 1. Introduction

La question de la contamination de l'environnement s'est peu à peu imposée face aux pollutions subies directement ou indirectement par les milieux naturels et/ou agricoles. Une grande variété de molécules polluantes est émise par les activités anthropiques et les conséquences sur les êtres vivants et les chaînes alimentaires ne sont pas bien connues. Dans cet ensemble de molécules contaminantes il faut distinguer les POP. Ces molécules sont définies par le Protocole d'Aarhus depuis 1998 (CEE-NU) à partir des 5 caractéristiques suivantes :

- 1) elles possèdent des caractéristiques toxiques
- 2) elles sont persistantes
- 3) elles sont susceptibles d'être bioaccumulées dans les organismes vivants
- 4) elles peuvent aisément être transportées dans l'atmosphère au-delà des frontières sur de longues distances et se déposer loin du lieu d'émission
- 5) elles risquent d'avoir des effets nocifs sur la santé et l'environnement aussi bien à proximité qu'à une grande distance des sources d'émission.

L'exposition chronique à ces polluants entraîne de nombreux risques sanitaires connus : malformations, cancers, déficiences immunitaires, altération de la croissance ou de la fertilité (Garban *et al.*, 2002). Un grand nombre de familles de molécules répond aux caractéristiques décrites ci-dessus mais face aux enjeux de santé la réglementation internationale a dressé une liste nominative des POP via le Protocole d'Aarhus et la Convention de Stockholm (Tableau 1).

**Tableau 1** : Liste des POP établie dans le cadre du Protocole d'Aarhus et de la Convention de Stockholm

Produits de synthèse		Sous-produits involontaires des processus industriels et de combustion
Pesticides	Produits industriels	
Hexachlorobenzène	Hexabromobiphényle	HAP
Mirex	PCB	PCDD
Toxaphène		PCDF
DDT		
Lindane (HCH)		
Aldrine		
Chlordane		
Dieldrine		
Heptachlor		
Endrine		

Diverses situations de crises (contamination en dioxines de nourriture pour bétail en Belgique en 1999 ou contamination de fourrage par les dioxines et PCB à proximité d'incinérateurs défectueux en France en 2001) ont affecté la filière agroalimentaire et renforcé une demande des consommateurs pour le droit à la sécurité des aliments et au respect du milieu naturel. Cette demande implique l'évaluation des risques de contamination des chaînes alimentaires. Il est admis que la matière grasse animale est responsable d'environ deux tiers de l'exposition humaine aux polluants organiques dans les pays industrialisés (Welsch-Pausch et McLachlan, 1998). Les POP peuvent donc être à l'origine de la contamination de matrices environnementales et biologiques. Leurs caractéristiques physico-chimiques (en particulier leur lipophilicité) et leur mode d'émission (voie atmosphérique) les amènent à être à l'origine d'un risque de transfert dans la chaîne alimentaire.

La contamination du ruminant laitier intervient lors de l'ingestion de fourrage ou de sols lorsque ceux-ci ont été soumis à des dépôts atmosphériques polluants. La connaissance du

risque de transfert des polluants organiques dans la chaîne alimentaire « fourrage-lait » représente ainsi un enjeu majeur. Plusieurs auteurs considèrent que la voie la plus importante de ce transfert chez les ruminants est l'alimentation (Kimbrough *et al.*, 1984 ; McLachlan *et al.*, 1990 ; McLachlan *et al.*, 1993). De ce fait, notre recherche a été orientée vers la contamination du ruminant *via* l'ingestion de fourrage. L'étude de trois familles de molécules a été particulièrement approfondie : les dioxines au sens large (les PolyChloroDibenzo-*para*-Dioxines (PCDD) et les PolyChloroDibenzoFuranes (PCDF), les PolyChloroBiphényles (PCB) et les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP).

Les PCDD/F forment une famille de 210 composés chimiques dont seuls 17 sont couramment étudiés car ils sont considérés comme les plus toxiques (Laurent *et al.*, 2005). Ils sont composés de deux noyaux benzéniques et diffèrent les uns des autres par le nombre et la position des atomes de chlore (au moins 4 en position 2,3,7,8) sur ces deux noyaux ainsi que par la présence d'un ou deux atomes d'oxygène (Tableau 2). Ils sont solides à température ambiante, peu ou pas volatils, fortement lipophiles (coefficient de partage octanol-eau,  $K_{ow}$ , élevée) et sont caractérisés par une durée de demi-vie chez l'homme entre 4 et 16 ans. Ils sont considérés comme mutagènes et cancérigènes chez les êtres vivants. Deux indicateurs évaluent leur toxicité : le Facteur d'Equivalence Toxique ou TEF et la Quantité d'Equivalence Toxique ou TEQ. Le TEF compare la courbe représentant la relation dose-effet d'un congénère à celle de la molécule de référence de la famille. Dans le cas des PCDD/F la 2,3,7,8-TCDD est la molécule de référence avec un TEF égal à 1. Le TEF a engendré le second indicateur qui permet de mesurer la toxicité d'un mélange, le TEQ qui résulte de l'équation suivante :

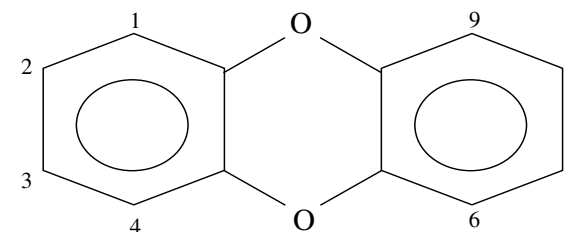
$$TEQ_{\text{mélange}} = \sum [PCDD/F]_i \times TEF_i$$

$i$  : un composé donné

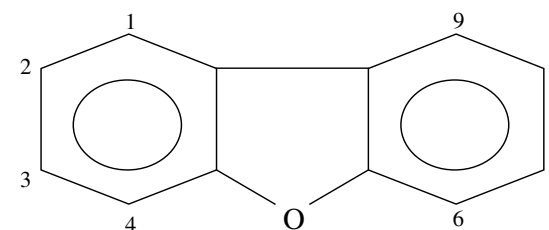
$[PCDD/F]_i$  : concentration de la molécule dans la matrice testée.

Tableau 2 : Structure chimique des PCDD, PCDDF et PCB

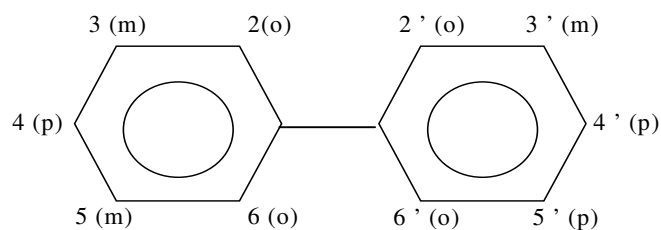
### PCDD



### PCDF



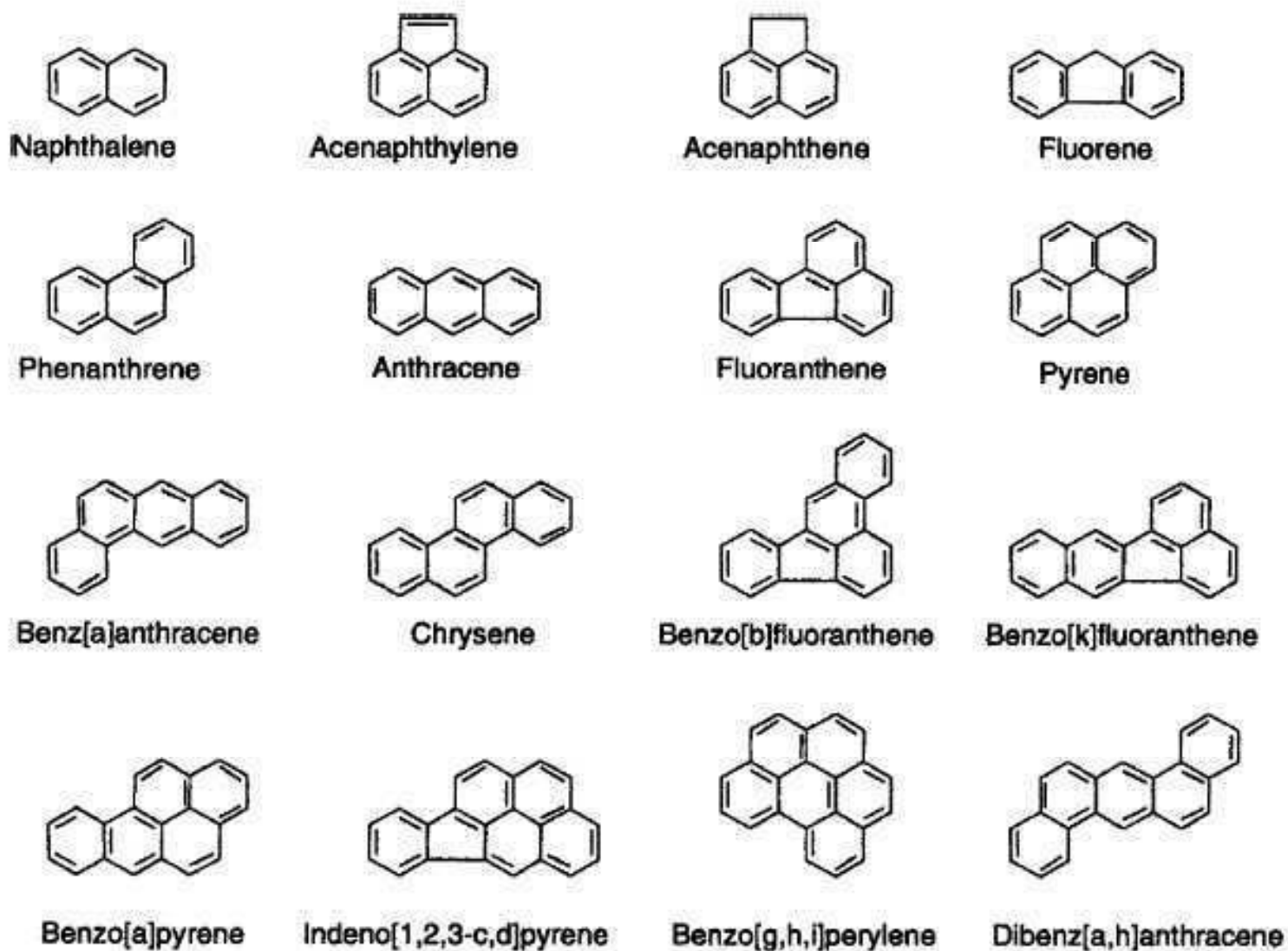
### PCB



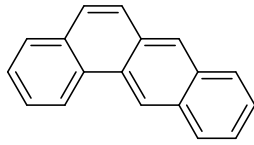
Indicateurs	PCB		Dioxines	Furanes
	Dioxin-like			
	Coplanaires	Non-coplanaires		
PCB 28 (2,4,4') (mono/di-o)			2,3,7,8 - TCDD	2,3,7,8 - TCDF
PCB 52 (2,2',5,5') "			1,2,3,7,8 - PeCDD	1,2,3,7,8 - PeCDF
PCB 101 (2,2',4,5,5') "	PCB 77 (3,3',4,4') (m,p)	PCB 105 (2,3,3',4,4') (mono-o)	1,2,3,4,7,8 - HxCDD	2,3,4,7,8 - PeCDF
PCB 118 (2,3',4,4',5) "	PCB 81 (3,4,4',5) "	PCB 114 (2,3,4,4',5) "	1,2,3,6,7,8 - HxCDD	1,2,3,4,7,8 - HxCDF
PCB 138 (2,2',3,4,4',5') "	PCB 126 (3,3',4,4',5) "	PCB 118 (2,3',4,4',5) "	1,2,3,7,8,9 - HxCDD	1,2,3,6,7,8 - HxCDF
PCB 153 (2,2',4,4',5,5') "	PCB 169 (3,3',4,4',5,5') "	PCB 123 (2',3,4,4',5) "	1,2,3,4,6,7,8 - HpCDD	1,2,3,7,8,9 - HxCDF
PCB 180 (2,2',3,4,4',5,5') "		PCB 156 (2,3,3',4,4',5) "	OCDD	2,3,4,6,7,8 - HxCDF
		PCB 157 (2,3,3',4,4',5') "		1,2,3,4,6,7,8 - HpCDF
		PCB 167 (2,3',4,4',5,5') "		1,2,3,4,7,8,9 - HpCDF
		PCB 189 (2,3,3',4,4',5,5') "		OCDF

Les PCB sont composés d'une famille de 209 congénères qui diffèrent entre eux par la position et le nombre d'atomes de chlore (1 à 10) associé à deux groupes phényles (Tableau 2). Un groupe de 7 PCB (indicateurs) a été listé par l'Union Européenne pour être représentatif de l'ensemble de la famille. Les propriétés physico-chimiques de l'ensemble de ces molécules sont proches de celles des PCDD/F, notamment une faible volatilité et une forte lipophilie. La toxicité des PCB entraîne des risques de cancer, des troubles de la reproduction et de l'immunité (Brouwer *et al.*, 1998).

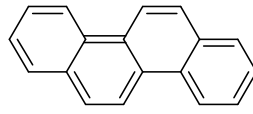
Les HAP sont des molécules constituées exclusivement d'atomes de carbone et d'hydrogène organisés sous forme de cycles aromatiques. Au sein de cette famille, seuls 16 congénères sont considérés comme prioritaires par l'agence de la protection de l'environnement des Etats-Unis (US-EPA, Figure 1). A la Commission Européenne, une autre liste avec 15 HAP prioritaires a été établie (Figure 2). Les différences entre les composés proviennent du nombre de cycles (2 à 6) ainsi que de leur arrangement spatial (Sims et Overcash, 1983). Dans la liste européenne les HAP retenus ont au moins 4 cycles benzéniques, par contre sur la liste de l'US-EPA, les molécules avec 2 et 3 cycles benzéniques sont aussi prises en compte. Les HAP se caractérisent par une faible solubilité dans l'eau, une grande lipophilie et une volatilité qui diminue avec l'augmentation du nombre de cycles aromatiques. Le Benzo[a]Pyrène (B[a]P) est considéré comme la molécule la plus toxique.



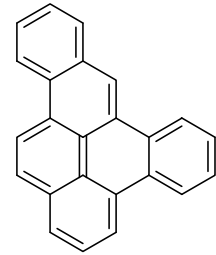
**Figure 1 : Structure des 16 HAP prioritaires proposés par l'U.S.-E.P.A**



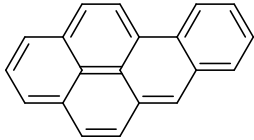
benzo[a]anthracène



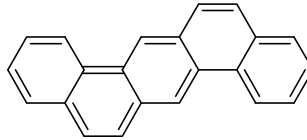
chrysène



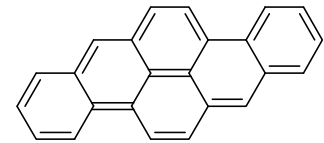
dibenzo[a,e]pyrène



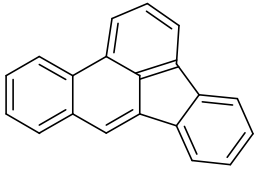
benzo[a]pyrène



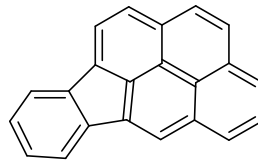
dibenzo[a,h]anthracène



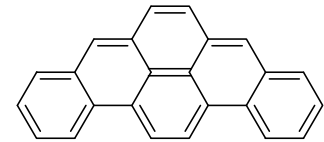
dibenzo[a,h]pyrène



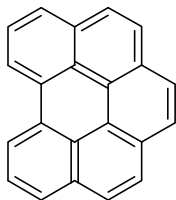
benzo[b]fluoranthène



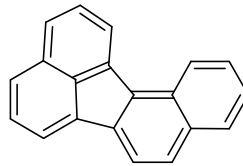
indeno[1,2,3-cd]pyrène



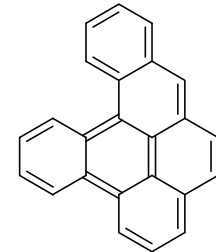
dibenzo[a,i]pyrène



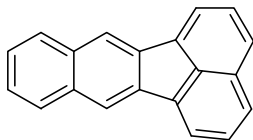
benzo[g,h,i]pérylène



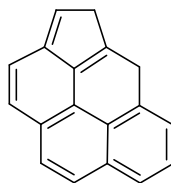
benzo[j]fluoranthène



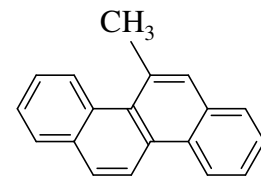
dibenzo[a,l]pyrène



benzo[f]fluoranthène



cyclopenta[c,d]pyrène



5-methylchrysène

Figure 2 : Liste de HAP prioritaires établie par la Commission Européenne

## **2. Contamination des fourrages en POP**

Les retombées atmosphériques des substances rémanentes émises par les incinérateurs d'ordures ménagères, les industries, le trafic routier et d'autres sources conduisent à la contamination des sols, des sédiments et des plantes avec comme conséquence un passage et une accumulation potentielle dans la chaîne alimentaire, essentiellement par l'ingestion par les animaux de végétaux ou de sol contaminés. L'intensité de la contamination dépendra de l'intensité des émissions. Les surfaces enherbées ou de cultures fourragères représentent des grandes surfaces de dépôt de POP qui peuvent alors être ingérés par les ruminants (Simonich et Hites, 1994 ; McLachlan, 1996). La végétation présente la capacité de rétention de ces composés, modifie leur processus d'échange entre l'air et le sol et peut correspondre à une voie d'entrée dans la chaîne alimentaire humaine. Nonobstant, il existe quelques incertitudes sur le rôle des végétaux sur le comportement des POP, spécialement sur les mécanismes de contamination par les PCDD/F. Même si les végétaux sont moins contaminés en HAP que les sols sur lesquels ils poussent, ils n'en restent pas moins l'aliment principal du ruminant (environ 15 kg de matière sèche (MS) quotidienne par bovin contre 0,28-0,84 kg de sol par animal et par jour (Kirby et Stuth, 1980)). La forme sous laquelle les POP sont déposés sur la plante est un facteur déterminant de leur absorption par le végétal ou leur rétention à la surface des plantes. La cuticule de la plante et les cires cuticulaires jouent un rôle important sur le stockage des POP (Kerstiens, 1996).

Les résultats présentés dans les tableaux 3 et 4 indiquent les niveaux de contamination des végétaux et les variations en fonction des lieux d'exposition. Les concentrations les plus élevées sont détectées dans des fourrages prélevés sur des sites proches de sources d'émissions comme les incinérateurs pour les PCDD/F ou les voies routières pour les HAP.



**Tableau 3** : Teneurs en PCDD/F et PCB dans des fourrages produits à proximité d'une cimenterie et d'un incinérateur.

PCDD/F	Schuhmacher <i>et al.</i> (2002)	Costera <i>et al.</i> (2006)		Costera <i>et al.</i> (2006)
	Herbe cimenterie (ng/kg MS)	Foin incinérateur (ng/kg MS)	PCB	Foin incinérateur (ng/kg MS)
2,3,7,8 TCDD	nd*	0,07	77	10,43
1,2,3,7,8 PeCDD	0,09	0,60	81	0,59
1,2,3,4,7,8 HxCDD	0,12	0,60	126	3,02
1,2,3,6,7,8 HxCDD	0,20	0,72	169	1,03
1,2,3,7,8,9 HxCDD	0,20	0,63	105	42,42
1,2,3,4,6,7,8 HpCDD	3,70	4,67	114	2,49
OCDD	25,30	10,56	118	126,70
2,3,7,8 TCDF	0,25	0,35	123	5,00
1,2,3,7,8 PeCDF	0,15	0,60	156	13,82
2,3,4,7,8 PeCDF	0,17	0,98	157	2,87
1,2,3,4,7,8 HxCDF	0,18	1,13	167	8,26
1,2,3,6,7,8 HxCDF	0,20	1,35	189	2,22
1,2,3,7,8,9 HxCDF	0,04	0,10	28	66,76
2,3,4,6,7,8 HxCDF	0,10	1,64	52	68,53
1,2,3,4,6,7,8 HpCDF	0,22	4,24	101	215,57
1,2,3,4,7,8,9 HpCDF	1,05	0,31	138	283,42
OCDF	0,73	1,35	153	457,98
			180	126,45

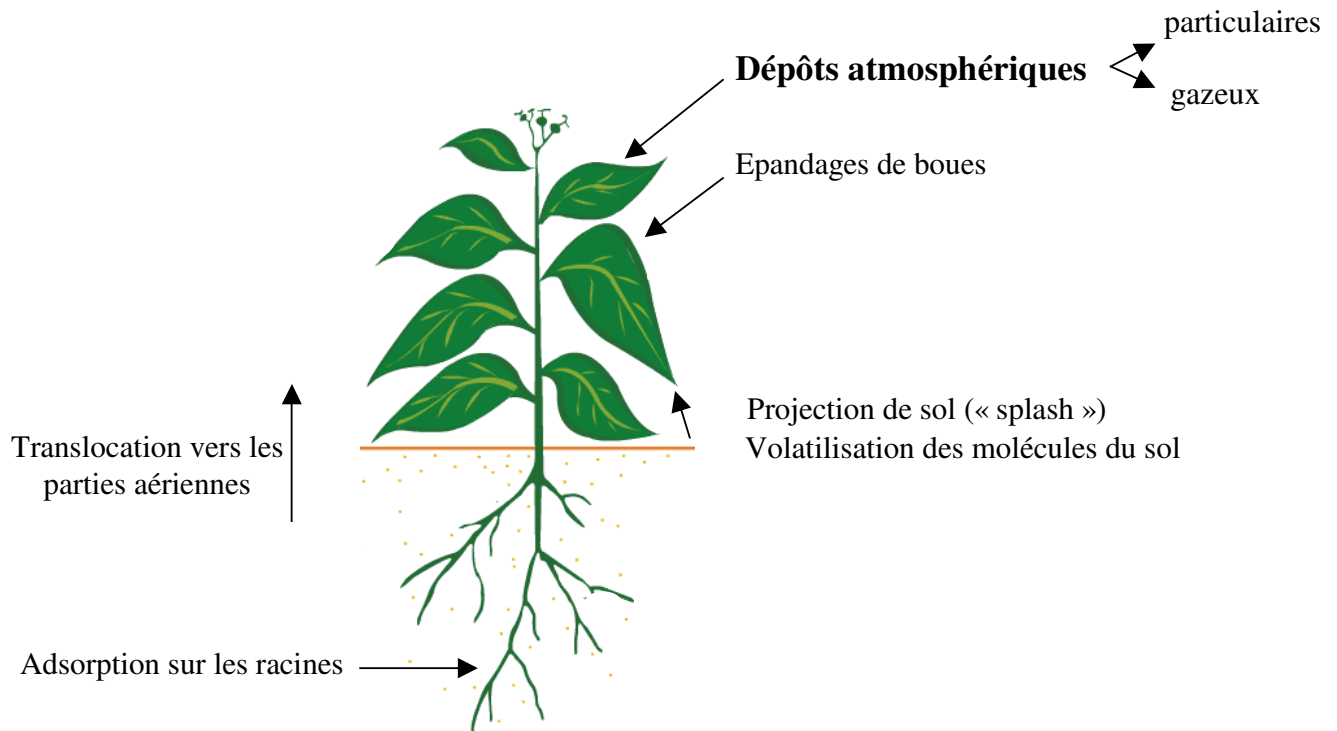
nd : non détecté

**Tableau 4** : Teneurs en HAP dans des fourrages produits à proximité de sources potentiellement polluantes

Espèces végétales	Concentration (ng/g)	Composés	Lieu de prélèvement	Auteurs
Herbe	981	$\Sigma$ 16 HAP	Bord d'autoroute urbaine	Crépineau <i>et al.</i> (2003)
Herbe	25	$\Sigma$ 16 HAP	Pâturage rurale	Crépineau-Ducoulombier <i>et Rychen</i> (2003)
Herbe	142	$\Sigma$ 16 HAP	Bord de route (13000 véhicules/jour)	Müller <i>et al.</i> (2001)
Ray-grass	100 à 900			
Fetuque	136 à 510	$\Sigma$ 24 HAP	Zone rurale	Smith <i>et al.</i> (2001)
Houlque	120 à 730			
Herbe	83			Grova <i>et al.</i> (2000)
Plantain	200 à 1 700	$\Sigma$ 8 HAP	Zone urbaine	Bakker <i>et al.</i> (2000)
Herbe	2400			Bakker <i>et al.</i> (2000)
Herbe	1461	$\Sigma$ 16 HAP	Bord d'autoroute	Bryselbout <i>et al.</i> (2000)
Herbe	153	$\Sigma$ 16 HAP	Zone urbaine	Meharg <i>et al.</i> (1998)
Végétation	1100			Simonich <i>et Hites</i> (1994)

## 2.1. Facteurs de variation de la partition des POP entre l'air ambiant et les végétaux

La contamination des végétaux en POP peut se faire par différentes voies (Figure 3). Les principales sont : les dépôts atmosphériques, les épandages de boues d'épuration, l'effet de « splash » (projection de particules de sol sur les parties aériennes des plantes à cause de la pluie), la volatilisation des polluants du sol et aussi le passage des racines aux parties aériennes de la plante (Fries, 1996 ; Smith et Jones, 2000). Néanmoins, le dépôt des polluants sur les végétaux provient essentiellement de l'atmosphère (Wild et Jones, 1995). Le dépôt atmosphérique des POP sur les végétaux peut se produire *via* les phases gazeuse, particulaire et humide (Welsch-Pausch *et al.*, 1995 ; Mader et Pankow, 2000). L'importance relative de ces voies dépendra de la partition air/particule des composés dans l'atmosphère. Le dépôt humide contient notamment les composés associés aux particules. La partition entre les phases gazeuse et particulaire de chaque composé varie avec la température, la quantité et la taille des particules de l'atmosphère et des propriétés physico-chimiques de chaque congénère. La température, le vent et la pluie sont des paramètres agissant directement sur la concentration en polluants de la plante. Ces actions physiques favorisent le décrochement et l'élimination des molécules adsorbées sur les surfaces du végétal (Smith *et al.*, 2001 b ). Dans le cas de végétaux poussant sur un sol pollué, les POP se répartiraient sur l'épiderme extérieur des racines avec une adsorption 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 ce genre de molécules (Briggs *et al.*, 1982).



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

### 2.1.1. Facteurs de variation de la partition des PCDD/F et PCB entre l'air ambiant et les végétaux

Le transfert principal des PCDD/F sur la végétation est dû aux échanges entre les surfaces foliaires des végétaux et la phase particulaire aérienne. Wagrowski et Hites (1998) suggèrent que la quantité des particules émises modifie la partition de ces molécules entre la phase gazeuse et la phase particulaire. Ces observations sont en accord avec celles de McLachlan (1997) pour qui le dépôt à partir de la phase particulaire joue un rôle important pour les congénères avec un faible degré de chloration. Par contre, le dépôt à partir de la phase gazeuse sera dominant pour les congénères faiblement chlorés dans les zones rurales où les niveaux de particules atmosphériques sont moindres. Récemment il a été montré que le débordement des rivières sur les prairies (où la phase particulaire joue un rôle très important) peut être un moyen d'entrée des PCDD/F et PCB dans la chaîne alimentaire (Lake *et al.*,

2005). De fait, ces auteurs ont montré que le lait de vaches pâturant sur des prairies sur lesquelles il y a eu débordement était plus contaminé que le lait d'autres exploitations. Cependant, selon Schuhmacher *et al.* (2006), le transfert des PCDD/F du sol vers la plante est quant à lui réduit, ce qui suggère que les animaux dont le lait est contaminé ingèrent soit de l'herbe contaminée soit du sol contaminé.

Les concentrations aériennes des PCDD/F sont plus élevées en hiver qu'en été et sont déterminées par les émissions locales (Hippelein *et al.*, 1996 ; Thomas *et al.*, 2002). Dans les zones de climat tempéré, la partition des molécules entre la phase gazeuse et la phase particulaire varie largement selon les saisons et selon les congénères. Les TCDD/F se trouvent dans la phase gazeuse et les OCDD/F sur la phase particulaire (Mader et Pankow, 2000). Welsch-Pausch *et al.* (1995) ont mis en évidence que la phase gazeuse est la voie dominante de dépôt des PCDD/F relativement non volatiles (entre 4-6 atomes chlores) sur les feuilles du ray-gras (*Lolium multiflorum*). La phase particulaire semble quant à elle une voie importante pour le dépôt des congénères plus chlorés (entre 7 et 8 atomes de chlore).

Thomas *et al.* (1998) ont à leur tour observé que les conditions météorologiques affectent les profils en PCB des végétaux. La pluie en particulier est un facteur influençant la concentration des PCDD/F lourds sur les prairies (Thomas *et al.*, 2002).

La contamination de la végétation en un site donné n'est pas uniquement due à la source la plus proche. C'est ce que démontre pour les PCDD/F l'étude de Domingo *et al.* (2002). La persistance des PCB a été démontrée par Thomas *et al.* (1998). Ces auteurs ne détectent pas de différences significative entre les teneurs en PCB de l'herbe en zone rurale et de l'herbe en zone industrielle.

La concentration des POP dans les tissus de la plante dépendent de l'apport atmosphérique, de l'effet dilution du fait de la croissance de la plante, des variables environnementales (température et précipitations) et aussi des caractéristiques physiologiques de la plante (McLachlan , 1995 ; Welsch-Pausch et McLachlan, 1996). Le dépôt humide et particulaire est un phénomène plus complexe qui dépend du degré de rétention du composé sur la surface de la plante. Dans ce phénomène interviendront le contenu lipidique de la plante, la rugosité et l'orientation verticale ou horizontale des feuilles (Wagrowski et Hites, 1998).

### 2.1.2. Facteurs de variation de la partition des HAP entre l'air ambiant et les végétaux

Plusieurs auteurs considèrent que la voie majeure d'exposition aux HAP des plantes est la voie atmosphérique, qui permet une déposition notamment sur les surfaces des feuilles à partir de la phase gazeuse (Wild *et al.* 1992 ; Simonich et Hites, 1994 ; Hortsmann et McLachlan, 1998 ; Phillips, 1999). Parallèlement, plusieurs auteurs ont montré que le dépôt des POP sur les feuilles et les fruits peut être effectué à travers les stomates ou sur la cuticule selon leur taille et leur volatilité, ainsi que par resuspension des particules du sol (Sabijić *et al.*, 1990 ; Keymeulen *et al.*, 1991). Simonich et Hites (1994) ont étudié le partage des HAP entre la végétation et l'atmosphère pendant la période de croissance et en conditions naturelles. Ils trouvent que ce procédé est gouverné notamment par la phase gazeuse et qu'il dépend de la température. Le dépôt sur les végétaux à partir de la phase particulaire (moindre) n'est pas dépendant de la température. Le transport des HAP ayant plus de 4 cycles aromatiques des racines vers les feuilles est négligeable. Cela serait dû à leur faible solubilité dans l'eau (Wild *et al.*, 1992 ; Malachowska-Jutz et Miksch, 2003).

En ce qui concerne le transfert atmosphérique des HAP sur les pâtures selon l'époque de l'année, un caractère saisonnier a été constaté par Smith *et al.* (2001 b). De fait, pour la plupart des HAP, les concentrations ont été plus fortes en hiver qu'en été. Malgré les différences morphologiques entre les différentes espèces des plantes étudiées, les concentrations ont été similaires entre les espèces.

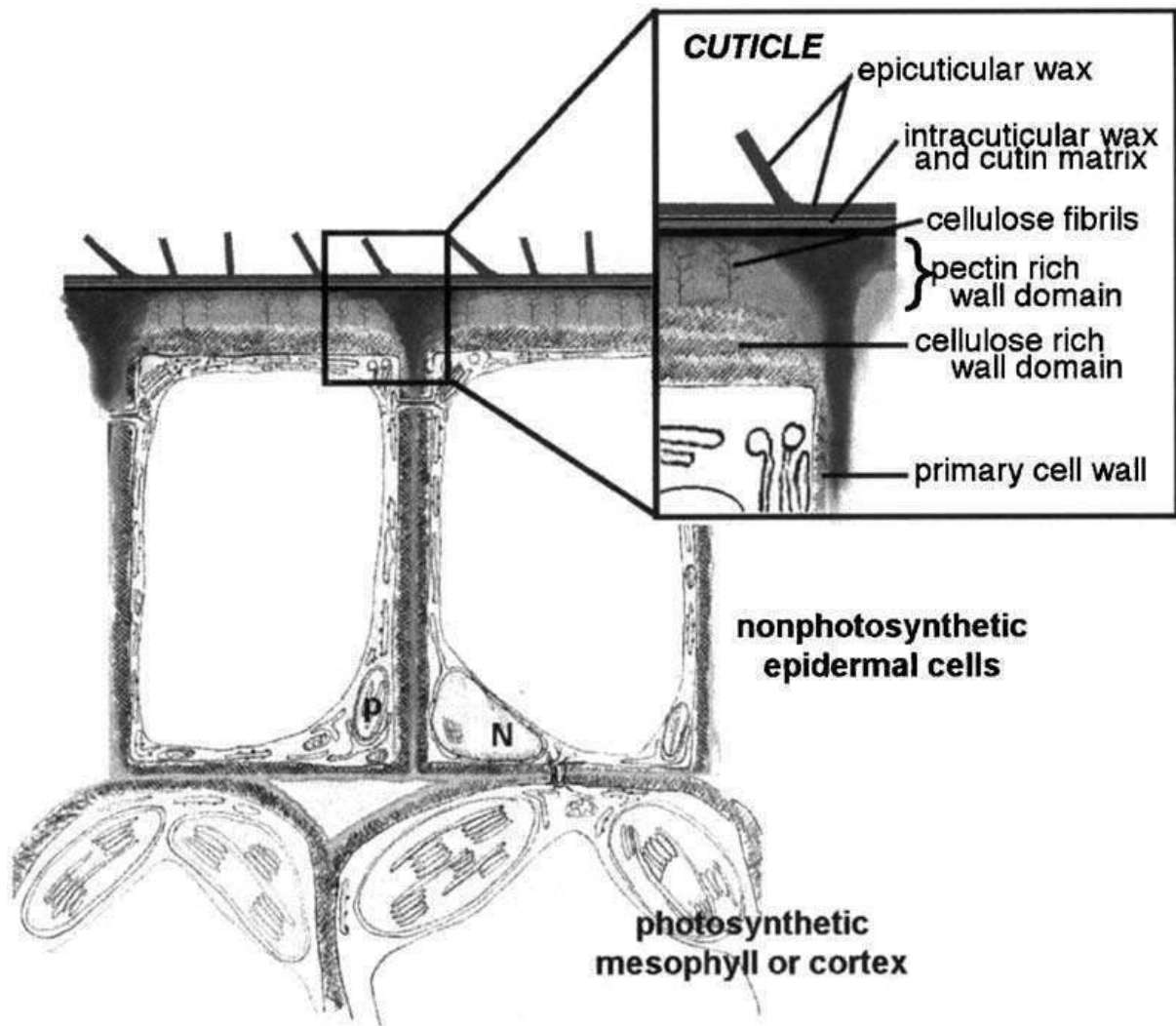
Les teneurs en HAP dans les plantes dépendent notamment de la distance à la source d'émission et des conditions météorologiques ( Kipopoulou *et al.*, 1999 ; Bryselbout *et al.*, 1999 ; Crépineau *et al.*, 2003). L'évaluation des teneurs en HAP de l'herbe de fermes situées en zones rurales ou urbaines a révélé une contamination plus importante des pâtures localisées à proximité de sources multiples (aciérie, autoroute et voie de chemin de fer) comparativement à celles situées en zone rurale (Grova *et al.*, 2000). Même si certains composés sont transportés sur de longues distances les composés de poids moléculaire les plus élevés se déposent à quelques dizaines de mètres du lieu d'émission (Koeleman *et al.* 1999). Crépineau *et al.* (2003) ont montré que les HAP détectés sur de l'herbe éloignée de toute source de contamination présentaient des niveaux de concentrations près de 40 fois inférieurs à ceux mesurés sur de l'herbe récoltée près d'une autoroute. Les composés de volatilité plus élevée se trouvaient surtout loin de la source de contamination. De manière

générale, les composés les moins volatils se déposent majoritairement dans une zone restreinte autour de la source d'émission.

En ce qui concerne l'effet des caractéristiques physiologiques des plantes sur le dépôt de ces molécules, les poils des feuilles et l'architecture de la plante sont des facteurs majeurs (Bakker *et al.*, 1999). Ces auteurs indiquent que ces types de cultures (graminées pour pâturage) sont exposées pendant des périodes de temps relativement courtes, ce qui probablement ne permet pas d'aboutir à un équilibre entre l'air et la plante. Cette argumentation semble en contradiction avec Thomas *et al.* (1998) qui ont mis en évidence pour une autre famille de polluants (les PCB) un temps court (6 jours) d'équilibre entre l'herbe et l'atmosphère.

## **2.2. Importance de la cuticule et des alcanes cuticulaires**

La cuticule est présente chez toutes les plantes terrestres qui ont des surfaces exposées à l'atmosphère (Hopkins, 2003). Elle comprend la cuticule proprement dite, la cire intracuticulaire et la cire épicuticulaire. La cuticule est formé par la cutine, un polymère insoluble qui forme une couche dense de cellules épidermiques. Le terme cire végétale est généralement utilisé pour décrire les composés lipidiques de la cuticule qui couvre la surface aérienne des tissus des plantes (Kunst et Samuels, 2003). La cire intracuticulaire est définie comme un mélange amorphe de lipides imbibés dans la cutine qui lie la cuticule avec la matrice de la paroi cellulaire. La cire épicuticulaire fait référence aux lipides de surface qui forment les cristoïdes ou une couche lisse extérieure à la cuticule (cf. Figure 4).



**Figure 4** : Représentation générale des composants cuticulaires, la paroi cellulaire et la cellule non photosynthétique des plantes (Kunst et Samuels, 2003).

Les cires cuticulaires peuvent être responsables de l'adsorption des PCB ; il a été estimé que la cutine recouvre entre 70 et 90% de la capacité de sorption de la cuticule (Riederer, 1995, d'après Thomas *et al.*, 1998). Bakker *et al.*, (2001) ont étudié la localisation de HAP déposés sur les feuilles de *Plantago major* et *Plantago media*. Ils ont conclu que les HAP à faible poids moléculaire sont surtout présents dans la cire cuticulaire et à l'intérieur des feuilles. Par contre les HAP à poids moléculaire élevé, restent surtout sur la surface de la feuille. Une étude plus récente a mis en évidence que la concentration des HAP dans les cires foliaires était de 1-2 fois plus importante que celle du tissu foliaire (Wang *et al.*, 2004).

Il a été montré que les alcanes (C<sub>21</sub>-C<sub>35</sub>) constituent les composants aliphatiques les plus présents dans la cire cuticulaire de différentes espèces végétales : *Arabidopsis* (38%, crucifère modèle des biologistes moléculaires), *Prunus laurocerasus* (80%) et un grand nombre de graminées (Mayes *et al.*, 1986 ; Dove et Mayes, 1991 ; Stammitti *et al.*, 1996 ; Maffei, 1996 ; Kunst et Samuels, 2003). Les alcanes pourraient ainsi être des marqueurs physiologiques de l'aptitude des végétaux à retenir des POP.

### **2.3. Méthodes analytiques d'identification et quantification des POP sur des matrices végétales contaminées**

L'analyse des POP sur des matrices végétales a été largement documentée (dans les cas des PCDD/F et PCB : Fürst *et al.*, 1993 ; Slob *et al.*, 1995 ; Welsch-Pausch et McLachlan, 1998 ; dans le cas des HAP : Wild *et al.*, 1992 b ; Górna-Binkul *et al.*, 1996 ; Kaupp et Sklorz, 1996 ; Bakker *et al.*, 1999 ; Phillips, 1999 ; Bakker *et al.*, 2000 ; Bakker *et al.*, 2001, Dugay *et al.*, 2002 ; Rojo Camargo et Toledo, 2003). Elle suppose la mise au point des méthodes d'extraction des molécules et l'utilisations des techniques analytiques les mieux sophistiquées.

Indépendamment de la matrice dans laquelle les POP doivent être analysés, l'analyse comporte plusieurs étapes : collecte et préparation, extraction, purification et détection. Le déroulement de chacune de ces étapes dépendra de la matrice à analyser ainsi que des propriétés physico-chimiques des molécules recherchées.

#### **2.3.1. Collecte et préparation**

Pour assurer l'homogénéité et la représentativité de l'échantillon les traitements les plus souvent utilisés sur les matrices végétales sont le hachage, le broyage, la lyophilisation ou le séchage. Les POP sont généralement présents à des niveaux de traces (pg/g), ce qui rend difficile l'extraction puis l'isolement à partir de la matrice à analyser.

#### **2.3.2. Extraction**

L'extraction des POP des fruits ou des végétaux peut être obtenue par la méthode de Soxhlet ou encore par sonication dans un solvant approprié (Phillips, 1999 ; Dugay *et al.*, 2002). L'extrait obtenu contient généralement un nombre considérable de composés interférents



autres que les molécules recherchées. Dans les cas des matières végétales, la chlorophylle ainsi que les colorants peuvent interférer sur l'extraction, il est donc obligatoire de les rendre hydrophiles afin de les séparer des POP (avec une saponification) avant l'étape de purification.

### **2.3.3. Purification**

Les PCDD/F et les PCB peuvent être purifiés dans des colonnes d'alumina (Liu *et al.*, 2004) ou par le passage dans différents types de colonnes telles que la silice, le fluorisil et le charbon (Costera *et al.*, 2006). Dans le cas des HAP, les colonnes de purification de type gel de silice, de sephadex et de fluorisil peuvent aussi être utilisées (Guillén, 1994).

### **2.3.4. Méthodes séparatives**

L'échantillon doit subir une séparation des composés par un système phase liquide comme la Chromatographie Liquide d'Haute Pression (HPLC) ou phase gazeuse comme la Chromatographie Gazeuse (CG). L'HPLC confère l'avantage de la sélectivité par l'interaction du soluté avec les deux phases stationnaire et mobile. La séparation en phase inverse sur une phase stationnaire de type C18 est la plus couramment utilisée. La phase mobile est usuellement un mélange de solvant et d'eau, dont la composition varie selon le gradient d'élution. Un autre avantage de l'HPLC réside dans sa sensibilité. Elle peut aussi être utilisée comme moyen de fractionnement avant son application à d'autres techniques de spectroscopie. La CG est une méthode de choix dans l'analyse des POP, elle permet de séparer des mélanges gazeux complexes suite à un équilibre s'établissant entre une phase mobile gazeuse et une phase stationnaire appropriée. Cette méthode ne s'adresse pas seulement aux molécules se trouvant naturellement à l'état de gaz, mais à tout composé susceptible d'être volatilisé par l'élévation de température.

### **2.3.5. Détection-Identification**

Dans cette dernière phase d'analyse des POP, l'HPLC est généralement couplée à un détecteur de fluorescence, UV, ou à barrette diode. En ce qui concerne la CG, elle est souvent associée à des détecteurs de type ionisation de flamme, détecteur à capture d'électron ou photoionisation. Dans l'analyse des HAP, ces types de détecteurs confèrent une excellente

linéarité, sensibilité et fiabilité. Cependant, la CG couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM) apparaît sans conteste comme la meilleure alliance pour l'analyse des HAP ainsi que pour les PCDD/F et PCB.

### **2.3.6. Principe de la fluorescence**

La fluorescence est le résultat de l'absorption de lumière par une molécule à une longueur d'onde spécifique qui l'amène à un état d'énergie supérieur. Au retour à leur état énergétique normal, les molécules excitées libèrent l'énergie absorbée sous forme de photons. La chromatographie de fluorescence, qui détecte le signal fluorescent d'un échantillon, est hautement sensible. Les faibles concentrations des échantillons n'ont pas d'effet adverse sur l'efficacité de l'analyse par fluorescence (Waters, 2001-2003).

La détection par fluorescence comporte plusieurs composants et procédés :

- Une source d'excitation (lampe émettrice de lumière dans le spectre UV et visible)
- Une filtration de la lumière (filtres optiques ou monochromateurs)
- Une excitation de l'échantillon avec la lumière filtrée
- Une mesure de la fluorescence émise
- L'amplification du signal émis

Le détecteur de fluorescence illumine l'échantillon avec une bande étroite de lumière de haute intensité. Le détecteur mesure alors les faibles niveaux de fluorescence émis par l'échantillon. La lumière émise est filtrée, amplifiée et transformée en un signal électrique qui peut être enregistré et analysé.

### **2.3.7. Principe de la spectrométrie de masse**

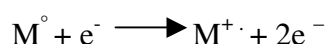
Le spectromètre de masse est un appareil qui sert à établir les masses moléculaires et la structure des substances. L'identification du composé se fait en analysant les ions formés à partir de la substance. A l'intérieur du spectromètre a lieu la volatilisation du produit, la formation des ions en phase gazeuse ainsi que leur séparation selon le rapport masse sur charge ( $m/z$ ). Les courants ioniques séparés sont amplifiés et enregistrés.

Un spectromètre est constitué des parties suivantes (Constantin et Traldi, 1996) :

- une source d'ions où a lieu la formation des ions à partir d'un échantillon
- un analyseur qui sépare les ions suivant le rapport  $m/z$
- un détecteur qui donne l'intensité du faisceau ionique correspondant à chaque espèce (le spectre de masse ainsi obtenu peut être visualisé sur un oscilloscope ou enregistré sous la forme d'un spectrogramme ou stocké dans la mémoire d'un ordinateur)
- une électronique pour alimenter les éléments décrits précédemment
- plusieurs systèmes de pompage

La formation des ions a lieu dans une chambre d'ionisation. A cet effet, plusieurs méthodes sont utilisées. Le choix d'une méthode est fonction de l'état physique et de la volatilité du produit ainsi que de la stabilité thermique des molécules. L'ionisation par impact électronique (70 eV) donne des résultats satisfaisants pour les produits en phase gazeuse. Pour les produits solides inorganiques tels que les sels, on utilise la thermo-ionisation, la désorption par champ et la désorption laser. L'utilisation du bombardement atomique ou ionique, se montre satisfaisant pour les composés organiques de poids moléculaire élevé.

Le processus d'ionisation a pour résultat la formation de l'ion moléculaire  $M^+$  selon la relation suivante :



Au cours de l'ionisation une certaine quantité d'énergie interne est communiquée à l'atome ou à la molécule. Cette énergie est variable et détermine, selon sa valeur, une ou plusieurs réactions de fragmentation. Les réactions les plus probables sont celles qui ont une faible énergie d'activation et qui conduisent à la formation d'espèces ioniques ou neutres, relativement stables. Les réactions successives de fragmentation conduisent, en général, à des ions fragments du type radicalaire. Il est à noter qu'au cours d'une fragmentation la charge se localise sur le fragment possédant le potentiel d'ionisation le plus faible. La formation de fragments stables peut avoir lieu suite à des changements dans les positions relatives des atomes de la molécule suivis par la décomposition de l'ion. Ce sont des réactions de réarrangement (Constantin et Traldi, 1996).

## 2.4. Conclusions

L'approche bibliographique synthétisée jusqu'ici permet de conclure que le fourrage est un récepteur réel des POP de l'air ambiant indépendamment de la source émettrice, des molécules ou de la façon dont les molécules sont déposées. Ainsi, les concentrations peuvent varier en guise d'exemple de 0,21 à 0,35 ng/kg de MS pour la TCDF ; de 1,68 à 10,6 ng/kg MS pour la OCDD ; de 0,6 à 460 ng/kg MS (PCB 81 et PCB 153 respectivement) ; de 25 à 1461 ng/kg MS pour la somme de 16 HAP (Bryselbout *et al.*, 2000 ; Crépineau-Ducoulombier et Rychen, 2003 ; Costera *et al.*, 2006). La cuticule des plantes est certainement impliquée dans l'adsorption des POP sur les feuilles du fait du caractère lipophile de ses constituants, les alcanes étant ses constituants majeurs. Les phases gazeuse et particulaire, la saison, la proximité de la source, les caractéristiques morphologiques de la plante ainsi que la météorologie sont des facteurs qui jouent un rôle important sur les niveaux de polluants détectés sur les végétaux.

### 3. Le ruminant et son rôle sur la biodisponibilité des POP

Les voies potentielles de contamination du ruminant laitier en micropolluants organiques sont l'ingestion, l'inhalation et l'absorption par contact cutané. Chez la vache en lactation, McLachlan *et al.* (1990) ont démontré que l'exposition par inhalation d'air contaminé et par ingestion d'eau polluée étaient des voies de contamination négligeables face à celle de l'alimentation. L'inhalation contribuerait pour moins de 1% de la prise de micropolluants organiques d'un troupeau laitier exposé à des teneurs normales dans l'environnement (McLachlan *et al.*, 1990 ; McLachlan, 1993). L'absorption cutanée de polluants organiques présents dans le sol ou les végétaux n'a pas été étudiée, mais quelques études menées sur des animaux de laboratoire, suggèrent que cette exposition est négligeable (Kimbrough *et al.*, 1984). De ce fait, l'orientation des recherches vers la contamination du ruminant *via* l'alimentation, plus concrètement *via* l'ingestion de fourrage semble le plus pertinent.

Etant donné que la voie alimentaire est la plus importante dans le transfert des micropolluants chez les ruminants, le rôle du tractus digestif doit être étudié. Le rumen, compartiment majeur du tractus digestif (entre 90 et 150 L, Michel *et al.*, 1987) comporte 3 groupes de microorganismes :

- les bactéries : il s'agit essentiellement de bactéries anaérobies strictes. Leur concentration qui avoisine les  $10^{11}$  cellules/mL 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).

Avec le réseau, le rumen constitue le réticulo-rumen où les aliments ingérés séjournent de 25 à 60 h en moyenne (Van Soest, 1982). La biomasse microbienne contribue à la digestion des aliments qui commencent à être dégradés dès leur entrée dans le rumen. Les bactéries du rumen sont en effet capables de dégrader l'amidon, la cellulose, l'hémicellulose ou encore la pectine (Van Soest, 1982). L'action des bactéries du rumen sur des nutriments a aussi été étudiée *in vitro* (Blanchart *et al.*, 1993 ; Lambert, 1998 ; Sales-Duval, 2000). Ceci nécessite la

mise en incubation (en conditions ruminales d'anaérobiose et de température) du jus de rumen pendant une durée d'environ 6 h (temps de vie des bactéries en milieu artificiel). Par contre, l'aptitude des bactéries, ou du jus de rumen en général, à rendre biodisponibles les POP apportés à travers l'ingestion de fourrage ne reste qu'une hypothèse.

La biodisponibilité d'un composé consiste à déterminer son accumulation dans l'organisme de l'animal ou dans les produits animaux. Elle a été définie de différentes façons, mais elle ne peut être évaluée qu'à partir d'un bilan de masses (Fries, 1996). Cet auteur définit la biodisponibilité comme la fraction d'un composé qui est absorbée dans le tractus gastro-intestinal et stockée, métabolisée ou excrétée par l'animal. Le bilan de masses consiste à déterminer la différence entre la somme des entrées (aliment) et la somme des sorties (fèces, urines, lait). Cette différence est attribuée au stockage dans l'animal, la dégradation ou l'erreur expérimentale (McLachlan *et al.*, 1990). Chez la vache laitière, Olling *et al.* (1991) ont calculé la biodisponibilité des PCDD/F suite à l'administration intraruminale d'une seule dose de 30 mL d'huile d'olive contenant 5 µg de PCDD/F mélangés. Ce calcul a été effectué à partir de la détermination de l'aire sous la courbe d'excrétion de lait au cours du temps, utilisant le principe trapézoïdal et additionnant la quantité stockée dans les organes. Le même principe d'intégration a été utilisé par Slob *et al.* (1995) qui notent que la biodisponibilité peut être déterminée de cette manière si le métabolisme est ignoré ainsi que les voies d'excrétion autres que le lait. Ce concept de biodisponibilité est appelé « carry-over rate (COR) par McLachlan *et al.* (1990), c'est à dire facteur de transfert (FT). Les termes abordés dans le chapitre suivant sont en relation avec la biodisponibilité.

## **4. Absorption, Distribution, Métabolisme et Excrétion des POP chez le ruminant**

### **4.1. Absorption des POP**

Le processus d'absorption gastro-intestinale fait suite aux phénomènes de mastication, de salivation, de déglutition et de dégradations enzymatiques buccales, stomacales et pancréatiques. L'absorption intestinale peut être définie comme le transfert de molécules de la lumière intestinale vers la voie lymphatique et/ou la voie portale. L'absorption des POP dépend de nombreux facteurs souvent en interaction tels que la nature des molécules analysées, l'espèce animale étudiée, leur dégradation potentielle dans les cellules intestinales, les matrices vecteurs utilisées et les doses ingérées. Le facteur analytique peut également être une explication des variations des taux d'absorption observés. Ces différents paramètres peuvent influencer sur les étapes de l'absorption à savoir :

- la solubilisation micellaire des aliments lipophiles ingérés (le lumen étant un milieu aqueux)
- le transfert du milieu extracellulaire vers le milieu intracellulaire des molécules
- le devenir des composants dans le cytoplasme des entérocytes
- leur passage dans le sang.

L'hypothèse communément acceptée quant au transfert des micropolluants organiques du lumen vers le cytoplasme des cellules intestinales est liée à une diffusion passive du milieu le plus concentré vers celui le moins concentré (Rees *et al.*, 1971 ; van Veld, 1990). Parmi les barrières physiques de l'intestin, les cellules épithéliales intestinales seraient le principal obstacle limitant le transport de composés (Hunter et Hirst, 1993).

#### **4.1.1. Absorption des PCDD/F et PCB**

Plusieurs études ont été réalisées sur l'absorption des PCDD/F et PCB chez différentes espèces monogastriques. L'âge a été trouvé comme un facteur influençant les taux d'absorption de ces molécules (Schlummer *et al.*, 1998 ; Schuhmacher *et al.*, 1999). Il a aussi été mis en évidence un effet dose sur le processus d'absorption de ces polluants qui semble dépendre des différences de concentration entre le lumen et le cytoplasme, et le cytoplasme et

le compartiment sanguin (Moser et MacLachlan, 2001). La matrice dans laquelle les dioxines ont été ingérées (huile, lait, sol) influent également sur les taux d'absorption (Laurent, 2003). L'absorption des PCDD/F et PCB est aussi liée aux caractéristiques physico-chimiques de ces molécules. Il a longtemps été admis que la lipophilicité d'une molécule était un facteur primordial de son absorption intestinale (Yamashita *et al.*, 2000 ; Raiman *et al.*, 2001). Laurent (2003) souligne que plus une molécule est lipophile et de poids moléculaire élevé, moins elle est absorbée. D'autres facteurs déterminants de l'absorption sont le nombre d'atomes de chlore ainsi que le  $K_{ow}$ . De fait l'absorption diminue avec l'augmentation du nombre de chlores et il n'y a pas de dépendance linéaire entre l'absorption et le  $K_{ow}$  (Pirard et De Pauw, 2004).

En ce qui concerne les ruminants les PCDD/F ne sont pas absorbés dans le rumen ni synthétisés à nouveau (Fries *et al.*, 2002). Ils suggèrent qu'une absorption a eu lieu dans la dernière partie de l'intestin grêle (iléon).

#### 4.1.2. Absorption des HAP

Le suc gastrique exerce un rôle indispensable dans la solubilisation des HAP s'ils sont liés à une matrice (sol, herbe...). De plus, chez les monogastriques, le temps de passage dans l'estomac est jugé trop court pour qu'un réel transfert à l'organisme ait lieu (Friedman *et al.*, 1980, cités par Oomen *et al.*, 2001).

Dans l'étape de solubilisation, le naphthalène (NA), l'acénaphthylène (ANL), l'acénaphtène, le fluorène (FLUO) et le PHE (HAP de 2 et 3 cycles aromatiques et de solubilité importante) n'auraient pas besoin d'intermédiaire pour franchir la barrière aqueuse (Rahman *et al.*, 1986). Pour l'absorption du pyrène (PYR), les données bibliographiques sont contradictoires. En effet, Withey *et al.* (1991) ont montré que le PYR était biodisponible à des taux avoisinant 60% de la dose administrée dans une solution saline chez les rats, laissant suggérer un transfert intestinal de cette molécule.

L'hypothèse de la diffusion passive des micropolluants organiques dans l'intestin est renforcée par le fait qu'*in vitro*, l'ajout ou non de molécules inhibant les transporteurs membranaires ne modifie pas le passage de ces composés lipophiles (Cavret, 2002). Il est couramment admis que suite à l'ingestion des micropolluants organiques, les congénères sont principalement sécrétés dans le compartiment lymphatique associée aux chylomicrons,



conformément aux propriétés physico-chimiques de ces congénères (Jans et Moon, 1970 ; Rees *et al.*, 1971 ; Kamp et Neumann, 1975 ; Lakshamanan *et al.*, 1986). Cependant, l'apparition sanguine du PYR, du PHE ou du benzo[a]anthracène (B[a]A) est très rapide, le pic de concentration sanguine étant obtenu entre 1 heure et 1 heure et demi (Modica *et al.*, 1983 ; Withey *et al.*, 1991 ; Kadry *et al.*, 1995). Ce délais semble trop court pour valider une absorption lymphatique qui a lieu entre 4 et 6 heures postprandiales (Dubois *et al.*, 1996).

Les estimations de l'absorption intestinale *in vivo* (rat, porc) de HAP de deux à cinq cycles varient selon les expériences entre 24 et 95%. Le PYR administré oralement à des rats est absorbé à 60% (Whithey *et al.*, 1991), le B[a]P de 30% à 40% (Laher *et al.*, 1984 ; Rahman *et al.*, 1986 ; Foth *et al.*, 1988). L'ingestion de lait contaminé avec <sup>14</sup>C-PHE ou du <sup>14</sup>C-B[a]P chez le porc conduit à un prélèvement intestinal, évalué par la radioactivité détectée dans le sang portal, de 95 et 33% respectivement (Laurent *et al.*, 2002). De plus, après ingestion par des rats de B[a]A, de chrysène (CHRY) et de triphénylène, Modica *et al.* (1983) trouvent une plus grande absorption intestinale pour le triphénylène. Il apparaît que, quel que soit le mode expérimental, le passage des HAP du tractus digestif au sang s'opère en des quantités différentes selon les congénères. La muqueuse intestinale représenterait donc une barrière sélective dans le transfert des HAP. Le devenir des HAP dans les entérocytes a fait l'objet de nombreux travaux. Cependant la plupart de ces recherches ont été effectués chez les poissons et principalement sur le B[a]P (Vetter *et al.*, 1985 ; van Veld, 1990 ; Meador *et al.*, 1995). Cependant, Laurent *et al.* (2002) suggèrent, d'après une étude chez le porc, que le B[a]P est transporté dans la phase lipidique, alors que la plus grande solubilité dans l'eau du PHE lui permet d'être transféré à la fois dans la phase aqueuse et dans la phase lipidique.

*En conclusion, il apparaît que l'absorption des PCDD/F et des PCB est dépendante de la dose ingérée. La matrice vecteur semble jouer un rôle très important. La lipophilicité ainsi que le degré de chloration de la molécule sont deux caractéristiques physico-chimiques primordiales quant à l'absorption de ces molécules. Concernant les HAP, leur absorption dépendra premièrement de leur solubilisation, elle même liée à la lipophilicité de chaque congénère. Ainsi, les taux d'absorption des HAP diffèrent selon les congénères.*

#### **4.2. Distribution des POP**

Après leur absorption, les POP se distribuent dans les différents tissus et organes via le sang. Le plus souvent, ils sont pris en charge par des systèmes enzymatiques hépatiques ou

extrahépatiques spécifiques du métabolisme oxydatif des substances liposolubles endogènes tels que les acides gras, les stéroïdes et les vitamines (Rose *et al.*, 1976 ; Narbonne, 1991). Dans les autres cas, ils sont stockés dans les structures de réserves lipidiques tissulaires (tissu adipeux) ou cellulaires. Les valeurs observées dans le sang sont le reflet des entrées et des sorties mais aussi de l'équilibre avec les tissus adipeux. Borlakoglu *et al.* (1993) ont montré que deux PCB-dioxin like (DL) de degré de chloration distinct se répartissent, d'une part de manière similaire dans les différentes fractions du compartiment sanguin et d'autre part principalement dans la fraction protéique.

Chez les ruminants, une fois les PCDD/F absorbées, ils sont, sans être métabolisés, soit stockés dans les tissus, soit excrétés dans le lait où un état d'équilibre (steady state) est établi une fois les tissus gras corporels saturés (McLachlan, 1997). Cet état d'équilibre ainsi que la biodisponibilité des polluants peuvent être mesurés ou estimés dans des conditions contrôlées (Firestone, 1979 ; Jensen et Hummel, 1982 ; Stevens et Gerbec, 1988 ; Slob *et al.*, 1995).

#### **4.3. Métabolisme des POP**

Les mécanismes métaboliques, comme par exemple l'hydroxylation, sont des moyens pour un organisme de biotransformer les molécules lipophiles et d'accroître leur solubilité dans l'eau en vue de leur excrétion dans les urines. Le métabolisme peut donc être considéré comme un mécanisme de détoxification des POP. Cependant, dans certains cas, les métabolites sont plus réactifs avec leur milieu que la molécule dont ils sont issus, et constituent alors des substances capables d'altérer les macromolécules cellulaires.

##### **4.3.1. Métabolisme des PCDD/F et PCB**

La biotransformation des molécules mères a lieu au cours du processus de digestion et au sein de l'organisme sous l'action d'inducteurs. Chez des poulets nourris avec un concentré enrichi en 7 PCB indicateurs : 28, 52, 101, 118, 138, 153 et 180, les concentrations des congénères 28, 118, 138, 153 et 180 dans la graisse abdominale augmentaient significativement au cours de l'expérimentation tandis que les niveaux des congénères 52 et 101 diminuaient significativement (Maervoet *et al.*, 2004). Ce résultat a mis en évidence la biotransformation des PCB 52 et 101. Ces auteurs suggèrent que les oiseaux ont une plus

grande capacité à transformer ces molécules. Le positionnement des atomes de chlore sur la molécule (*ortho*, *meta* ou *para*, cf. tableau 2, page 23v) joue un rôle très important quant à sa biotransformation chez les oiseaux et chez les poissons (Boon *et al.*, 1989). Le métabolisme oxydatif, qui conduit à l'hydroxylation des molécules, est la principale voie de biotransformation des PCB (Borlakoglu et Wilkins, 1993 ; Haraguchi *et al.*, 2005).

Dans le cas des ruminants, la dégradation microbienne, tel que la déchloration anaérobie ou d'autres formes de métabolisme peuvent se produire au cours de la digestion (Thomas *et al.*, 1999). D'après leurs estimations du degré de métabolisme, trois groupes ont été différenciés : les PCB largement métabolisés (18,28, 31, 33, 37, 44, 49, 52, 60, 87, 101, 110, 149 et 151), les PCB partiellement métabolisés ( 47, 61, 66, 105, 128, 187) et les PCB non métabolisés (118, 138, 141, 153, 156, 170, 180, 183, 194).

L'induction du métabolisme des PCDD/F ainsi que des PCB semble être dépendant des cytochromes CYP450 (Ramsey *et al.*, 1982 ; Nessel *et al.*, 1990 ; Hu et Bunce, 1999 ; Xu *et al.*, 2000). Le nom des CYP450 provient de la bande d'absorption observée à 450 nm quand les enzymes CYP450 sont liés à une molécule de monoxyde de carbone (Werck-Reichhart et Feyereisen, 2000). De multiples formes de CYP450 ont été identifiées. Plus de dix-sept familles ont ainsi été dénombrées dont les trois premières sont principalement impliquées dans le métabolisme de médicaments et de xénobiotiques et plus particulièrement les CYP450 1 (CYP1) et 2 (CYP2) pour les PCDD/F, les PCB et aussi les HAP.

Les enzymes CYP1A1, CYP1A2 et CYP2B18 sont les principaux responsables du métabolisme de ces groupes de molécules (Tai *et al.*, 1993 ; Watanabe *et al.*, 2005). Chez les poissons il semblerait que le cytochrome P450 ainsi que l'enzyme CYP1A ne sont pas associés au métabolisme (Niimi, 1996). L'efficacité de cet ensemble d'enzymes semble varié en fonction des congénères dans la mesure où certaines molécules comme l'OCDF, le 1,2,3,7,8-PeCDF et le 2,3,7,8-TCDF, disparaissent très rapidement chez les ruminants (Olling *et al.*, 1991 ; Fries *et al.*, 2002). Ainsi, l'affinité des polluants organiques avec le complexe enzymatique fluctue, d'une part, selon les espèces étudiées, et d'autre part selon les molécules. Les PCDD/F et les PCB-DL, par exemple, ne sont pas ou peu dégradées par les CYP450 intestinaux (Thomas *et al.*, 1999 ; Golor *et al.*, 2001 ; Bosveld *et al.*, 2002).

*Il peut être conclu que le métabolisme oxydatif est la voie majeure du métabolisme de ces molécules et que les métabolites formés diffèrent selon l'espèce animale en question. Le nombre d'atomes de chlore ainsi que la position qu'ils occupent sur la molécules semblent être des facteurs importants et limitants pour le métabolisme des composés organochlorés.*

#### **4.3.2. Métabolisme des HAP**

Chez les mammifères, de nombreuses études ont démontré le métabolisme enzymatique des HAP au niveau intestinal (Wattenberg *et al.*, 1962 ; Hietnanen, 1980 ; Porter *et al.*, 1982 ; Van Veld, 1990 ; Zhang *et al.*, 1996.). Il s'avère que ces enzymes sont induites par les micropolluants organiques d'où le terme de métabolisme auto-induit (van Veld, 1990 ; Buesen *et al.*, 2002). L'induction du complexe enzymatique est relativement rapide. En effet, chez le rat, 30 minutes après l'injection de B[a]P marqué au niveau jéjunal, 40% de la radioactivité administrée est détectée dans le sang portal et les métabolites en constituent 90% (Bock *et al.*, 1979). Cependant le métabolisme semble être dépendant de nombreux facteurs tels que l'espèce et le congénère (Golor *et al.*, 2001 ; Bosveld *et al.*, 2002). L'hypothèse de dégradation « congénère dépendant » des HAP peut être utilisée pour expliquer les différents pourcentages de métabolites du B[a]P et du NA détectés au niveau portal (respectivement de 90% et 13% des doses absorbées, Bock *et al.*, 1979). Par contre, cette suggestion ne permet pas d'expliquer la forte présence du NA sous forme native (84% de la dose administrée) dans le compartiment sanguin (Bock *et al.*, 1979). Ainsi il semblerait que les voies de dissipation des HAP au niveau des entérocytes (lymphe/sang portal) soit fonction du métabolisme cellulaire mais aussi des composés (les composés les plus solubles et constitués d'un nombre restreint de cycles aromatiques étant probablement excrétés comme les acides gras à chaînes petites et moyennes).

Les métabolites des HAP sont les produits de deux phases :

- La phase I consiste en des réactions d'oxydation réalisées par des systèmes enzymatiques dépendants du cytochrome P450 (CYP450). Elle a pour but d'augmenter le caractère polaire de son substrat. Pour cela l'introduction dans la molécule cible d'un group polaire hydroxyle (OH), carboxyle (COOH) ou amino (NH<sub>2</sub>) est produite. Ces biotransformations sont majoritairement assurées par les oxydases à fonction multiples (MFO). Les enzymes du cytochrome catalysent l'oxydation des xénobiotiques à structure plane tels que les HAP, de

façon spécifique pour l'éthoxyrésosufurine-*O*-dééthylase (EROD) (Roos *et al.*, 2002) et la B[a]P monooxygénase (B(a)PMO) ou non spécifique pour la 7-éthoxycoumarine *O*-dééthylase (ECOD) (Buet, 2002).

- Les réactions de phase II, ou phase de conjugaison, conduisent à la liaison d'un groupement hydrophile endogène sur une partie polaire de la molécule cible (Buet, 2002). Parmi les enzymes de conjugaison, figurent les glutathion-S-transférases (GST) et les sulfotransférases (SULT) et l'UDP-acide glucuronique (UDPGA). Les enzymes de phase II sont généralement cytosoliques et sont exprimées par le foie ainsi que dans de nombreux tissus périphériques. Les groupements conjugués de liaison de type glucuronique, sulfate ou glutathion augmentent le poids moléculaire et la solubilité des métabolites de HAP. La modification de cette structure peut diminuer directement l'activité du composé (en modifiant le groupe potentiellement réactif, par exemple la formation de triols ou de tétrols à partir des diolépoxydes) ou indirectement en augmentant la probabilité de son taux d'élimination (par l'introduction d'un groupe conjugué à un phénol ou un époxyde). Les variations de réactions rencontrées au sein d'un tissu pourraient s'expliquer par les enzymes spécifiques retrouvées dans celui-ci, les teneurs en HAP dans le tissu et la disponibilité des autres composants comme les sulfates ou le glutathion (Bories, 1993). La glucuronidation, quantitativement la plus importante réaction de phase II, se réalise au niveau du réticulum endoplasmique (Jansen *et al.*, 1992). Elle a lieu principalement dans le foie, mais sa présence a été détectée dans d'autres tissus tels que les reins, la muqueuse intestinale, les poumons et l'estomac, en ordre décroissant d'activité enzymatique. La conjugaison de l'ion sulfate avec les substrats endogènes ou exogènes est catalysée par les sulfotransférases cytosoliques, elle constitue une voie métabolique importante des HAP. La majorité des substrats éligibles à la sulfatation sont métabolisés par glucuronidation (Jansen *et al.*, 1992). Plusieurs conditions déterminent le choix entre la sulfatation et la glucuronidation comme voie de biotransformation, par exemple, la saturation des voies de sulfatation, l'affinité des enzymes pour le substrat, l'accès à l'enzyme et la disponibilité des enzymes de conjugaison.

Le métabolisme des HAP a été mis en évidence et étudié principalement dans le foie car cet organe est connu pour présenter de très fortes activités enzymatiques détoxifiantes (Aito, 1974 ; Bjorseth et Becher, 1986 ; Johnsen *et al.*, 1998 ; Honey *et al.*, 2000). Les données de Withey *et al.* (1991) sur la pharmacocinétique et la biodisponibilité des HAP chez le rat, suite à une administration orale et intraveineuse de 2-15 mg/kg de poids vif, ont mis en exergue

l'importance du cycle entéro-hépatique sur le devenir des HAP dans l'animal. Elmhirst *et al.* (1985) ont travaillé sur le métabolisme et la circulation entéro-hépatique du B[a]P 4,5-époxyde chez le rat. Suite à une administration intra-veineuse de 3Hbenzo[a]pyrène-4,5-époxyde (32,5 µmol/kg de poids vif) à des rats, 76% de la radioactivité associée au composé est apparue en 3 heures dans la bile. Cependant d'autres tissus constituent des sites potentiels de métabolisme de ces xénobiotiques (Matsuda *et al.*, 1995). La glande mammaire et surtout l'intestin, en raison de son exposition immédiate aux composés ingérés, seraient impliqués dans le métabolisme des HAP. Les transformations métaboliques ont lieu aussi dans le duodénum, les poumons, le rein et la peau (Roos *et al.*, 2002). Plusieurs études ont démontré la présence de divers systèmes enzymatiques (oxydatif, réducteur, conjugué...) dans les cellules des muqueuses mammaire et intestinale (respectivement Moore *et al.*, 1983 ; McDanell et McLean, 1984). Le métabolisme dans les cellules épithéliales peut jouer un rôle dans le transfert intestinal des HAP *via* une biotransformation qui, notamment, modifie leurs propriétés physico-chimiques (McDanell et McLean, 1984).

Comme dans la glande mammaire, les métabolites peuvent être conjugués dans l'intestin, principalement à l'acide glucuronique ou au sulfate. Augmentant avec la lipophilicité du composé, ce dernier événement a pour but de le rendre encore plus hydrophile (Barr et Reigelman, 1970 ; Grafström *et al.*, 1979 ; Roos, 2002). Chez le rat et l'homme, les cellules de l'intestin proximal, principales responsables de l'absorption gastro-intestinale des xénobiotiques, montrent les plus grandes concentrations en CYP450. Des quantités différentes de CYP450 sont détectées le long de l'intestin grêle, mais les enzymes humaines de la région intestinale proche du pylore ou de l'iléon présentent les mêmes mécanismes (Peters et Kremers, 1989 ; Hall *et al.*, 1999 ; Zhang *et al.*, 1999 ; Obach *et al.*, 2001). Les microsomes intestinaux de rat après ingestion de HAP montrent la présence de CYP1A1 quel que soit le niveau de contamination et le nombre de cycles des micropolluants (Roos, 1996). Par contre, l'enzyme n'est détectée dans le foie que pour des concentrations importantes en HAP à 5 ou 6 cycles. Ces résultats suggèrent un rôle important du métabolisme intestinal, notamment pour les HAP de plus petite taille.

Dans l'objectif de déterminer si les cellules intestinales peuvent métaboliser les HAP avec ou sans inhibiteurs du métabolisme, l'incubation des cellules Caco-2 avec du PHE, PYR et B[a]P marqués au <sup>14</sup>C pendant 6 heures a été effectuée (Cavret et Feidt, 2005). Ces résultats montrent que ces cellules peuvent hydroxyler les trois HAP étudiés (45%, 65% et 96%,

respectivement, de ce qui est retrouvé de l'autre côté de l'épithélium). Ils concluent que ce métabolisme au niveau intestinal peut influencer positivement le transport cellulaire. Dans le cas du B[a]P, ce métabolisme est indispensable pour le passage épithélial, en fait les caractéristiques de ce composé ne favorisent pas la diffusion passive. Pour les autres composés, moins lipophiles, le métabolisme se produit plus tard et est aussi moins important.

Afin de préciser le phénomène de biotransformation des HAP au sein de l'organisme des caprins et la partition des molécules natives et de leurs métabolites dans les produits d'excrétion, un apport unique de PHE (200 mg) a été administré par voie orale chez des chèvres en lactation (Grova *et al.*, 2005). La molécule native et ses métabolites ont été recherchés dans le sang, les urines, les fèces, le lait et certains tissus (foie, reins). Les métabolites identifiés ont été les suivants : 1,2,3,4 et 9-OH-PHE et le 9,10-di-OH-PHE. Les concentrations maximales de PHE (41 ng/mL) et de ses métabolites (209 ng/mL) dans le lait ont été détectées 7 heures après l'ingestion orale. Les 3- et 2-OH-PHE ont été les métabolites majeurs. Ce résultat suggère une importante biotransformation du PHE.

Le métabolisme du PYR s'amorce par une oxydation au niveau des liaisons 1-2 et 4-5, avec le 1-OH-PYR comme métabolite principal. Le 1-OH-PYR a été détecté dans l'urine de porc suite à une ingestion unique de PYR (Keiming *et al.*, 1983). Boyland et Sims (1964) ont mis en évidence les formes conjuguées du 1-OH-PYR à l'acide sulfurique ou l'acide glucuronique, le 1,6- et le 1,8-di-OH-PYR et le trans-4,5-di-OH-PYR dans l'urine de rat et de lapin suite à une injection intrapéritonéale avec du PYR. Beaucoup de ces métabolites ont aussi été identifiés ainsi que deux dérivés trihydroxylés suite à l'incubation de PYR dans des microsomes de rat isolés (Sims, 1970 ; Jacob *et al.*, 1982). De nombreux auteurs considèrent la détection du 1-OH-PYR dans les urines des animaux ou de l'homme comme un biomarqueur de l'exposition au HAP. En effet le 1-OH-PYR apparaît comme un bon index biologique de l'évaluation de la dose de PYR (Raszyk *et al.*, 1999 ; Jongeneelen, 2001). Etant donné que le PYR est ubiquiste dans de nombreux biotopes, le 1-OH-PYR pourrait servir également de bioindicateur pour l'ensemble des HAP (Jongeneelen, 2001).

Les études menées sur le PHE *in vivo* et *in vitro* indiquent que le processus de biotransformation commence par une époxidation au niveau des liaisons 1-2, 3-4 et 9-10, avec le dihydroxy comme premier métabolite et le 9-10 dihydroxy comme métabolite majoritaire. Le 9,10-, 1,2- et 3,4-di-OH-PHE ont été identifiés, soit libres, soit conjugués à l'acide

glucuronique dans les urines de rat et de lapin suite à une administration intrapéritonéale de PHE (Boyland et Sims, 1962). Les composés 1-,2-,3-,4-OH-PHE ont également été identifiés (Chu *et al.*, 1992). Les études *in vitro* avec des préparations de foie de porc de Guinée, de rat et de souris ont permis d'identifier le 9,10-, le 1,2- et le 3,4-diOH-PHE ainsi que le 9,10-oxyde et le 1,2diol-3,4-époxyde (Nordquist *et al.*, 1981).

*Il faut retenir que le métabolisme des HAP, comme celui des PCDD/F et PCB, est induit par le cytochrome P450 et que les enzymes du group CYP sont des acteurs dans la transformation de ces molécules. Le métabolisme a été constaté chez les ruminants. Des études in vitro ont mis en évidence ce métabolisme aux niveaux de l'intestin et de la glande mammaire.*

#### **4.4. Excrétion des POP**

Globalement, un organisme peut jouer le rôle de filtre en éliminant une fraction parfois importante de composés lipophiles vers une voie d'excrétion, soit au contraire il les concentre dans ses tissus (McLachlan, 1995). Les excrétions fécales et urinaires sont des voies d'élimination de POP quelle que soit l'espèce animale. L'œuf (cas de la poule pondeuse) et le lait (cas des femmes allaitantes et des ruminants laitiers) constituent des voies d'élimination complémentaires. Les molécules détectées dans les fèces ne correspondent pas seulement aux congénères non absorbés même si ces derniers sont majoritaires. En effet, au niveau des fèces, les molécules proviennent de (Laurent *et al.*, 2005) :

- les molécules non absorbées
- les molécules provenant d'une excrétion de cellules intestinales
- les molécules provenant de l'excrétion biliaire (circuit entéro-hépatique).

Quand à l'excrétion qualitative et quantitative des micropolluants organiques dans le lait, deux facteurs principaux sont susceptibles de l'affecter : les facteurs physico-chimiques de la molécule étudiée et les facteurs physiologiques directement liés à l'organisme (Bories, 1993).

##### **4.4.1. Excrétion des PCDD/F et PCB**

L'excrétion des PCDD/F et PCB chez les humains est documentée dans la littérature (Schlummer *et al.*, 1998 ; Moser et McLachlan, 2001). Dans le cas des enfants, plusieurs



études ont mis en évidence une absorption supérieure à 90 % (donc une très faible excrétion par voie fécale) pour toutes ces molécules à l'exception des congénères hepta- et octachlorés (Abraham *et al.*, 1994 ; Abraham *et al.*, 1996). Abraham *et al.* (1996) trouvent en plus que même si l'ingestion de PCDD/F est faible après le sevrage, les concentrations dans la graisse fécale ne diminuent pas substantiellement. Cela leur permet de conclure que les concentrations des PCDD/F dans les fèces sont plus ou moins un reflet de leur concentration dans la graisse corporelle.

Chez les adultes, contrairement à ce qui a été constaté chez les enfants, la presque totalité des PCDD/F et des PCB a été excrétée par voie fécale (Rohde *et al.*, 1999). Selon ces auteurs, le contenu fécal en PCDD/F est déterminé par la charge corporelle. L'augmentation de l'excrétion *via* les fèces des PCDD/F et PCB a été montrée chez l'homme adulte à partir de l'ingestion de « olestra » (Geusau *et al.*, 1999). L'olestra est un lipide non absorbable dérivé d'huile végétale et de sucre qui donne le même goût et la même texture aux aliments que les huiles et graisses qu'on emploie habituellement pour la friture (<http://agora.qc.ca/mot.nsf/Dossiers/Olestra>). Il accélère donc l'excrétion fécale en augmentant l'élimination de PCDD/F et PCB avec un facteur d'entre 1,5 et 11. La consommation réglée d'olestra pourrait ainsi être proposée comme une approche thérapeutique pour réduire la charge corporelle de ces molécules chez l'homme ayant subi une contamination ou comme une stratégie alimentaire chez les animaux d'élevage susceptibles d'une contamination pour diminuer les concentrations dans leur productions.

Une autre voie d'excrétion des composés organochlorés est le lait. Il a été montré que l'excrétion des PCB chez la femme est différente selon les congénères et que sa charge diminue avec le nombre de maternités (Yang *et al.* 2002). Le devenir des composés organochlorés a aussi été étudié sur d'autres espèces de mammifères. Dans les années 70, pour étudier le comportement de la TCDD chez le rat, Rose *et al.* (1976) ont suivi l'ingestion d'une dose de 1 µg/kg/jour de <sup>14</sup>C-2,3,7,8-TCDD pendant 7 semaines. L'activité du <sup>14</sup>C a été détectée dans les fèces mais pas dans les urines. Une autre étude réalisée par Hakk *et al.* (2001) sur la même espèce, a mis en évidence que la TCDD doit être métabolisée pour que son élimination prenne la voie biliaire ou urinaire. Ainsi, dans leurs conditions expérimentales, la voie majeure d'élimination de la TCDD native a été aussi la voie fécale.

Dans le cas des ruminants, l'excrétion des PCDD/F et PCB vers le lait dépendra des facteurs suivants :

- le nombre d'atomes de chlore présents dans la molécule
- le positionnement moléculaire de ces atomes de chlore
- la dose ingérée par l'animal

Plusieurs travaux ont permis de quantifier la concentration des molécules dans les différentes voies d'excrétion (Lorber *et al.*, 2000 ; Winters *et al.*, 2000 ; Fries *et al.*, 2002). Il a été constaté une augmentation du stockage et de l'excrétion de la 1,2,3,4,6,7,8-HpCDD et la 1,2,3,4,6,7,8,9-OCDD (molécules hautement chlorées) par rapport à l'ingestion avec un facteur de 1,7 et 3,4 respectivement (Fries *et al.*, 2002). Ces auteurs suggèrent que la synthèse de ces molécules se produit dans les fèces après l'excrétion. L'étude menée par Tuinstra *et al.* (1992) sur l'excrétion des PCDD/F dans le lait de vache apporte des pistes sur l'influence du nombre de chlores pour ce transfert, de fait il a été mis en évidence que trois composés principaux ont contribué à hauteur de 75% de la contamination totale en dioxines : la 2,3,7,8-TCDD, la 2,3,4,7,8-PeCDF et la 1,2,3,7,8-PeCDD (les moins chlorées). A l'opposé, Vrecl *et al.* (2005) ont montré que les PCB coplanaires et hautement chlorés (80, 155 et 169) sont plus fortement excrétés notamment dans le lait chez le mouton.

L'importance de la dose ingérée par jour et par un animal pour l'obtention d'un plateau d'équilibre a été soulignée par Fries *et al.* (1973). Ils ont trouvé chez la vache qu'une période de 60 jours n'est pas suffisante pour que l'excrétion des PCB dans le lait arrive à l'équilibre. Les vaches de cette expérimentation étaient exposées quotidiennement à 200 mg/jour d'Aroclor 1254 (mélange commercial de PCB).

Le positionnement des atomes de chlore dans la molécule semble être un facteur clef pour que les PCB soient excrétés dans le lait (McLachlan *et al.*, 1990 ; Krokos *et al.*, 1996). Les facteurs de bioconcentration dans le lait des ruminants (Thomas *et al.*, 1999) sont compris entre 0,2 et 21,2 selon les classements suivants : PCB 118 > 138 > 153 > 183 > 74 > 170 > 180 > 66 > 187 > 149 > 101 > 18 > 100 > 28. De fait, ces molécules possèdent un ou deux molécules de chlore en position *ortho*. Finalement, une variation saisonnière sur la concentration des PCB ainsi que des PCDD/F dans le lait a été signalée par quelques auteurs (Tuinstra *et al.*, 1980 ; Fürst *et al.*, 1992 ; Krokos *et al.*, 1996).

#### 4.4.2. Excrétion des HAP

L'excrétion urinaire et fécale des HAP a été largement étudiée (Raszyk *et al.*, 1999 ; Jongeneelen, 2001). Une étude réalisée par Van Schooten (1997) sur l'absorption et l'excrétion des HAP chez le rat exposé à un sol industriel contaminé a montré que les HAP étaient facilement absorbés, métabolisés puis excrétés principalement sous forme de métabolites dans les urines et les fèces. Le taux d'excrétion du PYR et du 1-OH-PYR dans les urines et les fèces serait directement corrélé au mode d'administration du composé. Il serait de 53,4 % suite à une administration orale, de 3,1 % en intrapéritonéal, de 30 à 37 % en intratrachéal et enfin de 0,003 % après application intrapulmonaire chez le rat (Jacob *et al.*, 1989). Même si l'excrétion urinaire a été la voie la plus étudiée, les recherches sur le métabolisme fécal se sont accrues suite à la reconnaissance de l'importance du cycle entéro-hépatique dans le métabolisme des HAP (Van de Wiel *et al.*, 1993 ; Van Schooten *et al.*, 1997). La majorité des métabolites de HAP sont excrétés dans l'urine, la bile et les fèces. Plus récemment, Grova (2003) et Grova *et al.* (2005) ont montré l'excrétion de métabolites de HAP dans le lait. Quand à l'élimination de POP de l'organisme *via* les œufs, seul le transfert sol-œufs a été étudié (Stephens *et al.*, 1995 ; Schuler *et al.*, 1997).

Tout comme au niveau fécal, la nature des HAP identifiés dans les urines est de deux types : molécules mères et métabolites, ces derniers étant prépondérants. A titre d'exemple, pour le PHE, l'étude comparative du métabolisme du PHE chez le rat et le porc de Guinée (Chu *et al.*, 1992) avait également montré un fort métabolisme du PHE et une excrétion importante de ces composés dans les urines chez ces 2 espèces. Le PHE apparaît ainsi comme un composé facilement absorbé, métabolisé et éliminé par les mammifères. L'urine apparaît de loin comme la voie d'excrétion principale du PHE, 15,2 % de la dose administrée a été retrouvée 118 h après l'administration. Seul 0,4 % de la quantité totale excrétée dans les urines se trouve sous la forme molécule mère, les formes hydroxylées constituent 99,6 % de la part excrétée dans cette matrice (Grova, 2003). Les processus de métabolisme chez la chèvre présentent des divergences qualitatives et quantitatives avec ceux du rat et du porc de Guinée (Chu *et al.*, 1992). En effet, le 9,10-diOH-PHE était présent à 70,7 % dans l'urine de chèvre, à 45 % chez le rat et à 28 % seulement chez le porc de Guinée. De même, le 1-OH-PHE apparaît comme la forme monohydroxylée la plus abondante dans les urines de rat et de porc tandis que chez la chèvre le 2-, le 3-, et le 4-OH-PHE présentent des quantités cumulées

similaires (entre 0 h et 118 h). Ces différences peuvent s'expliquer par la spécificité de l'équipement enzymatique. Bien qu'existant chez une espèce donnée, un système enzymatique déterminé peut ne pas s'exprimer, ou seulement faiblement, expliquant ainsi, les variations quantitatives d'une espèce à l'autre (Bories, 1993). Grova (2003) a mis en évidence une relation directe entre la lipophilie d'un composé et sa facilité à être transférée du compartiment sanguin à l'urine. Plus un composé est soluble plus il aura tendance à être excrété dans les urines. Ainsi les formes dihydroxylées avec un Log de  $K_{ow}$  de l'ordre de 3,23 présentent un taux d'excrétion supérieur à la molécule mère avec un log de  $K_{ow}$  à 4,5.

Pour les teneurs en HAP des laits, très peu de données sont disponibles dans la littérature, L'étude menée par Grova *et al.* (2000) a démontré que les teneurs en HAP du lait de ruminants variaient peu en fonction de la distance entre une source de pollution et l'exploitation laitière. Parmi les 16 HAP toxiques seuls 5 congénères ont été détectés dans le lait, à savoir le NA, le PHE, l'anthracène (ANT), le fluoranthène (FLUOT) et le PYR.

Trois hypothèses relatives à la détermination du profil des molécules dans le lait peuvent être formulées :

- les HAP de faible poids moléculaire sont présents dans l'environnement en plus fortes concentrations que les autres congénères, engendrant ainsi leur présence dans les produits d'origine animale
- seuls les HAP de faible poids moléculaire (nombre de cycles strictement inférieur à 5) peuvent franchir les barrières épithéliales intestinales et mammaires
- la différence entre le profil des HAP de l'environnement et celui du lait peut également résulter d'un métabolisme sélectif de ces molécules chez les ruminants laitiers

L'étude menée par Grova *et al.* (2002) a permis de confirmer la seconde hypothèse sans exclure la première : la radioactivité associée au B[a]P a été retrouvée dans le plasma sanguin ( $2 \text{ Bq.mL}^{-1}$ , au pic d'absorption) et à de très faibles pourcentages dans le lait (0,2 % de la dose administrée et 2,5 % de la dose absorbée) suite à l'ingestion unique de cette molécule marquée au  $^{14}\text{C}$  chez les chèvres en lactation. Il semblerait aussi que la barrière épithéliale mammaire joue un rôle de filtre, ne laissant passer que des molécules de faible encombrement spatial (Cavret, 2002).

L'étude réalisée par Grova (2003) confirme la cinétique d'apparition du PHE dans le lait entre 7h et 31h post ingestion. Le 3-OH-PHE apparaît comme le composé principal de cette matrice ( $p < 0,001$ ) (composé majoritaire dans le foie également). Il présente son pic d'apparition dans le lait dès 7h au même titre que le 1-OH-PHE et le PHE. Un deuxième groupe constitué du 2-OH, 4-OH et 9-OH-PHE atteignent leur niveau maximum 31 h après l'ingestion. La somme des concentrations en métabolites à 7h est 10 fois supérieure à celle du PHE au même moment. Il peut être suggéré que les métabolites hydroxylés, plus solubles, peuvent franchir plus facilement la barrière épithéliale mammaire. Dans le cas d'une diffusion passive (Cavret, 2002), l'équilibre de concentration en PHE et en métabolites dans le sang pourrait expliquer le rapport PHE/métabolites dans le lait au même moment. Le PHE non métabolisé préalablement par les cellules intestinales ou le foie pourrait être métabolisé au niveau des cellules épithéliales mammaires (malgré une activité métabolique nettement plus faible que dans le foie) (Williams et Phillips, 2000) entraînant ainsi un rapport métabolite/molécule parent encore plus important. Les résultats de Grova (2003) montrent que le ratio lait/sang d'un métabolite dihydroxylé apparaît inférieure au ratio urine/sang. De ce fait, le 9,10-diOH-PHE est largement excrété dans l'urine. Pour les hydroxyphénanthrènes, la concentration dans le sang et le lait est similaire, suggérant une diffusion passive des composés d'un compartiment à l'autre. Pour le PHE, le rapport est légèrement inversé.

Une dernière voie d'excrétion est proposée : la voie biliaire. De fait, Chipman (1982) ont montré que la bile est la voie principale d'excrétion des HAP durant les 6 heures suivant l'administration intraveineuse de 3  $\mu\text{mol/kg}$  de poids vif de B[a]P marqué chez des rats canulés au niveau du canal biliaire. 60% de la dose administrée est excrétée dans la bile pour seulement 3 % dans les urines. Les auteurs ont montré que des composés mutagènes ou potentiellement mutagènes peuvent alors être excrétés par la bile dans l'intestin (Chipman *et al.*, 1981 ; Chipman, 1982).

*Il peut être conclu que les POP peuvent être effectivement excrétés par la voie fécale, par la voie urinaire ainsi que vers le lait. La voie urinaire est la principale voie d'excrétion pour les molécules métabolisées. Le métabolisme et l'excrétion dépendront des caractéristiques physico-chimiques des molécules, telles que le nombre d'atomes de chlore, leur positionnement, le nombre de cycles benzéniques ainsi que des quantités ingérées par les animaux. Le transfert des polluants vers ces matrices biologiques doit être caractérisé.*

## 5. Caractérisation du transfert « herbe-produits d'excrétion » des POP

Les végétaux peuvent, par le phénomène d'adsorption racinaire ou foliaire, être des vecteurs de quantités non négligeables de composés organiques. Les ruminants jouent à leur tour un rôle dans le transfert de ces composés. Lorsque les niveaux trophiques croissent, la concentration, par exemple des dioxines, a tendance à augmenter. L'identification du risque de transfert nécessite l'appréciation des transferts depuis les matrices environnementales vers les animaux, l'identification des entrées potentielles et l'identification des pratiques à risque (Feidt *et al.*, 2000). La contamination du lait en POP est multifactorielle : elle est dépendante de facteurs environnementaux (contamination des fourrages), de facteurs propres du système d'élevage (fourrage et sol potentiellement contaminés, stade de lactation, état sanitaire du troupeau) et des caractéristiques des contaminants (Rychen *et al.*, 2005).

Dans la littérature, plusieurs termes ont été utilisés pour caractériser le transfert de composés chimiques de l'aliment des vaches vers la matière grasse du lait. Ainsi, les termes les plus fréquents sont : le facteur de bioconcentration (BCF), le facteur de biotransfert (BTF) et le carry-over rate (COR) (Fries et Paustenbach, 1990 ; McLachlan *et al.*, 1990 ; McLachlan, 1993 ; Welsch-Pausch et McLachlan, 1998 ; Huwe et Smith, 2005). Ces facteurs sont définis avec les équations suivantes :

$BCF = C_{MF} / C_{diète}$  , avec  $C_{MF}$  : concentration dans la matière grasse du lait en pg/g et  $C_{diète}$  : concentration dans la MS de la diète en pg/g. Le BCF est aussi un critère important utilisé pour l'accumulation d'éléments toxiques dans les organismes aquatiques.

$BTF = C_{milk} / I$ , avec  $C_{milk}$  : concentration dans le lait entier en pg/kg, et  $I$  : ingestion en ng/jour

$COR = 100 * A_{milk} / I$ , avec  $A_{milk}$  : quantité excrétée dans le lait en pg/g MG \* jour, et  $I$  : ingestion en pg/g MS \* jour.

Selon Fries *et al.* (1999) le COR est le terme les plus variable des coefficients obtenus en PCDD/F chez des vaches après avoir ingéré du bois traité avec pentachlorophénol. D'autres auteurs trouvent que le COR, étant relativement indépendant de paramètres tels que la lactation, le contenu de matière grasse du lait et la quantité d'aliments ingérés, est le meilleur

indicateur du comportement des polluants chez la vache laitière (MacLachlan, 1994 ; McLachlan et Richter, 1998). Ce paramètre d'expression du transfert a été choisi par McLachlan *et al.* (1990), face au BTF ou BCF, d'après une approche de bilan de masses chez la vache laitière. Désormais le COR sera désigné comme facteur de transfert (FT).

### 5.1. Transfert des PCDD/F et PCB

Les résultats obtenus par Fürst *et al.* (1993) indiquent que la voie du transfert « air-herbe-vache » est plus importante que la voie « sol-herbe-vache ». Un effet congénère est observé par ces auteurs pour le transfert des PCDD/F de l'herbe au lait. Fürst *et al.* (1993) indiquent que l'évaluation du risque devrait se faire sur la base d'un congénère spécifique. Dans le tableau 5 on peut observer le transfert vers le lait calculé congénère par congénère dans la famille des PCDD/F. Il convient de préciser que tous les congénères peuvent être retrouvés dans le lait. Pour les composés dont le log  $K_{ow}$  est supérieur à 6,5 le transfert décroît avec l'augmentation du log  $K_{ow}$ . Quelques exceptions doivent cependant être signalées parmi les PCDF (2,3,7,8-TCDF ; 1,2,3,7,8-PeCDF ; 1,2,3,7,8,9-HxCDF) pour lesquels on attribue un transfert faible du fait d'une dégradation hépatique.

**Tableau 5** : Valeurs des coefficients de transfert (%) aliment-lait des PCDD/F chez la vache cités dans la bibliographie (nd : non détecté ou  $p < 0,1$ )

	McLachlan <i>et al.</i> (1990)	Slob <i>et al.</i> (1995)	Fries <i>et al.</i> (1999)
Composés			
2,3,7,8 TCDD	35	15	35
1,2,3,7,8 PeCDD	33	10	24
1,2,3,4,7,8 HxCDD	17	5,6	15
1,2,3,6,7,8 HxCDD	14	6,4	18
1,2,3,7,8,9 HxCDD	18	3,1	13
1,2,3,4,6,7,8 HpCDD	3	0,6	3,3
OCDD	4	0,1	0,39
2,3,7,8 TCDF	nd	nd	nd
1,2,3,7,8 PeCDF	nd	nd	nd
2,3,4,7,8 PeCDF	25	12	17
1,2,3,4,7,8 HxCDF	nd	4,3	14
1,2,3,6,7,8 HxCDF	16	3,6	15
1,2,3,7,8,9 HxCDF	nd	nd	nd
2,3,4,6,7,8 HxCDF	14	4,2	8,9
1,2,3,4,6,7,8 HpCDF	3	0,4	3,5
1,2,3,4,7,8,9 HpCDF	8	0,5	4,3
OCDF	1	nd	nd

Les facteurs de transfert vers le lait des dioxines trouvés par Welsch-Pausch et McLachlan (1998) diminuent de 0,34 pour la TCDD à 0,01 pour la OCDD. Dans le cas des furannes, le FT le plus haut a été observé pour la 2,3,4,7,8-PeCDF (0,26) et le FT le plus faible a été trouvé pour la OCDF (0,0053). Ainsi, le transfert diminue avec l'augmentation du nombre d'atomes de chlore. Cela indique que l'absorption diminue aussi avec l'augmentation du nombre d'atome de chlore. Concernant les PCB, Thomas *et al.* (1999) trouvent que les PCB 138, 153 et 180 sont transférés sans être transformés de l'herbe au lait. Les PCB 52, 101 et 149 ont été les moins transférés du fait probablement de leur fort niveau de biotransformation. Un transfert rapide vers le lait de dioxines et de PCB coplanaires (plateau d'excrétion atteint à 17 jours) a été constaté chez des vaches durant un apport de 40 jours d'une dose journalière de 5,8 pg/kg dioxine-TEQ (Huwe et Smith, 2005).

## 5.2. Transfert des HAP

D'après les connaissances établies sur les mécanismes du transport intracellulaire, les propriétés physico-chimiques des congénères semblent jouer un rôle important dans le transfert des HAP vers le lait. Le degré de lipophilie, mesuré classiquement par le  $K_{ow}$  pourrait jouer un rôle prépondérant, puisqu'il détermine la capacité d'un xénobiotique non ionisé à traverser les membranes biologiques et, finalement, à passer dans le lait. Travis et Arms (1988) ont montré que les facteurs de transfert des composés organiques (DDT, PCB, dioxines, HAP) vers le lait étaient directement proportionnels au  $K_{ow}$ . Il semblerait que la lipophilie ne soit pas l'unique facteur influençant le transfert des HAP dans le lait. La conformation spatiale du composé pourrait intervenir dans ces phénomènes de transfert.

Les analyses de HAP dans l'herbe et le lait de vache (Grova *et al.*, 2000) présentent des distributions différentes des 16 congénères classés prioritaires par l'US-EPA. Ce résultat suggère des taux de transfert apparents différents pour les HAP. Le transfert «aliment-lait» a été évalué sur les HAP en utilisant le BTF de Travis et Arms (1988). Il a été estimé à 2,4% pour le NA et 2,2% pour l'ANT. Ces derniers se sont montrés supérieurs à ceux appréciés pour le PHE (0,6%), le FLUOT (0,7%) ou encore le PYR (0,9%) (Grova, 2000). Les travaux de Grova *et al.* (2000, 2002) insistent également sur l'importance du poids moléculaire dans les transferts des HAP, puisque ces deux études ont révélé l'absence de HAP à 5 cycles aromatiques et plus dans les laits de tank prélevés dans différentes exploitations exposées. Hietaniemi et Kumpulainen (1995) ont mesuré des teneurs en HAP dans les laits



d'exploitations situées à proximité de grands sites industriels. Les profils en HAP sont similaires à ceux mis en évidence dans les travaux précédents. En effet, les composés détectés dans les différents laits sont le PHE, l'ANT, le FLUOT, le PYR, le B[a]A, le triphénylène et le CHRY.

Une étude sur le transfert *in vivo* du B[a]P et du 3-méthylcholanthrène marqués au  $^{14}\text{C}$  chez la brebis suite à une ingestion chronique de 1 mg/jour durant 14 jours a révélé un taux de transfert vers le lait de 0,01 % (West et Horton, 1976). Eisele (1985) a évalué à  $25 \cdot 10^{-6}$  % le pourcentage cumulé de la radioactivité ingérée retrouvée dans le lait suite à un apport chronique de  $^{14}\text{C}$ -NA à des vaches laitières. Ce modèle *in vivo* fait état du transfert des molécules *via* l'organisme avant d'atteindre le lait. Les contaminants à faible  $\log K_{ow}$  ( $< 6,5$ ) seraient facilement dégradés par le ruminant et présenteraient ainsi de faibles taux de transfert (McLachlan, 1994 ; Holfelt, 2001). Par ailleurs, la radioactivité associée au PHE dans l'étude de Cavret *et al.* (2005 b), composé le moins lipophile ( $\log K_{ow}$  4,5), était retrouvée plus rapidement et en plus grande quantité dans le milieu apical soit 1,3 fois plus que le PYR présentant un  $\log K_{ow}$  intermédiaire ( $\log K_{ow} = 4,88$ ) et 7,7 fois plus que le B[a]P présentant une lipophilie élevée ( $\log K_{ow} = 6,31$ ). Le rôle de l'épithélium intestinal sur la perméabilité sélective des micropolluants a été spécifié par Cavret *et al.* (2005 ab). Le transfert peut être donc dépendant de la capacité des molécules à se rendre dans le milieu apical intestinal. Par ailleurs, Cavret *et al.* (2005 b) ont trouvé que l'épithélium mammaire peut jouer un rôle clé sur la sélection du transfert des HAP de l'aliment vers le lait. Effectivement, d'après leur étude *in vitro*, seulement le PHE et le PYR étaient prêts pour traverser la couche de cellules mammaires. La radioactivité associée au  $^{14}\text{C}$ -B[a]P présentait 6 heures après la contamination du milieu basal, un taux de transfert de l'ordre de 2,4% de la dose apportée initialement. Il a été conclu que l'étude du transfert intestinal des xénobiotiques comme les HAP n'est pas suffisant pour caractériser leur disponibilité et toxicité parce que le métabolisme intestinal peut remodeler la molécule (Cavret et Feidt, 2005).

Le transfert des POP vers le lait a été mis en évidence d'après les données bibliographiques. Cependant, les données concernant le transfert des POP du fourrage vers le lait en conditions contrôlées sont encore rares et partielles. Dans le cas des PCDD/F ou PCB la plupart des études sur le transfert ont été menés à partir de doses uniques directes des molécules. Si la matrice fourrage a été prise en compte, la totalité de ces molécules n'ont pas été recherchées. Nonobstant, le congénère en lui même ainsi que le nombre d'atomes de chlore des molécules

semblent être des facteurs déterminants du transfert de ces molécules. En ce qui concerne les HAP, des travaux portant sur leur transfert vers le lait, aucun n'a porté sur la matrice végétale. Tout de même il a pu être constaté que le transfert dépendra des propriétés physico-chimiques des molécules ainsi que de leur capacité à traverser les barrières physiologiques.

## **6. Conclusions de la synthèse bibliographique**

Les niveaux de contamination en POP des fourrages révèle un véritable risque d'entrée des contaminants dans la chaîne alimentaire. C'est à proximité des sources d'émissions que les risques sont les plus grands (tableaux 3 et 4).

Les POP sont transférables vers les produits animaux et le lait en particulier. En effet, les ruminants ingèrent des quantités importantes de fourrages contaminés (de l'ordre de 15 kg de MS par animal et par jour). Ces transferts sont dépendants d'une part, des modalités de dépôts liés aux conditions environnementales et aux propriétés physico-chimiques des molécules et d'autre part, de l'aptitude des POP à être extraits des matrices alimentaires. A l'heure actuelle peu de travaux ont été réalisés sur le transfert de ces trois familles de POP des végétaux vers le lait : les PCDD/F, les PCB et surtout les HAP. Plusieurs pistes doivent être approfondies :

- l'effet durée d'exposition. Peu d'études ont concerné le transfert des contaminants suite à un apport chronique
- le transfert comparé des molécules intra-famille et inter-familles
- l'effet matrice : plusieurs études ont été réalisées avec des doses de contaminants apportés directement à l'animal sans passer par le fourrage contaminé
- le devenir des contaminants dans le tractus digestif la biotransformation des POP absorbés : en termes de sécurité alimentaire, il conviendrait de s'intéresser au potentiel toxique à la fois des molécules parents et de leurs métabolites. Leur détection et quantification deviennent nécessaires.

L'objectif de ce travail de thèse est d'apporter des informations complémentaires sur le transfert des POP vers le lait à partir de l'ingestion de fourrage. Nous avons en particulier focalisé notre attention sur :

- les molécules retenues dans le protocole d'Aarhus : PCDD/F, PCB et HAP

- l'importance du fourrage comme matrice vecteur
- le rôle du tractus digestif du ruminant, notamment le rumen, sur la biodisponibilité des molécules
- le transfert au lait à partir de différentes « matrices alimentaires » (huile, foin, sol)
- la nécessité d'un apport chronique pour l'obtention d'un état d'équilibre d'excrétion dans le lait.

Ainsi, nous avons jugé utile, dans un premier temps, d'étudier le pouvoir du rumen à extraire d'une matrice végétale contaminée les composés susceptibles de biotransformation tels que les HAP (chapitre 1). Deuxièmement, nous avons caractérisé le transfert de ces molécules vers le lait et les urines à partir de l'ingestion d'herbe et sol contaminés (chapitre 2). Finalement, le transfert de molécules organochlorées (PCDD/F et PBC) vers le lait à partir d'un foin naturellement contaminé a été caractérisé (chapitre 3).

# **PARTIE EXPERIMENTALE**

## **CHAPITRE 1**

### **Etude *in sacco* sur l'extraction des HAP de l'herbe dans le rumen**

## 1. Introduction

Les prairies sont des surfaces sur lesquelles les POP sont potentiellement déposés et ingérés par les ruminants lors du pâturage (Simonich et Hites, 1994 ; McLachlan, 1996). Il a été montré que les cires cuticulaires des végétaux peuvent être responsables de l'adsorption de POP sur les feuilles (Thomas *et al.*, 1998 ; Bakker *et al.*, 2001 ; Wang *et al.*, 2004). Les alcanes (C<sub>21</sub>-C<sub>35</sub>) constituent les composants aliphatiques les plus présents dans la cire cuticulaire de différentes espèces végétales (Mayes *et al.*, 1986 ; Dove et Mayes, 1991 ; Stammitti *et al.*, 1996 ; Maffei, 1996 ; Kunst et Samuels, 2003). Concernant les herbes de prairie, l'hentriacontane (C<sub>31</sub>) est l'alcane le plus abondant suivi du tritriacontane (C<sub>33</sub>) et du nonacosane (C<sub>29</sub>), (137, 116 et 73 mg/kg MS respectivement ; Mayes *et al.*, 1986). Par ailleurs, une étude récente montre que les HAP sont surtout déposés sur les graminées dans les 10 premiers mètres perpendiculaires à un axe routier par les émissions des automobiles (Tankari Dan-Badjo, 2007). Ainsi, une exploitation laitière proche d'une source de contamination telle qu'une autoroute peut contribuer à l'entrée des polluants dans la chaîne alimentaire. Le rôle du ruminant dans le transfert potentiel des contaminants de l'herbe au lait doit donc être précisé. Le rumen, premier compartiment digestif des ruminants, est équipé d'une flore microbienne dont les actions sont responsables d'une grosse part des processus hydrolytiques digestifs, et probablement de la libération des POP fixés sur l'herbe.

Dans l'objectif d'approfondir le rôle du rumen dans l'extraction des POP de l'herbe, un essai préliminaire *in vitro* a été mis en place. Dans un premier temps nous avons focalisé notre attention sur les HAP et nous nous sommes inspirés du modèle de Russell *et al.* (1983) précédemment utilisé dans le cadre de travaux menés au sein de notre laboratoire (Lambert, 1998 ; Sales-Duval, 2000 ; Lutz, 2006). Le principe de cette approche se base sur l'incubation d'herbe pendant 6 heures en anaérobiose et à 39°C dans de jus de rumen naturel. Deux types d'herbe ont été utilisés, une herbe contaminée naturellement (273 ng/g MS, Σ 11 HAP) et une herbe artificiellement contaminée (4900 ng/g MS, Σ 3 HAP). Les résultats de cette étude n'ont pas permis de statuer clairement sur la capacité d'extraction du jus de rumen. Les procédures et les résultats principaux sont présentés dans l'annexe 1. Les limites de cette approche *in vitro*, nous ont amené à réaliser une approche *in sacco* permettant de s'approcher des conditions ruminales réelles et sur une période plus longue d'incubation. En effet la caractérisation de la dégradation dans le rumen des nutriments majeurs des différents aliments a largement été étudiée à partir de cette méthode avec des sachets nylon (Michalet-Doreau *et*

*al.*, 1987). Cette méthode permet de suivre la cinétique de disparition des constituants alimentaires (Michalet-Doreau et Nozière, 1999) et de ce fait la disparition des HAP des végétaux dans le rumen. En effet, à notre connaissance, aucun travail portant sur la disparition des HAP des végétaux dans le rumen n'a été publié. L'approche *in sacco* permet d'étudier en parallèle d'autres paramètres tels que la disparition d'alcane cuticulaires et la disparition de la MS. La question qui se pose est la suivante : la dynamique de disparition des HAP de l'herbe peut-elle être expliquée par la disparition des alcanes cuticulaires ? En effet, nous faisons l'hypothèse que les HAP sont fixés sur les premières couches foliaires, notamment sur la cuticule. Ainsi, l'objectif de cette étude est de déterminer le lien éventuel entre les dynamiques de disparition de 3 HAP modèles (PHE, PYR et B[a]P), et les dynamiques de disparition des alcanes cuticulaires majeurs (C<sub>27</sub>, C<sub>29</sub>, C<sub>31</sub>, C<sub>33</sub>) ou de la MS.

## **2. Matériel et méthodes**

### **2.1. Herbe utilisée**

Deux grammes et demi de PHE (Sigma Aldrich, Steinheim, Allemagne), 2,5g de PYR (Sigma Aldrich, Steinheim, Allemagne) et 2,5g de B[a]P (Fluka, Steinheim, Allemagne) ont été dissous dans 500 mL d'huile adjuvante d'origine végétale (Actirob B, Aventis Cropscience, France) et puis dans 10 L d'eau (proportions selon fabricant). Cette solution a été pulvérisée sur une surface de 10 m<sup>2</sup> d'herbe de prairie avec un rendement d'environ 240 g MS/m<sup>2</sup>. Les espèces suivantes ont été identifiées : *Festuca arundinacea* (40%), *Dactylis glomerata* (30%), *Arrhenatherum elatius* (20%) et *Lolium perenne* (10%). La pulvérisation a été réalisée en absence de pluie et de vent. Les pertes, pendant la pulvérisation, ont été déterminées au cours d'un pré-essai. Elles ont été prises en compte pour la préparation de cette solution de pulvérisation dans le but de retrouver 50 mg de chaque HAP sur 500 g de MS. Le lendemain de la pulvérisation la surface traitée a été fauchée et l'herbe placée dans un phytotron à 30°C pendant 5 jours pour la transformation en foin.

### **2.2. Incubation dans le rumen**

Environ 4 g de cette herbe artificiellement contaminée en PHE, PYR et B[a]P (concentration préalablement déterminée selon la méthode adaptée de Dugay *et al.*, 2002) ont été introduits dans des sachets nylon de dimensions 9x14 cm et d'une porosité de 50 µm (Blutex 120, Saati

France Co., Saily Saillisel, France). Le tableau 6 indique les espèces contenues dans le mélange d'herbe utilisé ainsi que le profil d'alcane majoritaires de chacune des espèces. Il peut être constaté que le C<sub>31</sub> est un des alcanes majoritaires.

Tableau 6 : Profil d'alcane présents dans les différentes graminées utilisées

Graminée	Alcane majoritaire	2 <sup>ème</sup> alcane majoritaire	3 <sup>ème</sup> alcane majoritaire
<i>Festuca arundinacea</i>	C <sub>31</sub> (51.7 %)	C <sub>29</sub> (15.4 %)	3M-C <sub>33</sub> (10.1 %)
<i>Dactylis glomerata</i>	2M-C <sub>28</sub> (28.4 %)	C <sub>31</sub> (14.4 %)	C <sub>29</sub> (12.6 %)
<i>Arrhenaterium elatius</i>	2M-C <sub>28</sub> (18.5 %)	C <sub>29</sub> (10.5 %)	C <sub>31</sub> (8.2 %)
<i>Lolium italicum</i>	C <sub>31</sub> (38.2 %)	C <sub>29</sub> (24 %)	3M-C <sub>33</sub> (8.6 %)
<i>Lolium multiflorum</i>	C <sub>31</sub> (34.9 %)	C <sub>29</sub> (14.4 %)	3M-C <sub>33</sub> (7.6 %)

Source : Maffei (1996)

Trois vaches munies d'une canule ruminale (#2C, Bar Diamond, Inc. Parma, ID, USA), et nourries avec une ration complète à base d'ensilage de maïs, ont été utilisées pour cette expérimentation. Les temps d'incubation des sachets dans le rumen ont été de : 1h, 3h, 6h, 12h, 24h et 48h. Pour chaque temps d'incubation, 6 sachets par vache ont été introduits dans le rumen. Après l'incubation, les sachets ont été lavés 2x5 minutes à l'eau froide puis séchés à 30°C pendant 5 jours avant les analyses. La disparition immédiate de MS (0h) a été déterminée après le lavage de 6 sachets 2x5 minutes à l'eau froide, ces sachets n'ont pas donc été incubés dans le rumen. Après le séchage, le poids des sachets a été déterminé afin de calculer la disparition de la MS. Après la pesée, les résidus des sachets d'un même temps d'incubation et d'une même vache ont été regroupés en vue des analyses des HAP et des alcanes comme suit :

- Avant incubation (0h), les 6 sachets ont été regroupés dans un seul échantillon.
- Après incubation (1h à 48h), les 6 sachets de chaque temps d'incubation ont été regroupés par vache (18 échantillons).

Chaque échantillon a fait l'objet d'une analyse des 3 HAP et des 4 alcanes ainsi que de la détermination de la MS.

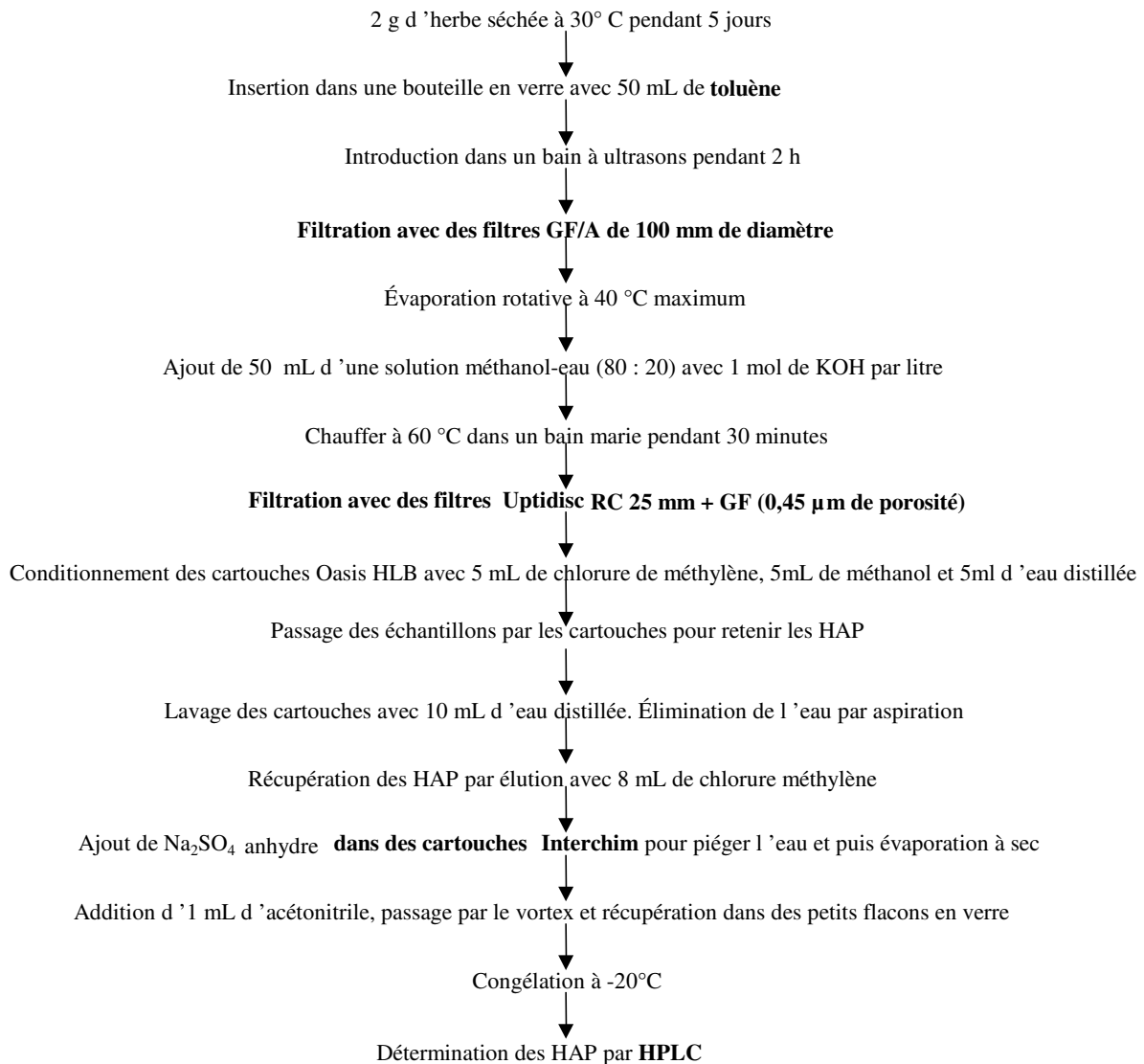
### **2.3. Détermination de la teneur en HAP**

Pour déterminer la quantité extraite de HAP dans le rumen il est essentiel de connaître au préalable les HAP totaux de l'herbe contaminée. Cela peut être effectuée à l'aide d'un solvant organique (Gorna-Binkul *et al.*, 1996 ; Bakker *et al.*, 2000 ; Dugay *et al.*, 2002). L'extraction des HAP de l'herbe a été réalisée en 5 répétitions après chaque traitement à partir de la méthode de Dugay *et al.* (2002) modifiée. La sonication du matériel végétal dans du toluène a été effectuée pour libérer les HAP. Certains auteurs ont démontré que le toluène est capable d'extraire le maximum des HAP retenus sur l'herbe (Kaupp et Sklorz, 1996 ; Dugay *et al.*, 2002). Pour mener à bien ces travaux, il a été nécessaire d'adapter la méthode d'extraction et de dosage des HAP au sein de notre laboratoire (cf. schéma 1). Des adaptations ont été effectuées sur :

- La taille des particules d'herbe (1 cm environ)
- La filtration : les essais préliminaires ont montré qu'avec les filtres à microfibrilles en verre GF/A de 150 mm de diamètre (Whatman, Schleicher&Schuell, England) l'herbe est bien séparée du filtrat après le bain à ultrasons. Plus tard, les filtres Uptidisc RC 25mm + GF (0,45µm de porosité) ont permis l'obtention d'un filtrat limpide avant le passage par les cartouches.



Schéma 1 : Méthode d'extraction des HAP de l'herbe (Dugay *et al.*, 2002) adaptée



La chromatographe liquide d'haute pression (HPLC) couplée à la détection de fluorescence (FD) a été la technique d'analyse des HAP choisie (Tomainova *et al.*, 1998 ; Pensado *et al.*, 2004 ; Villar *et al.*, 2006). Avant d'être injectés dans le chromatographe, les extraits ont été filtrés avec des filtres Minisart RC4 de 0,20 µm de porosité (Sartorius, Allemagne). La colonne utilisée pour séparer les molécules est une Vydac 201 QTP54,C18 (Grace Vydac, Hesperia, USA) avec les caractéristiques suivantes : 250 x 4,6 mm et 5 µm de porosité. La précolonne est une Vydac 201 GD54T (Grace Vydac, Hesperia, USA) avec les caractéristiques suivantes : 10 x 4,6 mm et 5µm de porosité. Les solvants utilisés sont de l'eau pure et de

l'acétonitrile. Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission des molécules permettant l'identification des HAP sont détaillées dans le tableau 7. Une solution standard commerciale avec un mélange de 16 HAP a été utilisée (Interchim, New Haven, USA) pour l'identification des HAP. Les concentrations de chaque HAP dans ce mélange sont détaillées dans l'annexe 2. Les aires des pics chromatographiques correspondants à chaque HAP ont été intégrées avec le logiciel Millennium<sup>32</sup> Waters (1997). Les temps de rétention déterminés pour chaque HAP sont aussi présentés dans le tableau 7. Parmi les 16 HAP classés prioritaires par l'US-EPA pour leur toxicité, 12 ont été pris en compte. Le NA et le FLUO n'ont pas été identifiés car ils sont très volatils. L'ANL et l'indeno(1,2,3-cd)pyrène n'ont pas pu être détectés. Le tableau 8 présente les rendements d'extraction des HAP de l'herbe à partir de cette méthode d'extraction et dosage.

Tableau 7 : Temps de rétention des HAP déterminés par HPLC et longueurs d'onde d'excitation et d'émission fluorimétrique pour leur identification.

HAP	Temps de rétention (min)	Intervalle du temps (min)	$\lambda_{\text{excitation}}$ (nm)	$\lambda_{\text{émission}}$ (nm)
NA	nd	0 - 24,2	280	355
ANL	nd			
ACN	20,4			
FLUO	nd			
PHE	22,3			
ANT	23,7			
FLUOT	25,1	24,2 - 29	250	420
PYR	26,0			
B[a]A	29,7			
CHRY	30,5	29 - 34	270	405
B(b)F	34,0			
B(k)F	36,4			
B[a]P	38,4	34 - 65	295	405
D(a,h)A	43,8			
B[g,h,i]P	44,6			
I(1,2,3,c,d)P	nd			

nd : non déterminé

Tableau 8 : Rendement d'extraction des HAP de l'herbe

HAP	Rendement d'extraction (%)
FLUO	63,1
PHE	88,8
ANT	61,4
FLUOT	100,5
PYR	100,1
B[a]A	75,3
CHRY	79,6
B[b]FLUOT	93,4
B[k]FLUOT	86,8
B[a]P	92,4
D[a,h]A	45,8
B[g,h,i]P	83,9

#### 2.4. Détermination de la teneur en alcanes

La détermination des alcanes cuticulaires a été réalisée au Laboratoire de Biogenèse Membranaire (UMR 5200 CNRS) de l'Université Victor Segalen à Bordeaux à partir de la méthode de Garcia (2005). Afin d'éliminer toute contamination, la verrerie et les filtres sont préalablement nettoyés avec du chloroforme à 95% de pureté. Les échantillons (1g de MS) ont été immergés 15 secondes dans 25 mL de chloroforme contenant 5 µg d'hexacosane (alcane témoin, C<sub>26</sub>). La solution a été filtrée à l'aide d'un filtre Miracloth. Le chloroforme a été évaporé sous azote et une étape de dérivation a été réalisée par addition de 100 µl de N,O-Bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide (BSTFA) + 1% de Triméthylchlorosilane (TMCS) (Supelco), pendant 1h à 80°C. Le chloroforme a été évaporé puis les composés ont été récupérés avec 200 µL d'hexane afin d'être analysés par Chromatographie en Phase Gazeuse. Deux extractions indépendantes ont été réalisées sur chaque échantillon.

Le chromatographe est un "Agilent Technologies 6850 Network GC System" équipée d'une colonne "HP1" de 30 m x 0,32 mm avec un film de 0,25 µm. Le volume injecté est de 1 µL par échantillon. Les cycles de températures sont : 1 min à 160°C ; 50°C/min de 160°C à 200°C ; 4°C/min de 200°C à 320°C ; 8 min à 320°C. Un échantillon étalon d'alcanes a

permis de déterminer les temps de rétention des composés étudiés. La quantité de composés étudiés a été calculée par rapport à l'alcane étalon. La limite de détection a été estimée de 1 ng/g MS.

## **2.5. Traitement de données**

L'incubation de l'herbe *in sacco* dans le rumen des vaches a permis de calculer par différence et pour chaque point de la cinétique la disparition de HAP, des alcanes cuticulaires ainsi que celle de la MS.

$$\text{Calcul du taux de disparition : } TD = \frac{Ci - Cr}{Ci} * 100$$

TD : taux de disparition

Ci : concentration initiale (ng/g MS)

Cr : concentration résiduelle après incubation (ng/g MS)

Les taux de disparition ont été ajustés, vache par vache, pour les HAP et les alcanes selon le modèle d'Ørskov et McDonald (1979) ( $y = a + b(1 - e^{-cx})$ ) à l'aide du logiciel Statist (V.5, 1991). Dans cette équation « a » représente le taux de disparition immédiat, « b » représente le taux de disparition progressive, et « c » la vitesse de disparition. De la même façon, une équation par composé a été obtenue à partir de la moyenne des 3 vaches (figure 8, page 70). A l'issue de la modélisation, les 3 paramètres « a », « b » et « c » ont été analysés statistiquement. Cette modélisation a également permis d'estimer le temps où le taux de disparition atteint son plateau (95% de  $a + b$ , Costera *et al.*, 2006). Par ailleurs, le taux de disparition de la MS a été ajusté à une équation linéaire.

## **2.6. Analyse statistique**

Une analyse de variance (ANOVA) en procédure GLM a été effectuée par vache sur les paramètres de l'équation modèle (3 facteurs étudiés) pour chacune des molécules (Phe, Pyr, B[a]Pyr, C<sub>31</sub>) à l'aide du logiciel SAS (V. 9.1, 2004). Un seuil de signification du 5% a été retenu.

### 3. Résultats

#### 3.1. Teneurs de l'herbe en HAP

Les concentrations moyennes (n=5) de chacune des molécules retrouvées dans l'herbe avant les incubations dans le rumen ont été les suivantes : 36222 ng/g MS pour le PHE (CV=24%), 84664 ng/g MS pour le PYR (CV=46%) et 57807 ng/g MS pour le B[a]P (CV=60%). Ainsi, la teneur en HAP de l'herbe contaminée artificiellement a été plus élevée que les concentrations trouvées lors de contaminations naturelles ( $\leq 2400$  ng/g MS, Crépineau-Ducoulombier et Rychen, 2003 ; Bakker *et al.*, 2000).

#### 3.2. Disparition *in sacco* des HAP, des alcanes et de la MS

La disparition *in sacco* des HAP est présentée dans la figure 5. Le taux de disparition des HAP a été très rapide. En effet, plus de 70% des 3 HAP ont disparu dès la première heure d'incubation pour atteindre un taux de disparition supérieur à 80% au bout de 48h. La disparition du PHE est apparue supérieure aux autres HAP étudiés au long de toute la cinétique (sauf pour le point de 6h).

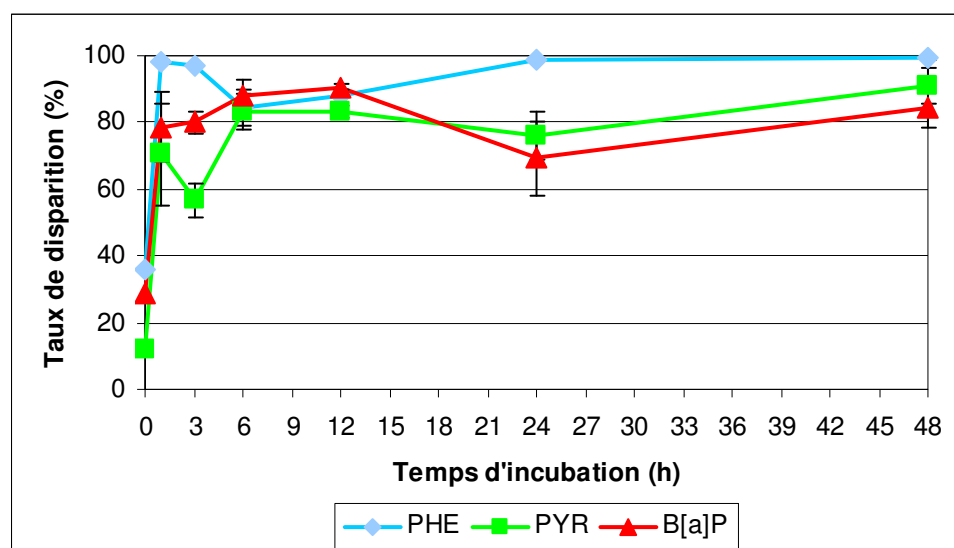


Figure 5 : Cinétiques de disparition *in sacco* des HAP de l'herbe (n=3)

Les cinétiques de disparition *in sacco* des alcanes étudiés mettent en évidence une cinétique de disparition similaire entre les composés (figure 6). Ainsi, la disparition semble progressive

(30% en moyenne à 1h) pour atteindre des niveaux proches de 60% pour les alcanes C<sub>29</sub>, C<sub>31</sub> et C<sub>33</sub> et d'environ 30% pour le C<sub>27</sub> à 48h.

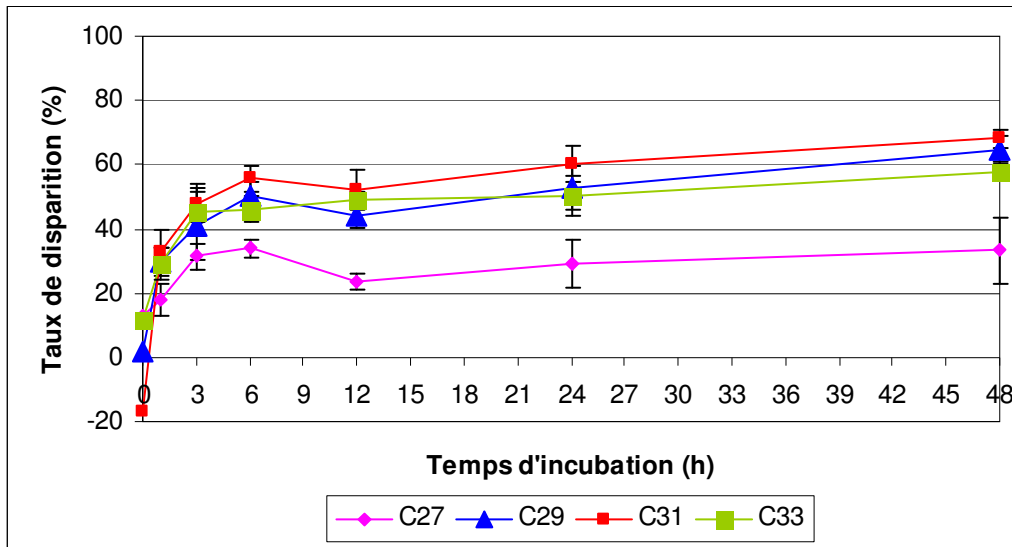


Figure 6 : Cinétiques de disparition *in sacco* d'alcanes cuticulaires (n=3)

Pour ce qui est de la MS de l'herbe, la disparition a été plus lente comparativement aux HAP et aux alcanes (figure 7). Le taux de disparition à 1h est d'environ le 20%. Ensuite, son évolution est linéaire sans dépasser le 70% à 48h.

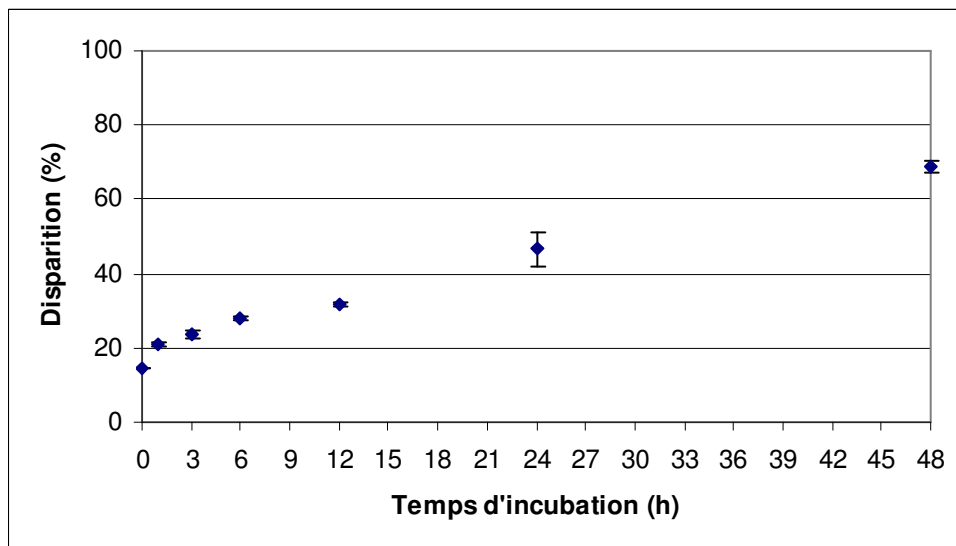


Figure 7 : Cinétique de disparition *in sacco* de la MS de l'herbe (n=3)

### 3.3. Modélisation et comparaison de la disparition des HAP, des alcanes et de la MS

La comparaison entre les cinétiques de disparition des 3 HAP, de l'hentriacontane (C<sub>31</sub>) et de la MS est présentée en figure 8. Pour ce qui est des alcanes, nous avons choisi de modéliser la dynamique de l'hentriacontane (C<sub>31</sub>) considéré comme l'alcane majoritaire selon la littérature (Mayes *et al.*, 1986 ; Maffei, 1996).

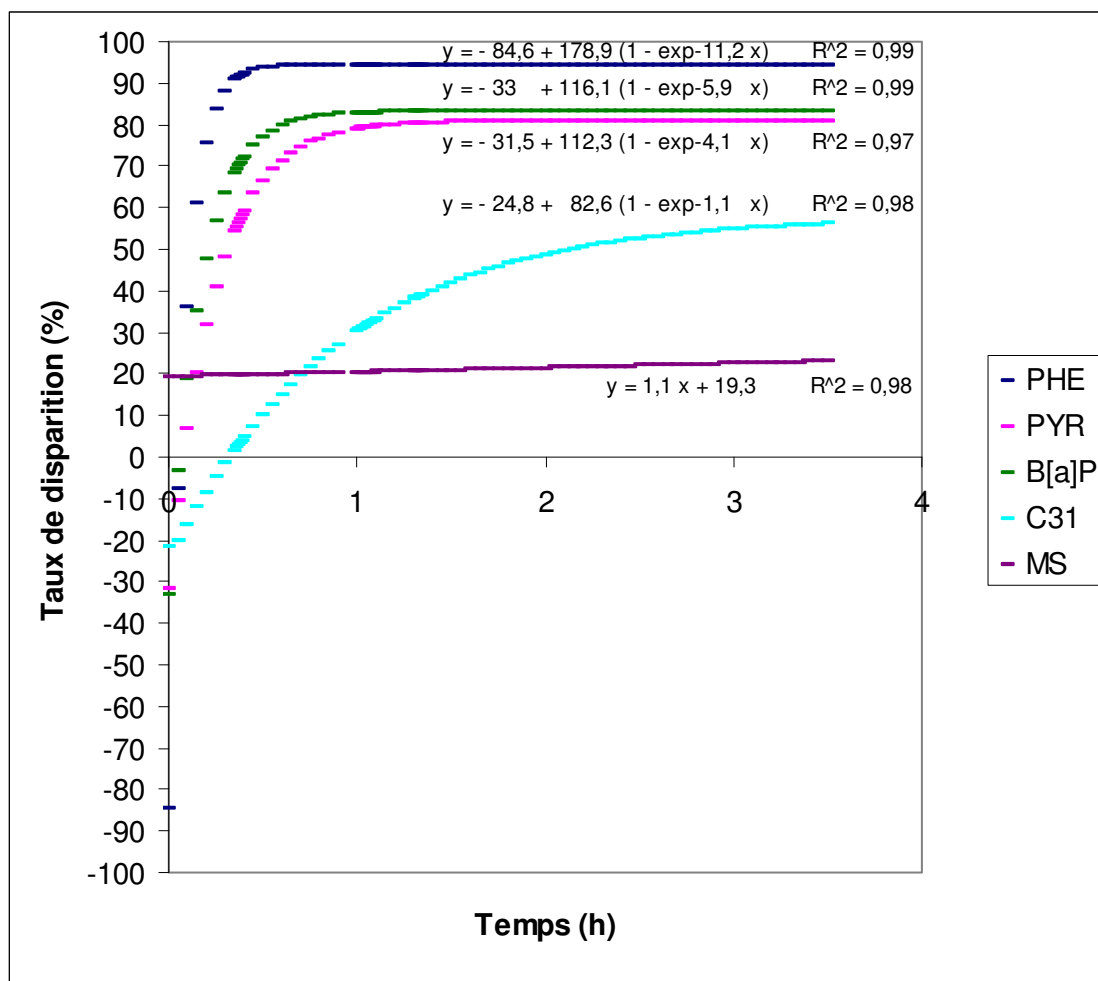


Figure 8 : Modèles de disparition *in sacco* dans le rumen des HAP, du C<sub>31</sub> et de la MS (n=3)

Le taux maximum de disparition « a+b » (asymptote) a été significativement différent entre le PHE et les autres deux HAP ( $p < 0,0002$ ). De ce fait, le PHE disparaît à hauteur de 91%, tandis que le B[a]P et le PYR disparaissent à hauteur de 80% et 77% respectivement. Les temps correspondant aux taux de disparition maximum ( $0,95(a+b)$ ) sont estimés à : 21 minutes (0,35h) pour le PHE, 36 minutes (0,60h) pour le B[a]P et 51 minutes (0,85h) pour le et PYR.

Le taux de disparition maximum pour le C<sub>31</sub> est atteint quant à lui à 183 minutes (3,05h), alors que pour la MS la disparition maximale n'est pas atteinte à 48h. Les valeurs au plateau du PYR et du B[a]P n'ont pas été significativement différentes entre elles. Contrairement, le taux maximum de disparition de l'hentriacontane a été significativement inférieure ( $p < 0,0001$ ).

#### **4. Discussion**

Les dynamiques de disparition des HAP peuvent s'expliquer par la différence des masses moléculaires de ces 3 molécules. En effet, la masse moléculaire est plus faible pour le PHE, et ce composé est celui qui disparaît le plus et le plus rapidement. Ce résultat suggère que l'adhérence du PHE aux feuilles soit moins forte que celle du PYR et du B[a]P. Le taux de disparition des 3 HAP a dépassé 70% dès la première heure d'incubation. Il révèle la rapidité avec laquelle les HAP sont détachés de l'herbe et susceptibles de passer dans la phase liquide du contenu ruminal.

L'ajustement de la disparition des alcanes au modèle de Ørskov et McDonald (1979) met en évidence une dynamique similaire entre la disparition des alcanes et celle des HAP, même si la disparition des alcanes est plus lente. Ainsi, la disparition maximale (plateau de la courbe modèle) du C<sub>31</sub> ne dépasse pas 55% après 3,05 h. Cela nous amène à formuler l'hypothèse selon laquelle la disparition du C<sub>31</sub> correspond à la dégradation de la cire épicuticulaire, plus facilement attaquable que la cire intracuticulaire par le jus de rumen.

En ce qui concerne la disparition de la MS, la droite modélisée indique une plus faible disparition de la MS par rapport à celle des HAP ou des alcanes. Ce résultat peut s'expliquer par la présence de lignine qui limite fortement la dégradation de la MS des graminées (Dewhurst *et al.*, 1995). Si l'on tient compte de la représentation générale des composants cuticulaires proposée par Kunst et Samuels (2003) (figure 9), et de l'hypothèse que les HAP sont déposés à la surface des feuilles, les dynamiques de disparition représentées sur la figure 8 peuvent s'expliquer aisément. En effet, les HAP disparaissent dès que les alcanes épicuticulaires commencent à être dégradés, et ils le font encore plus vite que les alcanes. Du fait de leur exposition au contenu ruminal, les alcanes seront à leur tour plus rapidement dégradés ou solubilisés que la MS dans sa globalité.



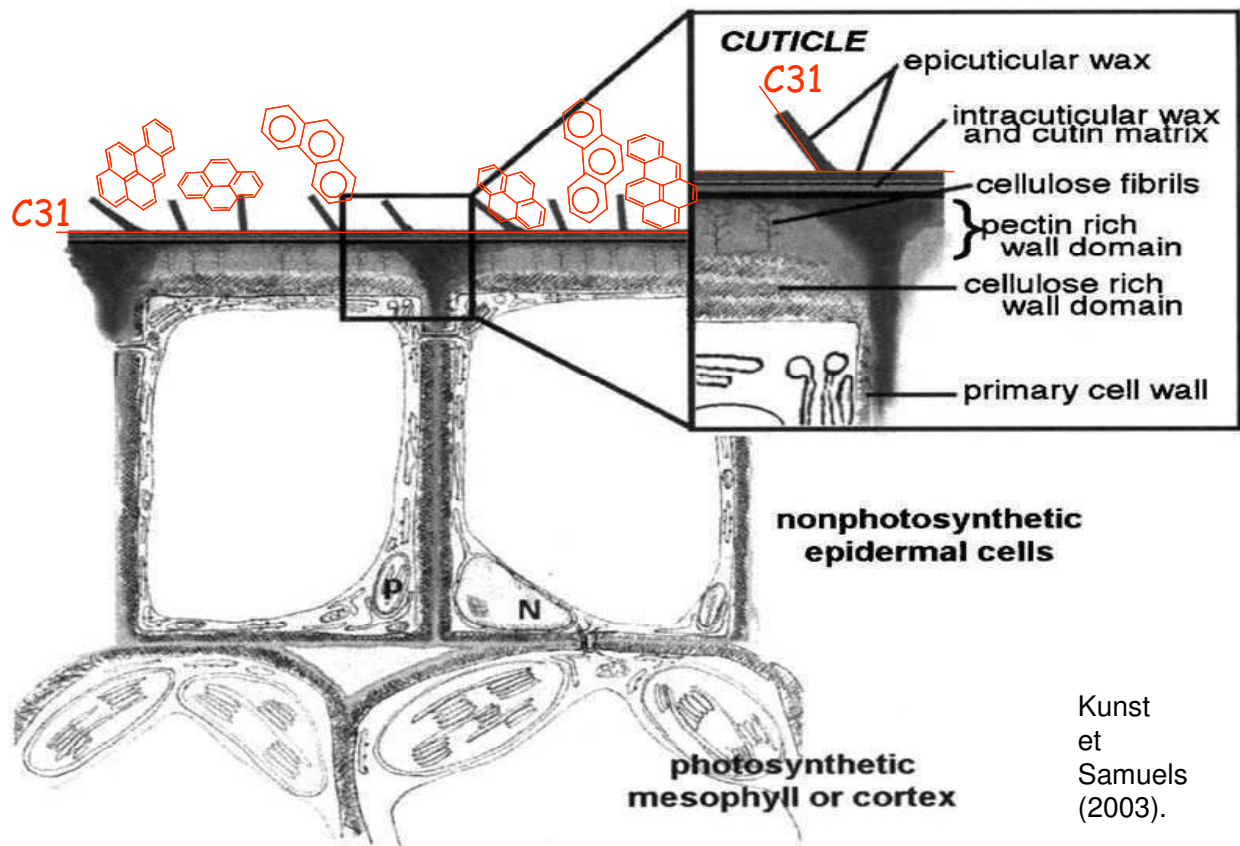


Figure 9 : Dépôt des HAP sur une feuille et localisation du C<sub>31</sub> dans la cuticule

## 5. Conclusions

Cette expérimentation *in sacco* a permis de mettre en évidence que les HAP ont, avec une vitesse accrue, une dynamique de disparition dans le rumen plus proche de celle des alcanes cuticulaires que de celle de la MS. Cela confirme ainsi l'hypothèse de l'adsorption des HAP sur la surface des feuilles et plus particulièrement sur les alcanes cuticulaires. L'essentiel des HAP (83% en moyenne des 3 HAP) est décroché de la MS de l'herbe. Il est possible que soient les particules de MS inférieures à 50  $\mu\text{m}$  (diamètre de la porosité des sachets nylon) qui contiennent la plupart des HAP, ce qui expliquerait aussi la forte disparition. Ce travail révèle aussi que les HAP de l'herbe sont susceptibles d'être absorbés dans le rumen. A partir de ce résultat, nous avons déterminé le transfert de HAP et métabolites du foin et du sol vers le lait chez les caprins.

## **CHAPITRE 2**

# **Transfert de HAP et métabolites du foin et du sol vers le lait chez la chèvre**

## 1. Introduction

La voie majeure d'exposition aux HAP des plantes est la voie atmosphérique. Elle permet un dépôt notamment sur les surfaces des feuilles à partir de la phase gazeuse (Wild *et al.*, 1992 ; Simonich et Hites, 1994 ; Hortsmann et McLachlan, 1998 ; Phillips, 1999). Quelques travaux ont mis en évidence que la localisation de HAP déposés sur les feuilles se fait surtout au niveau des cires cuticulaires (Bakker *et al.*, 2001 ; Wang *et al.*, 2004). Ainsi, une vache laitière pâturant à proximité d'une voie routière peut ingérer jusqu'à 2 mg de HAP par jour (somme des 16 HAP) *via* les fourrages (Müller *et al.*, 2001 ; Crépineau *et al.*, 2003) et il est établi que les POP peuvent être transférés vers le lait à partir de l'alimentation (West et Horton, 1976 ; Eisele, 1985 ; Travis et Arms, 1988 ; Fries et Paustenbach, 1990 ; McLachlan *et al.*, 1990 ; McLachlan, 1993 ; MacLachlan, 1994 ; Hietaniemi et Kumpulainen, 1995 ; Welsch-Pausch et McLachlan, 1998 ; McLachlan et Richter, 1998 ; Grova *et al.*, 2000 ; Grova *et al.*, 2005 ; Huwe et Smith, 2005).

Le sol peut quant à lui être beaucoup plus contaminé que l'herbe, avec des teneurs entre 2,7 et 18  $\mu\text{g/g}$  MS (Wild et Jones, 1995 ; Meharg *et al.*, 1998). Il a tendance à piéger les molécules hydrophobes au sein du complexe argilo-humique (Wild et Jones, 1992 ; Fries, 1987 ; Jones *et al.*, 1989). Les types de liaison des HAP au sol sont multiples. La force de ces liaisons varie de la simple adsorption à la liaison covalente (liaison forte). Ces liaisons covalentes associent la molécule et la matière humique du sol. Les liaisons deviennent ainsi résistantes à l'hydrolyse et aux dégradations microbiennes (Verstraete et Devlegher, 1996). Le dépôt de HAP sur l'herbe par resuspension des particules du sol a été aussi constaté (Sabijić *et al.*, 1990 ; Keymeulen *et al.*, 1991). L'ingestion de sol par les ruminants au pâturage est estimée entre 2 et 18% de la matière sèche quotidienne (Fries et Paustenbach, 1990 ; Wild et Jones, 1992 ; Fries, 1995). Un bovin peut ainsi ingérer une quantité moyenne estimée à 0,5 kg/animal/jour (Fries *et al.*, 1996). De ce fait, l'ingestion de sol peut mener jusqu'à un apport de plus de 50 mg de HAP par jour quand sa concentration avoisine 100  $\mu\text{g/g}$  MS (Bryselbout *et al.*, 2000).

Des travaux récents ont mis en évidence que les HAP pouvaient être transférés vers le lait sous la forme de molécules parents ou de leurs métabolites (Grova *et al.*, 2005 ; Lutz *et al.*, 2006). Ces auteurs ont par exemple identifié le 2-OH-PHE et le 3-OH-PHE comme les métabolites majeurs du PHE. Le 1-OH-PYR peut quant à lui servir de bioindicateur pour

l'ensemble des HAP grâce à son caractère ubiquiste (Jongeneelen, 2001). Enfin, le 3-OH B[a]P est un métabolite du B[a]P représentatif d'une exposition au B[a]P. Il est le métabolite monohydroxylé majoritaire du B[a]P dans les urines (Van de Wiel, 1993).

L'objectif de cette étude est de déterminer l'influence des matrices herbe et sol sur le transfert de 3 HAP (PHE, PYR et B[a]P) et de leurs métabolites majeurs (2-OH-PHE, 3-OH-PHE, 1-OH-PYR et 3-OH-B[a]P) vers le lait et les urines chez la chèvre. Nous formons l'hypothèse que la liaison des HAP avec la matière organique du sol est plus forte qu'avec le complexe cuticulaire des végétaux.

## **2. Matériel et Méthodes**

### **2.1. Animaux, schéma expérimental et alimentation**

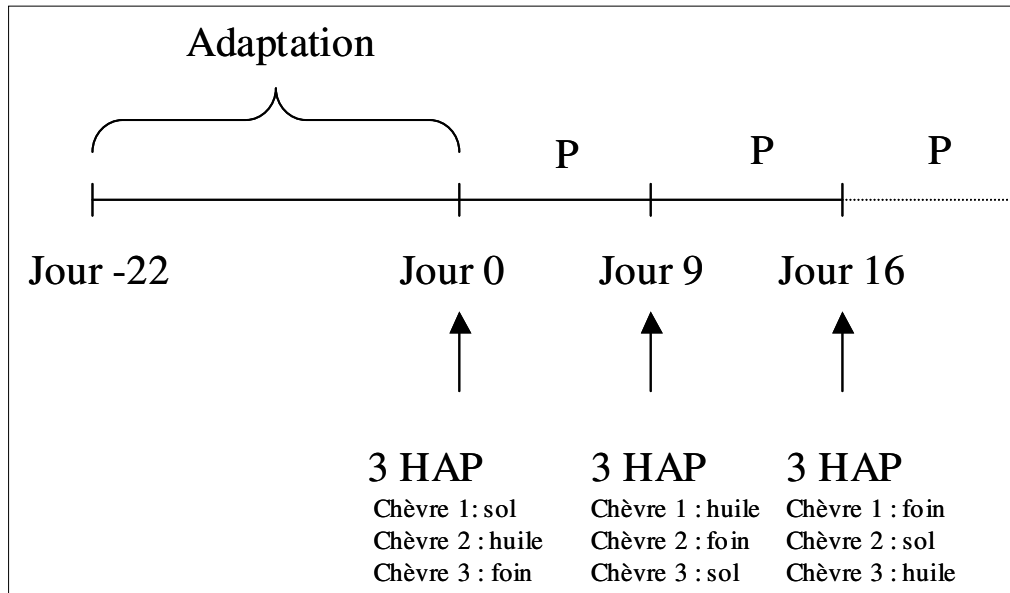
Une expérimentation a été mise en place avec 3 chèvres de race Alpine chamoisée en lactation d'environ 50 kg de poids vif et âgées de 2 ou 3 ans provenant du site expérimental « La Bouzule », à Laneuvelotte, de l'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires (ENSAIA). Une période d'adaptation de 22 jours des animaux aux locaux et aux conditions expérimentales a été nécessaire avant le début de l'expérimentation. Le protocole expérimental a été en accord avec les lignes directrices nationales et européennes (1986, N°: 86/609/CEE). Un apport de 50 mg de PHE, 50 mg de PYR et 50 mg de B[a]P en une seule dose a été effectuée à partir de 500 g de foin, 25 g de sol et 5 mL d'une solution d'huile (matrice considérée comme une matrice témoin dans cette étude). Cette dose doit permettre l'identification des métabolites dans le lait et les urines tout en restant dans des niveaux d'exposition plausibles.

Une procédure expérimentale en carré latin (3 matrices et 3 chèvres, voir Schéma 2) a été adoptée afin d'étudier l'effet matrice. Un intervalle d'au moins 1 semaine entre les apports a été respecté afin d'éviter que l'effet de l'une des matrices ne masque l'effet de la matrice suivante.

La ration journalière des chèvres était composée de 500 g de foin (foin contaminé en HAP les jours d'apport) et un mélange de concentré à base de maïs grain (500 g), de tourteau de soja (300 g), de pulpes de betterave (800 g) et de minéraux (20 g) afin de couvrir les besoins d'entretien et de production laitière des animaux (Jarrige, 1988). L'eau et les blocs de sel ont

été mis à leur disposition *ad libitum*. La traite mécanique a été pratiquée deux fois par jour (8h00 et 17h00).

Schéma 2 : Apport de HAP aux chèvres à partir des matrices contaminées



P : prélèvements de lait (0h, 9h, 24h, 33h, 48h, 57h) et d'urines (0h, 9h, 24h, 33h et 48h)

## 2.2. Contamination des matrices

### 2.2.1. Solution huileuse

La solution huileuse utilisée (huile de ricin polyéther) est le Cremophor EL (Fluka, Steinhem, Allemagne). Il s'agit d'une formulation généralement utilisée pour véhiculer de substances hydrophobes dans les études pharmacologiques (Gelderblom *et al.*, 2001). Cinquante mg de PHE, 50 mg de PYR et 50 mg de B[a]P ont été dissous dans 5 mL de Cremophor dans une bouteille en verre avec bouchon la veille de l'application. L'apport oral a été effectué à l'aide d'un seringue de 10 mL.

### 2.2.2. Foin

L'herbe utilisée dans cette expérimentation a été obtenue à partir de la pulvérisation décrite dans le chapitre 1 de cette thèse (*Festuca arundinacea* (40%), *Dactylis glomerata* (30%), *Arrhenatherum elatius* (20%) et *Lolium perenne* (10%)).

### **2.2.3. 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 l'ENSAIA 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 émietées 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 les plus grossiers.

La difficulté de la contamination artificielle réside 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 doit 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 cela a été préconisé par Liste et Alexander (2002). Pour intégrer en profondeur les HAP dans les agrégats de sol d'une façon réaliste (Le Masson, 2003), une première humidification du sol à 40% de sa capacité au champ a été effectuée avant de la contamination. Finalement, la capacité au champ a été ajustée à 80% en ajoutant de l'eau.

Quatre vingt trois mg de chaque HAP ont été dissous dans 50 mL d'acétonitrile et ajoutés dans 6 barquettes en aluminium de 25 g de sol chacune. Des quantités de sol plus élevées (50g) peuvent être ingérées par des petits ruminants (Assimakopoulos *et al.*, 1995). La quantité de HAP ajoutée au sol a été abondée de 40% en prévision de possibles pertes (Lutz, 2006). La maturation du sol a été réalisée à température ambiante pendant 4 semaines (Kottler et Alexander, 2001). La volatilisation et la photodégradation ont été limitées par une couverture de papier aluminium. A l'issue de la période de maturation, les 25 g de sol ont été divisés en 8 petites boulettes emballées avec de la ouate pure de cellulose (Tork, Allemagne). Les boulettes de sol ont été congelées à -20°C avant utilisation. Ce stockage a permis une conservation des HAP dans le sol sans qu'ils ne soient altérés (Rost *et al.*, 2002). Les boulettes ont été décongelées la veille de l'apport oral.

### **2.3. Echantillonnage et traitements**

La détermination de la concentration des 3 HAP a été effectuée dans le concentré et le foin non contaminés apportés pendant la période d'adaptation. A la fin de la période d'adaptation (J0), avant l'apport des HAP, 2 échantillons de lait et d'urines ont été prélevés sur chaque animal afin de déterminer la concentration de base en HAP avant traitement. Les prélèvements de lait ont été effectués à 9h, 24h, 33h, 48h et 57h après chaque apport de HAP. Les prélèvements d'urine ont été effectués à 9h, 24h, 33h et 48h à partir d'une sonde urinaire (Folatex, Porgès, Le Plessis Robinsons Cedex, France) implantée la veille de chaque apport de HAP. Les aliquotes (20 mL) ont été identifiées et congelées à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **2.4. Analyses**

Toutes les analyses ont été effectués en GC-MS au LABERCA (LABoratoire d'Etude des Résidus et Contaminants dans les Aliments, Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes). L'ajout d'étalons internes a permis de s'affranchir des pertes dues à l'extraction.

#### **2.4.1. Détermination des HAP des matrices cremophor, foin et sol**

La détermination de HAP dans les matrices utilisées comporte les trois étapes suivantes : l'extraction, la purification et quantification. L'extraction a été réalisée sur une prise d'essai d'1 g sur laquelle ont été ajoutés 50 ng de Phe d10, Pyr d10 et Perylène d12 comme standards internes. Un mélange de 40 mL cyclohexane/acétate d'éthyle (50/50, v/v) a été ajouté (sauf pour le cremophor) juste avant de pratiquer une agitation mécanique pendant 30 minutes. Une centrifugation à 4000 rpm pendant 30 minutes a suivi l'agitation mécanique ; le surnageant a été transféré dans un ballon de 250 mL en vue d'une évaporation rotative à température ambiante. Suite à cette évaporation les HAP ont été repris avec 6 mL de cyclohexane. Quant au cremophor, une dissolution avec du cyclohexane a été effectuée (qsp. 6 mL).

La purification a été obtenue avec des colonnes SPE Envi Chrom-P (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France), conditionnées avec 5 mL d'eau distillée, 5 mL de méthanol et puis 5 mL de cyclohexane. Après le passage des échantillons, les colonnes ont été lavées avec 6 mL de cyclohexane et les HAP ont été récupérés avec un mélange de 12 mL de cyclohexane/acétate (50/50, v/v). Cette élution a été évaporée à sec sous flux d'azote pour être

ensuite transférée dans des vials contenant 50 ng de CHRY d12 (étalon externe). Une nouvelle évaporation a sec a été effectuée avant la reprise par 100  $\mu$ L de toluène.

Les dosages ont été réalisés par l'injection de 2  $\mu$ L dans un chromatographe en phase gazeuse (Hewlett-Packard 6890, Palo Alto, CA, USA) couplée à un détecteur de spectrométrie de masse (quadropole HP-5973, Agilent Technologies, Palo-Alto, USA). L'injecteur split/splitless a été maintenu à 250°C, la durée du mode splitless étant de 1,5 min et le volume injecté de 2  $\mu$ L. La colonne utilisée pour la séparation des HAP comme des métabolites a été une OV-1 (Ohio-Valley) type (30 m x 0.25 mm I.D., épaisseur du film: 0,25  $\mu$ m). Les paramètres du GC appliqués sur la colonne ont été les suivants : 110°C (4,5 min), 10°C min<sup>-1</sup> jusqu'à 160°C, 5°C min<sup>-1</sup> jusqu'à 300°C (10 min), puis 20°C min<sup>-1</sup> jusqu'à 320°C (2 min) pour les HAP et leurs métabolites. Les conditions du spectromètre de masse en mode SIM ont été les suivantes :

0-10 min : front de solvant

10-13 min : Ions 152, 160, 176, 178 et 188 (dwell time : 70 ms)

13-15 min : Ions 101, 106, 200, 202, 208 et 212 (dwell time : 70 ms)

15-17 min : Ions 113, 226, 228 et 240 (dwell time : 100 ms)

17-26 min : Ions 126, 250, 252, 253 et 264 (dwell time : 70 ms)

#### **2.4.2 Détermination des HAP et des métabolites dans le lait**

La détermination des HAP et des métabolites du lait a été effectuée selon les étapes suivantes : déconjugaison, extraction liquide-liquide, purification pour éliminer les lipides, séparation des HAP des métabolites, saponification de la phase contenant les HAP et extraction liquide.

Pour mener à bien l'analyse, à 10 mL de lait ont été ajoutés 75  $\mu$ L des étalons internes à raison d'1  $\mu$ g/mL (d10-PHE, d10-PYR, d12-pérylène) et 100  $\mu$ L d'un mélange de standards internes des métabolites (2-OH-FLUO, 6-OH-CHRY) à raison d'1 ng/mL. Cent cinquante  $\mu$ L de suc d'*Helix Pomatia* (Biosepra, Villeneuve la Garenne, France; préparation contenant 25 unités de  $\beta$ -glucuronidase-arylsulfatase/ $\mu$ L) et 100  $\mu$ L d'acide acétique glacial sont additionnés de façon à hydrolyser les métabolites conjugués à l'acide glucuronide et aux



sulfates. Des échantillons supplémentés (ajouts) ainsi que des blancs ont été préparés de la même façon. En plus des étalons internes cités ci-dessus, les molécules recherchées sont additionnées dans les ajouts : FLUO, PHE, PYR, B[a]P, 2-OH-FLUO, 3-OH-PHE, 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 a été agité pendant 30 minutes avec 20 mL d'acétate d'éthyle/cyclohexane (50:50, v/v). Après agitation, la solution a été centrifugée à 4500 rpm pendant 30 min. Le surnageant constitué des solvants contenant les molécules mères et les métabolites a été évaporé à sec sous flux d'azote. Récupérés avec 6 mL de cyclohexane, les composés sont purifiés sur une colonne Envi-ChromP (Styrene-divinylbenzene copolymer resin, Envi Chrom P: 0,5 g) conditionnée successivement avec 5 mL d'eau, 5 mL de méthanol et 5 mL de cyclohexane. Après passage de l'échantillon sur la colonne, l'ajout de 6 mL de cyclohexane (2x6 mL) 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) ont été ajoutés dans le tube et agités 30 secondes. Les deux phases ont ensuite été séparées par centrifugation (3000 rpm, 5 min). La phase méthanol/eau est lavée avec 2 mL de cyclohexane et centrifugée à nouveau (3000 rpm, 5 min) ; le surnageant est ajouté à la première phase de cyclohexane.

La phase cyclohexane contenant les HAP a été évaporée puis saponifiée avec 5 mL de KOH 10% pendant 80 minutes 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 (5000 g, 5 min, 10°C). Le surnageant a été évaporé, et 40 µL d'étalon externe (d-12 CHRY) ont été ajoutés. Le mélange a été transféré dans des vials d'injection, évaporé à sec sous flux d'azote et repris dans 40 µL de toluène.

Les fractions méthanol/eau mises en commun ont été évaporées puis lavées avec 4 mL d'un mélange acétate d'éthyle/eau (50 :50, v/v), vortexées et centrifugées (3000 rpm, 5 min). Le surnageant a été évaporé, complété avec 40 µL d'étalon externe (chrysene d12 à raison d'1 ng/µL), transféré dans un vial d'injection et repris dans 20 µL de N-méthyl-N-(triméthylsilyl) trifluoroacétamide (MSTFA, Fluka, Buchs, Switzerland) pour dérivation. Finalement, 2 µL ont été injectés en GC-MS. Les conditions du spectromètre de masse pour les molécules natives ont été les mêmes que celles détaillées dans le sous-chapitre 2.4.1. Les conditions pour les métabolites ont été les suivantes :

0-11 min : front de solvant

11-15 min : Ions 235, 239, 251, 254, 265 et 266

15-26 min : Ions 239, 240, 267, 275, 290, 301, 316, 325 et 340

L'injection des HAP et des métabolites extraits du lait a été réalisée séparément, leur solvant d'injection étant différent. Toutes les analyses ont été réalisées en mode Electron Ionisation (70 eV) et mode d'acquisition SIM (Single Ion Monitoring). La composition des mélanges standards pour les HAP et les métabolites a été la suivante : 50  $\mu\text{L}$  d'un mélange HAP ou d'un mélange de métabolites (1 ng/ $\mu\text{L}$ ), 50  $\mu\text{L}$  de standard interne de HAP (1ng/ $\mu\text{L}$ ) et 40  $\mu\text{L}$  de CHRY d12 (1 ng/ $\mu\text{L}$ ). Les limites de détection et de quantification en GC-MS des HAP dans le lait sont présentées dans le tableau 9. Les limites de détection des différentes matrices sont basées sur un signal/bruit de 3/1, et les limites de quantification sur un signal/bruit de 10/1.

Tableau 9 : Limites de détection et quantification (GC-MS) des HAP dans le lait ( $\mu\text{g/L}$ )

	Limite de détection	Limite de quantification
PHE	0,74	2,78
PYR	0,14	0,48
B[a]P	7,29	24,00
2-OH-PHE	0,08	0,25
3-OH-PHE	0,04	0,16
1-OH-PYR	0,04	0,13
3-OH-B[a]PYR	0,07	0,23

### 2.4.3. Détermination de HAP et de métabolites dans les urines

La détermination des HAP et des métabolites des urines a été effectuée suivant les mêmes étapes que pour le lait à l'exception de la saponification. Ainsi, pour réaliser l'extraction, les urines ont été décongelées à 40°C dans une étuve. Sur 5 mL d'échantillon, une acidification a été effectuée avec 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{CH}_3\text{COOH}$  purex. Soixante quinze mL de suc d'*Helix pomatia* (BioSeptra) ont été ajoutés juste avant de réaliser la déconjugaison à 39°C pendant 12 h. Les standards internes ajoutés ont été les suivants : 75  $\mu\text{L}$  d'un mélange HAP (PHE d10, PYR d10, pérylène d12 à raison d'1 ng/ $\mu\text{L}$  chacun) et 200  $\mu\text{L}$  d'un mélange de métabolites (2-OH-FLUO, 6-OH-CHRY à raison de 1 ng/ $\mu\text{L}$  chacun). De suite 20 mL d'acétate d'éthyle et 20

mL de cyclohexane ont été ajoutés pour effectuer une agitation horizontale pendant 30 minutes. Les tubes ont été centrifugés à 4500 rpm pendant 30 minutes et puis le surnageant a été transféré dans un ballon de 250 mL et une évaporation rotative a été effectuée (5 min., température ambiante). Les résidus ont été récupérés avec 6 mL de cyclohexane. La purification a été réalisée dans des cartouches ENVI CHROM P, conditionnées au préalable avec 5 mL d'eau ultrapure, 5 mL de méthanol et 5 mL de cyclohexane. Ensuite les HAP et les métabolites sont récupérés avec 12 mL d'un mélange cyclohexane : acétate d'éthyle (50:50) préparé extemporanément. Les contenus des tubes ont été évaporés à sec avec un flux d'azote. Ensuite un ajout de 200 µL de toluène a été fait avec 40 µL de CHRY d12 comme étalon externe à raison d'1 ng/µL pour être transférés dans des vials et évaporés à sec encore sous flux d'azote. Finalement 20 µL de MSTFA ont été introduits dans les vials pour faire une dérivation à 60°C pendant 40 minutes avant d'être injecté en GC-MS dans les mêmes conditions que pour le lait.

Le standard a été composé de 50 µL de mélange HAP (1 ng/µL), 50µL de mélange standard interne HAP (PHE d10, PYR d10 et Pérylène d12) à raison d'1ng/µL, 50µL de mélange de métabolites (1ng/µL), 50µl de mélange standard interne métabolites (2-OH-FLUO et 6-OH-CHRY) à raison d'1 ng/µL et 40µL de CHRY d12 (étalon externe).

Les limites de détection et de quantification en GC-MS des HAP dans les urines ont été déterminées et elles sont présentées dans le tableau 10. Les limites de détection des différentes matrices sont basées sur un signal/bruit de 3/1, et les limites de quantification sur un signal/bruit de 10/1. Toutes les molécules étant détectées, les gammes d'étalonnage pour le PHE et le B[a]P n'ont pas été exploitables. De fait, du PHE a été initialement trouvé dans l'urine, mais le bruit de fond très important empêche la valorisation des données. Pour le B[a]P, le bruit de fond a été aussi très important et il y a eu des coélutions au niveau de ce pic.

Tableau 10 : Limites de détection et quantification en GC-MS des HAP dans les urines (µg/L)

	Limite de détection	Limite de quantification
PHE	0,23	0,77
PYR	0,22	0,75
B[a]P	0,12	0,41
2-OH-PHE	1,56	5,2
3-OH-PHE	1,54	5,15
1-OH-PYR	0,72	2,38
3-OH-B[a]P	0,48	1,60

## 2.5. Calculs et gestion des données

Les concentrations du PHE, PYR, B[a]P et leurs métabolites dans le lait et les urines ont été déterminées en vue de décrire les cinétiques d'excrétion. Pour chacune des matrices, les valeurs moyennes des 3 chèvres ont été comparées. Les facteurs de transfert vers les deux matrices biologiques ont aussi été établis et comparés selon les matrices d'apport. Ils ont été établis par le cumul de la quantité totale excrétée de chaque polluant entre 0h-24h, 0h-48h et 0h-57h pour le lait et entre 0h-9h, 0h-24h et 0h-48h pour les urines. La formule de calcul du facteur de transfert est la suivante :

$$FT = \frac{L * l}{M * m} * 100$$

FT : Facteur de transfert (%)

L : quantité de lait ou urines produite (g)

l : concentration du polluant dans le lait ou l'urine ( $\mu\text{g/L}$ )

M : ingestion de matrice (g)

m : concentration du polluant dans la matrice étudiée ( $\mu\text{g/L}$ )

En ce qui concerne les métabolites, les FT ont été établis de la même façon à partir de la molécule mère à l'origine des métabolites recherchés. Ainsi, le FT du 2-OH-PHE et du 3-OH-PHE est calculé à partir du PHE ingéré, le FT du 1-OH-PYR est calculé à partir du PYR ingéré et le FT du 3-OH-B[a]P est calculé à partir du B[a]P.

Une analyse de variance (ANOVA) a été effectuée sur les FT de chacune des molécules. La procédure MIXED du logiciel SAS (V. 9.1, 2004) et l'option de mesures répétées avec 3 facteurs contrôlés ont été utilisées. Les facteurs étudiés ont été la matrice d'apport, le temps et leur interaction. Les traitements ont été comparés sur la base des moyennes ajustées par le test de comparaison multiple de Tukey-Kramer et le seuil de signification du 5% a été retenu.

## 3. Résultats

### 3.1. Contamination en HAP des matrices cremophor, foin et sol. Ingestion de HAP

La contamination des matrices cremophor, foin et sol a été effectuée afin de comparer le transfert de 50 mg de HAP ingérés sous la forme de foin, de sol ou de cremophor. Les niveaux

de contamination réellement obtenus sont détaillés dans le tableau suivant : ils indiquent que le mode de contamination mis en oeuvre a été satisfaisant.

Tableau 11 : Concentrations de HAP dans les matrices étudiées suite à leur contamination

HAP	Matrice	Concentration attendue (mg/g)	Concentration obtenue (mg/g)
PHE	Cremophor	11	11
	Foin	0,1	0,12
	Sol	2	1,95
PYR	Cremophor	11	11
	Foin	0,1	0,14
	Sol	2	1,71
B[a]P	Cremophor	11	11
	Foin	0,1	0,08
	Sol	2	1,99

Les quantités moyennes de HAP ingérées par les animaux sous la forme de cremophor, de foin et de sol sont présentées dans le tableau 12.

Tableau 12 : Quantités moyennes de HAP ingérés par les chèvres à partir des matrices contaminées

HAP	PHE (mg)	PYR (mg)	B[a]P (mg)
Matrice			
Cremophor	50	50	50
Foin	24	28	17
Sol	49	43	50

Les chèvres 1, 2 et 3 ont ingéré respectivement 102, 319 et 192 g de foin tout en ayant 500 g qui ont été mis à leur disposition. Cette situation explique la faible quantité de HAP ingérés *via* cette matrice (tableau 12). Ainsi, les quantités moyennes ingérées de HAP à partir du foin ont été environ deux fois moindres que les quantités ingérées à partir du chremophor ou du sol

(ratio d'ingestion foin/cremophor : 0,48 ; 0,56 et 0,34 pour ; ratio d'ingestion sol/cremophor : 0,98 ; 0,86 et 1 pour le PHE, PYR et B[a]P respectivement).

### 3.2. Excrétion de HAP et métabolites dans le lait

Le PHE et le B[a]P n'ont pas été détectés dans le lait au-delà des seuils de détection (0,74 et 7,29  $\mu\text{g/L}$  respectivement). Les cinétiques d'excrétion du PYR dans le lait sont présentées dans la figure 10 et celles des 3 métabolites sont présentées dans les figures 11 à 13. Il peut être observé que l'excrétion du PYR se produit principalement durant les premières 24h après l'administration des matrices contaminées, avec un pic dès la 9<sup>ème</sup> heure (figure 10). L'excrétion des métabolites semble quant à elle décalée par rapport à celle du PYR, avec des niveaux maximums situés entre 24h et 48h. Le profil d'excrétion du PYR et des métabolites a été similaire pour les trois matrices, même si les niveaux ont été sensiblement différents. La concentration des métabolites apparaît généralement bien supérieure à celle du PYR : le 1-OH-PYR a été le métabolite présentant la concentration la plus élevée (450  $\mu\text{g/L}$  ; figure 11). Concernant les métabolites du PHE, la concentration maximale pour le 3-OH-PHE a été mesurée 24h après l'apport des matrices tandis que la concentration maximale du 2-OH-phénanthrène a été observée 33h après l'apport. Les profils d'excrétion de ces deux métabolites (graphes 12 et 13) ont été très similaires entre les matrices cremophor, foin et sol. En ce qui concerne le 3-OH-B[a]P, les concentrations obtenues ont été inférieures à la limite de quantification (0,23  $\mu\text{g/L}$ ).

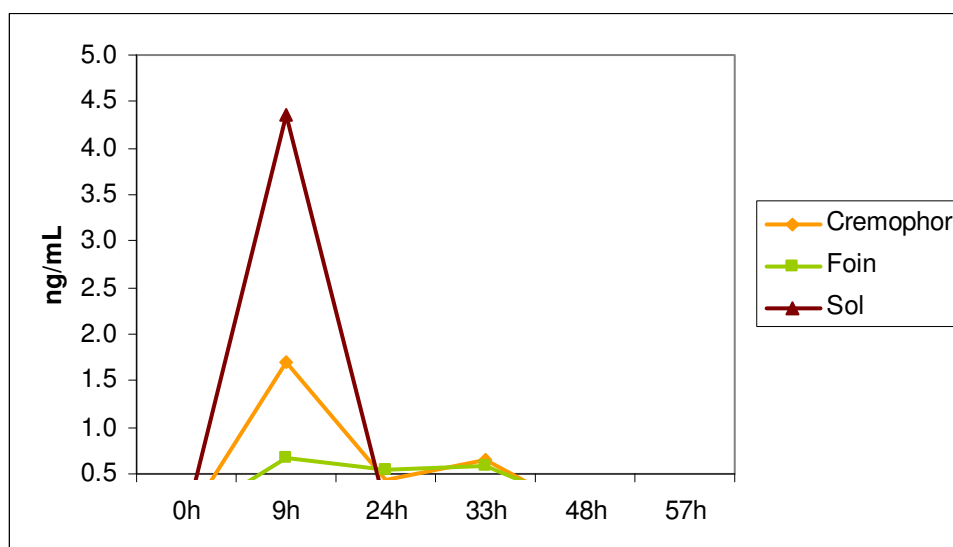


Figure 10 : Cinétiques d'excrétion du **PYR** dans le lait suite à l'ingestion des matrices étudiées.

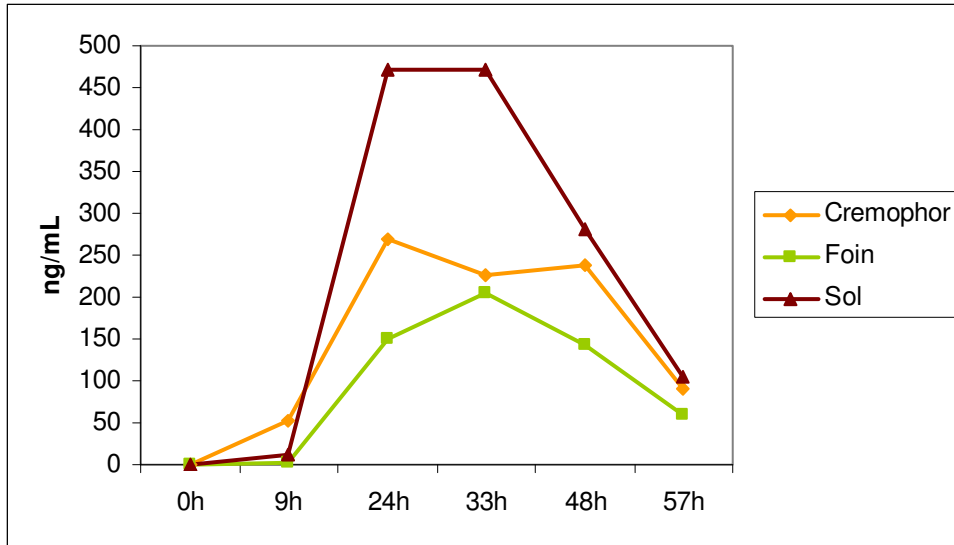


Figure 11 : Cinétiques d'excrétion du **1-OH-PYR** dans le lait suite à l'ingestion des matrices étudiées.

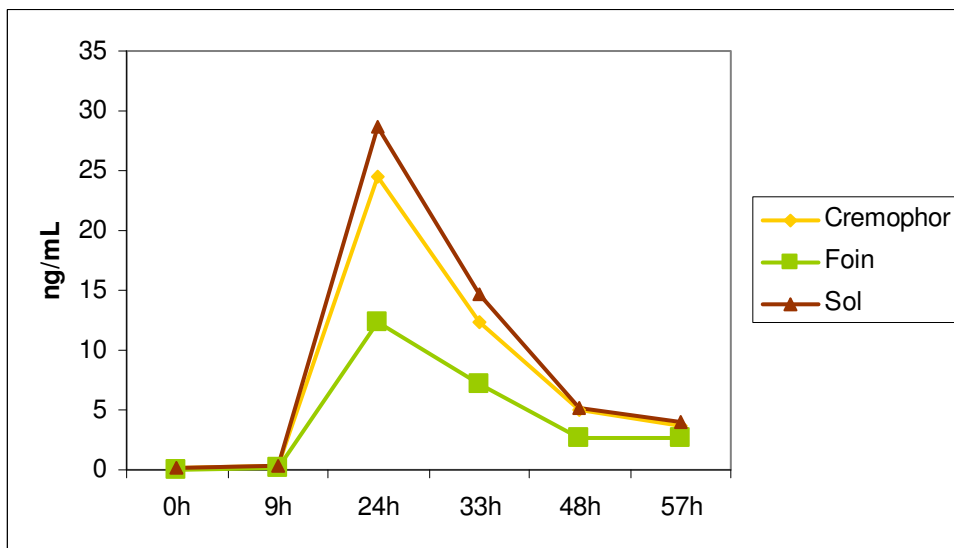


Figure 12 : Cinétiques d'excrétion du **3-OH-PHE** dans le lait suite à l'ingestion des matrices étudiées.

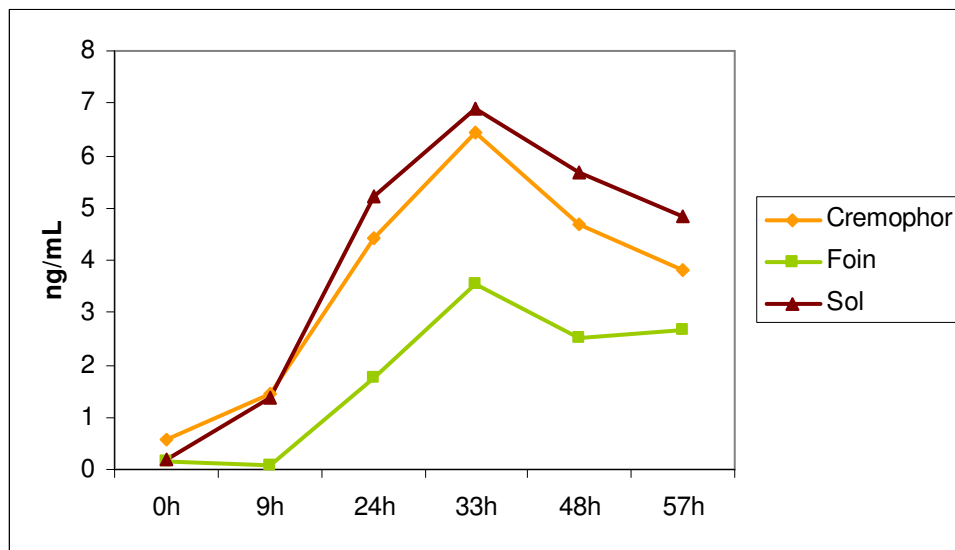


Figure 13 : Cinétiques d'excrétion du 2-OH-PHE dans le lait suite à l'ingestion des matrices étudiées.

### 3.3. Excrétion de HAP et de métabolites dans les urines

L'excrétion du PYR dans les urines est détectée dès 9h avec des niveaux de concentration qui n'ont pas dépassé les 14  $\mu\text{g/L}$ . Comme cela a été observé pour le lait, le 1-OH-PYR a été le métabolite majeur des urines pour l'ensemble des trois matrices (figure 14). La concentration de 1-OH-PYR a atteint 8000 ng/mL 9h après l'ingestion de sol contaminé. Les profils des autres métabolites ont présenté des dynamiques analogues. Le 3-OH-PHE a été retrouvé à des concentrations proches de 2000 ng/mL 9h après l'ingestion de sol (figure 15). Le 3-OH-B[a]P a été détecté à une concentration inférieure à 4,5 ng/mL. Ainsi, le passage de HAP et des métabolites semble se faire plus rapidement vers les urines comparativement au lait.



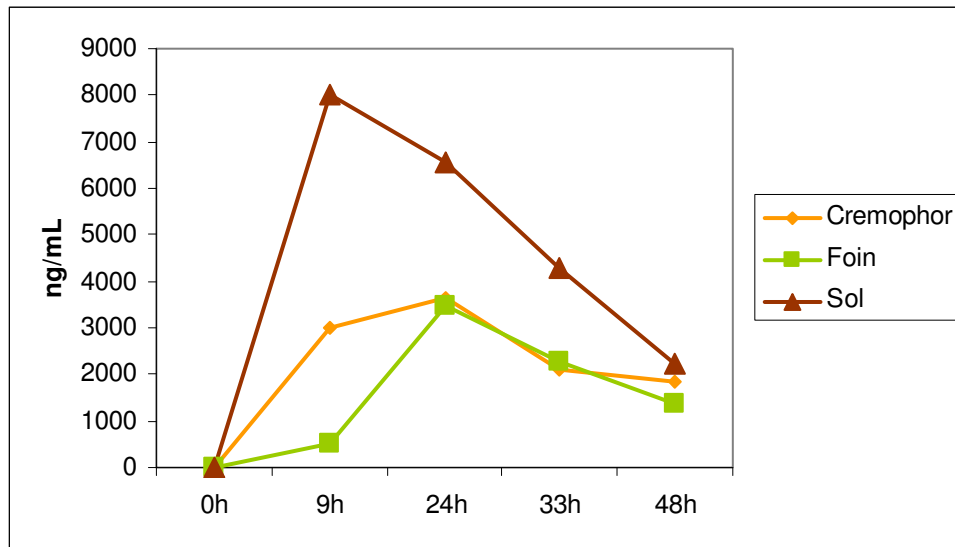


Figure 14 : Cinétiques d'excrétion du **1-OH-PYR** dans les urines suite à l'ingestion des matrices étudiées.

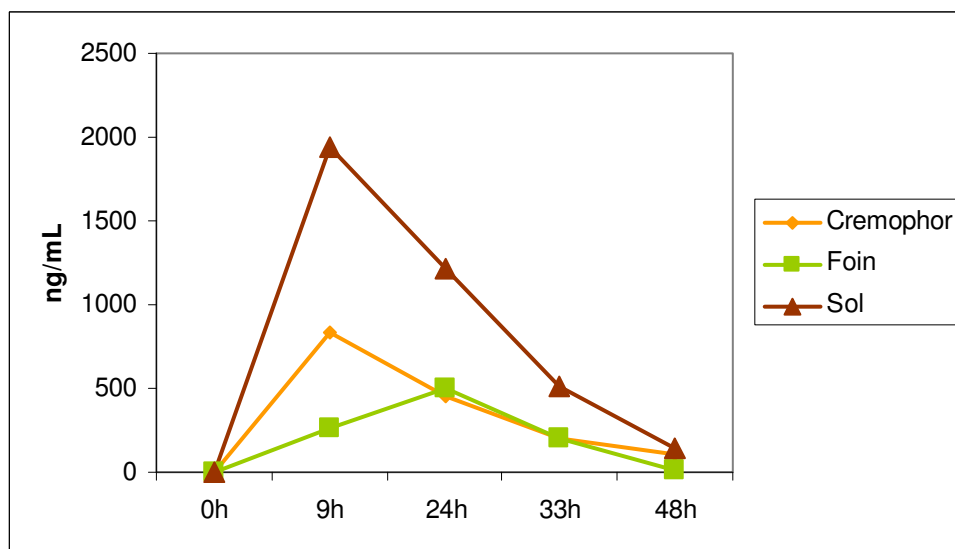


Figure 15 : Cinétiques d'excrétion du **3-OH-PHE** dans les urines suite à l'ingestion des matrices étudiées.

### 3.4. Transfert des molécules étudiées vers le lait et les urines

Les tableaux 13 et 14 indiquent les facteurs de transfert (FT, %) des trois HAP et de leurs métabolites des différentes matrices vers le lait et les urines. Pour le lait, les FT obtenus ont été très faibles pour toutes les molécules parents. Le transfert des métabolites ont été significativement plus élevés ( $p < 0,0001$ ) que le transfert des molécules parents, à l'exception

du 3-OH-B[a]P. Des niveaux avoisinant 1,8% ont été trouvés pour le 1-OH-PYR (tableau 13). Les niveaux de transfert de 1-OH-PYR ont été significativement supérieurs (presque dix fois supérieurs) aux taux de transfert des autres métabolites. Aucun effet matrice n'a été observé pour le transfert du 1-OH-PYR (molécule la plus transférée) vers le lait (ETR=1,6).

Tableau 13 : Facteurs de transfert (%) cumulés dans le lait selon la matrice d'apport

HAP	Matrice	0-24h	0-48h	0-57h
Phe	cremophor	0,000	0,001	0,003
	foin	0,000	0,002	0,005
	sol	0,001	0,003	0,004
Pyr	cremophor	0,002	0,003	0,003
	foin	0,004	0,006	0,006
	sol	0,008	0,008	0,009
B(a)Pyr	cremophor	0,000	0,000	0,000
	foin	0,000	0,001	0,001
	sol	0,003	0,003	0,003
Métabolite	Matrice	0-24h	0-48h	0-57h
2-OH-Phe	cremophor	0,007	0,019 <sub>B</sub>	0,023
	foin	0,010	0,029 <sub>A</sub>	0,035
	sol	0,014	0,036 <sub>A</sub>	0,041
3-OH-Phe	cremophor	0,032 <sub>B</sub>	0,049	0,052
	foin	0,068 <sub>A</sub>	0,097	0,102
	sol	0,061 <sub>A</sub>	0,092	0,097
1-OH-Pyr	cremophor	0,299	0,856	0,935
	foin	0,719	1,754	1,853
	sol	0,419	1,610	1,740
3-OH-B(a)Pyr	cremophor	0,001	0,001	0,001
	foin	0,001	0,002	0,002
	sol	0,001	0,003	0,003

A,B : dans une même colonne, des moyennes avec lettres distinctes indiquent une différence significative ( $p \leq 0,05$ ) entre matrices

Comme cela a été observé dans le lait, l'excrétion des molécules parents dans l'urine a été extrêmement faible (valeurs inférieures à 0,06 %). Pour ce qui est des métabolites, le 1-OH-PYR a été la molécule la plus transférée (33%). Des différences significatives ont été notées entre les matrices avec  $FT_{sol} > FT_{foin} = FT_{cremophor}$ . Le transfert de 1-OH-PYR a été similaire entre le cremophor et le foin pour les trois périodes étudiées. C'est pour la matrice sol que le transfert a été le plus important. De la même manière, les niveaux d'excrétion du 3-OH-PHE et du 2-OH-PHE ont été significativement supérieurs pour la matrice sol comparativement

aux matrices foin et cremophor. Les FT trouvés pour le 3-OH-B[a]P ont été très faibles (<0,06%) et de même niveau pour les trois matrices étudiées.

Des différences significatives ont aussi été observées ( $p < 0,05$ ) entre les 3 périodes de transfert étudiées (0-9h, 0-24h, 0-48h). Ce résultat suggère que le transfert du 1-OH-PYR n'est pas achevé à 48h. Aucune différence significative n'a été observée entre le transfert cumulé à 24h et 48h, pourtant le plateau du transfert cumulé du 3-OH-PHE est atteint dans les premières 24h.

Tableau 14 : Facteurs de transfert (%) cumulés des métabolites dans les urines selon la matrice d'apport

		0-9h	0-24h	0-48h
1-OH-Pyr	cremophor	<sup>b</sup> 2,8	<sup>a</sup> 12,5 <sub>AB</sub>	<sup>a</sup> 19,2 <sub>B</sub>
	foin	<sup>b</sup> 1,2	<sup>ab</sup> 6,9 <sub>B</sub>	<sup>a</sup> 16,0 <sub>B</sub>
	sol	<sup>c</sup> 8,1	<sup>b</sup> 22,4 <sub>A</sub>	<sup>a</sup> 32,8 <sub>A</sub>
3-OH-Phe	cremophor	<sup>b</sup> 0,8	<sup>a</sup> 2,0 <sub>B</sub>	<sup>a</sup> 2,5 <sub>B</sub>
	foin	0,7	1,7 <sub>B</sub>	2,0 <sub>B</sub>
	sol	<sup>b</sup> 1,7	<sup>ab</sup> 4,1 <sub>A</sub>	<sup>a</sup> 5,0 <sub>A</sub>
2-OH-Phe	cremophor	0,2 <sub>B</sub>	0,3 <sub>B</sub>	0,5 <sub>B</sub>
	foin	0,1 <sub>B</sub>	0,3 <sub>B</sub>	0,4 <sub>B</sub>
	sol	<sup>c</sup> 0,5 <sub>A</sub>	<sup>b</sup> 0,9 <sub>A</sub>	<sup>a</sup> 1,2 <sub>A</sub>

a,b,c : dans une même ligne, des moyennes distinctes indiquent une différence significative ( $p \leq 0,05$ ) entre périodes de temps. A,B : dans une même colonne, des moyennes avec lettres distinctes indiquent une différence significative ( $p \leq 0,05$ ) entre matrices.

## 4. Discussion

### 4.1. Dynamique des excrétiens

Les cinétiques d'excrétion des HAP et des métabolites dans le lait nous ont permis de constater que les concentrations en métabolites sont beaucoup plus importantes que celles des molécules natives (jusqu'à 500 fois pour le 1-OH-PYR). Selon Grova (2003), les métabolites formés, plus solubles que leurs composés parents, présenteraient une affinité plus grande à passer la barrière épithéliale mammaire. Cavret *et al.* (2005b) ont suggéré que l'épithélium

mammaire joue un rôle clef sur le transfert sélectif des HAP vers le lait. Ce résultat peut certainement être expliqué par le métabolisme enzymatique des HAP démontré par plusieurs auteurs chez les mammifères au niveau intestinal (Wattenberg *et al.*, 1962 ; Hietnanen, 1980 ; Porter *et al.*, 1982 ; Van Veld, 1990 ; Zhang *et al.*, 1996), dans le foie (Aito, 1974 ; Bjorseth et Becher, 1986 ; Johnsen *et al.*, 1998 ; Honey *et al.*, 2000) ainsi que dans d'autres organes (Moore *et al.*, 1983 ; Matsuda *et al.*, 1995 ; Roos *et al.*, 2002). La forme en cloche des courbes d'excrétion, commune pour toutes les molécules et toutes les matrices, révèle la capacité du ruminant à absorber, à biotransformer et à éliminer rapidement les HAP et leurs métabolites. Cette élimination est réalisée principalement via les urines où les concentrations ont été systématiquement plus élevées. Grova *et al.* (2002) avaient déjà détecté un transfert rapide (transfert maximum dans le lait à 7h pour le PHE et à 22 h pour le PYR suite à un apport oral des molécules marqués au <sup>14</sup>C) sans toutefois pouvoir distinguer les molécules parents de leurs métabolites. Pour ce qui est des concentrations de métabolites, il apparaît que le 1-OH PYR est de loin le métabolite le plus présent dans les matrices lait et urines. Lutz *et al.* (2006) avaient à leur tour observé une logique analogue d'excrétion des métabolites : 1-OH-PYR > 3-OH-PHE, alors que les quantités de HAP administrées aux animaux étaient bien supérieures. Contrairement au PYR, au PHE et à leurs métabolites, le B[a]P et le 3-OH-B[a]P n'ont quasiment pas été excrétés dans le lait ou les urines, et cela pour les trois matrices étudiées. Ce résultat pose la question de l'absorption du B[a]P dans le tube digestif du ruminant et/ou de son stockage éventuel dans l'organisme.

Afin de comparer les cinétiques d'excrétion des HAP dans le lait des trois matrices sol, foin et cremophor, nous avons corrigé les valeurs des concentrations de métabolites (1-OH PYR et du 3-OH PHE) par les niveaux d'ingestion des animaux (figures 16, 17, 18 et 19). Ces figures mettent en évidence un comportement analogue pour les matrices foin et cremophor. Elles révèlent aussi des niveaux d'excrétion plus élevés pour la matrice sol. Pour le métabolite principal, le 1-OH-PYR, la concentration maximale dans le lait est obtenue pour le sol à partir de 24h (figure 16). Des niveaux analogues ont été constatés pour les matrices foin et cremophor. Dans les urines, la concentration maximale pour le 1-OH-PYR a été atteinte à 9h avec le sol, et à 24h pour le foin ou le cremophor (figure 17).

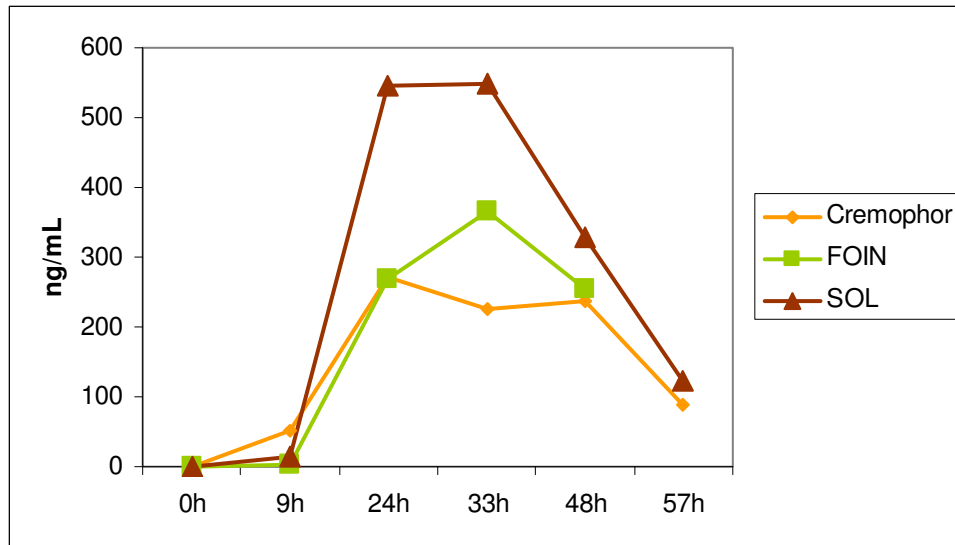


Figure 16 : Cinétiques corrigées de **1-OH-PYR** dans le lait à partir d'une ingestion équivalente en PYR par les trois matrices.

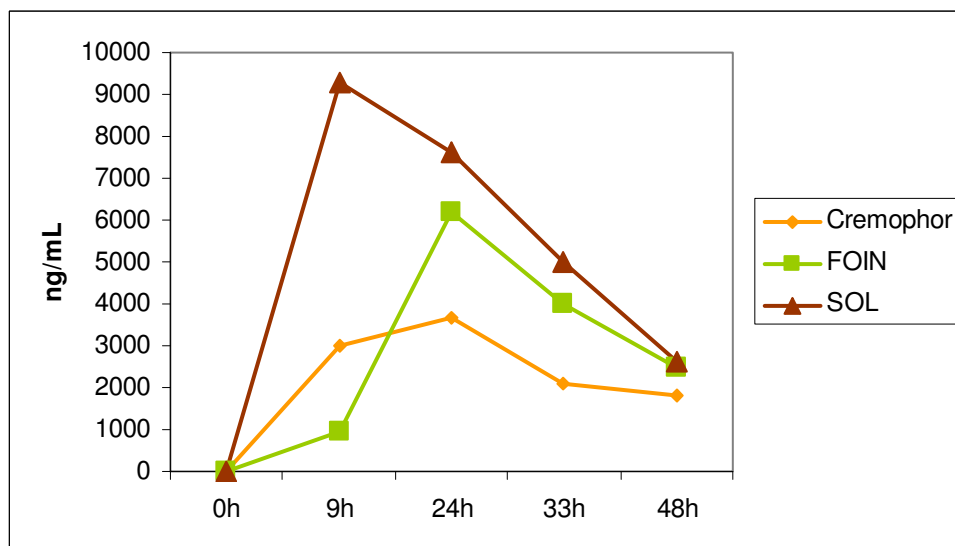


Figure 17 : Cinétiques corrigées de **1-OH-PYR** dans les urines à partir d'une ingestion équivalente en PYR par les trois matrices.

Pour le 3-OH-PHE (figure 18), les concentrations trouvées dans le lait sont identiques pour les trois matrices avec des niveaux toutefois bien inférieurs à ceux de l'1-OH-PYR (figure 16). Les cinétiques d'excrétion de 3-OH-PHE dans les urines (figure 19) semblent comparables (avec des niveaux inférieurs) aux cinétiques d'excrétion de 1-OH-PYR (figure 17).

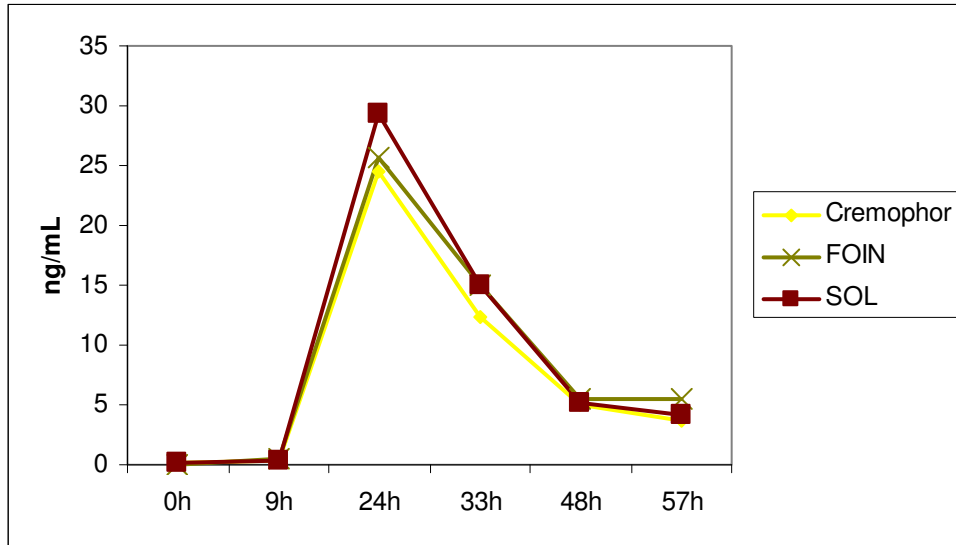


Figure 18 : Cinétiques corrigées du **3-OH-PHE** dans le lait à partir d'une ingestion égale en PHE par les trois matrices.

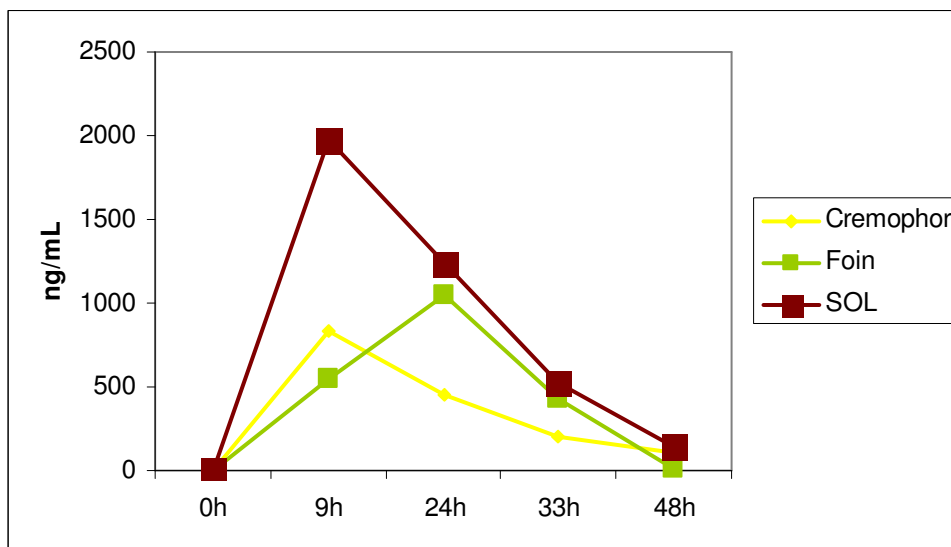


Figure 19 : Cinétiques corrigées du **3-OH-PHE** dans les urines à partir d'une ingestion égale en PHE par les trois matrices.

Pour les deux métabolites considérés, l'excrétion dans les urines est à la fois plus rapide et plus importante que l'excrétion des métabolites dans le lait. Ce résultat s'explique vraisemblablement par le caractère hydrosoluble des métabolites. Ainsi, ces composés seront préférentiellement orientés vers la voie urinaire (Grova, 2003).

Les figures 16, 17, 18 et 19 révèlent une apparition similaire des métabolites des HAP pour les trois matrices étudiées. Ainsi, contrairement à notre hypothèse, l'adhésion des HAP au sol n'est pas plus importante que l'adhésion au foin ou au crémophor. Les résultats semblent même indiquer que l'extractibilité des HAP du sol soit supérieure à celle des HAP des deux autres matrices. Ainsi, les liaisons d'adsorption entre le sol et les HAP ne semblent pas être un obstacle pour la libération des contaminants dans la lumière intestinale. Ce résultat met en exergue les risques associés à l'ingestion de sol.

En terme de sécurité alimentaire, la norme européenne actuelle sur la concentration en HAP dans le lait fixe une limite seulement pour le B[a]P : 1 µg/kg de lait frais (JO CE 208/2005). La toxicité du 1-OH-PYR, molécule la plus transférée, devrait également être étudiée afin de préciser ces normes vis à vis de la consommation humaine. Par ailleurs, l'évaluateur du risque devra ne pas négliger les contaminants provenant du sol.

#### **4.2. Transfert**

Il a été mis en évidence que les molécules natives sont très faiblement transférées vers le lait. Ceci est en accord avec les résultats obtenus par West et Horton (1976) chez les brebis (transfert de 0,012% pour le 3-méthylcholanthrène et pour le B[a]P). Ils indiquent qu'au bout de 24h, les hydrocarbures avaient été métabolisés entre 33% et 55%. Des niveaux très bas ont aussi été trouvés par Grova *et al.* (2002) pour le transfert du PHE (1,6%) et du PYR (1,9%) chez la chèvre laitière.

Dans notre étude, les métabolites ont été transférés vers le lait à des taux inférieurs à 2% et cela quel que soient les matrices d'apport. En accord avec ces résultats, Lutz *et al.* (2006) ont obtenu des valeurs de transfert inférieures à 1,5% suite à un apport chronique de sol contaminé chez la vache laitière. Dans l'étude de Grova (2003) sur le transfert de HAP vers le lait à partir de la ration chez la vache, des taux de transfert plus élevés ont été trouvés : 7,2% pour le PHE et 4,7% pour le PYR. De fait, la ration présentait des teneurs qui ne dépassaient pas les  $2,8 \pm 0,4$  µg/kg. Si on compare ces résultats avec ceux obtenus dans le présent travail, où les taux de transfert sont inférieurs à 2% avec des matrices contaminées à des niveaux bien supérieures, le transfert serait plus important à partir de faibles doses de HAP ingérées. Grova (2003) suggère une relation inverse entre la dose administrée et la part de PHE excrétée dans le lait ( $\% \text{ PHE excrété dans le lait} = - 24,5 \log \text{ dose administrée} + 62,4$ ,  $R^2 = 0,962$ ). Ainsi,

plus la dose augmente, plus le PHE est métabolisé. Il serait à présent utile de confirmer si des doses différentes seraient à même de faire varier les coefficients de transfert ainsi que l'induction au métabolisme.

En ce qui concerne le transfert vers les urines, le 1-OH-PYR est le métabolite le plus transféré (16-52%). Quelle que soit la matrice ingérée, ce métabolite semble être un bon indicateur de l'exposition du ruminant au même titre que chez l'homme (Bouchard et Viau, 1996 ; Pigni *et al.*, 2006). Son dosage apporte à la fois des renseignements en terme d'exposition de l'animal mais aussi en terme de qualité et de sécurité du produit. Le B[a]P ainsi que son métabolite majeur, le 3-OH-B[a]P, sont faiblement transférés vers le lait et les urines. En accord avec les résultats de Grova *et al.* (2002), le faible transfert du B[a]P peut être expliqué par une absorption limitée de ce composé. A l'égard du transfert vers les urines, le sol contribue à des transferts plus importants comparativement aux matrices foin et cremophor.

De manière générale, les taux de transferts observés révèlent une absorption conséquente des HAP des matrices étudiées. Ainsi, le taux d'absorption équivaut au minimum à la somme des métabolites excrétés par les urines et le lait. Il apparaît donc que l'absorption du PYR est au moins équivalente à 17%, l'absorption du PHE serait supérieure ou égale à 2,4% et celle du B[a]P semble quasiment nulle (cf. tableaux 13 et 14, pages 89 et 90). Ceci est en accord avec Van Schooten (1997) qui a montré chez des rats exposés à un sol industriel contaminé que les HAP étaient facilement absorbés, métabolisés puis excrétés principalement sous forme de métabolites dans les urines et les fèces. Dans notre étude, l'absorption et le transfert ont été les plus élevés avec la matrice sol, suivie de la matrice foin et de la matrice cremophor.

## **5. Conclusions**

D'après cette étude, il peut être conclu que les HAP natifs sont très faiblement transférés vers le lait quelle que soit la matrice d'apport ingérée par l'animal. La biotransformation des HAP a conduit à l'apparition de métabolites en faibles doses dans le lait, l'urine étant la principale voie d'excrétion (1-OH-PYR, métabolite majeur). Les transferts non négligeables de métabolites, notamment le 1-OH-PYR, vers les urines démontrent la biodisponibilité de ces polluants pour les ruminants à partir de foin et du sol contaminés. Ce métabolite pourrait être considéré comme un bio-indicateur de l'exposition des ruminants aux HAP. Il devrait être pris en compte dans l'évaluation du risque sanitaire et de la sécurité alimentaire. Une des



questions qui subsistent est de savoir si des POP plus hydrophobes et moins susceptibles d'être métabolisés sont transférés à des niveaux équivalents aux HAP. La possibilité d'utiliser du foin naturellement contaminé en PCDD/F et PCB nous a amené à préciser les facteurs de transfert de ces molécules vers le lait.

## **CHAPITRE 3**

# **Transfert de PCDD/F et PCB du foin vers le lait chez la chèvre**

## 1. Introduction

Les concentrations en POP sont généralement plus élevées dans des laits produits près des sources d'exposition (Rappe *et al.*, 1987; Stevens et Gerbec, 1988; Hippelein *et al.*, 1996). Ces concentrations peuvent dépasser les limites permises par les normes européennes (3 ng I-TEQ/g de matière grasse (MG) pour les PCDD/F et 6 ng I-TEQ/g MG pour la somme des PCDD/F et les PCB-DL ; JOCE Décembre 2001 L321/5). Ramos *et al.* (1997) ont par exemple observé des concentrations de 3,32 pg I-TEQ/g MG dans le lait produit à coté d'un incinérateur.

Plusieurs études ont d'ores et déjà contribué à préciser les niveaux de transfert des PCDD/F et PCB chez le ruminant laitier. Slob *et al.* (1995) ont réalisé par exemple une administration unique par voie orale des PCDD, des PCDF et des PCB chez des vaches en lactation. Firestone *et al.* (1979) ont quant à eux concentré leurs études sur les composés les plus fortement chlorés. Vrecl *et al.* (2004) ont déterminé l'excrétion individuelle des PCB 54, 80, 155 et 169 dans le lait et les fèces chez les moutons après l'administration unique par voie orale des composés étudiés. Pour d'autres auteurs les études ont été orientées vers la détermination du statut d'équilibre des contaminants dans l'organisme des animaux laitiers. Ainsi, Ruoff (1995) a observé que l'état d'équilibre du 2,3,4,7,8-PeCDF a été atteint après l'administration de cette molécule pendant 2,5 mois, tandis qu'il a été obtenu après deux semaines pour la 2,3,7,8-TCDD par Arstila *et al.* (1981). Dans une approche de terrain, Slob *et al.* (1995) ont mesuré la disponibilité spécifique des 17 PCDD/F et de trois PCB coplanaires chez les vaches laitières pâturant 60 jours à proximité d'un incinérateur de déchets municipaux. La disponibilité de foin fortement contaminé en PCDD/F et PCB collecté à Albertville en janvier 2000 nous a permis pour la première fois d'envisager une administration chronique de PCDD/F et PCB de fourrage naturellement contaminé et cela dans des conditions expérimentales contrôlées.

Ainsi, du foin « naturellement » contaminé en dioxines (OMS-PCDD/F-TEQ : 2 pg/g MS) et PCB (PCB-indicateurs, PCB-I : 1 ng/g MS et OMS-PCB dioxin-like-TEQ, DL-TEQ : 0,38 pg/g MS) a été collecté à Albertville en janvier 2002. Ce fourrage s'est révélé particulièrement utile pour approcher la biodisponibilité chez le ruminant laitier. Nous avons donc mis en place, avec les collègues du LABERCA, une étude sur les cinétiques de transferts des dioxines et PCB du fourrage vers le sang et le lait. L'objectif de cette étude est de déterminer

les cinétiques d'apparition des PCB et des dioxines dans le lait de chèvres en lactation suite à l'apport chronique (pendant 90 jours) de foin naturellement contaminé.

## **2. Matériel et méthodes**

### **2.1. Animaux et alimentation**

Le protocole expérimental a été en accord avec les lignes directrices nationales et européennes (1986, N°: 86/609/CEE). Il a mis en œuvre trois chèvres laitières (poids vif moyen:  $50 \pm 5$  kg) du troupeau du domaine expérimental de l'ENSAIA. Les chèvres (troisième lactation, 2ème mois de lactation, production laitière quotidienne de 3 L) ont été traites à 8h00 et à 17h00. Après une période d'adaptation de 10 jours aux installations expérimentales, les animaux ont été nourris quotidiennement sur la base de 800 g de foin contaminé (OMS-PCDD/F-TEQ :  $2 \text{ ng kg}^{-1}$  matière sèche(MS); PCB indicateurs :  $1 \text{ ng g}^{-1}$  MS; OMS-DL-PCB-TEQ:  $0,38 \text{ ng kg}^{-1}$  MS) récolté à Albertville à proximité d'un incinérateur défectueux, et d'un concentré à base de pulpes de betterave (800 g), de maïs grain (400 g), de tourteau de soja (200 g) et de minéraux (10g) . L'eau a été offerte à volonté. La ration a été établie de sorte à couvrir les besoins d'entretien et de production laitière des animaux (Jarrige, 1988). La production laitière et les quantités de foin ingérées ont été mesurées journalièrement. 500 mL de lait ont été collectés de chaque animal aux jours suivants : J-1, J7, J15, J22, J29, J36, J43, J57 et J71. Une pesée des animaux a été réalisée au début de l'expérimentation et a été répétée mensuellement à une heure fixe par rapport aux repas et à la traite.

### **2.2. Mesures et traitement des échantillons**

Les échantillons de lait ont été adressés en l'état sous 48h dans un emballage de polystyrène en vue de l'extraction de la matière grasse selon le protocole en vigueur au LABERCA. Un échantillon de foin témoin, de foin contaminé et de concentré ont été prélevés chaque semaine et broyé avec une grille de 1,5 mm. Les aliquotes hebdomadaires ont été stockées et homogénéisées afin de doser les PCDD/F et PCB dans des échantillons représentatifs du fourrage distribué.

## **2.3. Analyses**

Les PCDD/F et PCB ont été quantifiés par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse haute résolution (GC-HRMS). Trois étapes sont indispensables pour effectuer ces analyses. La première est une étape d'extraction suivie d'une purification et enfin de la quantification.

### **2.3.1. Extraction**

Juste avant l'extraction, 17 PCDD/F et 18 PCB marqués au  $^{13}\text{C}$  (Cambridge Isotope Laboratories et Wellington Laboratories) ont été ajoutés aux échantillons étudiés. Les échantillons solides ont été lyophilisés ou séchés, réduits en poudre et transférés dans les cellules d'un extracteur de solvants accéléré (ASE). La pression est fixée à 100 bar et la température à 120°C. Le solvant d'extraction était composé d'un mélange de toluène (Picograde-1350 Promochem) et d'acétone (Picograde-1142 Promochem) dans la proportion de 70 :30 (v/v) et 3 cycles d'extraction de 5 minutes chacun ont été réalisés. Les extraits après leur évaporation ont été dissous à nouveau dans de l'hexane.

Pour le lait, les mêmes standards marqués au  $^{13}\text{C}$  (17 PCDD/F, 12 DL-PCB et 7 PCB marqueurs) ont été ajoutés à 100 mL d'échantillon. Deux mL d'oxalate de sodium saturé ont été ajoutés pour précipiter les protéines. Un ajout d'éthanol et diethyl-éther a ensuite été effectué afin d'extraire la graisse avec n-pentane à deux reprises. Les extraits ont été évaporés à sec permettant de déterminer par gravimétrie la teneur en graisse. Finalement, 25 mL d'hexane (Picograde-1244 Promochem) ont été ajoutés avant la purification.

### **2.3.2 Purification**

La purification se décompose en trois étapes successives sur 3 systèmes chromatographiques ouverts avec des phases de silice, de florasil et de charbon. La première colonne en verre (50 cm de longueur et 2,5 cm de diamètre interne) était composée par des couches successives de 5 g de sulfate de sodium anhydre (ASC, ISO, Merck Eurolab, Darmstadt, Allemagne), 5 g de silice pure (Fluka, Allemagne), 20 g de silice acidifiée avec de l'acide sulfurique concentré (Merck) (44%) et 5 g de sulfate de sodium. Les dioxines et les PCB ont été éluées dans la même fraction avec 150 mL d'hexane.

La colonne de Florisil (25 cm de longueur et 1,25 de diamètre interne) a été préparée en ajoutant 6 g de Florisil à 6% d'eau (Promochem) à 10 mL d'hexane. Les échantillons purifiés sur la colonne précédente ont été réduits à 1 mL et placés sur la colonne de Florisil avant d'être rincés avec 9 mL d'hexane. Les PCB non-*ortho*, mono-*ortho* et di-*ortho* ont été élués avec 110 mL d'hexane et les PCDD/F avec 120 mL de toluène. Ces deux fractions ont été concentrés jusqu'à 1 mL puis évaporés à sec sous flux d'azote, et dissous à nouveau avec 1 mL d'hexane.

La fraction contenant les PCDD/F a été transférée sur la colonne de charbon et de célite (20 cm de longueur et 1 cm de diamètre interne), remplie avec un mélange de 0,25 g de Carbopack C et de célite 18/82 (g/g) lavé au préalable avec 10 mL de toluène, suivi d'un mélange de 5 mL de toluène/méthanol (Picograde-1263 Promochem)/dichlorométhane (Picograde-1185 Promochem) 5/20/75 (v/v/v), puis avec un mélange de 5 mL de dichlorométhane/cyclohexane (Picograde-1179 Promochem) 50/50 (v/v), et finalement avec 15 mL d'hexane.

L'extrait après son dépôt sur la colonne a été rincé avec 2 mL d'hexane et 1 mL de toluène/méthanol/dichlorométhane 5/20/75. L'élution a été faite avec 30 mL de toluène qui ont été évaporés à sec après ajout de 25 pg d'un standard interne ( $^{13}\text{C}$  1,2,3,4-TCDD).

La fraction contenant les PCB a été transférée sur la colonne de charbon mais cette fois complétée avec 0,25 g d'un mélange de Carbopack C et célite 12/82 (g/g) activé au préalable pendant la nuit à 130°C et 1 g de Florisil actif. Les mono et les di-*ortho* PCB ont été élués avec 10 mL d'hexane suivis de 30 mL de toluène pour l'élution des non-*ortho* PCB. Les deux échantillons ont été évaporés à sec après ajout d'un standard interne ( $^{13}\text{C}$  111-PCB) et reconstitués avec 20  $\mu\text{L}$  de toluène pour la fraction des non-*ortho* PCB et 50  $\mu\text{L}$  pour les autres.

### 2.3.3. Quantification

Les PCDD/F et PCB ont été analysés grâce à un chromatographe de gaz HP-5890 de Hewlett Packard (Palo Alto, CA, USA) couplé à un spectromètre de masse JMS 700 D, Jeol (Tokyo, Japon) à une résolution de 10000 et en mode impact électronique (38 et 42 eV d'énergie d'électron pour les PCDD/F et PCB respectivement). L'enregistrement du signal de l'ion

moléculaire les plus abondant (contribution isotopique  $^{35}\text{Cl}$  et  $^{37}\text{Cl}$ ) a été fait avec un SIM (Single Ion Monitoring). Une colonne capillaire DB5MS (30 m X 0,25 mm X 0,25  $\mu\text{m}$ ) de J&W a été utilisée en mode splitless.

Le programme de températures du GC pour les PCDD/F a été le suivant : 120°C (3 min), 20°C/min jusqu'à 170°C (0 min) et 3°C/min jusqu'à 275°C (7 min). Le programme GC pour les PCB était : 120°C (3 min), 20°C/min jusqu'à 170°C (0 min), 3°C/min jusqu'à 245°C (0 min) et finalement 20°C/min jusqu'à 275°C (7 min). Les signaux ont été intégrés par le logiciel JEOL Diok V2. Toutes les valeurs ont été corrigées automatiquement en prenant en compte le taux de recouvrement des molécules marqués au  $^{13}\text{C}$ .

La limite de détection des dioxines, pour tous les congénères, dans tous les échantillons était inférieure à 30 fg/g de matrice. Pour éviter des surestimations dans les aliments, notamment dans le foin, au début de l'expérimentation, quelques échantillons ont été injectés sur une colonne DB-dioxin de J&W (60 m X 0,25 mm X 0,15  $\mu\text{m}$ ) pour s'assurer que les concentrations en 2,3,7,8-TCDF, en 2,3,4,7,8-PeCDF et en 1,2,3,4,7,8-HxCDF n'étaient pas surestimées. La résolution de la colonne DB5MS était suffisante pour quantifier les congénères sans co-élution ou des congénères non substitués sur les positions 2,3,7,8.

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

#### 2.4. Paramètres calculés

Les cinétiques des concentrations de contaminants dans le lait ont été obtenues à l'aide du logiciel "toolbox-curve fitting of Matlab, software version 6.5" (The MathWorks, Natick, Massachusetts, USA). Il a ainsi été possible de déterminer le temps nécessaire à l'obtention d'un plateau d'équilibre (95% de la somme a + b) en utilisant l'équation suivante :

$$y = a + b(1 - e^{-cx})$$

y: concentration de la molécule (ng kg<sup>-1</sup> matière grasse du lait)

a: concentration initiale (ng kg<sup>-1</sup> matière grasse du lait)

a + b: concentration au plateau ( $\text{ng kg}^{-1}$  matière grasse du lait)

c: constante de temps

x: temps nécessaire pour l'obtention du plateau d'équilibre (jours)

Pour chacun des 35 composés, un FT a été calculé de la manière suivante :

$$\text{FT} = \frac{m \cdot f_y}{f \cdot F} * 100$$

FT: Facteur de transfert (%)

m: Concentration du polluant dans la matière grasse au plateau d'équilibre ( $\text{ng kg}^{-1}$ )

$f_y$ : matière grasse ( $\text{g j}^{-1}$ )

f: concentration du polluant dans l'aliment ( $\text{ng kg}^{-1}$  matière sèche)

F: ingestion quotidienne d'aliment ( $\text{g j}^{-1}$ )

Le paramètre FT est peu dépendant du stade de lactation, du poids de tissu gras de l'animal ou encore de l'aliment. Il semble ainsi parfaitement adapté pour décrire le transfert des contaminants chez les ruminants laitiers (McLachlan et Richter, 1998).

## 2.5. Analyse statistique

Les valeurs de FT ont fait l'objet d'une analyse de variance (ANOVA) à un facteur (molécule étudiée,  $n=3$ ) à l'aide du logiciel StatBox version 6.5 (GrimmerSoft, Paris, France). Les valeurs individuelles ont été comparées à l'aide d'un t-test selon Bonferroni ( $p < 0,05$ ).

## 3. Résultats

### 3.1. PCDD/F et PCB dans les aliments

Le tableau 15 (page 102v) indique les valeurs moyennes de PCDD/F et PCB de toutes les matrices alimentaires utilisées. Il révèle que le foin contaminé collecté à proximité d'un incinérateur défectueux est la principale source de PCDD/F et de PCB. De manière générale, les concentrations de PCB dans le foin contaminé ont été bien supérieures aux concentrations de PCDD/F. A quelques exceptions près (1,2,3,4,6,7,8-HpCDD et OCDD) le foin témoin était faiblement contaminé en PCDD/F. Quelques PCB ont cependant été détectés en quantités non



négligeables aussi bien dans le foin que dans les aliments concentrés. Cela a été noté en particulier pour les PCB indicateurs mais également quelques PCB-DL tels que les PCB 77, 105, 114, 118, 123, 156, 167.

**Tableau 15: Concentrations moyennes (ng kg<sup>-1</sup> MS) de PCDD/F et de PCB dans les aliments**

PCDD/F	Foin témoin	Foin contaminé	Aliment concentré	PCB	Foin témoin	Foin contaminé	Aliment concentré
2.3.7.8 – TCDD	0,04	0,07	0,02	77	3,86	10,43	0,72
1.2.3.7.8 - PeCDD	0,01	0,60	0,02	81	0,14	0,59	0,05
1.2.3.4.7.8 - HxCDD	0,02	0,60	0,02	126	0,63	3,02	0,14
1.2.3.6.7.8 - HxCDD	0,11	0,72	0,01	169	0,12	1,03	0,03
1.2.3.7.8.9 - HxCDD	0,04	0,63	0,01	105	19,45	42,42	6,53
1.2.3.4.6.7.8- HpCDD	1,92	4,67	0,19	114	1,27	2,49	0,40
OCDD	6,71	10,56	0,82	118	63,69	126,70	18,94
2.3.7.8 - TCDF	0,06	0,35	0,05	123	2,23	5,00	0,99
1.2.3.7.8 - PeCDF	0,04	0,60	0,02	156	6,68	13,82	2,56
2.3.4.7.8 - PeCDF	0,04	0,98	0,03	157	1,17	2,87	0,49
1.2.3.4.7.8 - HxCDF	0,05	1,13	0,02	167	4,57	8,26	1,54
1.2.3.6.7.8 - HxCDF	0,05	1,35	0,02	189	0,90	2,22	0,03
1.2.3.7.8.9 - HxCDF	0,05	0,10	0,02	28	57,00	66,76	21,29
2.3.4.6.7.8 - HxCDF	0,05	1,64	0,02	52	46,00	68,53	20,26
1.2.3.4.6.7.8 -HpCDF	0,36	4,24	0,05	101	169,00	215,57	51,04
1.2.3.4.7.8.9 -HpCDF	0,10	0,31	0,04	138	176,00	283,42	52,41
OCDF	0,40	1,35	0,06	153	319,00	457,98	93,02
				180	68,00	126,45	24,66

### 3.2. Excrétion de PCDD/F et de PCB dans le lait

Les cinétiques des différents composés ont été relativement similaires indiquant une augmentation des concentrations jusqu'à l'obtention de plateaux d'équilibre. Les temps nécessaires pour atteindre ces équilibres ainsi que les niveaux de concentrations correspondants sont indiqués dans le tableau 16.

Tableau 16 : Concentrations moyennes (ng kg<sup>-1</sup> MG du lait) de PCDD/F et de PCB au plateau d'équilibre et temps nécessaire pour l'obtention de ce plateau (jours)

PCDD/Fs	Concentrations moyennes au plateau d'équilibre (n = 3)	Temps nécessaire pour atteindre le plateau (jours)	PCB	Concentrations moyennes au plateau d'équilibre (n = 3)	Temps nécessaire pour atteindre le plateau (jours)
2.3.7.8 - TCDD	0.48 ± 0.05	65	77	13.37 ± 1.34	8
1.2.3.7.8 - PeCDD	2.81 ± 0.23	47	81	2.22 ± 0.10	8
1.2.3.4.7.8 - HxCDD	1.97 ± 0.25	48	126	20.97 ± 0.46	15
1.2.3.6.7.8 - HxCDD	2.20 ± 0.13	39	169	5.67 ± 0.15	15
1.2.3.7.8.9 - HxCDD	1.19 ± 0.11	41	105	660.13 ± 7.93	15
1.2.3.4.6.7.8- HpCDD	3.28 ± 0.29	68	114	29.94 ± 1.20	15
OCDD	2.31 ± 0.34	72	123	15.01 ± 0.7	22
2.3.7.8 - TCDF	0.52 ± 0.05	20	156	179.31 ± 9.25	15
1.2.3.7.8 - PeCDF	1.17 ± 0.12	26	157	40.32 ± 1.94	15
2.3.4.7.8 - PeCDF	3.83 ± 0.39	60	167	72.91 ± 3.25	15
1.2.3.4.7.8 - HxCDF	3.34 ± 0.31	74	189	18.94 ± 0.64	15
1.2.3.6.7.8 - HxCDF	3.20 ± 0.34	59	28	332.60 ± 7.19	15
1.2.3.7.8.9 - HxCDF	0.08 ± 0.01	*	52	140.00 ± 11.68	*
2.3.4.6.7.8 - HxCDF	2.81 ± 0.42	74	101	225.74 ± 13.45	*
1.2.3.4.6.7.8 -HpCDF	1,67 ± 0.15	57	118	1652.53 ± 52.18	15
1.2.3.4.7.8.9 -HpCDF	0,16 ± 0.01	37	138	1890.00 ± 65.99	15
OCDF	0,16 ± 0.06	*	153	3524.07 ± 85.21	15
			180	1191.76 ± 43.04	15

\* le plateau a été atteint dès le début de l'administration des molécules

Il est à noter que les composés ont quasiment tous atteint cette valeur d'équilibre à l'issue des 10 semaines expérimentales. Pour les PCDD/F et les PCB, les plateaux d'équilibre ont souvent été obtenus au courant du premier mois après le début de l'ingestion de foin contaminé.

Les PCDD/F ont été détectés à des niveaux de concentrations allant de 0,16 à 3,83 ng g<sup>-1</sup> MG. Les concentrations les plus faibles dans le lait correspondent aux molécules les moins présentes dans le foin contaminé (TCDD, TCDF, 1,2,3,7,8,9-HxCDF et 1,2,3,4,7,8,9-HpCDF). L'inverse a aussi été vérifié : les molécules les plus présentes dans le foin sont généralement les molécules les plus abondantes dans la matière grasse du lait (PeCDD, HpCDD, OCDD, 2,3,4,7,8-PeCDF, 1,2,3,4,7,8-HxCDF, 1,2,3,6,7,8-HxCDF et 2,3,4,6,7,8-HxCDF). Pour les PCB, les molécules fortement chlorées (5 ou 6 atomes de chlore) ont été les plus présentes dans la matière grasse du lait (153 > 138 > 118 > 180). Les PCB indicateurs ont été les plus abondants comparativement aux autres composés.

Le tableau 17 donne les valeurs OMS-I-TEQ et leurs cinétiques qui révèlent que dès la deuxième semaine après l'ingestion de foin contaminé, la valeur limite de 3 pg/g MG du lait correspondant aux normes internationales a été dépassée.

Tableau 17 : Evolution des valeurs OMS-I-TEQ\* des PCDD/F et PCB dans la MG du lait (pg/g) suite à l'ingestion chronique de foin contaminé

OMS-I-TEQ	Jour 0	Jour 8	Jour 15	Jour 71
PCDD/F	0,86	2,84	4,26	6,93
PCDD/F + PCB	2,46	4,85	6,84	9,24

\* Quantité d'Equivalence Toxique Internationale d'après l'Organisation Mondiale pour la Santé

### 3.3. Taux de transfert

Les figures 20 et 21 présentent les valeurs moyennes des FT pour les composés individuels PCDD/F et PCB respectivement. Pour les PCDD/F, la molécule 2,3,7,8-TCDD est la molécule dont le FT est le plus élevé (38,8%). Les composés les plus lourds (HpCDD, OCDD, 1,2,3,4,6,7,8-HxCDF, 1,2,3,4,7,8,9-HpCDF et OCDF) sont transférés à des niveaux inférieurs à 10%. Pour les PCDD, les FT semblent être liés au nombre d'atomes de chlore, ainsi FT<sub>TCDD</sub> > FT<sub>PeCDD</sub> > FT<sub>HxCDD</sub> > FT<sub>HpCDD</sub> > FT<sub>OCDD</sub>. Pour les molécules PCDF, une tendance similaire peut être notée à l'exception des trois composés suivants : TCDF, 1,2,3,7,8-

PeCDF et 1,2,3,7,8,9- HxCDF. Pour les molécules PCB-DL les FT les plus élevés ont atteint des valeurs supérieures à 80% (PCB 105, 118 et 157), elles s'étendaient de 5 % à plus de 50% pour les PCB-I. Cette fois encore une relation entre le nombre d'atomes de chlore et le taux de transfert est suggérée : les niveaux de FT les plus élevés ont été obtenus pour les PCB 118, 157, 156, 114, 189 dont le degré de chloration se situe entre 5 et 7. A l'opposé, les PCB 28, 52, 77 et 101 faiblement chlorés (3-5 atomes de chlore) ont été peu transférés vers le lait. Il est à noter également que malgré des niveaux de concentrations très différents entre les PCB-DL et les PCB-I, les FT ont été d'ampleur similaire.

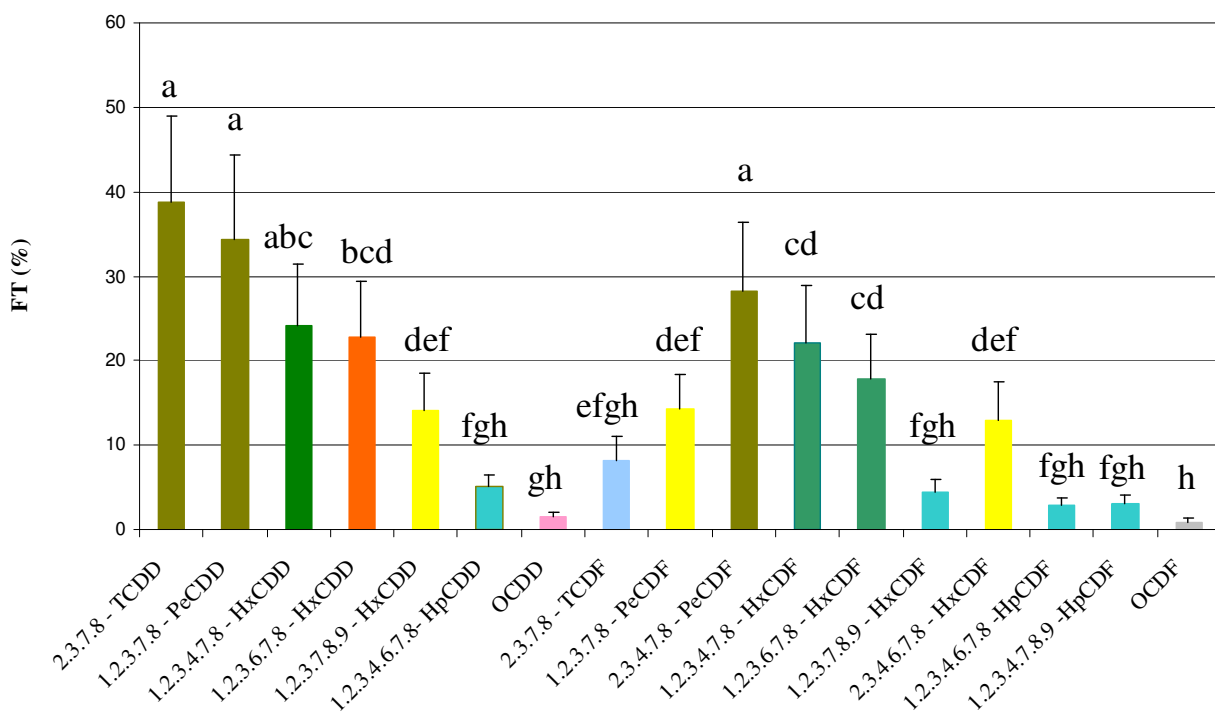


Figure 20 : Facteurs de transfert (%) des PCDD/F du foin contaminé vers le lait chez la chèvre.

<sup>a-h</sup> Les lettres distinctes indiquent une différence significative ( $p \leq 0.05$ )

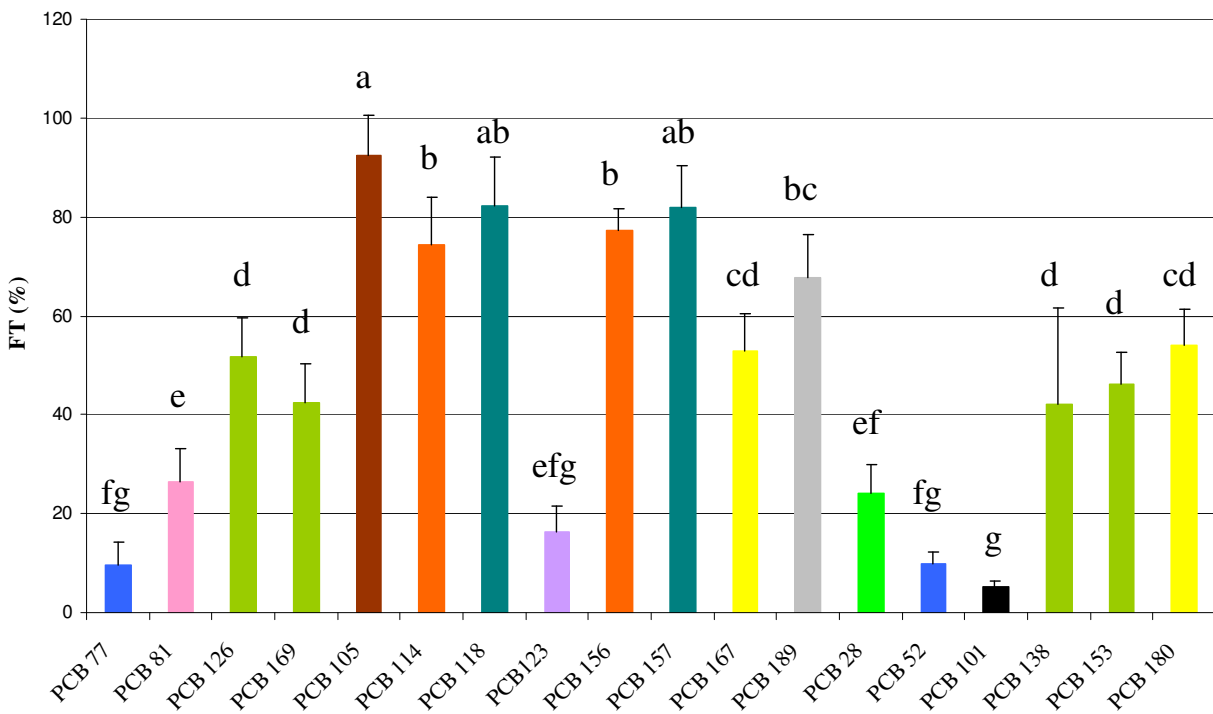


Figure 21 : Facteurs de transfert (%) des PCB du foin contaminé vers le lait chez la chèvre  
<sup>a-g</sup> Les lettres distinctes indiquent une différence significative ( $p \leq 0.05$ )

#### 4. Discussion

De manière générale, les figures 20 et 21 révèlent que tous les composés PCDD/F et PCB ont été retrouvés dans le lait après ingestion par les chèvres en lactation de foin naturellement contaminé. De plus, la répétabilité entre les mesures (faibles écart-types) suggère que les animaux sont relativement homogènes quant aux transferts des molécules étudiées. Les valeurs OMS-I-TEQ calculées indiquent à leur tour que les valeurs limites autorisées sont rapidement atteintes voire dépassées. Ce résultat montre que les molécules sont rapidement transférées vers le lait d'où la nécessité d'analyser les risques qui en découlent.

Afin d'expliquer les différents niveaux de transfert entre les composés, plusieurs auteurs ont proposé comme paramètres explicatifs les propriétés physico-chimiques des molécules (Firestone, 1979; McLachlan *et al.*, 1990; Olling *et al.*, 1991; Slob, 1995 ; McLachlan and Richter, 1998; Fries, 1999; Lorber *et al.*, 2000). Ces auteurs ont en particulier observé une diminution des taux de transfert avec l'augmentation du degré de chloration. Ils ont aussi suggéré une biotransformation dans l'organisme de certains composés. Ainsi, les FT réduits

de l'OCDD/F et de l'HpCDD/F mesurés dans notre étude suggèrent d'une part une absorption limitée et d'autre part un métabolisme dans l'organisme. McLachlan (1993) a montré que l'absorption de polluants organiques persistants est fonction du  $\log K_{ow}$  lorsque sa valeur dépasse 6.5. Cette observation peut globalement expliquer les FT des PCDD/F. Ainsi, le FT de la TCDD apparaît systématiquement le plus élevé (36-41%) alors que le FT de l'OCDD est beaucoup plus faible (0,68-2%) (McLachlan and Richter, 1998; Fries *et al.*, 1999; Lorber *et al.*, 2000). De plus les FT ne semblent pas affectés par les niveaux d'exposition des animaux : dans la plupart des résultats issus de la littérature, les niveaux d'exposition des animaux ont été de 10 à 1000 fois inférieurs à ceux de notre étude.

Malgré tout l'intérêt prédictif du paramètre  $\log K_{ow}$ , les résultats de la figure 20 n'ont pas permis de proposer de relation linéaire satisfaisante entre la masse moléculaire des composés et les valeurs de FT :  $FT = -12 \log K_{ow} + 108, R^2 = 0,30$ . Ainsi, le  $\log K_{ow}$  ne permet pas à lui seul d'expliquer les modalités de transfert des contaminants vers le lait. La biotransformation conséquente de certains composés pourrait expliquer la faible valeur de  $R^2$ . Il est connu par exemple que la 2,3,7,8-TCDF et la 1,2,3,7,8-PeCDF sont métabolisés fortement dans l'organisme (McLachlan, 1997). Cette biotransformation peut intervenir aussi bien dans la lumière intestinale qu'au sein de l'organisme. Après avoir été absorbées, les POP vont se lier aux composés lipidiques sanguins tels que le cholestérol, les tri-glycérides ou les lipoprotéines. C'est au niveau du foie que ces molécules vont être pris en charge par les complexes enzymatiques présents.

Les PCB dont les FT sont élevés (PCB-I 138, 153, 180 ou PCB-DL 105, 114, 118, 156, 157, 167 ou 189) ont probablement été transférés de manière inchangée vers le lait (Sewart et Jones, 1996). Des niveaux de cette ampleur (40 – 90 %) avaient déjà été calculés par Thomas *et al.* (1999) chez des vaches laitières ingérant un fourrage faiblement contaminé : les taux de transfert des PCB 118, 153, 180 et 183 oscillaient entre 65 et 109 %. Ces résultats suggèrent que les taux de transfert ne dépendent pas des doses auxquelles les animaux sont exposées. Comme cela avait été suggéré pour les PCDD/F, l'hydrophobicité des composés exprimé par le  $\log K_{ow}$  ne suffit pas à prédire les taux de transfert ( $FT = 27 \log K_{ow} - 135, R^2 = 0.30$ ). Le métabolisme conséquent de certains PCB pourrait expliquer le faible coefficient de régression. Thomas *et al.* (1999) avaient mis en évidence que les PCB 28, 52 et 101 sont fortement métabolisés, contrairement aux PCB 138, 153 et 180 par exemple.

## **5. Conclusions**

L'administration chronique de foin naturellement contaminé en PCDD/F et PCB a révélé le transfert de tous les composés vers le lait et l'obtention d'un plateau d'équilibre « fourrage-lait » pour tous les composés. L'originalité de cette expérimentation réside dans le fait que l'ensemble des molécules PCDD/F et PCB a été pris en compte. Par ailleurs la durée d'expérimentation a été suffisante pour l'établissement des FT aux plateaux d'équilibre. Cela n'avait pas pu être réalisé auparavant. De plus, l'utilisation de foin naturellement contaminé par une source polluante montre l'importance de cette matrice en terme de sécurité de la chaîne alimentaire. La valeur limite de OMS-I-TEQ (3 pg/g MG pour les PCDD/F et 6 pg/g MG pour la somme de PCDD/F et PCB) a été rapidement dépassée (moins de 15 jours après le début de l'administration de foin contaminé). Le fort niveau de transfert obtenu à la fois pour les PCDD/F et les PCB semble s'expliquer principalement par l'hydrophobicité des molécules et la susceptibilité métabolique pour les composés faiblement transférés. Enfin, les taux de transfert ne semblent dépendants ni des doses administrées ni des espèces de ruminants.



# **DISCUSSION GENERALE**

## **DISCUSSION GENERALE**

Le transfert de POP dans la chaîne alimentaire, avec pour modèle animal le ruminant laitier, fait l'objet d'études au sein de notre laboratoire depuis 1999. Les approches scientifiques développées se situent à tous les échelons de la chaîne « aliment-lait » et visent à caractériser le devenir et le transfert des micropolluants au sein de l'organisme. La présence de ces molécules dans certains laits a nécessité la mise en place d'expérimentations en situations contrôlées afin de préciser le transfert vers le lait de quelques molécules modèles (Grova *et al.*, 2002). Les travaux présentés dans cette thèse ont eu pour but de caractériser le transfert des micropolluants à partir de l'ingestion d'herbe contaminée. Le transfert de HAP à partir du sol a aussi été pris en compte dans l'une des études.

### **1. Extraction ruminale des POP des matrices fourragères ou du sol**

L'alimentation est la voie principale d'apport de polluants organiques chez les ruminants (Kimbrough *et al.*, 1984 ; McLachlan *et al.*, 1990 ; McLachlan *et al.*, 1993). La disponibilité réduite de travaux sur le transfert de POP à partir de l'ingestion de fourrage a été à l'origine de nos études. Au cours de nos expérimentations, nous avons formulé l'hypothèse que la flore microbienne ou le jus de rumen contribuent à l'extraction des POP à partir des matrices ingérées. La dégradation des aliments commence dès leur entrée dans le rumen par la digestion microbienne. La microflore participe à la dégradation des aliments et des fibres végétales. Elle va dégrader l'amidon, la cellulose, l'hémicellulose ou encore la pectine (Van Soest, 1982). L'analogie de ces composés polyaromatiques avec la structure hétérocyclique des POP et le potentiel d'attaque des bactéries ruminales suggèrent que leur libération de la matrice végétale se produit dans le rumen. De plus, le temps de passage des aliments dans le réticulo-rumen (de 25 à 60 h en moyenne selon Van Soest, 1982) peut être jugé assez long pour que les POP soient libérés et probablement transférés à l'organisme.

D'après la littérature, les POP s'adsorbent aux cires cuticulaires des végétaux (Thomas *et al.*, 1998 ; Bakker *et al.*, 2001 ; Wang *et al.*, 2004) et se trouvent principalement sur les couches extérieures du végétal. L'étude *in sacco* présentée dans le premier chapitre expérimental de cette thèse, a permis de mettre en évidence pour la première fois que les HAP sont libérés très rapidement de la matrice végétale, comparativement à la vitesse de dégradation des alcanes cuticulaires et de la matière sèche. Ce résultat peut être extrapolable aux PCDD/F et aux PCB.

Cependant, l'extraction d'un polluant de sa matrice ne renseigne pas sur l'absorption éventuelle des composés. Pour qu'un polluant soit absorbé, deux phases sont indispensables : une première phase d'extraction des polluants de la matrice considérée et une deuxième phase de solubilisation. La première phase a été mise en évidence pour les HAP (approche *in sacco*). Les mécanismes de solubilisation et d'absorption restent quant à eux méconnus. Fires *et al.* (2002) ont suggéré par exemple que les PCDD/F ne sont pas absorbés au niveau du rumen, mais plutôt dans l'iléon. Des travaux sur les mécanismes d'absorption des contaminants chez le ruminant laitier devraient être envisagés.

La matière organique du sol est responsable de la rétention de quantités significatives de polluants organiques (humus), particulièrement des HAP semi-volatiles, des PCB et des pesticides chlorés (Khol et Rice, 1998). Un travail approfondi sur la sorption de PYR lors d'incubation de sédiments a montré que le PYR était plus largement séquestré dans l'humine que dans les acides humiques (Guthrie *et al.* 1999). Il est probable qu'une maturation longue permette des liaisons covalentes, et donc plus fortes, entre les POP et le sol. De ce fait, Macleod et Semple (2003) ont observé des diminutions significatives pour l'extraction du PYR par un mélange méthanol/eau et par le n-butanol avec l'augmentation du temps de contact entre le PYR et le sol. Très récemment, il a été observé que la désorption des HAP « historiques » (aussi appelés anciens ou natifs) du sol est plus lente ou plus difficile que la désorption de HAP ajoutés (Vessigaud, 2007). Selon Macleod et Semple (2003), il est nécessaire d'étudier à long terme le rôle de la communauté microbienne sur la formation de résidus non extractibles par les solvants. Ces éléments sur les modalités de fixation des POP dans le sol, nous amènent à conclure que l'extraction des HAP d'un sol artificiellement contaminé (maturation d'un mois) est probablement plus importante que l'extraction des HAP d'un sol naturellement contaminé. Ce niveau de questionnement s'applique également aux matrices végétales : qu'en est-il de l'extraction de POP de matrices végétales naturellement contaminées comparativement à des matrices végétales artificiellement contaminées ?

## **2. Variation de la biodisponibilité des POP selon le composé**

L'accumulation d'un composé dans l'organisme animal ou dans les produits animaux peut être définie par le terme de biodisponibilité. D'après Fries (1996), il s'agit de la fraction du composé absorbée dans le tractus gastro-intestinal et stockée, métabolisée ou excrétée par l'animal. McLachlan *et al.* (1990) indiquent que la biodisponibilité chez les ruminants laitiers

peut être déterminée par le FT des contaminants vers le lait. D'une manière globale les molécules organochlorées sont transférées vers le lait à des niveaux élevés tandis que les HAP parents sont faiblement transférés. Dans notre étude, des FT élevés ont été observés pour les PCB et les PCDD/F. Ils varient de 5 à 90% pour les PCB, et de 1 à 40% pour les PCDD/F. Pour ce qui est des HAP les FT ne dépassent pas 2%. Les niveaux de transfert entre les deux familles PCDD/F et PCB sont apparus relativement distincts suggérant un comportement différent des molécules. Cela peut être observé dans les figures 22 et 23 (profils des PCDD/F et des PCB indicateurs dans le foin contaminé et dans le lait) révélant des profils différents entre les deux matrices. Ainsi, les congénères les plus chlorés sont beaucoup plus présents dans le foin que dans le lait. Cela suggère une biotransformation significative dans l'organisme animal de certains congénères (particulièrement l'OCDD et le PCB 101). Ainsi, l'hypothèse d'une déchloration (notamment pour les molécules avec  $\geq 6$  atomes de chlore) semble être le principal élément d'explication de cette biotransformation chez le ruminant, comme cela a été suggéré auparavant par d'autres auteurs (Firestone *et al.*, 1979 ; Rappe *et al.*, 1987 ; McLachlan *et al.*, 1990 ; Olling *et al.*, 1991 ; Fries *et al.*, 1999). La faible absorption des molécules les plus chlorées peut être aussi suggérée. Des différences de transfert et donc d'absorption sont ainsi manifestes entre les composés.

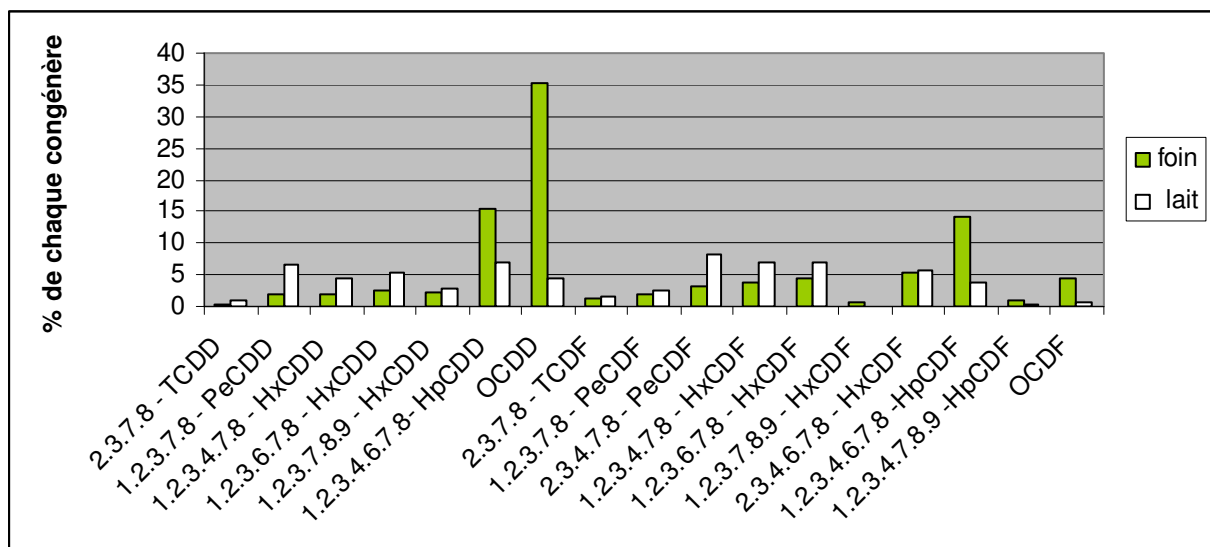


Figure 22 : Comparaison des profils des PCDD/F entre le foin contaminé et le lait de chèvre ayant consommé ce foin.

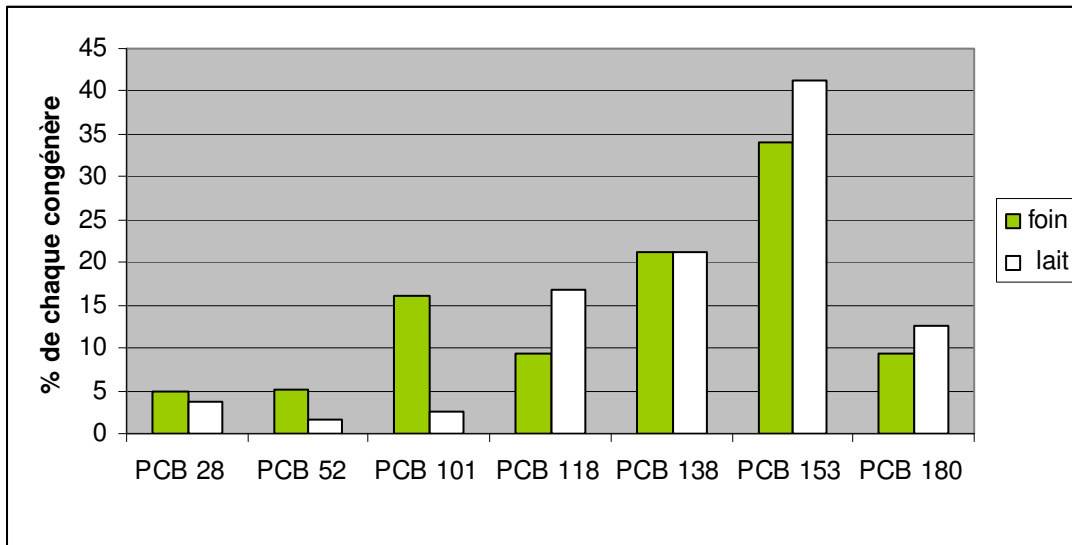


Figure 23 : Comparaison des profils des PCB indicateurs entre le foin contaminé et le lait de chèvre ayant consommé ce foin.

Les résultats obtenus par Grova *et al.* (2002) indiquent une différence significative de comportement entre la TCDD et les 3 HAP (à savoir le PHE, le PYR et le B[a]B). Le transfert le plus élevé a été trouvé pour la molécule chlorée. Plus tard il a été montré que le PHE est largement métabolisé par l'organisme animal (Grova *et al.*, 2005). Un faible transfert des molécules parents a également été montré au cours du présent travail. Par ailleurs, l'apparition croissante des métabolites de HAP a aussi été mis en évidence suite à l'ingestion de matrices telles que le foin et le sol (chapitre 2). Les travaux de Grova *et al.* (2005) avaient permis de préciser le processus de biotransformation des HAP au sein de l'organisme des ruminants et la partition des molécules natives et de leurs métabolites dans les produits d'excrétion. Nos travaux ont à leur tour contribué à préciser les transferts à partir des matrices herbe et sol. Ainsi, pour ces matrices, les polluants organochlorés semblent préférentiellement transférés sous la forme de composés parents et les HAP principalement sous la forme de composés biotransformés.

L'hypothèse que la TCDD soit synthétisée dans l'organisme a été formulé par Laurent (2003). Cette synthèse peut provenir de la déchloration de certains PCDD, phénomène démontré par Wittich (1998) chez des micro-organismes. Dans le travail présenté au chapitre 3, il a été trouvé que les PCDD/F plus chlorés sont en effet les moins transférés, ce qui peut alimenter l'hypothèse d'une biotransformation, et l'obtention de molécules possédant moins d'atomes de chlore, ou d'une faible absorption. Selon Willet *et al.* (1989), les PCB seraient

partiellement dégradés chez la vache laitière, notamment lors de la fermentation de la ration dans le rumen. Si l'on tient compte de la forte libération des HAP de la matrice herbe dans le rumen (cf. chapitre 1), il se peut que ces molécules soient aussi dégradées et partiellement absorbées au niveau du rumen.

Il faut ajouter que le transfert des molécules modèles telles que la TCDD (pour le cas des dioxines) ou le B[a]P (pour le cas des HAP) n'est pas suffisant pour prédire le comportement des composés de la même famille. La relation directe entre les caractéristiques physico-chimiques des molécules, telles que l'hydrophobicité, et leur transfert vers le lait, n'explique pas le comportement de l'ensemble des congénères. Ainsi, l'hydrophobicité des composés, et en conséquence le  $\log K_{ow}$ , ne peut être le seul déterminant du devenir des polluants organiques lipophiles dans la chaîne alimentaire aquatique ou terrestre. La susceptibilité métabolique est également un facteur qui influencera directement le transfert des contaminants vers le lait (Feidt, 2004). La spécificité de la liaison avec le système enzymatique mono-oxygénase, accrédité par la littérature (Feidt, 2004), peut expliquer les différences d'absorption, et ainsi des différences de transfert, entre molécules.

### **3. Transfert de POP vers le lait et conséquences en terme de sécurité alimentaire**

Dans le cadre de cette thèse, la biotransformation des HAP a été confirmé, notamment pour le PYR. Ce résultat nous amène à nous interroger sur les normes actuelles, fondées sur la teneur en molécules parents dans les matrices alimentaires. En terme de sécurité des aliments, il conviendra donc de s'intéresser au potentiel toxique à la fois des molécules parents et de leurs métabolites. La toxicité du 1-OH-PYR devrait en particulier être abordée car il s'agit du métabolite majeur dans le lait. Les mécanismes de toxicité des POP restent inconnus, surtout si l'on tient compte des situations réelles d'exposition où interfèrent en particulier toutes les autres molécules. Ainsi, des études cliniques sur la toxicité des polluants et des métabolites permettraient d'aboutir à des conclusions sur les dangers réels de ces molécules pour l'espèce humaine et les risques associés.

Pour ce qui est des molécules organochlorés, nous avons observé que le dépassement des normes en vigueur peut être très rapide. Ainsi, le lait a été contaminé à plus de 3 pg/g de MG (OMS-I-TEQ) en PCDD/F 15 jours après l'ingestion d'un foin contaminé. La teneur de 6 pg/g de MG a même été dépassée 15 jours après l'ingestion du foin contaminé lorsque les PCB

sont pris en compte avec les PCDD/F. Les teneurs obtenues révèlent donc un risque de contamination de l'homme *via* le lait.

Une des questions majeures qui résulte de nos expérimentations et qui reste en suspens est la signification physiologique des niveaux de HAP, PCDD/F ou PCB du lait. Les niveaux de concentrations observés peuvent-ils exercer des effets néfastes sur l'organisme cible ? Des travaux récents menés au sein de notre laboratoire ont par exemple montré que l'ingestion de lait contaminé par des POP pourrait affecter le métabolisme de jeunes rats (Labelle-Alvarez, 2006). Ces travaux sont actuellement poursuivis afin de préciser les voies métaboliques concernées. En parallèle, une approche comportementale a mis en évidence des différences de comportement pour les rats ayant consommé le lait contaminé. Ces premiers résultats semblent donc indiquer qu'une exposition chronique à du lait contaminé peut affecter le métabolisme et le comportement.

#### **4. Pertinence et limites des méthodes utilisées**

Les dispositifs expérimentaux utilisés lors de nos travaux ont été établis de manière à se rapprocher le plus possible de situations réelles. Les modèles bovins et caprins laitiers ont permis la réalisation en conditions contrôlées des expérimentations grâce aux infrastructures présentes au Domaine Expérimental de la Bouzule et à l'animalerie de l'ENSAIA.

La littérature indique que la phase gazeuse est la voie majeure d'exposition aux HAP des plantes (Wild *et al.*, 1992 ; Simonich et Hites, 1994 ; Horstman et McLachlan, 1998 ; Phillips, 1999). La contamination artificielle de l'herbe par pulvérisation a donc été employée avec l'objectif de véhiculer les HAP sur les plantes. Cela a permis d'homogénéiser la contamination afin d'obtenir une bonne répartition des contaminants sur l'herbe récoltée et à des niveaux devant permettre une bonne détection des molécules parents et des métabolites dans le lait et les urines. Quant à la contamination artificielle du sol, des niveaux équivalents de contamination ont été recherchés et atteints. Il se peut que la contamination artificielle limite les forces de fixation des molécules aux matrices. De ce fait, dans le sous-chapitre précédent il a été mentionné que la désorption des HAP « historiques » d'un sol est plus lente ou plus difficile que la désorption de HAP ajoutés (Vessigaud, 2007). Si la contamination artificielle des matrices utilisées peut être considérée comme une limite pour ce qui est de la fixation des molécules, du point de vue de la sécurité alimentaire les faibles transferts obtenus

dans nos études ne sont que plus rassurants. Ainsi, nous considérons que la contamination artificielle est un bon modèle pour maximiser les effets.

Nos études ont mis en évidence des faibles facteurs de transfert vers le lait, notamment pour les HAP. Une des questions qui restent en suspens concerne le devenir de la majeure partie des HAP ingérés. En effet, il convient de s'interroger également aux autres voies d'excrétion ou d'accumulation. Ainsi, la détermination des POP éliminés par la voie fécale (dans le cas du chapitre 2 et 3) et par la voie urinaire (dans le cas du chapitre 3) ainsi que leur accumulation dans les organes nous aurait permis de mieux appréhender le devenir des POP ingérés. En effet, Grova *et al.* (2002) ont trouvé par exemple que le 71,2% de la radioactivité de la TCDD reste dans l'organisme et le 88% de la radioactivité ingérée du B[a]P a été détectée dans les fèces.

En ce qui concerne les déterminations analytiques, nous avons bénéficié de l'appui et du savoir faire des collègues du LABERCA (laboratoire de référence en France pour l'analyse de résidus et de contaminants organiques dans les aliments). La collaboration avec ce laboratoire nous a permis de mener à terme les analyses de HAP et de métabolites sur les matrices foin, sol, crémophor ainsi que sur les matrices biologiques lait et urines. Les analyses des PCDD/F et PCB ont aussi été effectuées au LABERCA. Dans le cadre de nos travaux, l'analyse des HAP a été limitée à 3 composés (PHE, PYR et B[a]P) et à leurs métabolites hydroxylés majeurs. Ce choix nous semble pertinent pour les raisons évoquées dans la partie expérimentale. Il n'est cependant pas impossible que d'autres HAP aient un comportement différent au sein de l'organisme des ruminants. Nous avons également adapté dans notre laboratoire une méthode d'extraction et de dosage des HAP de l'herbe à partir de la méthode de Dugay *et al.* (2002). Le dosage a été effectué par HPLC couplé à un détecteur fluorimétrique. La séparation et la quantification des pics a permis le dosage de 12 HAP des 16 listés par la US-EPA. Cette méthode est cependant limitée dans le fait qu'elle n'utilise pas de standards internes deutérés.



**CONCLUSION GENERALE  
ET  
PERSPECTIVES**

## CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Les recherches développées dans cette thèse ont eu pour objectif de contribuer à la connaissance du transfert de POP (PCDD/F, PCB et HAP) des fourrages vers le lait. Dans un premier temps, et dans l'optique d'approfondir nos connaissances sur le rôle du rumen nous avons montré que ces molécules sont extraites rapidement de la matrice herbe et à des niveaux élevés. D'après les résultats obtenus pour les HAP de l'herbe à partir de la méthode *in sacco*, nous suggérons que les PCDD/F et les PCB sont également extraits du foin dans le rumen. De ce fait, tous les congénères PCDD/F et PCB ont été transférés dans le lait, avec des facteurs de transfert variant selon la molécule. Pour ce qui est des HAP, ils sont faiblement transférés et fortement métabolisés, la voie urinaire étant la principale voie d'excrétion, et le 1-OH-PYR le métabolite majeur. Les différentes structures chimiques des molécules peuvent être à l'origine des différences de transfert même au sein d'une famille de polluants. Jusqu'à présent, il était admis que le taux de transfert peut être modulé selon plusieurs paramètres dont la matrice ingérée (Laurent *et al.*, 2005). Les résultats présentés dans cet ouvrage montrent que les cinétiques d'apparition des HAP dans le lait sont similaires quelle que soit la matrice d'apport (foin ou sol). Le taux de transfert vers l'urine a quant à lui été supérieur après l'ingestion de sol. Ce résultat doit inciter les éleveurs à limiter au maximum les pratiques conduisant à l'ingestion de sol (surpâturage...)

Il a été constaté que les molécules organochlorées sont transférées à des niveaux importants, contrairement aux HAP, faiblement transférés. Par contre, les niveaux des concentrations trouvés pour les PCDD/F et les PCB sont bien moindres (de l'ordre du ng/kg MG) que les concentrations trouvées pour les HAP (de l'ordre du ng/mL de lait entier). Quelle sera donc la signification toxicologique de ces différents niveaux de concentration entre ces familles de molécules ? Les conséquences toxiques, seront-elles les mêmes suite à l'ingestion d'un lait contaminé en dioxines ou l'ingestion d'un lait contaminé à des concentrations 1000 fois plus élevées en HAP ? Pour pouvoir répondre à ces questions, l'étude de la toxicité des molécules doit être précisée. Rappelons cependant que les normes européennes fixes comme limites supérieures : 1 µg/kg de poids à l'état frais pour le B[a]P et à 3 pg I-TEQ/g de MG pour les PCDD/Fs, PCB. Il semblerait donc qu'en terme de toxicité le rapport varie aussi d'environ 1000 entre les deux familles considérées. A notre connaissance, aucune norme n'a été définie pour les métabolites de HAP qui pourtant peuvent être détectés dans le lait à des niveaux bien plus élevés que les molécules parents.

Une autre perspective peut être l'étude d'autres contaminants contenant des éléments halogénés tels que les polybromobiphényles (PBB), les polybromodiphényléthers (PBDE) ou des pesticides utilisés en agriculture pendant des années. La persistance de ces composés dans des sols contaminés pourrait entraîner des risques de transfert vers le lait notamment dans les exploitations où le pâturage est intensif.

Actuellement, peu de données sont disponibles sur le transfert des POP de la matrice sol. Est-il finalement un vecteur de transfert plus important que l'herbe ? Si oui, quels sont les vrais risques ? Les perspectives devraient donc aller dans le sens d'études approfondies sur le transfert vers le lait de ces molécules à partir de sols naturellement contaminés. Le transfert de contaminants à partir d'autres matrices fourragères telles que les légumineuses, les céréales ou d'autres graminées est aussi une perspective à envisager. A notre connaissance, l'adhésion des POP à d'autres espèces végétales est méconnu. Le dépôt des POP sur la cuticule est-il semblable pour toutes les espèces ? Quels sont les alcanes principaux cibles ? Il se peut en effet que les différentes structures physiologiques entre les espèces influencent l'accumulation de POP et les niveaux de transfert vers le lait.

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

- Abraham K., Hille A., Ende M. and Helge H. 1994. Intake and fecal excretion of PCDDs, PCDFs, HCB and PCB (138, 153, 180) in a breast-fed and a formula-fed infant. *Chemosphere*, **29** : 2279-2286.
- Abraham K., Knoll A., Ende M., Papke O. and Helge H. 1996. Intake, fecal excretion, and body burden of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in breast-fed formula-fed infants. *Pedriatic Research*, **40** : 671-679.
- Aito A. 1974. Effect of chrysene and carbon tetrachloride administration on rat hepatic microsomal monooxygenase and UDPglucuronosyltransferase activity. *FEBS Lett.*, **42** : 46-48.
- Arstila A.V., Reggiani G., Sorvari T.E., Räisänen S. and Wipf H.K. 1981 Elimination of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxine in goat milk. *Toxicology Letters*, **9** : 215-219.
- Assimakopoulos, P. A., K. Divanes, Pakou, A.A., Stamoulis, K.C., Mantzios, A.S. and Nikolaou, E. 1995. Radiostrontium transfer to sheep's milk as a result of soil ingestion. *The Science of the Total Environment*, **172**: 17-20.
- Bakker M.I., Verenhout M. Sijm D.T.H.M. and Kolloffel C. 1999. Dry deposition of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons in three plantago species. *Environmental Toxicology & Chemistry*, **18**(10): 2289-2294.
- Bakker M.I., Casado B., Koerselman J.W., Tolls J. and Kollöffel C. 2000. Polycyclic aromatic hydrocarbons in soil and plant samples from the vicinity of an oil refinery. *The Science of the Total Environment*, **263** : 91-100.
- Bakker M. I., Koerselman J. W., Tolls J. and Kolloffel C. 2001. "Localization of deposited polycyclic aromatic hydrocarbons in leaves of plantago. *Environmental Toxicology & Chemistry* **20**(5): 1112-1116.
- Bard D. 2004. Impact sur la santé des hydrocarbures aromatiques polycycliques halogénés : état des connaissances. Dioxines & Polluants Organiques Persistants. Quelles sources d'émissions ? Quels impacts ? Comment maîtriser les rejets ? ADEME.
- Barr W.H. and Riegelman S. 1970. Intestinal drug absorption and metabolism I : comparison of methods and models to study physiological factors of *in vitro* and *in vivo* intestinal absorption. *J. Pharm. Sci.*, **59** : 154-163.
- Bjorseth A. and Becher G. 1986. Polycyclic aromatic hydrocarbons in workplace atmospheres: occurrence and determination. CRC Press, Boca Raton, Florida, 1p.
- Blanchart G., Picard J.F., Boisaubert B. and Oleffe P. 1993. Digestibilité *in vitro* d'aliments forestiers chez le cerf (*Cervus elaphus*), le chevreuil (*Capreolus capreolus*) et le mouton (*Ovis aries*). *Gibier Faune Sauvage*, **10** : 203-216.

- Bock K.W., van Clausbruch U.C. and Winne D. 1979. Absorption and metabolism of naphthalene and benzo[a]pyrene in the rat jejunum in situ. *Medical biology*, **57** : 262-264.
- Bories G. 1993. Résidus alimentaires dans les laits animaux et lait de femme. Biologie de la lactation. Jack Martinet et Louis-Marie Houdebine. *Editions INSERM/INRA*.
- Boon, J. P., Eijgenraam, F., Everaarts, J.M. and Duinker, J.C. 1989. "A structure-activity relationship (SAR) approach towards metabolism of PCBs in marine animals from different trophic levels. *Marine Environmental Research* **27**(3-4): 159-176.
- Borlakoglu, J. T. and J. P. G. Wilkins (1993). "Metabolism of di-, tri-, tetra-, penta- and hexachlorobiphenyls by hepatic microsomes isolated from control animals and animals treated with aroclor 1254, a commercial mixture of polychlorinated biphenyls (pcbs)." *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology* **105**(1): 95-106.
- Bosveld A.T.C., de Bie P.A.F., van den Brink N.W., Jongepier H. and Klomp A.V. 2002. In vitro EROD induction equivalency factors for the 10 PAHs generally monitored in risk assessment study in the Netherlands. *Chemosphere*, **49**: 75-83.
- Bouchard M. and 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.
- Boyland B.E. and Sims P. 1964. Metabolism of polycyclic compounds. The metabolism of pyrene in rats and rabbits. *Biochem. J.*, **90**: 391-398.
- 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.
- Brouwer A., Ahlborg U.G., Rolaf van Leeuwen F.X., Mark Feeley M., G. Ahlborg U., Brouwer B., Carlsen A. and Feeley M. 1998. Report of the who working group on the assessment of health risks for human infants from exposure to PCDDS, PCDFS and PCBS. *Chemosphere*, **37**(9-12): 1627-1643.
- Bryselbout C., Henner P. and Lichtfouse E. 1999. Fossil fuel biomarkers in plant waxes as pollution parameters. *The Science of the Total Environmen.*, **222** : 201-204.
- Bryselbout C., Henner P., Carsignol J. and Lichtfouse E. 2000. Polycyclic aromatic hydrocarbons in highway plants and soils. Evidence for a local distillation effect. *Analisis*, **28** (4) : 32-35.

- Buesen R., Mock M., Seidel A., Jacob J. and Lampen A. 2002. Interaction between metabolism and transport of benzo[a]pyrene and its metabolites in enterocytes. *Toxicology and applied pharmacology*, **183**: 168-178.
- Buet A. Impact biologique des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) chez l'anguille européenne. Thèse ADEME. Février 2002.
- Cavret S. Transfert *in vitro* des hydrocarbures aromatiques polycycliques dans les épithéliums mammaire et intestinal. Thèse. Sciences Agronomiques. Décembre 2002. INPL.
- Cavret S. and Feidt C. 2005. Intestinal metabolism of PAH: *in vitro* demonstration and study of its impact on PAH transfer through the intestinal epithelium. *Environmental Research*, **98**(1): 22-32.
- Cavret S., Feidt C. and Laurent F. 2005. Differential transfer of organic micropollutants through intestinal barrier using Caco-2 cell line. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, **53**(7): 2773-2777.
- Cavret S., Feidt C., Le Roux Y. and Laurent F. 2005. Short communication: study of mammary epithelial role in polycyclic aromatic hydrocarbons transfer to milk. *Journal Of Dairy Science* , **88**(1): 67-70.
- Chipman J.K. 1982. Bile as a source of potential reactive metabolites. *Toxicology*, **25**: 99-111.
- Chipman J.K., Hiron P.C., Frost G.S. and Millburn P. 1981. The biliary excretion and enterohepatic circulation of benzo[a]pyrene and its metabolites in the rat. *Biochem. Pharmacol.*, **30**: 937-944.
- Chu I.K.M., Ng, Benoit F.M. and Moir D. 1992. Comparative metabolism of phenanthrene in the rat and guinea pig. *J. Environ. Sci. Heal. Part. B, pesticides, food contaminants, and Agricultural wastes*, **27**: 729-749.
- Constantin E. et Traldi P. Spectrométrie de masse : principes et applications. 2<sup>ème</sup> éd. Paris : Technique et documentation-Lavoisier, 1996. 279 p. ISBN : 2743000848.
- Costera A., Feidt C., Marchand P., Le Bizec B. and Rychen G. 2006. PCDD/F and PCB transfer to milk in goats exposed to a long-term intake of contaminated hay. *Chemosphere*, **64**: 650-657.
- Crépineau-Ducoulombier C. and 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.

- Crépineau C., Rychen G., Feidt C., Le Roux Y., Lichtfouse E. and Laurent F. 2003. Contamination of pastures by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in the vicinity of a highway. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51** : 4841-4845.
- Demeyer D.I. 1981. Rumen microbes and digestion of plant cell walls. *Agric. Envir.*, **6** : 295-337.
- Dewhurst R.J., Hepper D. and Webster A.J.F. 1995. Comparison of in sacco and in vitro techniques for estimating the rate and extent of rumen fermentation of a range of dietary ingredients. *Animal Feed Science and Technology*, **51** (3-4) : 211-229.
- Domingo J.L., Schuhmacher M., Agramunt M.C., Llobet J.M., Rivera J. and Muller L. 2002. PCDD/F levels in the neighbourhood of a municipal solid waste incinerator after introduction of technical improvements in the facility. *Environment International*, **28**(1-2): 19-27.
- Dove, H. and Mayes, R.W. 1991. The use of plant wax alkanes as marker substances in studies of the nutrition of herbivores: a review. *Australian Journal of Agricultural Research* **42**(6): 913-952.
- Dubois C., Arnaud M., Férézou J. Beaumier G., Porugal H., Pauli A.M., Bernard P.M., Bécue T., Lafont H. and Lairon D. 1996. Postprandial appearance of dietary deuterated cholesterol in the chylomicron fraction and whole plasma in healthy subjects. *Amer. J. Clin. Nutr.*, **64**: 47-52.
- Dugay A., Herrenknecht C., Czok M., Guyon F. and Pages N. 2002. New procedure for selective extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons in plants for gas chromatographic-mass spectrometric analysis. *Journal of Chromatography A*, **958** : 1-7.
- Eisele G.R. (1985). Naphthalene distribution in tissues of laying pullets, swine, and dairy cattle. *B. Environ. Contam. Tox.* 34:549-556.
- Elmhirst T.R.D., Chipman J.K., Ribeiro O., Hirom P.C. and Millburn P. 1985. Metabolism and enterohepatic circulation of benzo[a]pyrene-4,5-epoxy in the rat. *Xenobiotica*, **15**: 899-906.
- Feidt C., Grova N., Laurent C., Rychen G. et Laurent F. 2000. Le transfert des micropolluants organiques dans la chaîne alimentaire. Etat et perspectives de recherche. *OCL*, 7 (5) Septembre-Octobre : 431-435.
- Feidt C. 2004. Prédire la contamination des produits animaux par les polluants organiques lipophiles - Modèle laitier. HDR, INPL, 110p.



- Firestone D., Clower M., Borsetti A.P., Teske R.H. and Long P.E. 1979. Polychlorodibenzo-*p*-dioxin and pentachlorophenol residues in milk and blood of cows fed technical pentachlorophenol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **27**: 1171-1177.
- Fismes J., Schwartz C., Bispo A., Caussanel J.P., Empereur-Bissonnet P., Hulot C., Jager C., Jourdan M.J., Marot F., Morel J.L., Perrin-Ganier C. 2002. Contamination des végétaux exposés à des sites pollués par des substances organiques. Première rencontre nationale de la recherche sur les sites es sols pollués. Décembre 2002, Maison de la Chimie, Paris, France.
- Focant J.F., Eppe G., Pirard C., Massart A.C., André J.E. and De Pauw E. 2002. Levels and congeners distributions of PCDDs, PCDFs and non-*ortho* PCBs in belgian foodstuffs. Assessment of dietary intake. *Chemosphere*, **48** : 167-179.
- Foth H., Kahl R. and Khal G.F. 1988. Pharmacokinetics of low doses of benzo[a]pyrene in the rat. *Fd chem. Toxic.*, **26**: 45-51.
- Fries G.F., Marrow Jr G.S., and Gordon C.H. 1973. Long-term studies of residue retention and excretion by cows fed a polychlorinated biphenyl (Aroclor 1254). *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, **21**(1): 117-121.
- Fries, G.F. 1987. Assesment of potential residues in food derived from animals exposed to TCDD-contaminated soils. *Chemosphere*, 16: 2123-2128.
- Fries G.F. and Paustenbach D.J. 1990. Evaluation of potential transmission of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-contaminated incinerator emissions to humans *via* foods. *Journal of Toxicology and Environmental Health* , **29**: 1-43.
- Fries G.F., Paustenbach D.J. and Luksemburg W.J. 2002. Complete mass balance of dietary polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and furans in dairy cattle and characterization of the apparent synthesis of hepta- and octachlorodioxins. *J. Agr. Food Chem.*, **50** : 4226-4231.
- Fries, G.F. 1995. Transport of organic environmental contaminants to animal products. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 141: 71-109.
- Fries G.F. (1996). Ingestion of sludge applied organic chemicals by animals. *Science of the Total Environment*, **185**:93-108.
- Fries G.C., Paustenbach D.J., Mather D.B. and Luksembur W.J. 1999. A congener specific evaluation of transfer of chlorinated dibenzo-*p*-dioxines and dibenzofurans to milk of cows following ingestion of pentachlorophenol-treated wood. *Environmental Science & Technology*, **33**(8) : 1165-1170.

- Fries G.F., Paustenbach D.J. and Luksemburg W.J. 2002. Complete mass balance of dietary polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in dairy cattle and characterization of the apparent synthesis of hepta- and octachlorodioxins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50** : 4226-4231.
- Fürst P., Krause G. H. M., Hein D., Delschen T. and Wilmers K. 1993. PCDD/PCDF in cow's milk in relation to their levels in grass and soil. *Chemosphere*, **27**(8): 1349-1357.
- Gao Y. and 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. and Ollivon D. 2002. Atmospheric bulk deposition of PAHs onto France: trends from urban to remote sites. *Atmospheric Environment*, **36**(34): 5395-5403.
- Garcia C. La 3-hydroxyacyl-CoA déshydratase de l'acyl-CoA élongase: identification et caractérisation de gènes candidats chez *Arabidopsis thaliana*.. Thèse. Sciences Biologiques et Médicales (Option Biologie-Santé). Décembre 2005. Université Victor Segalen Bordeaux 2.
- Gelderblom H., Verweij J. Nooter K. and Sparreboom A. 2001. Cremophor EL: the drawbacks and advantages of vehicle selection for drug formulation. *European Journal of Cancer*, **37**(13) : 1590-1598.
- Geusau A., Tschachler E., Meixner M., Sandermann S., Pöpke O., Wolf C., Valic E., Stingl G and McLachlan M. 1999. Olestra increases faecal excretion of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *The Lancet*, **354** : 1266-1267.
- Golor G., Yamashita K., Körner W., Hagenmaier H., and Neubert D. 2001. Kinetics and inductive potency of 1,2,3,4,6,7,8-heptachlorodibenzo-p-dioxin (H7CDD) in rats. *Life sciences*, **69** : 493-508.
- Gorna-Binkul A., Keymeulen, R., Van Langenhove H. and Buszewski B. 1996. Determination of monocyclic aromatic hydrocarbons in fruit and vegetables by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **734** : 297-302.
- Grafström J.D., Moldeus P., Andersson B. and Orrenius S. 1979. Xenobiotic metabolism by isolated rat small intestinal cells. *Med. Biol.*, **57**: 287-293.
- Grova N., Laurent C., Feidt C., Rycken G., Laurent F. and Lichtfouse E. 2000. Gas chromatography-mass spectrometry study of polycyclic aromatic hydrocarbons in grass and milk from urban and rural farms. *European Journal of Mass Spectrometry*, **6** : 457-460.

- Grova N., Feidt C., Laurent C. and Rychen G. 2002. [14C] Milk, urine and feces excretion kinetics in lactating goats after an oral administration of [14C]polycyclic aromatic hydrocarbons. *International Dairy Journal*, **12**(12): 1025-1031.
- Grova N. Transfert et métabolisme des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques chez le ruminant laitier. Thèse. Sciences Agronomiques. Novembre 2003. INPL.
- Grova, N., Monteau F., Le Bizec B., Feidt C., André F. and Rychen G. 2005. Determination of Phenanthrene and Hydroxyphenanthrenes in Various Biological Matrices at Trace Levels using Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Journal Of Analytical Toxicology* **29**(3): 175-181.
- Guillén M.D. 1994. Polycyclic aromatic compounds : extraction and determination in food. *Food additives and contaminants*, **11** (6) : 669-684.
- Guthrie E.A., Bortiatynski J.M., Van Heemst J.D.H., Richman J.E., Hardy K.S., Kovach E.M. and Hatcher P.G. 1999. Determination of [<sup>13</sup>C]Pyrene sequestration in sediment microcosms using flash pyrolysis-GC-MS and <sup>13</sup>C NMR. *Environmental Science and Technology*, **33**: 119-125.
- Hakk H., Larsen G. and Feil V. 2001. Tissue distribution, excretion, and metabolism of 1,2,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in the rat. *Chemosphere*, **42** : 975-983.
- Hall S.D., Thummel K.E., Watkins P.B., Lown K.S., Benet L.Z., Paine M.F., Mayo R.R., Turgeon D.K., Bailey D.G., Fontana R.J. and Wrighton S.A. 1999. Molecular and physical mechanisms of first-pass extraction. *Drug Metab. Disp.*, **27**: 161-166.
- Haraguchi, K., Koga, K. and Kato, Y. 2005. Comparative metabolism of polychlorinated biphenyls and tissue distribution of persistent metabolites in rats, hamsters, and Guinea pigs." *Drug Metabolism And Disposition: The Biological Fate Of Chemicals* **33**(3): 373-380.
- Hietaniemi V. and Kumpulainen J.T. 1995. Contents of PCBS, organochlorine pesticide residues and PAH compounds in finnish foodstuffs. [www.mtt.fi/et/etk/fao/pdf/hietanie.pdf](http://www.mtt.fi/et/etk/fao/pdf/hietanie.pdf).
- Hietnanen E. 1980. Oxidation and subsequent glucuronisation of 3,4-benzopyrene in everted intestinal sacs in control and 3-methylcholanthrene-pretreated rats. *Pharmacology*, **21**: 233-243.
- Hippelein M., Kaupp H., Dorr G. McLachlan M. and Hutzinger O. 1996. Baseline contamination assessment for a new resource recovery facility in Germany part II: atmospheric concentrations of PCDD/F. *Chemosphere*, **32**(8): 1605-1616.

- Hofelt C.S., Honeycutt M., McCoy J.T. and Haws L.C. 2001. Development of a metabolism factor for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons for use in multipathway risk assessments of hazardous waste combustion facilities. *Regul. Toxicol. Pharm.* 33:60-65.
- Honey S., O'Keefe P., Draushuk A.T., Olson J.R., Kumar S. and Sikka H.C. 2000. Metabolism of benzo(a)pyrene by duck liver microsomes. *Compa. Biochem. Physiol. Part C*, **126** : 285-292.
- Hopkins W.G. Physiologie végétale. 2<sup>ème</sup> éd. Bruxelles : De Boeck & Larcier s.a. 2003. 514 p. ISBN : 2-7445-0089-5
- Hortsmann M. and McLachlan M.S. 1998. Atmospheric deposition of semivolatile organic compounds to two forest canopies. *Atmospheric Environment*, 32 :1799-1809.
- Hu K. and Bunce N.J. 1999. Metabolism of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and related dioxin-like compounds. *J. Toxicol. Environ. Health*, **2**: 183-210.
- Hunter J., Hirst B.H., Simmons N.L. 1993. Drug absorption limited by P-glycoprotein-mediated secretory drug transport in human intestinal epithelial Caco-2 cell layers. *Pharm. Res.*, 10: 743-749.
- Huwe, J. K. and Smith D.J. 2005. Laboratory and on-farm studies on the bioaccumulation and elimination of dioxins from a contaminated mineral supplement fed to dairy cows. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, **53**(6): 2362-2370.
- Jacob J., Grimmer G., Raab G. and Schmoltdt A. 1982. The metabolism of pyrene by rat liver microsomes and the influence of various mono-oxygenase inducers. *Xenobiotica*, **12**: 45-53.
- Jacob J. and Seidel A. 2002. Biomonitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons in human urine. *J. Chromatogr. B*, **778**: 31-47.
- Jansen P.L., Mulder G.J., Burchell B. and Bock K.W. 1992. New developments in glucuronidation research: report of a workshop on 'Glucuronidation, its role health and disease'. *Hepatology*, **15** (3): 532-544.
- Janss D.H. and Moon R.C. 1970. Absorption of intragastrically administered 7,12-dimethylbenzanthracene. *Federation Proc.*, **29** : 817 (abstract).
- Jarrige, R., 1988. Alimentation des bovins, ovins et caprins. INRA, Paris.
- Jensen D.J. and Hummel R.A. 1982. Secretion of TCDD in milk cream following the feeding of TCDD to lactating dairy cows. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **29**: 440-446.

- Johnsen N.M., Nyholm S.H., Haug K., Scholz T. and Holme J.A. 1998. Metabolism and activation of cyclopenta polycyclic aromatic hydrocarbons in liver tissue from rats and humans. *Chem. Biol. Interac.*, **113**: 217-231.
- Jones K.C., Grimmer G., Jacob J. and Johnston A.E. 1989. Changes in the polynuclear aromatic hydrocarbon content of wheat grain and pasture grassland over the last century from one site in the U.K. *The Science of the Total Environment*, **78** : 117-130.
- Jongeneelen F.J. 2001. Benchmark guideline for urinary 1-hydroxypyrene as biomarker of occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *British Occupational Hygiene Society*, **45** : 3-13.
- 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. and 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.
- Kadry A.M., Skowronski G.I., Turkall R.M. and Abdel-Rahman M.S. 1995. Comparison between oral and dermal bioavailability of soil-absorbed phenanthrene in female rats. *Toxicology letters*, **78**: 153-163.
- Kamp J.D. and Neuman H.-G. 1975. Absorption of carcinogens into the thoracic duct lymph of the rat: aminisbilbene derivatives and 3-methylchloranthrene. *Xenobiotica*, **5**: 717-725.
- Kaupp H. and Sklorz M. 1996. A method for analysing Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in plant samples. *Chemosphere*, **32** (5) : 849-854.
- Keiming S.D., Kirby K.W. and Morgan D.P. 1983. Identification of 1-hydroxypyrene as a major metabolite of pyrene in pig urine. *Xenobiotica*, **13**: 415-420.
- Kerstiens G. 1996. Signaling across the divide: a wider perspective of cuticular structure-function relationship. *Trends in Plant Science*, **1** : 125-129.
- Keymeulen R., Van Langenhove H. and Schamp N. 1991. Determination of monocyclic aromatic hydrocarbons in plant cuticles by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography*, **541** : 83-88.
- Khol S.D. and Rice J.A. 1998. The binding of contaminants to humin: A mass balance. *Chemosphere*, **36** : 251-261.
- Kimbrough R.D., Falk H., Stehr P. and Fries G. 1984. Health implications of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) contamination of residential soil. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, **14** : 47-93.

- Kipopoulou A.M., Manoli E. and Samara C. 1999. Bioconcentration of polycyclic aromatic hydrocarbons in vegetables grown in an industrial area. *Environmental Pollution*, **106** : 369-380.
- Kirby D.R. and Stuth J.W. 1980. Soil-ingestion rates of steers following brush management in Central Texas. *Journal of Range Management*, **33**(3) : 207-209.
- Koeleman M., vd Laak W.J. and Ietswaart H. 1999. Dispersion of PAH and heavy metals along motorways in the Netherlands. An overview. *The Science of The Total Environment*, **235**(1-3): 347-349.
- Kottler B.D. and Alexander M. 2001. Relationship of properties of polycyclic aromatic hydrocarbons to sequestration in soil. *Environ. Poll.*, **113**: 293-298.
- Kunst L. and Samuels A.L. 2003. Biosynthesis and secretion of plant cuticular wax. *Progress in Lipid Research*, **42**(1): 51-80.
- Labelle-Alvarez B. Intérêt de l’outil métabonomique et de l’exploration comportementale pour la mise en évidence d’effets biologiques de laits contaminés en polluants organiques persistants. Master 2 Bio-procédés, Agro-alimentaire, Nutrition, Toxicologie. Septembre 2006. Nancy Universités.
- Lake I.R., Foxall C.D., Lovett A.A., Fernandes A., Dowding A., White S. and Rose M. 2005. Effects of river flooding on PCDD/F and PCB levels in cow's milk, soil, and grass. *Environmental Science & Technology*, **39**(23): 9033-9038.
- Laher J.M., Rigler M.W., Vetter R.D., Barrowman J.A. and Patton J.S. 1984. Similar bioavailability and lymphatic transport of benzo[a]pyrene when administered to rats in different amounts of dietary fat. *Journal of lipid research*, **25** : 1337-1342.
- Lakshmanan M.R., Campbell B.S., Chirtle S.J., Ekarohita N. and Ezekiel M. 1986. Studies on the mechanism of absorption and distribution of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in the rat. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **239** : 673-677.
- Lambert A. La protéolyse par les bactéries du rumen : étude dynamique de la libération et de l’utilisation des peptides caractérisés par leur poids moléculaire. Thèse. Sciences Agronomiques. Octobre 1998. Institut National Polytechnique de Lorraine.
- Laurent C. Evaluation de l’absorption et de la distribution tissulaire de micropolluants organiques suite à l’ingestion de lait contaminé. Thèse. Sciences Agronomiques. Avril 2003. Institut National Polytechnique de Lorraine.

- Laurent C., Feidt C., Grova N. Mpassi D., Lichtfouse E., Lurent F. and Rychen G. 2002. Portal absorption of <sup>14</sup>C after ingestion of spiked milk with <sup>14</sup>C-phenanthrene, <sup>14</sup>C-benzo(a)pyrene or <sup>14</sup>C-TCDD in growing pigs. *Chemosphere*, **48**: 843-848.
- Laurent C., Feidt C. and Laurent F. 2005. Contamination des sols. Transferts des sols vers les animaux. ADEME. 216p.
- Laurent C., Marchand P., Feidt C., Le Bizec B. and Rychen G. 2005. Tissue distribution and bioconcentration factors of PCDD/Fs in the liver and adipose tissue following chronic ingestion of contaminated milk in rats. *Chemosphere*, **60**(7): 929-938.
- 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. INPL.
- Liu W., Zheng M., Wang D., Xing Y., Zhao X., Ma X and Qian Y. 2004. Formation of PCDD/Fs and PCBs in the process of production of 1,4-dichlorobenzene. *Chemosphere*, **57**(10) : 1317-1323.
- Lorber M., Fries G.F., Winters D., Ferrario J. and Byrne C. 2000. A study of the mass balance of dioxins and furans in lactating cows in background conditions. Part 2: Mass balance and bioconcentration factors. *Organohalogen compounds*, **46**: 326-329.
- Lutz S. Evaluation du risque de transfert des hydrocarbures aromatiques polycycliques du sol vers le lait chez le ruminant laitier. Thèse. 10 juillet 2006. Sciences Agronomiques. INPL.
- Lutz S., Feidt C., Monteau F., Rychen G., Le Bizec B., Jurjanz S. 2006. Effect of exposure to soil-bound polycyclic aromatic hydrocarbons on milk contaminations of parent compounds and their mono-hydroxylated metabolites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**, 263-268.
- Macleod C.J.A. and 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.
- Mader B.T. and Pankow J.F. 2000. Controlled field experiments to study the gas/particle partitioning of polychlorinated dibenzodioxins, polychlorinated dibenzofurans and of polycyclic aromatic hydrocarbons to urban, suburban, and rural particles. *Organohalogen Compounds*, **45** : 260-263.
- Maervoet, J., Chu, S.G., De Vos, S., Covaci, A., Voorspoels, S., De Schrijver, R. and Schepens, R. 2004. Accumulation and tissue distribution of selected polychlorinated biphenyl congeners in chickens. *Chemosphere*, **57**(1): 61-66.

- Maffei M. 1996. Chemotaxonomic significance of leaf wax alkanes in the gramineae. *Biochemical Systematics and Ecology*, **24**(1): 53-64.
- Malachowska-Jutczak A. and Miksch K. Accumulation of organic contamination in plant roots and the influence of plant rhizosphere on removal of PAH, TPH and heavy oil fractions from soil. In V. Šašek *et al.* (ed.) The utilization of bioremediation to reduce soil contamination : problems and solutions. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. 2003. p 359-365.
- Matsuda T., Imoaka S., Funae Y., Otori K. and Fukushima S. 1995. Induction of CYP isoenzymes in various organs of rats by 3-methylcholanthrene or  $\beta$ -naphthoflavone. *Cancer Lett.*, **97**: 137-143.
- Mayes R.W., Lamb C.S. and Colgrove P.M. 1986. The use of dosed and herbage n-alkanes as markers for the determination of herbage intake. *Journal of Agricultural Science*, **107**: 161-170.
- McDanell R. and McLean A.E. 1984. Differences between small and large intestine and liver in the inducibility of microsomal enzymes in response to stimulation by phenobarbitone and betanaphthoflavone in the diet. *Biochem. Pharmacol.*, **33**: 1977-1980.
- McLachlan M.S., Thoma H., Reissinger M. and Hutzinger O. 1990. PCDD/F in an agricultural food chain. Part1 : PCDD/F mass balance of a lactating cow. *Chemosphere*, **20** : 1013-1020.
- McLachlan M.S. 1993. Mass balance of polychlorinated biphenyls and other organochlorine compounds in a lactating cow. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **46** : 1166-1172.
- McLachlan M.S. 1994. Model of the fate hydrophobic contaminants in cows. *Environ. Sci. Technol.* **28**:2407-2414.
- McLachlan M.S. 1995. Accumulation of PCDD/F in an agricultural food chain. *Organohalogen compounds*, **26** : 105-106.
- McLachlan M.S. 1996. Bioaccumulation of PCDD/F in an agricultural food chains. *Environmental Science and Technology*, **30** : 252-259.
- McLachlan M.S. 1997. A simple model to predict accumulation of PCDD/Fs in an agricultural food chain. *Chemosphere*, **34** (5-7): 1263-1276.
- McLachlan M. S. and Richter W. 1998. Uptake and transfer of PCDD/Fs by cattle fed naturally contaminated feedstuffs and feed contaminated as a result of sewage sludge application. 1. Lactating cows. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, **46**: 1166-1172.



- Meharg A.A., Wrigth J., Dyke H. and Osborn D. 1998. Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) dispersion and deposition to vegetation and soil following a large scale chemical fire. *Enviromental Pollution*, **99** : 29-36.
- Michalet-Doreau B., Verité R. et Chapoutot P. 1987. Méthodologie de mesure de la dégradabilité *in sacco* de l'azote des aliments dans le rumen. *Bull. Tech. C.R.Z.V. Theix I.N.R.A.*, **69** : 5-7.
- Michalet-Doreau B. et Nozière P. 1999. Intérêts et limites de l'utilisation de la technique des sachets pour l'étude de la digestion ruminale. *INRA Productions Animales*, **12** (3) : 195-206.
- Michel G., Salomon F.V. and Gutte G. 1987. Morphologie Landwirtschaftlicher Nutztiere. VEB Deutscher Landwirtschaftsverlg.
- Modica R., Fiume M., Guitani A. and Bartosek I. 1983. Comparative kinetics of benzo[a]anthracene, chrysene and triphenylene in rats after oral administration. I. Study with single compounds. *Toxicology letters*, **18** : 103-109.
- Moore C.J., Bachhuber A.J. and Gould M.N. 1983. Relationship of mammary tumor susceptibility, mammary cell-mediated mutagenesis, and metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons in four types of rats. *J.N.C.I.*, **70**: 777-784.
- Moser G.A. and McLachlan M.S. 2001. The influence of dietary concentration on the absorption and excretion of persistent lipophilic organic pollutants in the human intestinal tract. *Chemosphere*, **45** : 201-211.
- Mouriot J. 2005. Extractibilité du phénanthrène et du benzo[a]pyrène par du jus de rumen synthétique. DEA. INPL.
- Müller J.F., Hawker D.W., McLachlan M.S. and Connell D.W. 2001. PAHs, PCDD/Fs, PCBs and HCB in leaves from Brisbane, Australia. *Chemosphere*, **43**(4-7) : 507-515.
- Narbonne J.F. 1991. Mécanismes de bio-transformation des polluants organiques chez les animaux marins. *Océanis*, **17**(4): 449-458.
- Nessel C.S., Amoruso M.A., Umbreit T.H. and Gallo M.A. 1990. Hepatic aryl hydroxylase and cytochrome P450 induction following the transpulmonary absorption of TCDD from intratracheally instilled particles. *Fundamental and applied Toxicology*, **15**: 500-509.
- Niimi, A. J. (1996). Evaluation of PCBs and PCDD/Fs retention by aquatic organisms. *Science of The Total Environment*, **192**(2): 123-150.
- Nordquist M., Thakker D.R. and Vyas K.P. 1981. Metabolism of chrysene and phenanthrene to bay region diol epoxydes by rat liver enzymes. *Mol. Pharmacol.*, **19**: 168-178.

- Obach R.S., Zhang Q.Y., Dunbar D. and Kaminsky L.S. 2001. Metabolic characterization of the major human small intestinal cytochrome P450s. *Drug Metab. Disp.*, **29**: 347-352.
- Olling M., Derks H.J.G.M., Berende P.L.M., Liem A.K.D. and De Jong A.P.J.M. 1991. Toxicokinetics of eight <sup>13</sup>C-labelled polychlorinated dibenzo-p-dioxins and -furans in lactating cows. *Chemosphere*, **8-10** : 1377-1385.
- Oomen A.G., Hack A., Minekus M., Zeijdner E., Corneils C., Schoeters G., Verstraete W., Van de Wiele T., Wragg J., Rempelberg C.J.M., Sips A.J.A.M. and Van Wijnen J.H. 2002. Comparison of five in vitro digestion models to study the bioaccessibility of soil contaminants. *Environ. Sci. Technol.*, **36** : 3326-334.
- 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.
- Ørskov, E.R. and McDonald, P. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *J. Agric. Sci.*, v.92, p.499-503, 1979.
- Pensado L., Blanco E., Casais M.C., Mejuto M.C., Martínez E., Carro A.M. and Cela R. 2004. Strategic sample composition in the screening of polycyclic aromatic hydrocarbons in drinking water samples using liquid chromatography with fluorimetric detection. *Journal of Chromatography A*, **1056**(1-2) : 121-130.
- Peters W.H.M. and Kremers P.G. 1989. Cytochromes P-450 in the intestinal mucosa of man. *Biochem. Pharmacol.*, **38**: 1535-1543.
- Phillips D.H. 1999. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the diet. *Mutation Research*, **443**, 139-147.
- Pigini D., Cialdella A.M., Faranda P. and Tranfo G. 2006. Comparison between external and internal standard calibration in the validation of an analytical method for 1-hydroxypyrene in human urine by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications In Mass Spectrometry: RCM*, **20** : 1013-1018.
- Pirard, C. and E. De Pauw (2005). Uptake of polychlorodibenzo-p-dioxins, polychlorodibenzofurans and coplanar polychlorobiphenyls in chickens. *Environment International*, **31**(4): 585-591.
- Porter C.W., Dworaczek D. and Gurtoo H.L. 1982. Biochemical localization of aryl hydroxylase in the intestinal epithelium of the rat. *Cancer Research*, **42**: 1283-1285.

- Rahman A. and Barrowman J.A. 1986. The influence of bile on the bioavailability of polynuclear aromatic hydrocarbons from the rat intestine. *Can. J. Physiol. Pharm.* **64** : 1214-1218.
- Raiman J. , Niemi R. Vepsäläinen J., Yrityk K., Järvinen T., Mönkkönen J. 2001. Effects of calcium on transport of clodronate and its esters through Caco-2 cells. *Int. J. Pharm.*, **213** : 135-142.
- Ramsey J.C., Hefner J.G., Karbowski R.J., Braun W.H. and Gehring P.J. 1982. The in vivo biotransformation of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) in the rat. *Toxicol. Appl. Pharm.*, **65** : 180-184.
- Rappe C., Anderson R., Bergqvist P.-A., Brohede C., Hansson M., Kjelleer L.-O., Lindstrom G., Marklund S., Nygren M. and Swanson S. 1987. Sources and relative importance of PCDD and PCDF emissions. *Waste Management & Research*, **5**(3): 225-237.
- Raszyk J., Neca J., Salava J. and Palac J. 1999. A pilot study of 1-hydroxypyrene in the urine of pigs and cows. *Vet. MED.-CZECH.*, **44**: 359-363.
- Rees E.D., Mandelstam P., Lowry J.Q. and Lipscomb H. 1971. A study of the mechanism of intestinal absorption of benzo[a]pyrene. *Biochim. Biophys. Acta*, **225** : 96-107.
- Rhode S., Moser G.A., Pöpke O. and McLachlan M.S. 1999. Clearance of PCDD/Fs via the gastrointestinal tract in occupationally exposed persons. *Chemosphere*, **38**: 3397-3410.
- Rojo Camargo M.C. and Toledo M.C.F. 2003. Polycyclic aromatic hydrocarbons in Brazilian vegetables and fruits. *Food Control*, **14** : 49-53.
- Roos P.H., Van Afferden M., Strotkamp D., Pfeifer F. and 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.
- Roos P.H., Tschirbs S., Welge P., Hack A., Theegarten D., Mogilevski G., Wilhelm M. 2002. Induction of cytochrome P450 1A1 in multiple organs of minipigs after oral exposure to soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH). *Arch. Toxicol.*, **76**: 326-334.
- Rose J.Q., Ramsey J.C., Wentzler T.H., Hummel R.A. and Gerhing P.J. 1976. The fate of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin following single and repeated oral doses to the rat. *Toxicol. Applied Pharmacol.*, **36**: 209-226.
- 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.

- Ruoff U. 1995. Untersuchungen zum Übergang ausgewählter polychlorierter dibenzo-p-dioxine und -furan nach oraler Supplementierung in die Milch laktierender Kühe. Thesis. Christian-Albrechts-Universität.
- Russell J.B., Sniffen C.J. and 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.
- Rycken G., Ducoulombier-Crépineau C., Grova N., Jurjanz S and Feidt C. 2005. Modalités et risques de transfert des polluants organiques persistants vers le lait. *INRA Productions Animales*, **18** : 355-366.
- Sabijić A., Güsten H., Schönherr J. and Riederer M. 1990. Modeling plant uptake of airborne organic chemicals.1. Plant cuticle/water partitioning and molecular connectivity. *Environmental Science and Technology*, **24**(9) : 1321-1326.
- Sales-Duval M. Effets des interdépendances nutritionnelles entre bactéries protéolytiques sur l'efficacité de la protéolyse dans le rumen. Thèse. Sciences Agronomiques. Décembre 2000. INPL.
- Schlummer M., Moser G.A. and McLachlan M.S. 1998. Digestive tract absorption of PCDD/Fs, PCBs and HCB in humans: mass balances and mechanistic considerations. *Toxicol. Applied Pharmacol.*, **152** : 128-137.
- Schuler F., Schmid P. and Schlatter Ch. 1997. The transfer of polychlorinated dibenzo-p-dioxines and dibenzofurans from soil into eggs of foraging animals. *Chemosphere*, **34**: 711-718.
- Schuhmacher M., Bocio A., Agramunt M.C.C, Domingo J.L. and de Kok H.A.M. 2002. PCDD/F and metal concentrations in soil and herbage samples collected in the vicinity of a cement plant. *Chemosphere*, **48**(2): 209-217.
- Schumacher M., Domingo J.L., Llobet J.M., Lindström G. and Wingfors H. 1999. Dioxin and dibenzofuran concentrations in blood of a general population from Tarragona, Spain. *Chemosphere*, **38** : 1123-1133.
- Schuhmacher M., Jones K.C. and Domingo J.L. 2006. Air-vegetation transfer of PCDD/PCDFs: an assessment of field data and implications for modeling. *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)*, **142**(1): 143-150.
- Sewart A. and Jones K.C. 1996. A survey of PCB congeners in U.K. cow's milk. *Chemosphere*, **32** (12) : 2481-2492.
- Simonich S.L. and Hites R.A. 1994. Vegetation-atmosphere partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental Science and Technology*, **28** (5) : 939-943.

- Sims P. 1970. Qualitative and quantitative studies on the metabolism of a series of aromatic hydrocarbons by rat-liver preparations. *Biochem. Pharmacol.*, **19**: 795-818.
- Sims R.C., Overcash M.R. 1983. Fate of polynuclear aromatic compounds (PNAs) in soil-plant systems. *Residue Reviews*, **88**:1-68.
- Slob W., Olling M., Derks H.J.G.M. and Jong A.P.J.M. 1995. Congener-specific bioavailability of PCDD/Fs and coplanar PCBs in cows: laboratory and field measurements. *Chemosphere*, **31**(8) : 3827-3838.
- Smith K.E.C. and Jones K.C. 2000. Particles and vegetation: implications for the transfer of particle-bound organic contaminants to vegetation. *Science of the Total Environment*, **246**: 207-236.
- Smith K.E.C., Green M., Thomas G.O. and Jones K.C. 2001. Behavior of sewage sludge-derived PAHs on pasture. *Environmental Science and Technology*, **35** : 2141-2150.
- Smith K.E.C., Thomas G.O. and Jones K.C. 2001. Seasonal and species differences in the air-pasture transfer of PAHs. *Environmental Science and Technology*, **35** : 2156-2165.
- Stammitti L., Derridj S. and Garrec J.P. 1996. Leaf epicuticular lipids of *Prunus laurocerasus*: importance of extraction methods. *Phytochemistry*, **43**(1): 45-48.
- Stephens R.D., Petreas M.Y. and Hayward D.G. 1995. Biotransfer and bioaccumulation of dioxins and furans from soil : chickens as a model for foraging animals. *The Sci. Total Environ.*, **175** : 253-273.
- Stevens J.B. and Gerbec N. 1988. Dioxin in the agricultural food chain. *Risk Analysis*, **8**: 329-335.
- Stewart C.S. and Bryant M.P. 1988. The rumen bacteria. The rumen microbial ecosystem. Edition P.N. Hobson, Elsevier Applied Science.
- Tai H. L., McCreynolds J. H., Goldstein J.A., Eugster H.P., Sengstag C., Alworth W.L. and Olson J.R. 1993. Cytochrome-P4501A1 Mediates the Metabolism of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzofuran in the Rat and Human. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **123**(1): 34-42.
- Tankari Dan-Badjo A. Modalités de contamination du ray-grass par les éléments du groupe platine (PGE) et les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) à proximité des voies routières. Thèse. Janvier 2007. Sciences Agronomiques. INPL, Nancy.
- Thomas G.O., Smith K.E.C., Sweetman A.J. and Jones K.C. 1998. Further studies of the air-pasture transfer of polychlorinated biphenyls. *Environmental Pollution*, **102**(1): 119-128.

- Thomas, G. O., Sweetman, A.J. and Jones, K.C. 1999. Metabolism and body-burden of PCBs in lactating dairy cows. *Chemosphere*, **39**(9): 1533-1544.
- Thomas G.O., Jones J.L., Jones K.C. 2002. Polychlorinated dibenzo-*p*-dioxin and furan (PCDD/F) uptake by pasture. *Environmental Science & Technology*, **36**(11): 2372-2378.
- Tomainová M., Hajšlová J., Pavelka Jr J., Kocourek V. and Klimová I. 1998. Microwave-assisted solvent extraction - a new method for isolation of polynuclear aromatic hydrocarbons from plants. *Journal of Chromatography A*, **827**(1) : 21-29.
- Travis C.C. and Arms A. 1988. Bioconcentration of organics in beef, milk and vegetation. *Environ. Sci. Technol.* **22**:271-274.
- Tuinstra L.G.M.Th., Roos AH., Berende P.L.M., van Rhijn J.A., Traag W.A. and Mengelers M.J.B.1992. Excretion of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins -furans in milk of cows fed on dioxins in the dry period. *J. Agric. Food Chem.*, **40** : 1772-1776.
- Van de Wiel J.A.G., Fijneman P.H.S., Duijf C.M.P., Anzion R.B.M., Theuws J.L.G., and 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 Schooten F.J., Moonen E.J.C., van der Wal L., Levels P. and 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.
- Van Veld P.A. 1990. Absorption and metabolism of dietary xenobiotics by the intestine of fish. *Aquatic Sciences*, **2** : 185-203.
- Verstraete W. and Devliegher W. 1996. Formation of non-bioavailable organic residues in soil: perspectives for site remediation. *Biodegradation*, **7**: 471-485.
- Vessigaud S. Re-mobilisation des hydrocarbures aromatiques polycycliques de terres industrielles de cokerie et mécanismes impliqués dans le "vieillissement" du fluoranthène. Thèse. 28 février 2007. Sciences Agronomiques. INPL.
- Vetter R.D., Carey M.C. and Patton J.S. 1985. Coassimilation of dietary fat and benzo[a]pyrene in the small intestine: an absorption model using the killifish. *Journal of lipid research*, **26**: 428-434.
- Villar P., Callejón M., Alonso J.C., Jiménez J.C. and Guiraum A. 2006. Temporal evolution of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in sludge from wastewater treatment plants: Comparison between PAHs and heavy metals. *Chemosphere*, **64**(4) : 535-541.

- Vrecl M., Ursic M., Pogacnik A., Zupancic-Kralj L. and Jan J. 2005. Excretion pattern of coplanar and non-coplanar tetra- and hexa-chlorobiphenyls in ovine milk and faeces. *Toxicol. and Appl. Pharmacol.*, **204** : 170-174.
- Wagrowski D.M. and Hites R.A. 1998. Partitioning of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans between the atmosphere and corn. *Environmental Science & Technology*, **32**(16): 2389-2393.
- Wang Y.-q., Zuo Q., Jiao X.-c., Wu S.-p and Tao S. 2004. Polycyclic aromatic hydrocarbons in plant leaves from Peking University campus and nearby in summer season. *Huan Jing Ke Xue= Huanjing Kexue / [Bian Ji, Zhongguo Ke Xue Yuan Huan Jing Ke Xue Wei Yuan Hui "Huan Jing Ke Xue" Bian Ji Wei Yuan Hui.]* **25**(4): 23-27.
- Watanabe, M. X., Iwata H., Okamoto M., Kim E.-Y., Yoneda K., Hashimoto T. and Tanabe S. 2005. Induction of Cytochrome P450 1A5 mRNA, Protein and Enzymatic Activities by Dioxin-Like Compounds, and Congener-Specific Metabolism and Sequestration in the Liver of Wild Jungle Crow (*Corvus macrorhynchos*) from Tokyo, Japan. *Toxicological Sciences: An Official Journal Of The Society Of Toxicology*, **88**(2): 384-399.
- Waters. 2001-2003. Waters 2475 multi  $\lambda$  fluorescence detector operator's guide. 71500247502, Revision B. Waters Corporation.
- Wattenberg L.W., Leong J.L. and Strand P.J. 1962. Benzpyrene hydroxylase activity in the gastrointestinal tract. *Cancer research*, **22**: 1220-1225.
- Welsch-Pausch K., McLachlan M.S. and Umlauf G. 1995. Determination of the principal pathways of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans to *Lolium multiflorum* (Welsh Ray Grass). *Environmental Science and Technology*, **29** (4) : 1090-1098.
- Welsch-Pausch, K. and McLachlan M.S. 1996. Pathways of atmospheric PCDD/F to a native grassland culture: the importance of particle-bound deposition. *Organohalogen Compounds*, **28** : 72-75.
- Welsch-Pausch, K. and McLachlan M.S. (1998). Fate of airborne polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in an agricultural ecosystem. *Environmental Pollution*, **102**(1): 129-137.
- Werk-Reichhart D. and Feyereisen R. 2000. Cytochromes P450 : a success story. *Genome Biology*, **1** : 1-9.
- West C.E. and Horton B.J. 1976. Transfert of polycyclic aromatic hydrocarbons from diet to milking rats, rabbits and sheep. *Life Sci.* 19:543-551.

- Wild S.R. and Jones K.C. 1992. Organic chemicals entering agricultural soils in sewage sludges: screening for their potential to transfer to crop plants and livestock. *The Science of The Total Environment*, **119**: 85-119.
- Wild S.R., Jones K.C. and Johnston A.E. 1992. The Polynuclear Aromatic Hydrocarbon (PAH) content of herbage from a long-term grassland experiment. *Atmospheric environment*, **26A** (7) : 1299-1307.
- Wild S.R. and Jones K.C. 1995. Polynuclear aromatic hydrocarbons in the united kingdom environment: a preliminary source inventory and budget. *Environmental Pollution*, **88**: 91-108.
- Willet K.L., Loerch S.C. and Willet L.B. 1989. Effects of halogenated hydrocarbons on rumen microorganisms. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians*, **1**: 120-123.
- Williams J.A. and Phillips D.H. 2000. Mammary expression of xenobiotic metabolising enzymes and their potential role in breast cancer. *Cancer Res.*, **60**: 4667-4677.
- Winters D., G. F. Fries, Lorber M., Ferrario J. and Byrne C. 2000. A study of the mass balance of dioxins and furans in lactating cows in background conditions. Part 1: Study design and analysis of feed. *Organohalogen compounds*, **46**: 534-537.
- Withey J.R., Law F.C.P. and Endrenyi L. 1991. Pharmacokinetics and bioavailability of pyrene in the rat. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, **32**: 429-447.
- Wittich R.M. 1998. Degradation of dioxin-like compounds by microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **49**: 489-499.
- Xu L., Li A.P., Kaminski D.L. and Ruh M. 2000. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin induction of cytochrome P4501A in cultured rat and human hepatocytes. *Chemico-biological interactions*, **124** : 173-189.
- Yamashita S., Furubayashi T., Kataoka M., Sakane T., Sezaki H., Toduka H. 2000. Optimized conditions for prediction of intestinal drug permeability using Caco-2. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **10** : 195-204.
- Yang Y.H., Chang Y.S., Kim B.H., Shin D.C. and Ikonomou M.G. 2002. Congener-distribution patterns and risk assessment of polychlorinated biphenyls, dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans in Korean human milk. *Chemosphere*, **47** : 1087-1095.
- Zhang Q.Y., Dunbar D., Ostrowska A., Zeisloft S., Yang J. and Kaminsky L. 1999. Characterization of human small intestinal cytochromes P-450. *Drug Metab. Disp.*, **27** : 804-809.



Zhang Q.-Y., Wikoff J., Dunbar D. and Kaminsky L.S. 1996. Characterization of rat small intestinal cytochrome P-450 composition and inductibility. *Drug Metabolism and Disposition*, **24** : 322-328.

# **ANNEXES**

## ANNEXE 1 : PROCEDURES ET RESULTATS PRINCIPAUX DE L'ESSAI PRELIMINAIRE *IN VITRO* SUR L'EXTRACTION DES HAP DE L'HERBE

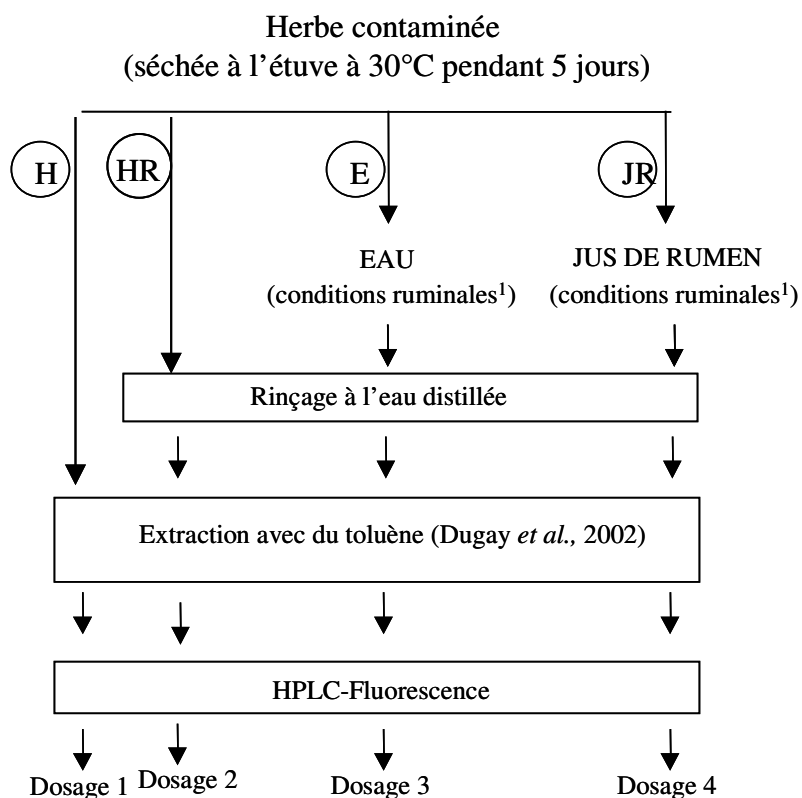
### Herbes utilisées

Dans un premier temps, de l'herbe contaminée naturellement par des émissions routières a été récoltée à 3 m environ du bord de l'autoroute A31. Le mélange d'herbes a été composé des espèces suivantes : *Arrhenatherium elatius* L. (55%), *Dactylis glomerata* (30%), *Festuca pratensis* Huds. (10%), *Lolium perenne* L. (5%). Dans un deuxième temps, de l'herbe artificiellement contaminée à partir d'une solution de pulvérisation a été utilisée. Pour cette pulvérisation, trois HAP modèles ont été utilisés : PHE, PYR et B[a]P, avec 3, 4 et 5 cycles aromatiques respectivement et représentatifs de l'ensemble de HAP. La solution a été préparée avec 40 mg de chaque HAP dilués dans 4 mL d'huile adjuvante d'origine végétale (Actirob B, St. Paul de Léon, France), avant d'être incorporés dans 150 mL d'eau dans un pulvérisateur manuel. Cette solution a été pulvérisée sur 1 m<sup>2</sup> d'herbe qui a été récolté 24 heures après et séchée pendant 5 jours à 30°C. Une fois séchée, les deux types d'herbe ont subi les mêmes traitements détaillés dans les sous-chapitres suivants.

### Traitements effectués sur les deux types d'herbe

Le schéma expérimental est détaillé sur le schéma 3. Une partie de l'herbe utilisée (témoin, H) a subi l'extraction et le « dosage 1 » dans le but de déterminer la charge totale en HAP. Une autre partie de cette herbe (HR) a subi un rinçage avec 500 mL d'eau distillée suivi de l'extraction et du « dosage 2 » dans le but de déterminer la quantité de HAP extraits par ce rinçage. Une 3<sup>ème</sup> partie de l'herbe utilisée (E) a été incubée dans l'eau en conditions ruminales (39°C et anaérobiose) suivi du rinçage, de l'extraction et du « dosage 3 » afin de déterminer l'extraction des HAP par l'eau. Finalement, une 4<sup>ème</sup> partie de l'herbe utilisée (JR) a été incubé dans du jus de rumen (39°C et anaérobiose). Le rinçage qui suit ces étapes a été appliqué après chaque traitement, avec l'objectif de séparer les bactéries ruminales et mettre les 3 traitements dans les mêmes conditions. Ensuite, l'extraction et le « dosage 4 » ont été effectués dans le but de déterminer l'extraction du jus de rumen.

**Schéma 3 : Détermination du pouvoir d'extraction des HAP de l'herbe par l'eau et le jus de rumen**



H : herbe témoin (aucun traitement)

HR : herbe rincée avec 500 mL d'eau distillée

E : herbe incubée *in vitro* dans l'eau en conditions ruminales pendant 6

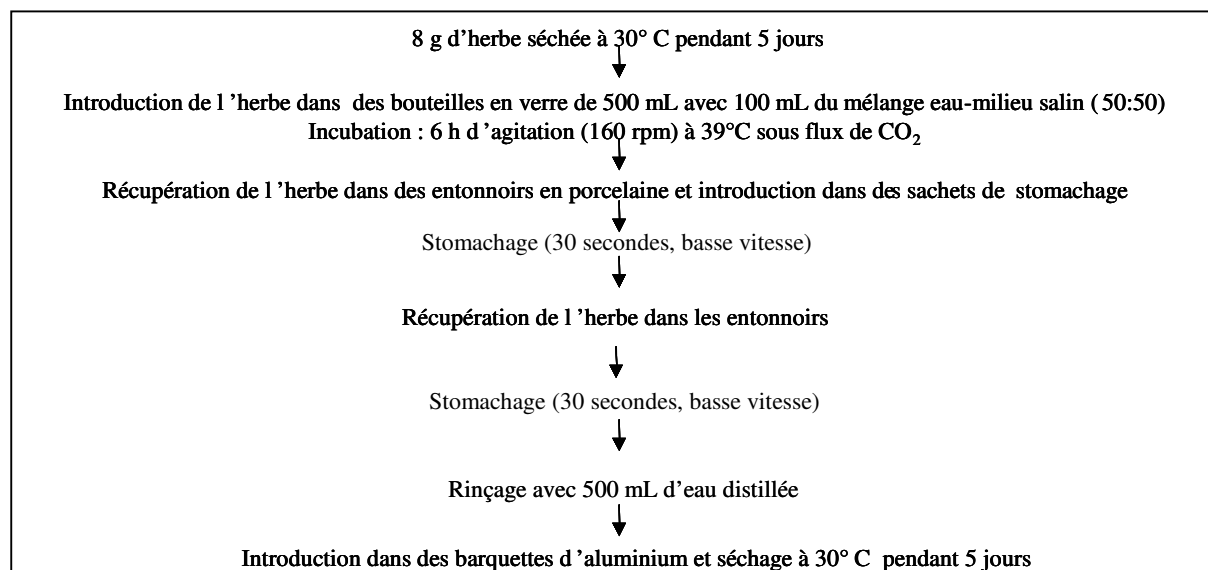
JR : herbe incubée *in vitro* dans le jus de rumen en conditions pendant 6 heures

<sup>1</sup> Température : 39°C, anaérobie (flux de CO<sub>2</sub>), agitation (incubateur) : 160 rpm.

### Pouvoir d'extraction de l'eau

Le schéma 4 montre comment l'herbe a été traitée afin de déterminer le pouvoir d'extraction de l'eau.

#### **Schéma 4 : Extraction des HAP de l'herbe *in vitro* par incubation dans l'eau**



\*Le milieu salin est composé par (source Blanchart *et al.*, 1993) :

9240 mg/mL de NaHCO<sub>3</sub>

7125 mg/mL de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O

470 mg/mL de NaCl

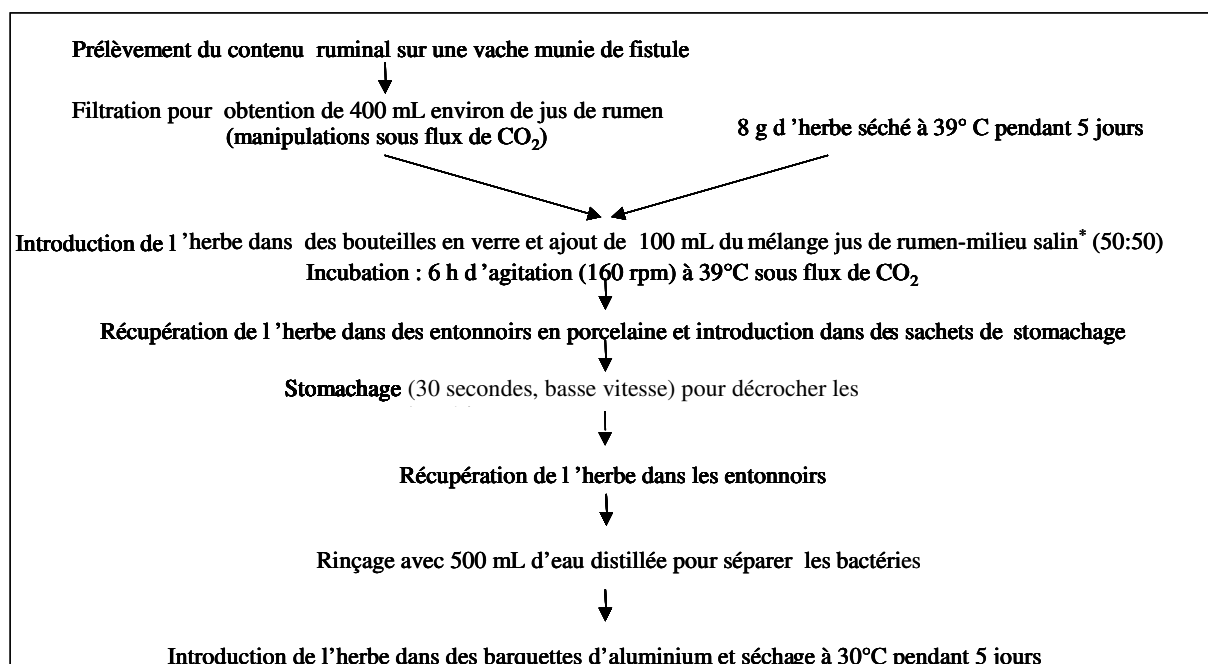
450 mg/mL de KCl

Le milieu salin est ajouté afin de maintenir le pH du milieu ruminal. La durée de l'incubation a été fixée à 6h du fait de la durée de vie des microorganismes dans les conditions *in vitro* (Lutz, 2006). Ces temps d'incubation ont été semblables pour les deux types d'incubation (E, JR). Les incubations, 5 répétitions par traitement, ont été effectuées dans un incubateur à 39°C, sous flux de CO<sub>2</sub> et à une vitesse de 160 rpm. A l'issue de ce procédé, une méthode d'extraction des HAP sur l'herbe (cf. pages 63v et 64) a été mise en oeuvre pour déterminer la concentration résiduelle de ces composés.

### Pouvoir d'extraction du jus de rumen

Afin de définir la capacité d'extraction du jus du rumen, du contenu ruminal d'une vache munie d'une fistule (#2C, Bar Diamond, Parma, ID, USA) issue du domaine expérimentale de l'ENSAIA a été prélevé et transporté au laboratoire en conditions isothermiques et à l'abri de l'air. Une filtration sous flux de CO<sub>2</sub> visant à séparer les particules alimentaires a été effectuée à l'aide d'un tissu en nylon de 50 µm de porosité (Blutex 120, Saati France Co., Saily Saillisel, France). L'incubation de l'herbe a été effectuée suivant la procédure détaillée dans le schéma 5. Après l'incubation, la même méthode d'extraction a été aussi pratiquée pour déterminer la concentration résiduelle en HAP.

**Schéma 5 : Procédure d'extraction des HAP de l'herbe *in vitro* par le jus du rumen**



\*Le milieu salin a la même composition que celui détaillé précédemment.

### Détermination de la teneur en HAP

L'extraction des HAP de l'herbe a été réalisée en 5 répétitions après chaque traitement à partir de la méthode de Dugay *et al.* (2002) (cf. chapitre 1).

### Calcul des taux d'extraction des HAP de l'herbe

L'extraction des HAP de l'herbe suite aux différents traitements a été calculée comme suit :

- Taux d'extractibilité des HAP de l'herbe suite au rinçage à l'eau distillée :

$$TE_{HR} = ([H]-[HR])*100/[H]$$

- Taux d'extractibilité des HAP de l'herbe suite à l'incubation dans l'eau :

$$TE_E = ([H]-[E])*100/[H]$$

- Taux d'extractibilité des HAP de l'herbe suite à l'incubation dans le jus de rumen :

$$TE_{JR} = ([H]-[JR])*100/[H]$$

Avec [H] : concentration en HAP dans l'herbe témoin ; [HR] : concentration en HAP dans l'herbe après rinçage à l'eau distillée ; [E] : concentration dans l'herbe après incubation dans l'eau ; [JR] : concentration en HAP dans l'herbe après incubation dans le jus de rumen.

### Analyse statistique

Une analyse de variance (ANOVA) en randomisation totale a été effectuée par la procédure GLM (general linear model) du logiciel S.A.S. (V. 9.1, 2004) pour expliquer la variabilité observée entre traitements (2 facteurs : molécule et matière d'extraction). Le test t Student a été employé pour comparer les moyennes.

### Résultats

#### a) Herbe naturellement contaminée

L'herbe utilisé pour cette expérimentation a atteint une contamination de 273 ng/g MS ( $\Sigma$  11 HAP). Le composé le plus présent a été le PYR suivi du PHE et du FLUOT. Le composé le moins concentré a été le D[a,h]A. L'acénaphène n'as pas été détecté dans l'herbe témoin (H), à différence de l'herbe incubée dans l'eau (E) et de l'herbe incubée dans le jus de rumen (JR) où il a été identifié (figure 24 et tableau 18).

Le rinçage de l'herbe a permis l'extraction de 9% de la somme de 11 HAP déterminés sur l'herbe : le B[k]F, le PHE, et l'ANT ont été les composés les plus extraits avec des taux d'extraction de 45%, 44%, et 33% respectivement. Aucune différence significative entre l'herbe témoin et l'herbe rincée n'a été observée à l'exception du PHE et du B[k]F (figure 24).

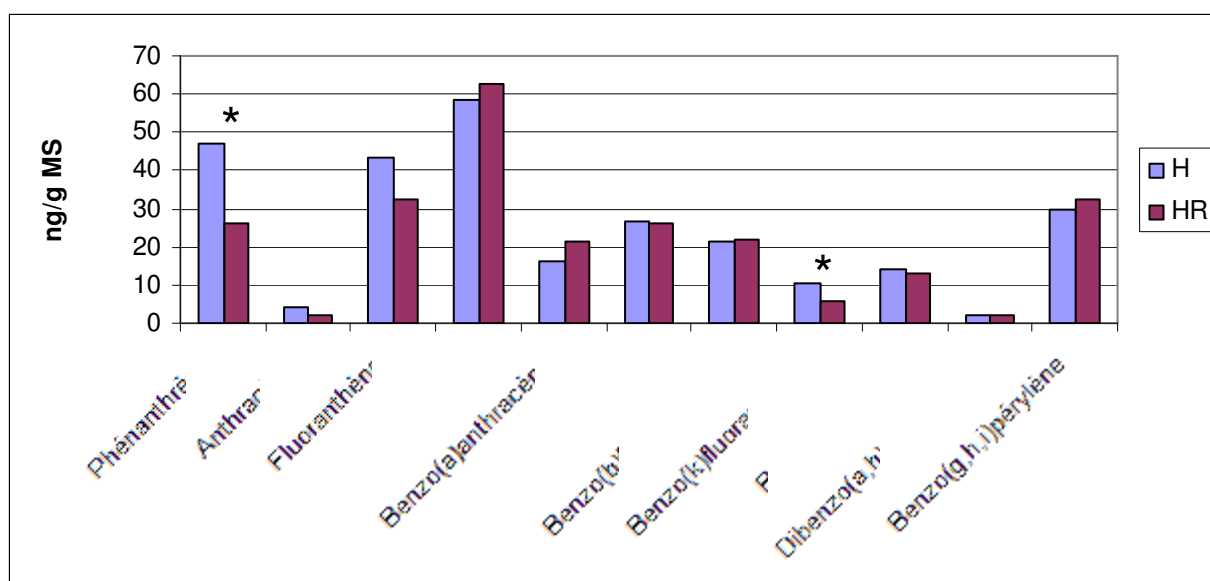


Figure 24 : Comparaison des contaminations de l'herbe en HAP avant et après rinçage.

\* concentrations significativement différentes ( $p < 0,05$ ). H : herbe témoin, HR : herbe rincée.

Le Tableau 18 indique les teneurs en HAP de l'herbe témoin (H), de l'herbe après l'incubation dans de l'eau (E) et de l'herbe après l'incubation dans du jus de rumen (JR). Il peut être observé que l'effet de la matière d'extraction (eau, jus de rumen) varie selon les molécules. Après l'incubation dans l'eau, le taux d'extraction a été de 44% pour la somme des 11 HAP, le B[g,h,i]P étant le composé le plus extrait (77%). Le PHE a été le composé avec le taux d'extraction le plus faible (41%). L'incubation dans le jus de rumen a conduit à l'extraction de 7% de la somme de 10 HAP, le B[a]P étant le composé le plus extrait (69%). Le PYR a été le composé avec le taux d'extraction le plus faible (3%).



Tableau 18 : Concentration moyenne en HAP (n=5) dans l'herbe naturellement contaminée (témoin) et concentration moyenne après incubation dans l'eau et dans le jus de rumen

	ng/g MS			Effet traitement	ETR
	H	E	JR		
ACN	nd	<sup>b</sup> 2,9	<sup>a</sup> 7,1	**	0,9
PHE	<sup>a</sup> 46,8	<sup>b</sup> 27,6	<sup>a</sup> 61,1	**	11,8
ANT	<sup>a</sup> 4,1	<sup>b</sup> 1,1	<sup>ab</sup> 1,5	*	1,8
FLUOT	<sup>b</sup> 43,3	<sup>b</sup> 46,1	<sup>a</sup> 71,8	***	11,5
PYR	<sup>a</sup> 58,5	<sup>b</sup> 26,6	<sup>a</sup> 56,8	*	7,2
B[a]ANT	16,3	5,4	10,1	NS	5,8
CHRY	<sup>a</sup> 26,4	<sup>b</sup> 13,2	nd	***	6,2
B[b]FLUOT	<sup>a</sup> 21,7	<sup>b</sup> 6,9	<sup>b</sup> 8,8	*	3,4
B[k]FLUOT	<sup>a</sup> 10,2	<sup>b</sup> 3,2	<sup>b</sup> 4,0	***	3,5
B[a]P	<sup>a</sup> 13,9	<sup>b</sup> 4,5	<sup>b</sup> 3,7	**	4,3
D[a,h]ANT	<sup>a</sup> 1,8	<sup>b</sup> 0,6	<sup>ab</sup> 1,6	***	0,6
B[g,h,I]P	29,80 <sup>a</sup>	6,91 <sup>b</sup>	17,12 <sup>c</sup>	*	4,2

\* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,01$  ; \*\*\* :  $p < 0,001$  ; NS : non significatif

ETR : écart type résiduel ; H : herbe témoin ; E : herbe incubée dans l'eau

JR : herbe incubée dans jus de rumen

#### b) Herbe artificiellement contaminée

La concentration en HAP trouvée dans l'herbe après la pulvérisation a été de 4900 ng/g MS ( $\Sigma$  3 HAP). Le résultat de la comparaison des traitements est présenté dans la figure 25. La première observation concerne la teneur en HAP de l'herbe témoin : pour les trois HAP les concentrations détectées ont été entre 26 et 39 fois supérieures à celles de l'herbe naturellement contaminée. Cependant, même si la concentration initiale dans la solution de pulvérisation a été identique pour les 3 HAP, le PYR a été retrouvé avec une concentration bien supérieure de celle du PHE ou du B[a]P. Pour le PYR et le B[a]P aucune différence significative n'a pu être observée entre les traitements ( $p < 0,05$ ). Par contre, pour le PHE, une réduction significative de la teneur a été observée lors de l'incubation de l'herbe dans l'eau (E) par rapport à l'herbe témoin (H).

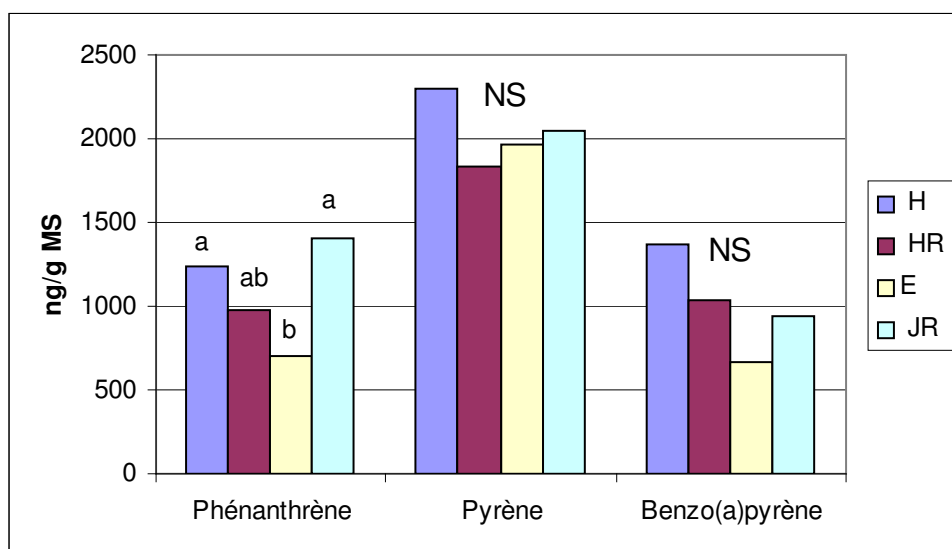


Figure 25 : Comparaison entre traitements de la concentration dans l'herbe artificiellement contaminée pour une molécule donnée.

<sup>a,b</sup> histogrammes avec lettres différentes, concentrations significativement différentes ( $p < 0,05$ ). H : herbe témoin, HR : herbe rincée avec de l'eau distillée, E : herbe incubée dans l'eau, JR : herbe incubée dans le jus de rumen. NS : non significatif.

En ce qui concerne l'extraction, le rinçage de l'herbe conduit à un taux d'extraction de 22% sur la somme des 3 HAP déposés sur l'herbe. L'incubation dans l'eau en conditions ruminales a permis un taux d'extraction de 32% sur la somme des 3 HAP, avec une variabilité importante ( $> 40\%$ ) dans le cas du PYR. Le jus de rumen a quant à lui permis une extraction de 11% sur la somme des 3 HAP, le B[a]P étant le composé le plus variable.

**ANNEXE 2 : CERTIFICAT D'ANALYSE DU MELANGE COMMERCIAL DE HAP  
(INTERCHIM)**

HAP	N° CAS #	Pureté (%)	[ ] Préparée (µg/mL)	[ ] Certifiée (µg/mL)
Acénaphthène	83-82-9	100,0	100,40 ± 4,02	100,40
Acénaphthylène	208-96-8	99,2	100,30 ± 4,01	99,50
Anthracène	120-12-7	100,0	100,10 ± 4,00	100,10
Benzo[a]anthracène	56-55-3	99,5	10,00 ± 0,40	9,95
Benzo[a]pyrène	50-32-8	98,4	10,04 ± 0,40	9,88
Benzo[b]fluoranthène	205-99-2	100,0	10,01 ± 0,40	10,01
Benzo[g,h,i]perylène	191-24-2	99,2	10,00 ± 0,40	9,92
Benzo[k]fluoranthène	207-08-9	99,2	5,00 ± 0,20	4,96
Chrysène	218-01-9	98,2	10,02 ± 0,40	9,84
Dibenzo[a,h]anthracène	53-70-3	98,1	10,06 ± 0,40	9,87
Fluoranthène	206-44-0	97,9	10,26 ± 0,41	10,04
Fluorène	86-73-7	98,1	100,30 ± 4,01	98,4
Indeno[1,2,3-cd]pyrène	193-39-5	100,0	10,00 ± 0,40	10,00
Naphtalène	91-20-3	100,0	100,00 ± 4,00	100,00
Phenanthrène	85-01-8	99,8	100,20 ± 4,01	100,00
Pyrène	129-00-0	98,6	10,00 ± 0,40	9,86

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

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

**Monsieur Arturo ANADON, Professeur, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, Madrid, Espagne**

**Monsieur Pierre NOZIERE, Chargé de Recherche, INRA, St Genès-Champenelle**

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

**Monsieur COSTERA PASTOR Adrián**

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

**"Transfert des Polluants Organiques Persistants (POP) du fourrage vers le lait chez le ruminant"**

en vue de l'obtention du titre de :


**DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE**

Spécialité : « **Sciences agronomiques** »

Fait à Vandoeuvre, le 29 mai 2007

Le Président de l'I.N.P.L.,

F. LAURENT



NANCY BRABOIS  
2, AVENUE DE LA  
FORET-DE-HAYE  
BOITE POSTALE 3  
F - 54501  
VANDŒUVRE CEDEX