



HAL
open science

Toxicocinétique de la chlordécone chez la brebis

Mailie Saint-Hilaire

► **To cite this version:**

Mailie Saint-Hilaire. Toxicocinétique de la chlordécone chez la brebis. Agronomie. Université de Lorraine, 2018. Français. NNT : 2018LORR0256 . tel-02127468

HAL Id: tel-02127468

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-02127468>

Submitted on 17 Dec 2020

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

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



AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Université de Lorraine

École Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires

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

École Doctorale Science et Ingénierie des Ressources Naturelles (SIReNa)

THÈSE :

Présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur de l'Université de Lorraine

Spécialité : Sciences Agronomiques

Soutenue publiquement le 17 décembre 2018

Maïlie SAINT-HILAIRE

Toxicocinétique de la chlordécone chez la brebis

Directeur de thèse : RYCHEN Guido

Co-directrice de thèse : FOURNIER Agnès

Membres du Jury :

Rapporteurs :

BOUSQUET-MELOU Alain, Professeur, ENVT, Toulouse

CRAVEDI Jean-Pierre, Directeur de recherche, INRA, Toulouse

Examineurs :

PASQUINI Laure, Ingénieure, ANSES, Nancy

FOURNIER Agnès, Maître de Conférences, Université de Lorraine - ENSAIA, Vandoeuvre-lès- Nancy

RYCHEN Guido, Professeur, Université de Lorraine - ENSAIA, Vandoeuvre-lès- Nancy

Invités :

WIEST Laure, Ingénieure de Recherche, ISA UMR 5280, Villeurbanne

PARINET Julien, Chargé de projets scientifiques et techniques, ANSES, Maisons-Alfort

Aux Antilles Françaises, les animaux d'élevage sont susceptibles d'être exposés à la chlordécone (CLD), Polluant Organique Persistant (POP) présent dans leur environnement. Afin de sécuriser les Denrées Alimentaires d'Origine Animale (DAOA) destinées à la consommation humaine, nos travaux ont porté sur l'étude du devenir de la CLD chez la brebis. Les objectifs de ces travaux étaient de comprendre comment s'effectue l'élimination de la molécule depuis l'organisme animal c'est-à-dire de déterminer par quelle(s) voie(s), sous quelle(s) forme(s), en combien de temps, en quelle quantité et par quels mécanismes s'élimine la CLD.

Pour cette étude, deux volets ont été considérés : un volet analytique et un volet toxicocinétique. En effet, les méthodes de dosage connues des métabolites de la CLD ne permettaient pas d'obtenir la sensibilité et la fiabilité attendues pour nos travaux. Ainsi, un développement analytique de méthodes de dosage de la CLD et de ses métabolites dans les matrices d'intérêt a été mené. Ces travaux analytiques se sont appuyés sur une méthodologie d'extraction de type Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe (QuEChERS), une analyse par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) et l'utilisation d'étalons internes isotopiques. Ce développement permet de disposer de méthodes de dosage sensibles, rapides et fiables de la CLD et de ses métabolites dans différentes matrices animales. A l'issue de l'étape de développement analytique, les méthodes dans le foie, les fèces et les urines ont été validées à l'aide de profils d'exactitude établis selon la norme V03-110 et le guide SANTE de référence pour les pesticides. Pour exemple, dans la matrice foie, des limites de quantification de $1,36 \mu\text{g kg}^{-1}$ PF et de $2,50 \mu\text{g kg}^{-1}$ PF respectivement de chlordécone et de chlordécol (métabolite de la CLD) ont été retrouvées.

Le deuxième volet de cette thèse s'est appuyé sur deux protocoles toxicocinétiques réalisés chez la brebis. A l'aide de ces expérimentations, il a été possible de combler une partie des lacunes sur la toxicocinétique de la CLD chez la brebis. Nos travaux ont démontré que la CLD est partiellement métabolisée en chlordécol (CLDOH) par la chlordécone réductase dans le foie des brebis. Par la suite, la CLD et le CLDOH peuvent être métabolisés à l'aide d'UDP-glucuronosyl-transferases et de sulfo-transferases en métabolites conjugués de la CLD et du CLDOH (CLD-C et CLDOH-C). Le CLDOH est un métabolite intermédiaire qui n'est quasiment jamais quantifié dans l'organisme animal hormis dans le tissu gras. L'élimination de la CLD se fait majoritairement via les fèces : $1/3$ de la molécule parent CLD est éliminé sous forme de CLD et $1/6$ est éliminé sous forme de CLDOH. La voie urinaire est une voie mineure d'élimination de la CLD. A l'aide de ces travaux, un modèle compartimental a été proposé. Sur la base de ce modèle, des travaux de modélisation seront possibles et permettront la proposition et la mise en place de stratégies de décontamination des ovins aux Antilles Françaises.

Mot Clés : CLD, méthode analytique, toxicocinétique, métabolites, brebis

In the French West Indies (FWI), farming animals can be exposed to CLD, a persistent organic pollutant (POP) bound to soil in contaminated areas. In order to produce safe animal products, this thesis was focused on the CLD's fate in ewes. The aims were to determine by which way(s), in which form(s), in how much time, in which quantities and by which mechanisms, CLD would be eliminated from the animal body.

In this thesis, two complementary approaches were followed. First it was necessary to improve the analytical methods especially for the metabolites in order to obtain more sensitive and reliable methods than the actual ones. In the analytical approach, methods for CLD and its metabolites were developed in various animal matrices suitable for the toxicokinetic studies. The extraction method was based on the Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe (QuEChERS) methodology and the analysis was performed with a liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Isotopic Standards were also used. Thanks to this work, sensitive, quick and reliable methods were obtained in animal matrices. The set-up methods in liver, feces and urine were validated with accuracy profiles according to the French Standard NF V03-110 and European Union guidelines. Limits of quantifications of $1.36 \mu\text{g kg}^{-1}$ and $2.50 \mu\text{g kg}^{-1}$ of fresh liver were respectively found for chlordecone and chlordecol (the CLD's metabolite).

Secondly, and thanks to the analytical development, *in vivo* toxicokinetic studies were performed to determine the fate of CLD in ewes. The second approach of this thesis was based on two toxicokinetic protocols realized in ewes. The results revealed that CLD is partially metabolized in chlordecol (CLDOH) by the chlordecone reductase in ewe's liver. Then, CLD and CLDOH can be conjugated by UDP-glucuronosyl-transferases and sulfo-transferases in conjugated metabolites (CLD-C and CLDOH-C). It appeared that CLDOH is only an intermediate metabolite which is almost never quantified in the organism except in fat tissue. The major route of CLD elimination is in feces: 1/3 of the molecule is eliminated in its CLD's form and 1/6 in its CLDOH's form. The urinary way of CLD elimination is minor.

Based on the obtained results, a compartmental model was proposed. It will allow to propose and to establish ovine decontamination strategies in the FWI.

Keywords: CLD, analytical method, toxicokinetics, metabolites, ewe

« Sé grèn diri ka fè sak »

Avant de présenter mes travaux de recherche, je tiens tout d'abord à remercier M. Jean-Pierre Cravedi et M. Alain Bousquet-Melou d'avoir accepté d'être les rapporteurs de mon manuscrit de thèse. Je remercie également, Mme Laure Pasquini, Mme Laure Wiest, M. Julien Parinet, Mme Agnès Fournier et M. Guido Rychen d'avoir accepté d'être membre de mon jury de thèse.

J'exprime ensuite toute ma gratitude à mon directeur de thèse M. Guido Rychen et à ma co-directrice de thèse Mme Agnès Fournier de m'avoir fait confiance pendant ces trois années de thèse. Je vous remercie pour votre encadrement au quotidien, votre disponibilité en dépit de votre charge de travail importante, votre patience, votre pédagogie tant pour les corrections de mes écrits ou lors des nombreuses et fructueuses réunions que nous avons pu avoir. Je tiens aussi à vous remercier pour vos conseils qui je le sais me serviront tout au long de ma carrière professionnelle. Enfin, merci d'avoir toujours pris le temps de m'encourager. C'est très clairement grâce à votre complémentarité que j'ai pu mener à bien mon travail de recherche.

Je tiens à ensuite à remercier « le dernier maillon de ma chaîne encadrante » Cyril Feidt, qui m'a suivie et aidée tout comme mes directeurs de thèse tout au long de ces trois ans. Merci Cyril d'avoir tout comme Agnès et Guido cru en moi et surtout de m'avoir toujours poussée à tendre vers le meilleur. Je n'oublierai pas non plus tes conseils et encore moins ton humour hors du commun.

J'ai eu la chance de pouvoir effectuer mon travail de recherche au sein de l'UR AFPA et de l'unité Pesticides et Biotoxines Marines (PBM) de l'ANSES de Maisons-Alfort et donc de faire de très nombreuses et belles rencontres !

La réalisation de mes travaux a nécessité la mise en place d'expérimentations animales chez la brebis et je tiens à remercier chaleureusement toute l'équipe UR AFPA pour leur soutien au cours de mes expérimentations et en particulier pour avoir su m'épauler lorsque j'étais en déplacement à l'ANSES ou encore m'aider lors des prélèvements animaux.

Je remercie particulièrement Paméla Hartmeyer qui a été un soutien au quotidien lors de mes expérimentations animales. Merci de tes nombreux conseils et pour ta bonne humeur ! Merci Pam !

Merci à Hervé Toussaint pour son aide dans la gestion des animaux mais je te remercie aussi les discussions que nous avons pu partager.

Je tiens ensuite à remercier Claire Soligot et Marion Huguet pour leur appui indispensable au laboratoire et en particulier sur la préparation ou la gestion de tous les échantillons que mes travaux ont générés. Merci de m'avoir épaulée lorsque j'étais en déplacement et d'avoir permis que mes travaux se passent dans de très bonnes conditions.

Qui dit expérimentation, dit traitement des données et à l'UR AFPA on a l'un des meilleurs ! Merci à Yves Le Roux d'avoir pris le temps de m'initier au traitement statistique. Je te remercie pour tes conseils avisés, ta disponibilité et enfin pour ta bonne humeur communicative.

Je continue mes remerciements et selon moi l'URAFPA rime avec Matthieu Delannoy ! Merci à toi Matthieu pour ton aide au quotidien, ta patience, ta disponibilité et en particulier lorsque j'avais des problèmes informatiques ou encore pour finaliser mon manuscrit mais aussi pour nos discussions, nos fous rires et surtout tes encouragements !

Je tiens ensuite à remercier Catherine Larrière, Emilie Dethine, Nathalie Vuillaume et Nathalie Cadario pour la gestion administrative de mes nombreux déplacements entre la capitale et la Lorraine. Merci pour votre efficacité qui a permis de faciliter mes déplacements mais merci aussi pour toutes les discussions que nous avons pu avoir !

Je remercie ensuite Stefan Jurjanz, Claire Collas, Frédéric Desor pour votre aide chacun à différents niveaux dans mes travaux. Ce fût un plaisir de travailler avec vous !

Je remercie ensuite Catherine Corbier de m'avoir aidée dans la mise au point des méthodes de suivi enzymatique de la chlอร์ดécone réductase. Merci pour ta patience, pour ta disponibilité et pour m'avoir permis d'aller plus loin dans la compréhension de mes travaux de thèse !

Mes prochains remerciements s'adressent à mes chers collègues et plus encore mes amis doctorants avec qui j'ai pris plaisir à partager notre bureau des doctorants. Je remercie Aurore Fourcot, Aseel El Hajj et François Le Cor pour leur soutien au quotidien et en particulier lors de ma dernière année de thèse pour Aurore et François. Merci pour la bonne humeur que vous avez su apporter au bureau mais aussi pour nos moments de détente en dehors du laboratoire qui n'a fait que nous unir encore plus !

Je remercie ensuite mes anciennes collègues et amies du bureau des doctorants anciennement nommé « Le Bureau des Filles du Soleil ». Merci à Eléna Dominguez-Romero, Marie-Laure Lastel et Sarah Yehya. Vous étiez en effet de vrais soleils pour moi ! Merci pour votre soutien tout au long de ma thèse !

J'ai ensuite eu la chance d'encadrer deux stagiaires au sein du laboratoire UR AFPA. Je remercie chaleureusement Martina Ministrini et Lysa Maigrot pour leur aide dans mes travaux de thèse ! C'était un plaisir de vous encadrer ! Merci de votre rigueur et de votre gentillesse ! Je ne les ai pas encadrées mais je tiens aussi à remercier Aurelia Poerio et Opaline Journeau, deux anciennes stagiaires du laboratoire avec qui j'ai pu partager le bureau. Merci à vous pour les moments partagés !

Un grand merci à tout l'UR AFPA ! Merci pour votre esprit d'équipe, vos encouragements et aussi de m'avoir fait découvrir les spécialités culinaires de la Lorraine !

Une partie de mes travaux de thèse a été réalisée au sein du Département contaminants chimiques des aliments et plus précisément au sein de l'unité PBM de l'ANSES de Maisons-Alfort. Je tiens à remercier Thierry Guérin et Gwenaëlle Lavison-Bompard pour leur accueil et leurs conseils avisés au cours de mes travaux analytiques à l'ANSES.

Je remercie ensuite mes deux encadrants, Chanthadary Inthavong et Julien Parinet de m'avoir suivie et conseillée dans l'orientation de mes travaux analytiques. Merci pour votre aide et particulièrement pour les discussions que nous avons pu avoir. Je tiens enfin à remercier particulièrement Julien pour ses conseils en matière de rédaction d'articles scientifiques. Merci aussi pour tous les bons moments que nous avons passés ensemble !

Mes prochains remerciements vont à Karelle Huby, une collègue en or qui m'a épaulée tout au long de mes travaux analytiques. Merci de m'avoir formée sur notre cher 5500 Q-trap qui nous en a fait voir parfois de toutes les couleurs ! Merci pour nos discussions matinales et d'avoir toujours pris le temps de m'écouter, de me conseiller et de m'aider quand j'en avais besoin ! Merci aussi pour tous nos fous rires malgré la fatigue ! Tu as été un véritable soutien pour moi ! Merci pour tout.

Je tiens ensuite à remercier Thomas Bertin, le premier stagiaire que j'ai eu la chance d'encadrer et qui est à présent un de mes collègues à l'ANSES. Merci à toi Thomas pour ton aide, ton soutien et surtout ta bonne humeur au cours de tes 6 mois de stage (en particulier quand rien ne fonctionnait !). Je te remercie aussi de ta gentillesse et ton esprit d'équipe !

Je remercie ensuite Kam eng Trinh et Patricia Leroy, deux supers collègues qui m'ont aussi beaucoup soutenue et aidée dans mes travaux ! Merci de vos mots et gestes d'encouragements mais aussi pour nos discussions d'ordre professionnelle mais aussi personnelle. Je remercie ensuite Inès Dom, doctorante tout comme moi au sein de l'unité avec qui j'ai eu la chance de partager le bureau pendant 2 ans. Merci Inès pour nos discussions, pour tes encouragements et ton soutien !

Je tiens ensuite à remercier chaleureusement Hanène Ghezzal et Ronel Biré pour leur soutien et leur bonne humeur plus que communicative ! Un grand merci à Vincent Hort pour son aide en matière de validation des méthodes analytiques, merci d'avoir pris à chaque fois de répondre à mes nombreuses questions ! Je tiens aussi à remercier Marc Bourgeois pour toutes nos discussions analytiques mais aussi tous tes conseils ! Je remercie ensuite Jacques Mallet pour son aide notamment dans la gestion des commandes pour mes travaux de thèse.

Je remercie toute l'unité PBM pour leur accueil, leur encouragement et pour tous les bons moments que nous avons passés au détour d'une discussion dans le couloir ou pendant les pauses café !

Je tiens ensuite à remercier l'unité ET2M, dans laquelle 2 ans avant le début de ma thèse j'avais eu la chance d'effectuer un stage de Master 1. Je remercie particulièrement Rachida Chekri, Nathalie Marchond

et Claude Chafey pour leur soutien et leur encouragement ! Merci pour toutes nos discussions et pour votre bonne humeur inégalable !

Merci à tout le Département contaminants chimiques des aliments !

J'ai eu la chance de collaborer avec de nombreuses personnes au cours de ma thèse ! Je remercie en particulier le laboratoire du CART de Liège pour leur accueil lors de mon déplacement professionnel. Merci en particulier à Jean-Pierre Thomé, Catherine Adam, Célia Joaquim-Justo et Eric Gismondi. Je tiens aussi à remercier chaleureusement Pierre-Loïc Saaidi du laboratoire CEA-Génoscope d'Evry pour toutes les discussions que nous avons eu à propos de la CLD par mail ou téléphone ! Merci aussi à ses doctorantes pour leur appui dans la synthèse des métabolites de la CLD ! Mes prochains remerciements vont à Laurent Noël de la DGAI avec qui j'avais eu la chance de travailler au sein l'équipe ET2M de l'ANSES quelques années auparavant. Merci à toi Laurent, pour tes conseils, tes encouragements et encore plus pour la personne que tu es. Je remercie enfin les membres de mon comité de pilotage de thèse de leurs conseils avisés sur mes travaux de thèse.

Mes prochains remerciements s'adresseront à mes amis et à ma famille qui m'ont soutenue et crue en moi pendant ces trois longues années !

Je tiens à remercier le groupe des antillais à Nancy que j'ai rencontré très rapidement après mon arrivée en Lorraine. Merci particulièrement à Médy, Tracy, Kanou, Gwéna, Awnus et Veldaes. Je vous remercie pour tous les supers moments que nous avons partagés et que nous partagerons encore ! Merci de votre soutien au quotidien et de vos encouragements !

Je tiens aussi à remercier deux très bonnes amies qui ont toutes les deux connues l'aventure de la thèse. Merci à Marie-Laure et Fanny ! Vos conseils m'ont beaucoup aidé ! Un grand merci en particulier à toi Laulau qui même à 8000 km me donnait l'impression d'être là avec moi ! Merci d'avoir cru et de croire en moi comme tu le fais !

Je tiens ensuite à remercier mes amis de Paris qui me permettaient de me vider la tête lorsque je rentrais. Merci en particulier à Doria, Yumi, Loïs, Andy et Angéline ! Merci à tous pour les moments que nous avons partagés !

Je tiens ensuite à remercier un ami très proche qui malheureusement n'est plus là pour voir l'aboutissement de mon travail de thèse. Merci à toi Kévin pour ton soutien au quotidien pendant ma thèse, merci pour toute la force que tu me donnais et surtout d'avoir cru en moi comme tu le faisais ! Je sais que tu aurais été très fier de moi ! Merci pour tout Ridarch...

Mes remerciements vont ensuite à ma famille de Paris et en particulier à mon cousin Celo, ma cousine Cycyne et ma Stanou. Merci à vous d'avoir toujours cru en moi depuis mon plus jeune âge. Merci

pour les supers moments passés en famille ! Merci pour les encouragements, en bref merci d'être là et de supporter mes blagues comme vous le faites si bien !

Je continue mes remerciements et je traverse ensuite les 8000 km qui me sépare de mon île pour remercier mes proches qui depuis la Martinique m'ont toujours suivie, épaulée et encouragée. Je tiens tout d'abord à remercier Katherine. Tu as été une vraie bouffée d'air pendant mes trois années de thèse ! Je tiens ensuite à remercier Kenny de m'avoir épaulée, conseillée et reboostée en particulier pendant mes deux derniers mois de thèse ! Merci pour tout ! Je remercie ensuite tous les membres de ma belle et grande famille avec qui j'ai la chance de me ressourcer presque chaque année ! Je remercie particulièrement ma grand-mère pour sa force de caractère qu'elle a transmise à chacun d'entre nous, je remercie Natou, Fabrice, Slayou, Momo, Titi, Maguy et mon père, d'avoir pris tous pris soin de moins depuis ma tendre naissance et surtout pour votre soutien !

Et je termine par remercier les personnes les plus importantes de ma vie, ma maman, Manu, mon frère et ma sœur pour m'avoir soutenue pendant ces trois longues années en particulier lors de mes nombreux déplacements entre Nancy et la banlieue parisienne ! Merci de vos encouragements au quotidien et d'avoir toujours cru en moi !

Mwen lov zôt !

PUBLICATIONS :

- **Internationales**

Saint-Hilaire, M., Rychen, G., Thomé, JP., Joaquim-Justo, C., Le Roux, Y., Feidt, C., Fournier, A. Linear toxicokinetic of chlordecone in ewe's serum. *Soumis à ESPR*

Saint-Hilaire, M., Bertin, T., Inthavong, C., Lavison-Bompard, G., Guérin, T., Fournier, A., Feidt, C., Rychen, G., Parinet, J. (2018) Validation of analytical methods for chlordecone and its metabolites in the urine and feces of ewes. *Journal of Chromatography B*, 1093-1094, 66-76.

Saint-Hilaire, M., Inthavong, C., Bertin, T., Lavison-Bompard, G., Guérin, T., Fournier, Feidt, C., Rychen, G., Parinet, J. (2018). Development and validation of an HPLC-MS/MS method with QuEChERS extraction using isotopic dilution to simultaneously analyze chlordecone and chlordecol in animal livers. *Food Chemistry*, 252, 147-153.

COMMUNICATIONS ORALES :

- **Nationales**

Saint-Hilaire M., Feidt C., Parinet J., Inthavong C., Thomé J-P., Rychen G., Fournier A. Détermination de différentes formes d'élimination de la chlordécone chez la brebis. *47e congrès du Groupe Français des Pesticides*, 15-18 mai 2017, Nancy, France.

COMMUNICATIONS AFFICHEES :

- **Congrès internationaux**

Saint-Hilaire, M., Bertin, T., Inthavong, C., Lavison-Bompard, G., Guérin, T., Fournier, A., Feidt, C., Rychen, G., Parinet, J. Development and validation of QuEChERS extraction methods with or without enzymatic pretreatment to analyze chlordecone and its metabolites by HPLC-MS/MS in urine and feces of ewes, *28th Annual Meeting of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC Europe)*, 14-17 mai 2018, Rome, Italie

Saint-Hilaire, M., Fournier, A., Thomé, J.-P., Adam, C., Parinet, J., Inthavong, C., Feidt, C., Rychen, G. Chlordecone elimination kinetics in ewes, *28th Annual Meeting of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC Europe)*, 14-17 mai 2018, Rome, Italie

Fournier, A., **Saint-Hilaire, M.**, Thomé, J.-P., Adam, C., Feidt, C., Rychen, G. Toxicokinetic of chlordecone in small ruminants : linearity and half-life. *27th Annual Meeting of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC Europe)*, 08-11 mai 2017, Bruxelles, Belgique

Saint-Hilaire, M., Fournier, A., Rychen, G., Feidt, C., Inthavong, C., Parinet, J. Development of an HPLC-MS/MS Method to Measure Chlordecone's Metabolites in Livestock Liver. *27th Annual Meeting of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC Europe)*, 08-11 mai 2017, Bruxelles, Belgique

- **Congrès nationaux**

Saint-Hilaire, M., Rychen, G., Thome, J.-P., Joaquim-Justo, C., Parinet, J., Inthavong, C., Feidt, C., Fournier, A., Devenir de la chlordécone chez la brebis : linéarité, demi-vie et élimination, *Colloque Chlordécone*, 16-17 octobre 2018, Martinique, France

Saint-Hilaire, M., Inthavong, C., Fournier, A., Feidt, C., Rychen, G., Bertin, T., Parinet, J. Maîtriser l'exposition de la population à travers le développement de méthodes analytiques performantes pour le dosage de la chlordécone et ses métabolites chez les animaux d'élevage, *Colloque Chlordécone*, 16-17 octobre 2018, Martinique, France

Saint-Hilaire, M., Fournier, A., Thome, J.-P., Joaquim-Justo, C., Parinet, J., Inthavong, C., Feidt, C., Rychen, G. Toxicocinétique de la chlordécone chez la brebis, *6èmes Journées INRA Phase*, 04-05 avril 2018, Rennes, France

Saint-Hilaire, M., Inthavong, C., Fournier, A., Feidt, C., Rychen, G., Bertin, T., Parinet, J. Développement d'une méthode de dosage de la chlordécone et du chlordécol par LC-MS/MS avec dilution isotopique dans la matrice foie animale. *Congrès SEP*, 28-30 mars 2017, Paris, France

- **Séminaire de l'école doctorale RP2E et Journées des Doctorants ANSES**

Saint-Hilaire, M., Inthavong, C., Bertin, T., Lavison-Bompard, G., Guérin, T., Fournier, Feidt, C., Rychen, G., Parinet, J. Développement et validation de méthodes de dosage de la chlordécone et de ses métabolites dans les foies, les urines et les fèces d'animaux : appui aux études toxicocinétiques chez les animaux d'élevage. *Journées Scientifiques et Doctorales de l'ANSES*, 5-6 décembre 2018, Maisons-Alfort, France (communication orale)

Saint-Hilaire, M., Inthavong, C., Bertin, T., Lavison-Bompard, G., Guérin, T., Fournier, Feidt, C., Rychen, G., Parinet, J. Développement et validation d'une méthode LC-MS/MS et d'une méthode d'extraction QuE-ChERS par dilution isotopique pour l'analyse simultanée de la chlordécone et du chlordécol dans les foies d'animaux. *Journées Scientifiques et Doctorales de l'ANSES*, 25-26 octobre 2017, Maisons-Alfort, France (communication affichée)

Saint-Hilaire, M., Fournier, A., Feidt, C., Rychen, G. Caractérisation du métabolisme de la chlordécone via l'étude de ses métabolites chez l'animal d'élevage, *Séminaire Ecole Doctorale 2016* (communication affichée)

- **Prix de thèse :**

2ème prix de thèse "**Durabilité des élevages**" lors de la journée *Natural Concept* organisée à Rennes le 11 décembre 2018 par Agrocampus Ouest.

COLLABORATIONS SCIENTIFIQUES :

- **Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) et plus précisément au sein du Laboratoire de Sécurité des Aliments (LSAI), Unité Pesticides et Biotoxines Marines (UPBM), Maisons-Alfort, France :** Collaboration scientifique à l'aide d'une convention établie entre ANSES et UR AFPA. Cette convention s'est étalée du 20 avril 2016 au 3 août 2018. Cette convention a été établie afin de me permettre de mettre en place et valider des méthodes de dosages de la chlordécone et de ses métabolites dans les matrices biologiques animales. De plus, j'ai pu réaliser les analyses des échantillons biologiques des différentes études toxicocinétiques mises en place à l'UR AFPA dans le cadre de ma thèse. Encadrement effectué par Chantadary Inthavong et Julien Parinet.

- **URAFPA Qualité de l'Alimentation Vieillesse (QUALIVIE), Vandoeuvre-Lès-Nancy, France :** Collaboration scientifique avec Catherine Corbier pour la mise en place des méthodes d'identification de la chlordécone réductase et de son activité spécifique enzymatique (Chapitre 1, Partie 2).

- **Center for Analytical Research and Technology (CART) Liège, Belgique :** Collaboration scientifique dans le cadre du dosage de la chlordécone dans les sérums du protocole toxicocinétique 1 (Chapitre

2) et de mon déplacement professionnel au CART pour observer comment est réalisée l'analyse de la chlordécone dans les sérums. Contribution de Jean-Pierre Thomé, Catherine Adam et des autres membres de l'équipe du CART.

- **CEA-Genoscope, Evry, France** : Collaboration scientifique entre UR APFA et Génoscope. Contribution de Pierre-Loïc Saaidi et sa doctorante Oriane Della-Negra dans le cadre de la synthèse du chlordécol sulfaté (Discussion Générale).

ENCADREMENTS :

- **Thomas Bertin**, stagiaire de Master de 2^{ème} année (Master Qualité des Produits de santé Université de Descartes). Encadrement effectué au Laboratoire de Sécurité des Aliments (Unité Pesticides et Biotoxines Marines) du 6 février au 4 août 2017. Contribution à la mise en place et à la validation des méthodes de dosages de la chlordécone et de ses métabolites dans les urines et les fèces ainsi qu'à l'analyse des échantillons urinaires et fécaux du protocole toxicocinétique 1 chez la brebis (Chapitre 2).
- **Martina Minestrini**, stagiaire ERASMUS de Master de 2^{ème} année (Master 2 Biotechnologie Végétale ERASMUS, Italie). Encadrement effectué à l'UR AFPA du 1 mars 2018 au 31 mai 2018. Contribution à la mise en place des tests d'identification et d'activité spécifique (Partie 2 du Chapitre 1).
- **Lysa Maigrot**, stagiaire de Master de 1^{ère} année (Master FAGE : Biologie et écologie pour la Forêt, l'AGronomie et l'Environnement). Encadrement effectué à l'UR AFPA sur les périodes allant du 9 avril au 27 avril 2018 et du 21 mai au 22 juin 2018. Contribution à la mise en place du protocole toxicocinétique 2 chez la brebis (Partie 2 du Chapitre 3)

Résumé	i
Abstract	iii
Remerciements	vii
Valorisation Scientifique des Travaux de Thèse	xiii
Table des Matières.....	xviii
Liste des Figures.....	xxiii
Liste des Tableaux.....	xxvi
Liste des Abréviations	xxviii
INTRODUCTION GENERALE.....	1
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	7
PARTIE 1: Contamination des animaux d'élevage par la chlordécone aux Antilles Françaises	10
1. La Chlordécone	10
i. Origine, découverte et utilisations	10
ii. Propriétés physico-chimiques	10
iii. Toxicité de la CLD	12
iv. Persistance de la CLD dans les sols antillais : cartographie des zones contaminées.....	12
2. Contamination des animaux d'élevage par la chlordécone	14
i. Production animale et consommation de produits animaux aux Antilles.....	14
ii. Circuits contrôlés et non contrôlés	17
3. Sécurisation des produits animaux afin de réduire l'exposition humaine à la chlordécone.....	18
i. Exposition de la population humaine à la chlordécone	18
ii. Réglementation sur les Denrées Alimentaires d'Origine Animale.....	20
iii. Problématique de la thèse	20
Résumé de la Partie 1	22
PARTIE 2: Toxicocinétique de la chlordécone chez les ruminants	23
1. Voies d'exposition des animaux à la chlordécone	23
2. Biodisponibilité relative	26
3. Biodisponibilité absolue.....	26
4. Distribution de la chlordécone	26
i. Organotropisme de la chlordécone	26
ii. Corrélation entre les concentrations de CLD sanguine et tissulaire	27
5. Métabolisation de la chlordécone.....	28
i. Généralités sur le métabolisme des xénobiotiques	28
ii. Voies suggérées de métabolisation de la chlordécone.....	29
iii. Métabolisme de phase I : une enzyme espèce dépendante	31
(iii-1). Identification d'une aldo-céto reductase de la chlordécone	31
(iii-2). Activité spécifique	32
(iii-3). Une répartition majoritairement hépatique de la chlordécone réductase	33
(iii-4). Réversibilité de la réaction de métabolisation du chlordécol.....	34
iv. Métabolisme de phase II.....	34

v. Phase III d'efflux	35
vi. Métabolisme du microbiote intestinal	35
vii. Répartition des métabolites de la chlordécone dans l'organisme animal.....	35
6. Excrétion de la chlordécone	36
i. Elimination sanguine de la chlordécone	36
ii. Elimination urinaire et fécale de la chlordécone	36
iii. Autres voies d'excrétion de la chlordécone.....	37
Résumé de la Partie 2.....	43
PARTIE 3: Etat des lieux sur les méthodes de dosage de la chlordécone et de ses métabolites dans les compartiments biologiques.....	44
1. Généralités sur le dosage des pesticides dans différentes matrices : Développement, validation et analyse.....	44
2. Méthodes de dosages de la chlordécone et de ses métabolites dans les matrices biologiques animales	45
i. Dosage dans la bile, les urines et les fèces	45
ii. Dosage dans le sang, le sérum et le plasma	47
3. Méthode de dosages de la chlordécone et des métabolites dans les foies, le tissu gras et le muscle	48
4. Méthodes supplémentaires de dosage de la chlordécone et du chlordécol	50
Résumé de la Partie 3	54
Conclusion de l'approche bibliographique.....	55
CHAPITRE 1 : DEVELOPPEMENTS METHODOLOGIQUES POUR LES ETUDES TOXICOCINETIQUES	57
Introduction du chapitre 1	60
PARTIE 1: Développement analytique pour le dosage de la chlordécone et de ses métabolites dans les différentes matrices biologiques	62
1. Choix analytiques retenus et mise au point.....	62
i. La technique d'analyse par LC-MS/MS	62
(i-1). La spectrométrie de masse en tandem (MS/MS)	62
(i-1-a). Choix analytiques	62
(i-1-b). Principe de l'ESI-MS/MS	63
(i-1-c). Mise au point	64
(i-2). La Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP)	67
(i-2-a). Choix analytiques	67
(i-2-b). Principe de la Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP)	67
(i-2-c). Mise au point	68
ii. Extraction de la chlordécone et du chlordécol dans le foie	68
(ii-1). Etapes préliminaires.....	68
(ii-2). Choix analytique	69
(ii-3). Principe de l'extraction QuEChERS.....	70
(ii-4). Mise au point	72
iii. Extraction de la chlordécone, du chlordécol et de ses métabolites conjugués dans le foie	72
iv. Validation de la méthode d'analyse.....	72
2. Article 1 : Développement et validation de la méthode de dosage simultané de la chlordécone et du chlordécol dans les foies d'animaux	73
ARTICLE 1 Development and validation of an HPLC-MS/MS method with QuEChERS extraction using isotopic dilution to simultaneously analyze chlordecone and chlordecol in animal livers ...	74

3. Article 2 : Validation de la méthode de dosage de la CLD et de ses métabolites dans les urines et les fèces des brebis	82
ARTICLE 2 Validation of analytical methods for chlordecone and its metabolites in the urine and feces of ewes.....	83
4. Extraction de la CLD et de ses métabolites dans le sérum, le tissu gras, la bile et les organes des animaux	95
i. Extraction de la CLD et de ses métabolites dans le sérum	95
ii. Extraction de la chlordécone et du chlordécol dans le tissu gras.....	95
iii. Extraction de la chlordécone et de ses métabolites dans les organes et la bile.....	96
iv. Vérification des performances des méthodes complémentaires de dosage de la chlordécone	97
PARTIE 2: Méthodes pour l'identification de la chlordécone réductase et de son activité spécifique.	98
1. Extraction des protéines du foie des animaux : préparation du cytosol	98
2. Identification de l'aldo-céto reductase AKR1C4 par Western-Blot dans des foies d'animaux	99
i. Principe du Western-Blot	99
ii. Mise au point du Western-Blot à partir d'un foie de brebis	99
iii. Application du Western-Blot à différentes espèces animales.....	100
3. Dosage de l'activité spécifique de la chlordécone réductase	101
i. Tests préliminaires par spectrophotométrie	102
ii. Dosage de l'activité spécifique chlordécone réductase par LC-MS/MS	105
(ii-1). Contexte et objectif	105
(ii-2). Mesure de l'activité spécifique dans un foie de brebis	106
(ii-3). Mesure de l'activité spécifique chlordécone réductase dans des foies de différentes espèces	109
4. Discussion	110
Conclusion du chapitre 1	112
CHAPITRE 2 : TOXICOCINETIQUE DE LA CHLORDECONE CHEZ LA BREBIS	117
Introduction du chapitre 2	120
MATERIEL ET METHODES	124
1. Schémas expérimentaux	125
i. Protocole 1	125
ii. Protocole 2	125
2. Prélèvements et traitements des échantillons	126
i. Sang	126
ii. Urines.....	126
iii. Fèces	126
iv. Bile.....	127
v. Organes et contenus intestinaux	127
3. Dosage des échantillons	127
4. Analyse des données	127
i. Données sériques	127
ii. Données urinaires et fécales	128
RESULTATS	135
PARTIE 1: Cinétiques sanguines, urinaires et fécales après administration de chlordécone ou de chlordécol	136
1. Linéarité de l'élimination sanguine de la chlordécone.....	136

ARTICLE 3	Linear toxicokinetic of chlordecone in ewe's serum.....	137
2.	Voies et formes d'élimination de la chlordécone et du chlordécol	155
i.	Elimination sanguine après administration i.v de CLD ou de CLDOH	155
(i-1).	Cinétiques d'élimination sanguines	155
(i-2).	Comparaison des paramètres toxicocinétiques de la CLD et du CLDOH.....	156
ii.	Elimination urinaire et fécale après i.v de CLD ou CLDOH.....	157
(ii-1).	Résultats après administration i.v de CLD	157
(ii-2).	Résultats après administration i.v de CLDOH.....	158
3.	Corrélation entre les concentrations sériques, urinaires et fécales.....	159
(i-1).	Corrélation entre les concentrations sériques et les concentrations fécales.....	160
(i-2).	Corrélation entre les concentrations sériques et les concentrations urinaires.....	161
PARTIE 2:	Distribution tissulaire de la chlordécone et de ses métabolites après administration de chlordécone ou de chlordécol	162
PARTIE 3:	Approche quantitative des formes d'excrétion de la chlordécone et du chlordécol.....	165
1.	Etude du transfert de la chlordécone et du chlordécol de la bile vers les fèces	165
2.	Détermination des pourcentages excrétés de chlordécone et chlordécol	167
(i-1).	Pourcentage de la dose de CLD administrée éliminée via les fèces après i.v de CLD.....	167
(i-2).	Pourcentage de la dose de CLDOH administrée éliminée via les fèces après i.v de CLDOH	170
3.	Proposition d'un premier modèle compartimental chez la brebis.....	171
	Conclusion du chapitre 2.....	174
DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES	177
PARTIE 1:	Une étude toxicocinétique support pour la gestion de la contamination animale aux Antilles	181
1.	De nouvelles connaissances sur le devenir de la CLD.....	181
i.	Le métabolisme, une voie d'explication des modalités de vitesse d'élimination de la chlordécone	181
(i-1).	Linéarité de l'élimination de la CLD.....	181
(i-2).	Temps de demi-vie et activités enzymatiques spécifiques.....	181
ii.	Le métabolisme hépatique permet d'expliquer en partie les formes distribuées et éliminées de la chlordécone	183
iii.	... mais le métabolisme ne pilote quantitativement pas l'élimination de la chlordécone.....	183
2.	Application à court terme des nouvelles connaissances chez la brebis.....	184
i.	Réduction de l'exposition du consommateur à la chlordécone et de ses métabolites	184
(i-1).	Stratégies de décontamination animale.....	184
(i-2).	Est-il possible de retrouver du chlordécol dans les DAOA ?	185
ii.	Rejet de la chlordécone dans l'environnement...mais aussi du chlordécol, son métabolite qu'il faudra surveiller	186
PARTIE 2:	Un développement analytique propice à des projets portant sur la chlordécone.....	187
1.	Une nouvelle méthode d'extraction sensible de la chlordécone et du chlordécol.....	187
i.	Une méthode d'analyse fiable et sensible de dosage de la chlordécone et du chlordécol	187
ii.	Une même méthodologie d'extraction pour différentes matrices biologiques animales.....	187
iii.	Le dosage des métabolites conjugués de la chlordécone et du chlordécol	188
2.	Application à court terme.....	193
i.	Une méthodologie rapide et moins coûteuse d'extraction de la chlordécone.....	193
ii.	Des améliorations autour du dosage des métabolites de la CLD pour un meilleur suivi de la contamination animale	193

PARTIE 3: Vers la réalisation d'un modèle compartimental de la chlordécone chez la brebis.....	195
CONCLUSION GENERALE	197
ANNEXE.....	201
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	205

Figure 1 : Cartographie des risques de contamination des sols par la chlordécone à la Guadeloupe.....	13
Figure 2: Représentation régionale de niveau de contamination des sols martiniquais par la chlordécone (mise à jour 2016) (Desprats <i>et al.</i> , 2016)	13
Figure 3: Voies d'exposition de l'Homme à la chlordécone.....	18
Figure 4: Métabolisme des xénobiotiques (Baldi <i>et al.</i> , 2013)	28
Figure 5: Voies suggérées de métabolisation de la chlordécone proposées par Fariss <i>et al.</i> (1980) chez l'Homme.....	30
Figure 6: Equation de la réaction enzymatique de métabolisation de la chlordécone en chlordécol	32
Figure 7 : Schéma récapitulatif de la répartition de la CLD et de ses métabolites chez deux rongeurs : le rat et la gerbille.....	39
Figure 8 : Schéma récapitulatif de la répartition de la CLD et de ses métabolites chez deux monogastriques : l'Homme et le porc	40
Figure 9 : Schéma récapitulatif de la répartition de la CLD et de ses métabolites chez un polygastrique	41
Figure 10 : Schéma général d'hydrolyse de la β -glucuronidase	45
Figure 11 : Schéma général d'hydrolyse de la sulfatase	45
Figure 12: Schéma de dosage de la CLD et des métabolites dans la bile (Fariss <i>et al.</i> , 1980)..	46
Figure 13 : Schéma illustrant le devenir d'un ion à travers un triple quadripôle (Marquet, 2005).....	64
Figure 14 : Spectres de masse [M-H ⁻] en mode Full Scan de la chlordécone, du chlordécol et de leurs étalons internes respectif.....	66
Figure 15 : Récapitulatif des étapes d'extraction de la méthode de référence de dosage de la CLD	69
Figure 16 : Récapitulatif des deux grandes étapes de la méthode QuEChERS (fait à partir de http://ftp.mn-net.com/english/Flyer_Catalogs/Chromatography/SPE/KATEN200134_CHROMABOND_QuEChERS_EN_www.pdf).....	71
Figure 17 : Etapes d'extraction et de salting-out (à gauche) et de purification du surnageant par la PSA/C18/Envi-Carb (à droite) d'un foie de bovin.....	72
Figure 18 : Préparation d'un cytosol de foie de brebis dans du tampon phosphate (de gauche à droite : mélange foie + tampon phosphate, homogénat après ultracentrifugation, dialyse du cytosol, cytosol dialysé pour les mesures enzymatiques).....	99
Figure 19 : Optimisation de la quantité de protéines totales à déposer depuis le cytosol de foie de brebis afin d'identifier l'AKR1C4 par Western-Blot.....	100
Figure 20 : Identification de l'AKR1C4 responsable de la métabolisation de la CLD dans des cytosols de foies de différents animaux	101

Figure 21 : Schéma de métabolisation de la chlordécone en chlordécol par la chlordécone réductase.....	102
Figure 22 : Récapitulatif des différentes formes existantes de la chlordécone.....	105
Figure 23 : Application de la méthode de dosage simultané de la CLD et du CLDOH par LC-MS/MS pour la détermination de l'activité spécifique chlordécone réductase	106
Figure 24 : Dosage LC-MS/MS du cytosol de foie de brebis sans ajout de CLD pour réaliser la réaction <i>in vitro</i>	107
Figure 25 : Suivi de la transition MRM CLDOH montrant l'apparition du CLDOH au cours du temps	108
Figure 26 : Courbe représentant la concentration de CLDOH apparue lors de la réaction enzymatique en fonction du temps dans le cytosol de foie de brebis	109
Figure 27 : Courbe représentant la concentration de CLDOH apparue lors de la réaction enzymatique en fonction du temps dans le cytosol de foie de porc	110
Figure 28 : Récapitulatif des travaux de développement analytique effectués dans les différentes matrices animales.....	113
Figure 29 : Schéma d'élimination de la chlordécone chez la brebis complété à l'aide du chapitre 1.....	114
Figure 30 : Présentation des hypothèses pour les travaux de thèse (Hypothèses 1 et 2)	122
Figure 31 : Présentation des hypothèses pour les travaux de thèse (Hypothèses 2 et 3)	123
Figure 32 : Présentation du protocole toxicocinétique 1 réalisé chez la brebis	132
Figure 33 : Présentation du protocole toxicocinétique 2 réalisé chez la brebis	133
Figure 34 : Concentrations de CLD et de CLDOH-C retrouvées dans le sérum des brebis en fonction du temps de prélèvement (n=5) après i.v de CLD à 1 mg kg ⁻¹ PV	155
Figure 35 : Concentrations de CLDOH et de CLDOH-t retrouvées dans le sérum des brebis en fonction du temps de prélèvement (n=3) après i.v de CLDOH à 1 mg kg ⁻¹ PV	156
Figure 36 : Equilibre de la réaction de métabolisation de la CLD à l'issu des travaux	156
Figure 37 : Concentrations de CLD et de CLDOH-t retrouvées dans les urines des brebis en fonction du temps moyen de l'intervalle de prélèvement (n=5) après administration i.v de CLD à 1 mg kg ⁻¹ PV.....	157
Figure 38: Concentrations de CLD et de CLDOH retrouvées dans les fèces des brebis en fonction du temps moyen de l'intervalle de prélèvement (n=5) après administration i.v de CLD à 1 mg kg ⁻¹ PV	158
Figure 39 : Concentrations de CLD et de CLDOH retrouvées dans les fèces des brebis en fonction du temps moyen de l'intervalle de prélèvement (n=3) après administration i.v de CLDOH à 1 mg kg ⁻¹ PV.....	159
Figure 40 : Bilan des voies et formes d'élimination de la chlordécone et du chlordécol chez la brebis.....	159
Figure 41 : Corrélation entre les concentrations sériques de CLD et les concentrations fécales de CLD chez la brebis.....	160
Figure 42 : Corrélation entre les concentrations fécales de CLD et de CLDOH chez la brebis.....	160

Figure 43: Distribution de la chlordécone dans les organes des brebis, 72h après i.v de CLD	162
Figure 44 : Distribution du CLDOH et de ses métabolites 24h (A) et 72h (B) après i.v de CLDOH	163
Figure 45: Concentrations de CLD, CLDOH et CLDOH-C dans la bile après i.v de CLD ou i.v de CLDOH (n=3, les barres d'erreurs indiquent l'écart-type autour de la moyenne)....	165
Figure 46 : Proportion de CLD et de métabolites dans la bile, le contenu du colon.....	166
Figure 47 : Comparaison du transfert intestinal du CLDOH et de ses métabolites 24h (A) et 72h (B) après i.v de CLDOH	166
Figure 48 : Clairances fécales de la CLD chez la brebis après i.v de CLD	167
Figure 49 : Clairances fécales du CLDOH-t chez la brebis après i.v de CLD.....	168
Figure 50 : Clairances fécales du CLDOH après i.v de CLDOH	170
Figure 51 : Approche compartimentale de l'élimination de la chlordécone chez la brebis	172
Figure 52 : Equations mathématiques du modèle compartimental de la chlordécone chez la brebis	173
Figure 53 : Schéma global d'élimination de la chlordécone chez la brebis.....	175
Figure 54 : Chromatogramme d'un mélange CLD, CLDOH et CLDOH-S obtenu par LC-MS/MS	190
Figure 55 : Chromatogramme d'une urine de brebis au temps de prélèvement 24-45h après i.v de CLDOH et avant déconjugaison enzymatique obtenu par LC-MS/MS	191
Figure 56 : Chromatogramme d'une urine de brebis au temps de prélèvement 24-45h après i.v de CLDOH et après déconjugaison enzymatique	192

Tableau 1 : Propriétés physico-chimiques de la chlordécone tiré de la thèse de Lastel (2016) (IPCS, 1984; Kermarrec, 1980; Le Déaut and Procaccia, 2009; Picot.A & Rabache.M, 2005;Comité d'étude des polluants organiques persistants, 2006).....	11
Tableau 2: Bilan de la production animale et végétale aux Antilles Françaises (IEDOM, 2015)	14
Tableau 3 : Dénombrement des exploitations et du cheptel bovin de la Guadeloupe et de la Martinique (Galan <i>et al.</i> , 2009).....	15
Tableau 4: Statistiques de la production alimentaire de la filière animale guadeloupéenne en 2010 (DAAF, IEDOM, AMIG, IGUAVIE, ODEADOM) à partir de la thèse de Lastel, (2016).....	16
Tableau 5 : Contribution des circuits d'approvisionnement à l'exposition humaine par la chlordécone ("Exposition des consommateurs des Antilles au chlordécone, résultats de l'étude Kannari," 2017).....	19
Tableau 6: Quantités de sol ingérées par différentes espèces de rente (Bouveret, 2012)	24
Tableau 7 : Estimation de l'exposition des animaux via l'eau, les plantes et le sol	25
Tableau 8 : Enzymes impliquées dans la biotransformation des xénobiotiques.....	31
Tableau 9: Comparaison de l'activité spécifique chlordécone réductase chez la gerbille dans différents tissus (Réadapté de Molowa <i>et al.</i> (1986b)).....	33
Tableau 10: Comparaison des ratios CLD-totale (CLD-t) / CLDOH-total (CLDOH-t) et pourcentages de métabolites conjugués dans la bile de différentes espèces animales.....	34
Tableau 11 : Comparaison des ratios CLD-totale (CLD-t) /CLDOH-total (CLDOH-t) et pourcentage de métabolites conjugués dans les fèces de différentes espèces animales	37
Tableau 12 : Répartition connue de la CLD et de ses métabolites dans les matrices de différentes espèces animales	38
Tableau 13: Comparaison des différentes méthodes de dosage de la chlordécone dans le sang	47
Tableau 14 : Comparaison des différentes méthodes de dosage de la chlordécone dans le foie, le tissu gras et le muscle des animaux	49
Tableau 15 : Méthodes supplémentaires de dosage de la CLD et du CLDOH par LC-MS/MS	50
Tableau 16 : Récapitulatif des méthodes connues pour le dosage de la chlordécone et de ses métabolites	52
Tableau 17 : Optimisation de la quantité de protéines pour la mesure de l'activité spécifique	103
Tableau 18 : Optimisation de la quantité de CLD pour la mesure de l'activité spécifique	104
Tableau 19 : Optimisation du pourcentage de méthanol pour la mesure de l'activité spécifique	104

Tableau 20 : Paramètres toxicocinétiques de la CLD et du CLDOH (moyenne \pm écart-type de la moyenne)	157
Tableau 21 : Détermination des pourcentages de CLD excrétés via les fèces	169
Tableau 22 : Détermination des pourcentages de CLDOH excrétés.....	170

LISTE DES ABREVIATIONS

¹³ C-CLD		GC-ECD	
Etalon interne de la CLD	47	Chromatographie en phase gazeuse couplée à	
13C-CLDOH		un détecteur à capture d'électron	48
Etalon interne du CLDOH	65	GC-MS	
ACN		Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à	
Acétonitrile	48	la spectrométrie de masse	46
ADME		GMS	
Absorption, Distribution, Métabolisme et		Grandes et Moyennes Surfaces	4
Excrétion	23	HDL	
AKR		High-Density Lipoproteins	26
Aldo cétoréductases	31	i.v	
AKR1C4		Intraveineuse	125
Aldo cétoréductases de la famille 1 (sous-		ICH	
famille C4)	31	International Conference for Harmonisation	44
ANSES		IGN	
Agence nationale de sécurité sanitaire de		Institut national de l'information géographique	
l'alimentation, de l'environnement et du		et forestière	13
travail	4	INRA	
BRGM		Institut National de Recherche Agronomique	12
Bureau de Recherches Géologiques et		JAJA	
Minières	12	programme Jardins Familiaux	13
CDR		kDa	
Chlordécone réductase	31	kilodalton	32
CE		K _{ow}	
Commissio n Européenne	20	Coefficient eau-octanol	26
CIRAD		LC-MS/MS	
Centre de coopération internationale en		Chromatographie en phase liquide couplée à	
recherche agronomique pour le		la spectrométrie de masse en tandem	48
développement	13	LD	
CLD		Limite de Détection	49
Chlordécone	4	LDL	
CLD-C		Low Density Lipoproteins	27
Chlordécone conjuguée	34	LMR	
CLDOH		Limites Maximales de Résidus	4
Chlordécol	12	LQ	
CLDOH-C		Limite de Quantification	47
Chlordécol conjugué	34	LSAI	
CLDOH-t		Laboratoire de Sécurité des Aliments	60
Chlordécol total	34	M.U	
CLD-t		millions d'unités	16
Chlordécone totale	34	m/z	
DAAF		rapport masse sur charge	62
Direction de l'Alimentation, de l'Agriculture et		MeOH	
de la Forêt	13	Méthanol	67
DAOA		MG	
Denrées Alimentaires d'Origine Animale	4	Matière Grasse	17
EDE		MRM	
Etablissements départementaux d'élevage	14	Multiple Reaction Monitoring	63
ESI			
Electrospray	63		

MS		Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe	60
Matière Sèche	24		
NADPH		SAU	
Nicotinamide adenine dinucléotide phosphate	32	Surface Agricole Utile	4
PBM		SIG	
Pesticides et Biotoxines Marines	60	Système d'Information Géographique	13
pc		SPE	
poids corporel	19	Extraction sur Phase Solide	47
PCBs		$t_{1/2}$	
Polychlorobiphényles	27	Temps de demi-vie d'élimination	36
PF		tec	
Poids Frais	20	tonnes équivalent carcasses	16
POP		Union Européenne	
Polluant Organique Persistant	4	UE	4
PV		UR AFPA	
Poids Vif	125	Unité de Recherche Animal et Fonctionnalités des Produits Animaux	99
QuEChERS		v/v	
		volume/volume	46

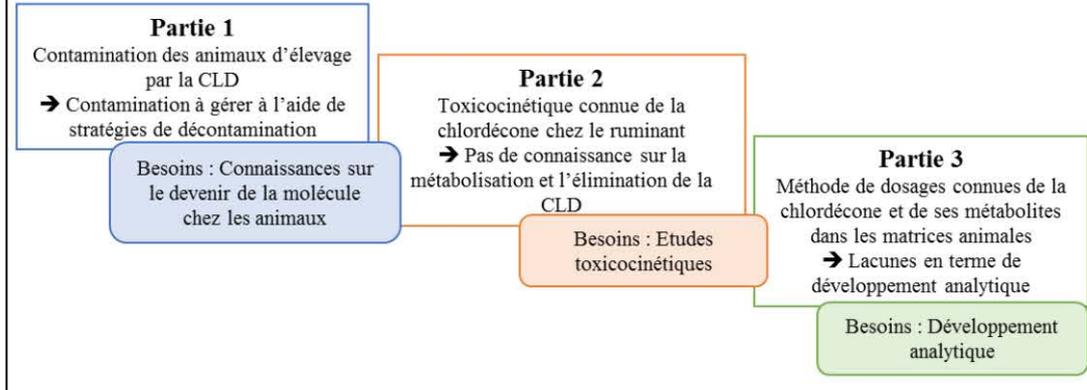
1

Introduction Générale

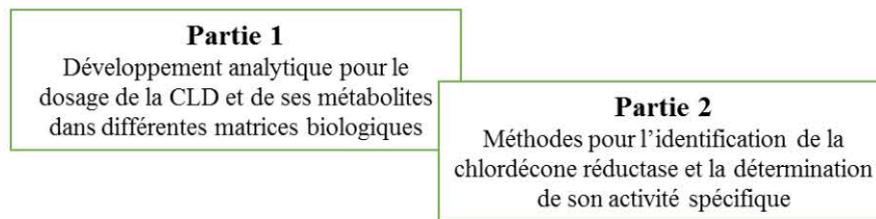
Introduction Générale

Comment s'élimine la chlordécone (CLD) chez la brebis ?

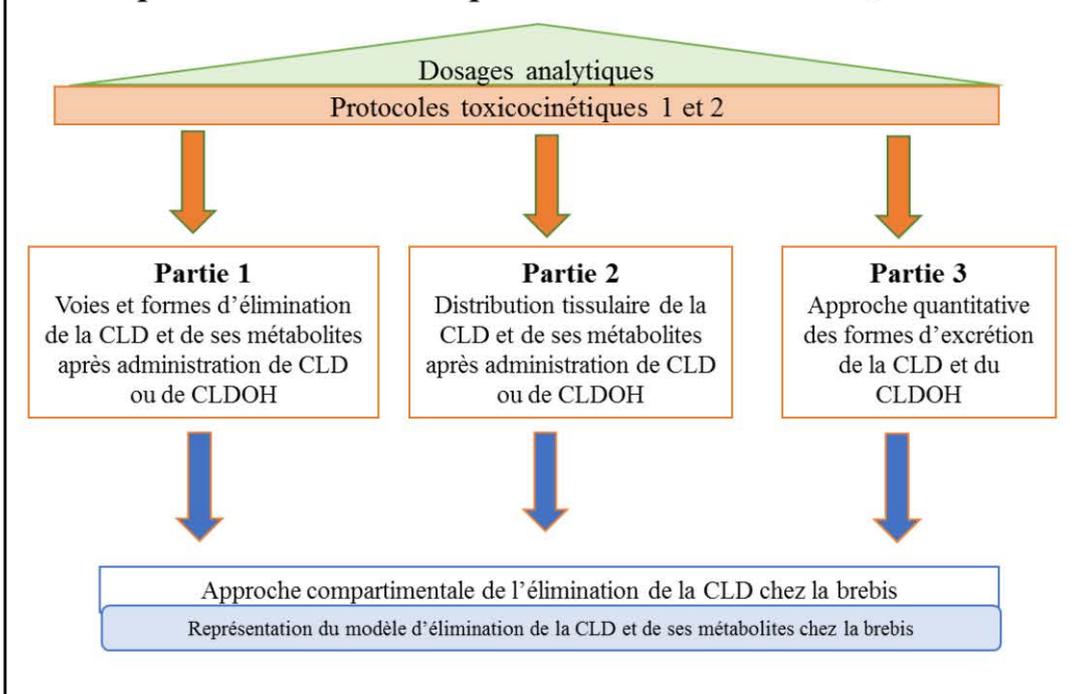
Synthèse Bibliographique



Chapitre I: Développements méthodologiques pour les études toxicocinétiques



Chapitre II: Toxicocinétique de la chlordécone chez la brebis



Discussion générale et Perspectives

Conclusion générale

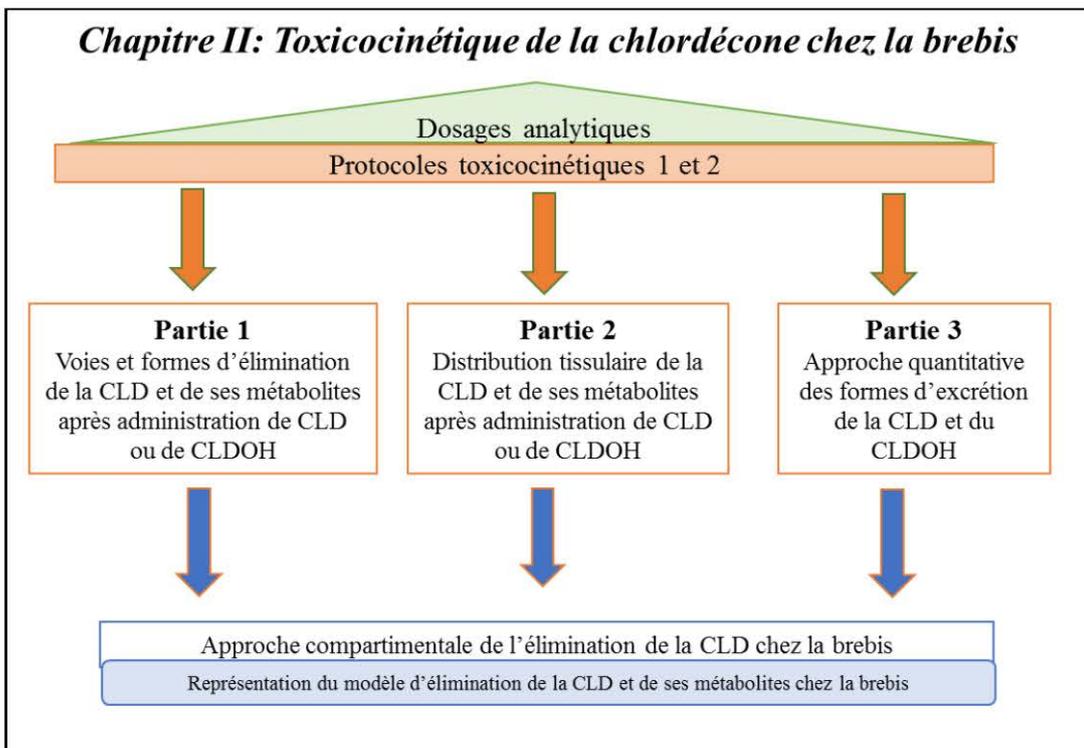
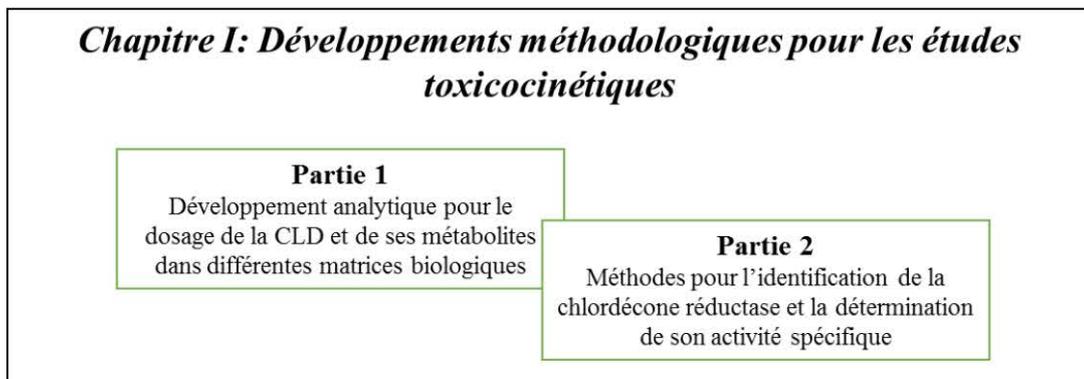
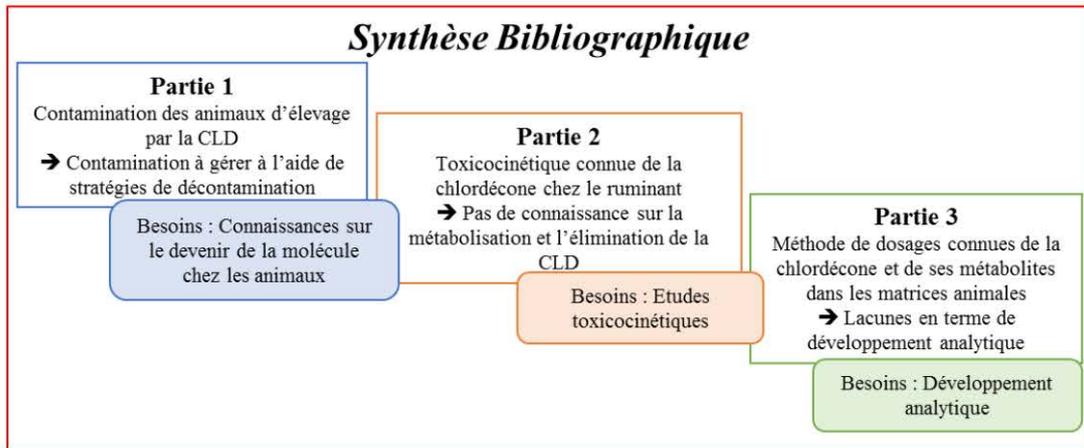
La consommation d'aliments sains est un enjeu actuellement au cœur des préoccupations de la population. Différentes crises sanitaires et préoccupantes ont été dévoilées au cours de ces 30 dernières années. Certaines d'entre elles sont dues à l'utilisation de produits phytosanitaires comme par exemple en 2017, le scandale des œufs contaminés au fipronil. En 2018, l'affaire de la Chlordécone (CLD), un pesticide utilisé pour lutter contre le charançon du bananier des années 1972 à 1993 dans les Départements de la Guadeloupe et de la Martinique a été fortement médiatisée. Ce pesticide, classé Polluant Organique Persistant (POP), en raison de sa faible dégradation biotique et abiotique, de sa persistance dans l'environnement, de sa bioaccumulation dans la chaîne alimentaire et de sa toxicité pour les êtres vivants est aujourd'hui encore présent sur 15 % de la Surface Agricole Utile (SAU) des Antilles Françaises. Par conséquent, les animaux pâturant sur des sols contaminés par la CLD sont susceptibles d'être exposés et de produire des Denrées Alimentaires d'Origine Animale (DAOA) à risque pour l'Homme. Actuellement, la population antillaise consomme des DAOA provenant soit de circuits dits contrôlés (par exemple de type Grandes et Moyennes Surfaces, GMS) soit non-contrôlés (par exemple de type marchés ou bord de route). Un récent rapport de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) indique que les circuits non contrôlés contribuent majoritairement à l'exposition de la population par la CLD c'est-à-dire qu'ils ne respectent pas les Limites Maximales de Résidus (LMR) actuellement fixées par l'Union Européenne (UE) qui garantissent la santé du consommateur. Afin de sécuriser les DAOA destinées à la consommation humaine, une des solutions est de maîtriser la contamination des animaux. Cette maîtrise de la contamination animale peut s'effectuer en réduisant l'exposition des animaux et/ou en proposant des stratégies de décontamination animale dans les zones contaminées. Or, ces stratégies de décontamination se basent sur la compréhension de l'élimination de la molécule chez l'animal.

Dans ce contexte, l'objectif de ces travaux de thèse est d'étudier comment s'élimine la chlordécone chez la brebis, une espèce animale présente dans le paysage agricole antillais. Cette thèse est tout d'abord introduite à l'aide d'une *synthèse bibliographique* faisant le point (1) sur la contamination animale par la CLD, (2) sur les connaissances en termes de devenir de la CLD chez l'animal d'élevage et (3) sur les connaissances concernant les méthodes de dosage actuelles de la CLD et de ses métabolites dans différentes matrices animales. A l'issue de cette première partie, des lacunes et des manquements ont été identifiés. Les travaux de cette thèse ont pour vocation d'apporter des réponses à quelques-unes des lacunes identifiées dans la synthèse bibliographique. Le *premier chapitre* de cette thèse présente les *développements méthodologiques* pour les études toxicocinétiques autour de deux axes (1) le développement analytique et (2) le développement pour le suivi enzymatique. Le *deuxième chapitre* permet d'exposer deux protocoles expérimentaux *in vivo* mis en place chez la brebis permettant d'obtenir de nouvelles connaissances sur le *devenir de la CLD chez la brebis*. La présentation des résultats obtenus a été scindée en trois parties. A l'issue des deux chapitres de thèse, l'ensemble des travaux et résultats obtenus sont analysés et mis en perspective par rapport à la synthèse bibliographique à l'aide d'une *discussion générale* qui termine ce manuscrit.

2

Synthèse Bibliographique

Introduction Générale
Comment s'élimine la chlordécone (CLD) chez la brebis ?



Discussion générale et Perspectives

Conclusion générale

PARTIE 1:
**Contamination des animaux d'élevage par la chlordécone aux Antilles
Françaises**

1. La Chlordécone

i. Origine, découverte et utilisations

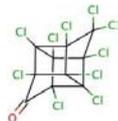
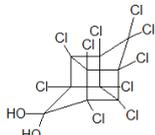
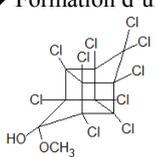
La Chlordécone (CLD) est une molécule de synthèse produite et découverte aux Etats-Unis en 1940 (Anderson *et al.*, 2005). Elle a été brevetée en 1952 et commercialisée à partir de 1958 sous les noms de Kepone®, Curlone® et de GC-1189® (Le Déaut and Procaccia, 2009). Elle a été utilisée dans le domaine de l'agriculture en tant qu'insecticide. La CLD a fait l'objet de 55 formulations à différents dosages : 0,125% pour les pièges à fourmis, 5 % pour la lutte contre le charançon du bananier, 50 % pour le contrôle du cricket de Floride et 90 % pour la lutte contre les doryphores. 300 tonnes de CLD auraient été épandues sur les sols de la Guadeloupe et de la Martinique entre 1972 et 1993 (Le Déaut and Procaccia, 2009) afin de lutter contre le charançon du bananier (*Cosmopolites sordidus*). En pratique, chaque année un traitement de 30 g de Kepone/Curlone a été appliqué par pied de banane ce qui équivaut à 3-5 kg de matière active par hectare. La poudre de CLD était déposée sur les sols à un rayon allant de 30 à 50 m autour du pied du bananier. L'épandage aérien de la CLD n'a jamais été pratiqué aux Antilles Françaises.

A la fin des années 1970, à l'issue des rapports Snegaroff (1977), Kermarrec (1980) et IPCS (1984) la persistance de la molécule dans l'environnement (eaux de rivières et écosystèmes) a été décrit ainsi que sa toxicité pour les êtres vivants. La molécule a alors été interdite en 1990 (Gaumand *et al.*, 2005) mais utilisée jusqu'en 1993 suite à des dérogations successives. C'est en 1993 que la molécule a été définitivement interdite. A l'issue de ces rapports, de nombreux projets et études financés par les gouvernements ont été mis en place et ont montré une importante contamination par la CLD des eaux de consommation (Bonan and Prime, 2001), et des poissons et crustacés dans les rivières (Coat *et al.*, 2011). La CLD est actuellement considérée comme un Polluant Organique Persistant (POP) et a été ajoutée à la liste des substances interdites (Convention de Stockholm en 2009).

ii. Propriétés physico-chimiques

La CLD est un composé appartenant à la famille des organochlorés de formule brute $C_{10}Cl_{10}O$. La molécule est constituée de 10 atomes de carbones, de 10 atomes de chlore et d'un unique atome d'oxygène. Etant donné sa structure particulière, la CLD est une molécule très stable, peu soluble dans l'eau et qui peut fortement se lier aux sols et sédiments pendant plusieurs années avec un faible taux de libération (Cabidoche *et al.*, 2009). Le tableau 1 présente les principales caractéristiques physico-chimiques de la molécule.

Tableau 1 : Propriétés physico-chimiques de la chlordécone tiré de la thèse de Lastel (2016) (IPCS, 1984; Kermarrec, 1980; Le Déaut and Procaccia, 2009; Picot.A & Rabache.M, 2005; Comité d'étude des polluants organiques persistants, 2006)

Identité	Famille : Organochloré, bishomocubane	
	Nom IUPAC 1,1a,3,3a,4,5,5a,5b,6-décachlorooctahydro-2H-1,3,4-(méthanetriyl) cyclobuta[cd]pentalen-2-one	Noms usuels commerciaux Kepone®, Curlone®, GC-1159®, ENT 16391
	Formule chimique C ₁₀ Cl ₁₀ O	Structure chimique 
	N° CAS 143-50-0	
	Synonymes - Décachlorocétone - Décachloro-pentacyclo[5,2,1,0 _{2,6} ,0 _{3,9} ,0 _{5,8}]decan-4-one - Décachloro-octahydro-1,3,4-métheno-2H-cyclobuta(cd)pentalène-2-one	
Propriétés chimiques et physiques	Poids moléculaire 490,64 g.mol ⁻¹	État physique Solide brun-blanc (inodore)
	Stabilité Thermiquement stable	Températures caractéristiques Point de sublimation : 350°C Incinération à partir de 1 000°C
	Solubilité	
	Eau pH 4 : 1,75 mg.L ⁻¹ Eau pH 10,9 : 175 mg.L ⁻¹	Acétone : très soluble Éther de pétrole : soluble
	Solvants organiques (benzène et hexane) : soluble sous sa forme anhydre	Solvants oxygénés (alcools et cétones) : soluble sous sa forme hydratée
	Réactivité	
	Eau → Forme hydratée gem-diol  Coefficient de partage octanol/eau (K_{ow}) entre 4,50 et 5,41	Méthanol → Formation d'un hemi-cétal 
	Inflammabilité Ininflammable	Volatilité Faible → Constante de la loi de Henry variant entre 2,0.10 ⁻² et 5,45.10 ⁻³ Pa.m ³ .mole ⁻¹ (25°C) selon les données utilisées pour son calcul
	Affinité - Pour les tissus adipeux - Pour la matière organique des sédiments et du sol	Incompatibilité - Acides minéraux forts - Oxydants puissants
	Dégradabilité - Faible dégradation biotique et abiotique - Résistante à la dégradation aérobie en milieu aquatique ou dans le sol - Biodégradation anaérobie sous certaines conditions	
Risques	 Toxique	 Effets néfastes sur les organismes des milieux aquatiques
	 Cancérogène Mutagène Reprotoxique	

La forme « gem-diol » de la chlordécone a été mise en évidence à partir d'échantillons commerciaux solides par le Bureau de Recherches Géologiques et Minières (BRGM) à l'aide de la spectrométrie par infra-rouge. Sur le spectre de la chlordécone, il n'y avait pas de bandes d'absorption caractéristiques des fonctions carbonyles mais uniquement des bandes caractéristiques des vibrations d'élongations des liaisons alcools. Dans l'environnement, la forme réelle de la chlordécone est la forme gem-diol (Bristeau, 2012). Dans le manuscrit, c'est sous cette forme que seront effectuées les analyses de la chlordécone.

iii. Toxicité de la CLD

La CLD est une molécule toxique (Boucher *et al.*, 2013; Multigner *et al.*, 2010) pour toutes les espèces animales, qu'elles soient aquatiques ou terrestres. La CLD est un perturbateur endocrinien qui induit des modifications cellulaires, structurelles et fonctionnelles importantes sur le système reproducteur des animaux : elle a été qualifiée de xéno-oestrogène (Naber and Ware, 1964; Eroschenko and Wilson, 1974; Eroschenko and Place, 1977; Eroschenko and Hackmann, 1981; Shelby *et al.*, 1996; Cravedi *et al.*, 2007). Des travaux réalisés par Guzelian, (1982) ont montré que l'incubation *in vitro* d'explants d'oviductes de poules avec de la CLD induisait, comme pour l'œstradiol, la synthèse spécifique *de novo* de protéines de blanc d'œuf et augmentait le nombre de séquences spécifiques d'ARN messagers codant pour ces protéines. Chez l'Homme, des études ont montré un lien de cause à effet entre l'exposition à la CLD et l'augmentation du risque d'apparition de cancer de la prostate (Multigner *et al.*, 2010). La CLD a des effets néfastes sur le développement visuel, cognitif et moteur d'enfants exposés pendant la gestation ou après la naissance (Dallaire *et al.*, 2012). Ces travaux ont montré que lors d'une exposition pré-natale à la CLD, une diminution de la reconnaissance visuelle était observée ainsi qu'une augmentation du temps de traitement de l'information visuelle. La CLD possède un métabolite principal : le chlordécol (CLDOH) présent chez l'Homme, la gerbille et le porc (Fariss *et al.*, 1980; Houston *et al.*, 1981; Soine *et al.*, 1983). Ce métabolite possède une toxicité proche de celle observée chez la CLD sur les mitochondries et sur la perméabilité d'érythrocytes d'ovins (Desaiah and Koch, 1975; Moreland and Soileau, 1988; Soileau and Moreland, 1983). En 2003, les Valeurs Toxicologiques de Référence de la CLD ont été définies comme indiqué dans les saisines N° 2003-SA-0330, 0132 et 009, sur la base des études de neurotoxicité réalisées à court terme chez le rat et elles intègrent un facteur de sécurité de 100 rendant compte de la variabilité inter et intra-espèce.

iv. Persistance de la CLD dans les sols antillais : cartographie des zones contaminées

Comme indiqué précédemment, la CLD a été directement épanchée sur les sols antillais et est actuellement persistante dans les sols de la Martinique et de la Guadeloupe. Afin d'estimer l'étendue de la contamination des sols par la CLD des cartes de contamination des sols ont été produites. En Guadeloupe, une étude cartographique « des zones à risque » avait été établie en 2005 par les services déconcentrés du Ministère en charge de l'agriculture et par l'Institut National de Recherche Agronomique (INRA) en se basant sur

l'historique de l'occupation des sols par la culture bananière pendant la période de commercialisation de la CLD et des données de carte de l'Institut national de l'information géographique et forestière (IGN) de 1969, 1985 et 1997. Afin d'actualiser les cartes de risques de contamination à la Guadeloupe le projet ChlEauTerre a été initié (Rochette *et al.*, 2017). En effet, la cartographie établie jusqu'alors a pu omettre un certain nombre de parcelles pourtant anciennement cultivées. Cette nouvelle cartographie a été établie en retravaillant et réanalysant les documents qui avaient servis à l'établissement de la cartographie de 2006. De plus, d'autres cartes d'occupations historiques du sol ont été exploitées. La nouvelle cartographie établie est présentée sur la figure 1. Elle se base sur quatre nouvelles classes de risque échelonnées du risque le plus fort (Risque 1) au risque le plus faible (Risque 4).

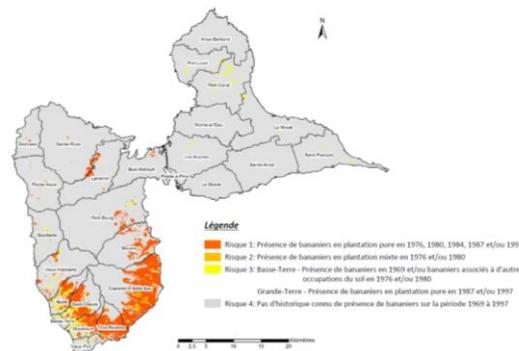


Figure 1 : Cartographie des risques de contamination des sols par la chlordécone à la Guadeloupe (Projet ChlEau Terre (Rochette *et al.*, 2017))

En Martinique, tout comme en Guadeloupe, le suivi et la mise à jour de cartographie de la contamination des sols par la chlordécone est effectuée à l'aide du Système d'Information Géographique (SIG). La dernière mise à jour date de 2016 et permet d'obtenir une cartographie régionale de la contamination sur les sols martiniquais (Desprats *et al.*, 2016) présentée sur la figure 2. Ces données de contamination proviennent essentiellement de la Chambre de l'Agriculture, de la Direction de l'Alimentation, de l'Agriculture et de la Forêt (DAAF), de l'Agence Régionale de Santé (ARS) dans le cadre du programme Jardins Familiaux (JAFA), du BRGM et du Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement (CIRAD).

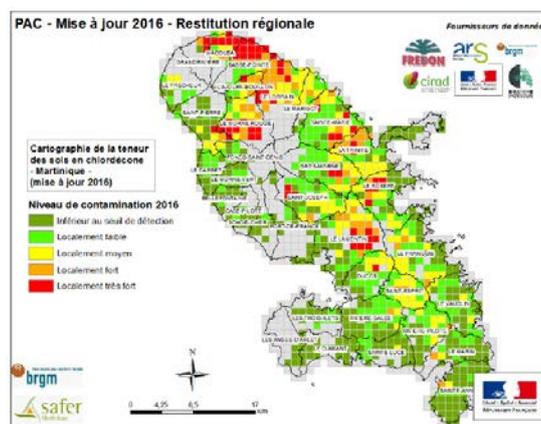


Figure 2: Représentation régionale de niveau de contamination des sols martiniquais par la chlordécone (mise à jour 2016) (Desprats *et al.*, 2016)

A l'aide de ces cartographies il est possible de mettre en évidence que près de 20 % de la SAU des îles antillaises sont pollués ; ce qui équivaut à presque la moitié de la SAU de la Basse-Terre pour l'île de la Guadeloupe.

2. Contamination des animaux d'élevage par la chlordécone

i. Production animale et consommation de produits animaux aux Antilles

L'élevage aux Antilles Françaises représente environ 20 % du chiffre d'affaire total de la production agricole (bovins, caprins, ovins et porcins) comme le montre le tableau 2 ci-dessous. L'élevage de ruminants est une composante majeure car il est présent sur 30 à 45 % de la surface agricole (Galan *et al.*, 2009). En Guadeloupe, l'élevage traditionnel est de type extensif (Naves *et al.*, 2001; Alexandre *et al.*, 2012): il consiste à attacher un animal au piquet sur un site donné et de déplacer les piquets en fonction des ressources herbacées. Cet élevage est pratiqué par 60 % des éleveurs de caprins, 90 % des éleveurs de bovins et certains élevages porcins patrimoniaux (Boval *et al.*, 2012). Il existe cependant aussi des systèmes d'élevage qualifiés de semi-intensifs à intensifs conciliant la conduite traditionnelle (animaux au piquet, monte naturelle, ventes occasionnelles) et la conduite productiviste (intensification du chargement, introduction partielle de génotypes croisés, structuration de l'exploitation) (Naves, 2003). De plus, une distinction importante est faite entre les éleveurs d'animaux de rente, associés aux différentes filières d'élevage (adhérents des coopératives, allocataires déclarés à l'assurance maladie des exploitants agricoles...) et les détenteurs d'animaux de rente en dehors des circuits officiels. Ainsi, il existe une différence notable entre le nombre de détenteurs bovins connus des établissements départementaux d'élevage (EDE) et celui des détenteurs « actifs », c'est à dire ayant notifié, au minimum, un mouvement d'animaux au cours de l'année civile : naissance, vente ou mortalité (tableau 3).

Tableau 2: Bilan de la production animale et végétale aux Antilles Françaises (IEDOM, 2015)

en millions €	2013		2014		*Var 14/13
	Valeur	% Part	Valeur	% Part	
Légumes	23,9	12,1 %	25,6	12,7 %	7,1 %
Fruits (dont bananes d'exportation)	75,1	38,1 %	82,7	41,1 %	10,1 %
Plantes industrielles (dont canne à sucre)	19,5	9,9 %	24,7	12,3 %	1,3 %
Divers (fleurs, plantes..)	27,7	14,0 %	19,7	9,8 %	- 14,7 %
Total production végétale	155,4	78,9 %	162,5	80,6 %	1,3 %
Bétail (bovins, caprins, ovins, porcins)	30,9	15,7 %	25,5	12,7 %	0,6 %
Autres animaux	9,8	5,0 %	12,5	6,2 %	-0,4 %
Produits des animaux	1,0	0,5 %	1,0	0,5 %	0,0 %
Total production animale	41,7	21,1 %	39,0	19,4 %	0,3 %
Production agricole totale	197,1	100 %	201,4	100 %	1,2 %

Légende : *Var 14/13 : Variation des valeurs entre 2013 et 2014

Tableau 3 : Dénombrement des exploitations et du cheptel bovin de la Guadeloupe et de la Martinique
(Galan *et al.*, 2009)

	Guadeloupe	Martinique
Nombre de femelles adultes (x 1000)	30	16
Nombre de détenteurs bovins	10 900	7 400
dont actifs	2 300	1 900
Nombre de bovins abattus par an	8 200	5 000
Poids moyen des carcasses (en kg)	231	237

Comme indiqué dans le rapport ANSES de décembre 2017 ([“Exposition des consommateurs des Antilles au chlordécone, résultats de l’étude Kannari,” 2017](#)), les DAOA peuvent provenir de différents circuits de consommation. Dans ce rapport, les circuits d’approvisionnement cités sont : les abattoirs, l’autoproduction, les GMS, les marchés, les bords de route et les boucheries. La consommation annuelle de viande en Guadeloupe est estimée à 50 kg par habitant (Galan *et al.*, 2008). De plus, la composition journalière en viande (viande + volaille) de la ration solide est de 6,31 % chez les adultes guadeloupéens et de 6,94 % chez les adultes martiniquais ([“Exposition des consommateurs des Antilles au chlordécone, résultats de l’étude Kannari,” 2017](#)). La majorité des viandes proviennent des importations comme indiqué par le tableau 4 qui suit. Il est important de préciser qu’actuellement peu de données sont disponibles concernant la production de viande caprine ou ovine. Concernant les habitudes d’approvisionnement alimentaire en Guadeloupe, le rapport de l’ANSES indique que les viandes hors volailles sont majoritairement achetées en boucherie ou GMS (58 %) mais que la part de l’autoproduction (24 %) et du don (16 %) reste non négligeable. A la Martinique, les GMS représentent quant à elle 67 % des approvisionnements. Cependant, la part de viandes consommées issues de circuits informels resterait un mode d’approvisionnement fréquent et non négligeable.

Tableau 4: Statistiques de la production alimentaire de la filière animale guadeloupéenne en 2010 (DAAF, IEDOM, AMIG, IGUAVIE, ODEADOM) à partir de la thèse de [Lastel, \(2016\)](#)

Productions animales	Abattages contrôlés ou Production [AP]	Importations [I]
	Quantité	Quantité
Bœufs	2 000 tec	4 389 tec
Porcs	1 269 tec	2 376 tec
Volaille de chair	139 tec	13 035 tec
Oeufs	45,8 M.U.	15 M.U.
Lapin	25 t	23 t
Caprins-Ovins	~14 tec	1 500 tec

Légende :

tec : tonnes equivalent carcasses.

M.U. : millions d'unités.

t : tonnes.

ii. Circuits contrôlés et non contrôlés

Les animaux présents sur les sols antillais pollués par la CLD peuvent se contaminer et par conséquent produire des matrices alimentaires à risque pour l'Homme. Différents plans de contrôle ont été menés afin de collecter des données de contamination des DAOA aux Antilles Françaises. Ces plans de contrôle ont été mis en place dans les abattoirs locaux afin d'évaluer la présence de CLD chez les animaux issus de zones polluées et de retirer si nécessaire les carcasses des circuits de consommation. Entre 2008 et 2010, les contrôles réalisés à l'abattoir départemental du Moule en Guadeloupe ont révélé la présence de bovins contaminés à fortement contaminés dans l'île (concentration de CLD dans les tissus adipeux péri-rénaux comprise entre 3 et 650 $\mu\text{g CLD kg}^{-1}$ Matière Grasse (MG) et en 2011, près de 12 % des carcasses examinées présentaient des valeurs supérieures au seuil réglementaire de 100 $\mu\text{g CLD kg}^{-1}$ MG fixé par l'Union Européenne (Lastel, 2016). Le rapport ANSES de 2017 (["Exposition des consommateurs des Antilles au chlordécone, résultats de l'étude Kannari," 2017](#)) a permis d'actualiser les données d'exposition à la chlordécone des populations mais aussi de présenter l'influence des modes d'approvisionnements sur les concentrations retrouvées de CLD dans les DAOA. Concernant les circuits contrôlés, ce rapport indique que 83 DAOA (en prenant en compte uniquement les DAOA de type agneau, mouton, cabri, bœuf, veau, porc et abats) sur les 1192 DAOA analysés présentaient un dépassement des valeurs réglementaires autorisées soit un taux de non-conformité de 6 %. Ainsi, les animaux présents sur les sols antillais pollués peuvent être contaminés par la CLD. Les circuits informels de type dons ou autoproduction contribueraient majoritairement à un risque plus important d'exposition des consommateurs à la CLD par comparaison aux circuits contrôlés. Aux Antilles Françaises, la production animale est un élément majeur de l'économie locale. Des données de contamination ont montré une contamination réelle et possible des animaux à la CLD. Les antillais s'approvisionnent principalement en viande via des circuits contrôlés (GMS) mais une part non négligeable provient des circuits informels non contrôlés (dons et autoproduction). Ainsi, afin de sécuriser les DAOA consommés par la population, il est nécessaire de maîtriser la contamination animale. La partie suivante présentera comment sécuriser les produits animaux pour réduire l'exposition humaine par la CLD. Cette sécurisation passe par une meilleure connaissance de l'exposition de la population humaine à la CLD, par l'application de normes réglementaires sur les produits animaux et enfin par la proposition de stratégies de décontamination des animaux.

3. Sécurisation des produits animaux afin de réduire l'exposition humaine à la chlordécone

i. Exposition de la population humaine à la chlordécone

La CLD présente dans le sol peut être transférée via différents compartiments environnementaux ou animaux et entraîner une exposition de l'Homme à la CLD. La figure 3 résume les différentes voies connues d'exposition de l'Homme à la CLD.

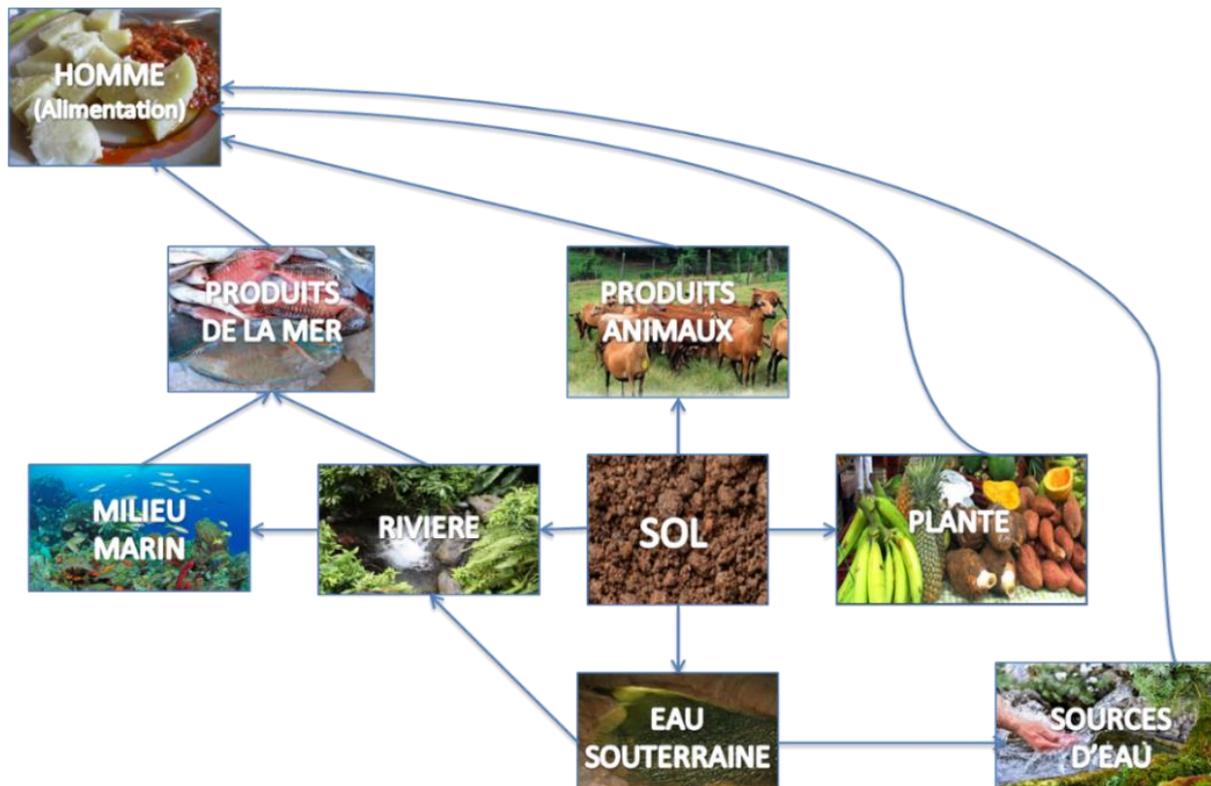


Figure 3: Voies d'exposition de l'Homme à la chlordécone

A la suite de la découverte de la contamination persistante de la CLD aux Antilles françaises, différentes études ont été menées en Guadeloupe et en Martinique afin d'évaluer les niveaux d'expositions de la population antillaise. Le tableau en annexe résume les différentes études d'exposition menées depuis les années 2000. De plus, à l'aide des récents résultats de l'étude Kannari, la contribution des circuits présentés précédemment, à l'exposition et à l'approvisionnement est détaillée dans le tableau 5 qui suit.

Tableau 5 : Contribution des circuits d’approvisionnement à l’exposition humaine par la chlordécone (“Exposition des consommateurs des Antilles au chlordécone, résultats de l’étude Kannari,” 2017)

Ile	Circuit	Contribution à l’exposition (%)	Contribution à l’approvisionnement (%)	Rapport contribution à l’exposition/ contribution à l’approvisionnement
Guadeloupe	Don	39,18	29,48	1,33
	Autoproduction	25,48	18,35	1,39
	Marchés	11,23	14,74	0,76
	Non renseigné	5,81	-	-
	GMS	5,51	18,39	0,30
	Epiceries, primeurs, poissonneries, boucheries	5,48	13,73	0,40
	Bords de route, marchands ambulants	5,29	4,57	1,16
	Gros marchés	1,77	0,50	3,54
	Petits marchés	0,25	0,23	1,09
Martinique	Autoproduction	25,91	5,37	4,82
	Don	21,99	17,51	1,26
	GMS	20,38	52,61	0,34
	Bords de route, marchands ambulants	13,33	8,34	1,60
	Non renseigné	6,75	-	-
	Epiceries, primeurs, poissonneries, boucheries	5,60	4,65	1,20
	Marchés	3,02	10,28	0,29
	Petits marchés	2,40	0,99	2,42
	Gros marchés	0,63	0,25	2,52

A l’aide du tableau 5, il est possible de constater que les circuits informels issus des dons et de l’auto-production sont les principaux contributeurs à l’exposition humaine à la CLD par comparaison au mode d’approvisionnement en circuits contrôlés (GMS, marchés, épiceries). Les expositions moyennes des enfants (enfants âgés de 3 à 15 ans) sont comprises entre 0,06 et 0,15 $\mu\text{g kg}^{-1} \text{pc j}^{-1}$ (pc : poids corporel) en Martinique et entre 0,07 et 0,21 $\mu\text{g kg}^{-1} \text{pc j}^{-1}$ en Guadeloupe. Concernant les adultes (âgés de plus de 16 ans), les expositions moyennes sont comprises entre 0,08 et 0,09 $\mu\text{g kg}^{-1} \text{pc j}^{-1}$ en Martinique et entre 0,09 et 0,13 $\mu\text{g kg}^{-1} \text{pc j}^{-1}$ en Guadeloupe. Concernant la consommation de viande hors volaille, aucune recommandation n’a été indiquée dans le rapport de l’ANSES. Cependant, dans le rapport est indiqué que l’autoconsommation d’œufs et de volaille produits en zones contaminées, du fait de leurs forts niveaux de contamination, peut entraîner une surexposition par rapport au reste de la population. Afin de sécuriser l’exposition humaine à la CLD, des LMR autorisées ont été établies depuis 2005.

ii. Réglementation sur les Denrées Alimentaires d'Origine Animale

Afin de garantir la sécurité du consommateur, des LMR ont été fixées pour la CLD. En 2005, les LMR ont été fixées par la Commission Européenne (CE) à l'aide du règlement n°396/2005 à la suite des études d'exposition ESCAL et CALBAS à :

- **20 µg kg⁻¹ pour les denrées cultivables sous climat tropical ou tempéré (agrumes, fruits tropicaux, tous les légumes, maïs, canne à sucre...).**
- **10 µg kg⁻¹ pour certains produits spécifiques aux régions de climat tempéré ou susceptibles d'être importés de pays autres que les Antilles (blé, riz, pommes, poires et fruits à noyaux, betterave sucrière...).**
- **20 µg kg⁻¹ pour les denrées alimentaires d'origine animale qu'elles soient d'origine terrestre ou aquatique et quelle que soit leur provenance géographique.**

En 2013, dans les produits carnés les valeurs de LMR anciennement fixées par le règlement (CE) ont été modifiées par le règlement (UE) n°212/2013. En effet, dans ce règlement, une précision a été apportée concernant les pesticides liposolubles dans la viande et a été supprimée dans l'annexe I. Ainsi, les LMR étaient fixées à 0,1 mg kg⁻¹ MG dans les denrées carnées contenant 20 % de MG (viande d'origine bovine par exemple), soit 0,02 mg kg⁻¹ Poids Frais (PF) et à 0,2 mg kg⁻¹ MG dans les denrées contenant 10 % de MG (viande de volaille) soit 0,02 mg kg⁻¹ PF. Avec l'entrée en vigueur du règlement (UE) n°212/2013, les LMR sont depuis 2013 de **0,1 mg kg⁻¹ PF dans les denrées carnées contenant 20 % de MG** (viande d'origine bovine par exemple) et de **0,2 mg kg⁻¹ PF dans les denrées contenant 10 % de MG** (viande de volaille). Récemment, il a été demandé à l'ANSES de déterminer si les nouvelles LMR en vigueur sont suffisamment protectrices vis-à-vis de la population antillaise. L'ANSES dans la saisine n°2017-SA-0029 relative aux LMR du rapport de 2017 (["Exposition des consommateurs des Antilles au chlordécone, résultats de l'étude Kannari," 2017](#)) répond que : « ..., au regard des résultats des calculs d'exposition réalisés, il apparaît qu'une réduction des LMR en vigueur pour la chlordécone dans les denrées alimentaires d'origine animale ne permet pas d'abaisser les expositions à la chlordécone. En effet cette exposition est très majoritairement liée à la consommation de denrées issues des circuits informels non contrôlés ». Ce rapport met donc en avant l'importance de suivre les recommandations de consommation émises dans le rapport plutôt qu'un abaissement des LMR. L'établissement de LMR permet de maîtriser l'exposition de l'Homme à la CLD, cependant, il paraît indispensable de proposer des stratégies afin de réduire, en amont la contamination des animaux par la CLD.

iii. Problématique de la thèse

Ainsi, il apparaît indispensable de limiter la contamination des animaux par la CLD afin de réduire l'exposition humaine à la CLD. Cette réduction de l'exposition peut s'effectuer à l'aide de proposition de stratégies pour limiter l'ingestion de la CLD par les animaux ou encore pour les décontaminer. Différents travaux ont été réalisés pour mieux appréhender les transferts et le devenir de la chlordécone

vers l'eau ou encore les plantes (Clostre *et al.*, 2014b; Rochette *et al.*, 2017). Concernant les animaux et plus particulièrement les animaux d'élevage, il existe des travaux pour mieux comprendre le devenir de la CLD mais des manquements sont présents dans ces études et ceux-ci seront présentés dans la partie suivante. En effet, afin de maîtriser la contamination animale et de proposer des stratégies de décontamination des animaux, il apparaît nécessaire d'étudier le devenir de la CLD dans l'organisme animal. **L'objectif principal de cette thèse est d'étudier comment la chlordécone s'élimine chez la brebis.** La compréhension de l'élimination de la CLD passe aussi par l'étude de son métabolisme. En effet, c'est un processus de biotransformation de la molécule mère en métabolites qui sont à leurs tours éliminer par l'animal. Dans un premier temps, il sera donc nécessaire de déterminer si oui ou non les animaux d'élevage métabolisent la CLD, et si oui il sera important de caractériser cette métabolisation c'est-à-dire déterminer comment, où elle se déroule, quelles sont les enzymes impliquées dans la métabolisation de la chlordécone et quels sont les métabolites (si présents) formés et retrouvés dans le corps de l'animal. Dans un deuxième temps, il sera important de déterminer sous quelle forme la molécule s'élimine de l'organisme animal : molécule mère ou métabolites, par quelles voies (urinaire et/ou fécale), en combien de temps (temps de demi-vie d'élimination sanguine). Cette étude de l'élimination de la CLD est en effet indispensable pour pouvoir proposer des stratégies de décontamination des animaux mais aussi pour sécuriser les DAOA. Ces études devront s'appuyer sur des méthodes analytiques performantes, validées et permettant le dosage de la CLD et de ses métabolites dans différentes matrices biologiques animales. Afin de répondre aux objectifs de cette thèse, seront tout d'abord détaillés les connaissances acquises et les manquements concernant (1) la toxicocinétique de la CLD chez les animaux d'élevage et (2) les méthodes de dosages de la CLD et de ses métabolites dans les différents compartiments biologiques.

La chlordécone est un insecticide organochloré qui a été utilisé de 1972 à 1993 aux Antilles Françaises pour lutter contre le charançon du bananier (*Cosmopolites sordidus*). Cette molécule est très stable, peu soluble dans l'eau et rémanente dans les sols. Cette molécule est toxique pour toutes les espèces animales. Des études ont montré un lien entre exposition à la CLD et augmentation du risque d'apparition de cancer de la prostate. De plus, elle aurait des effets néfastes sur le développement embryonnaire et après la naissance. En 2009, elle a été classée comme POP et ajoutée à la liste des substances interdites de la Convention de Stockholm.

L'élevage d'animaux aux Antilles Françaises représente environ ¼ du chiffre d'affaire total de la production agricole (bovins, caprins, ovins et porcins). Les DAOA peuvent provenir de circuits d'approvisionnement dits contrôlés : Grandes et Moyennes Surfaces et abattoirs mais aussi de circuits dits informels qui sont non contrôlés : marchés, bords de route, autoproduction, dons. Les animaux qui sont donc présents sur les sols antillais pollués par la CLD peuvent potentiellement se contaminer après ingestion de sol. Ils peuvent ainsi produire des matrices alimentaires contaminées par la CLD. En effet, entre 2008 et 2010, les contrôles réalisés à l'abattoir départemental du Moule en Guadeloupe ont révélé la présence de bovins contaminés à fortement contaminés dans l'île (concentration de CLD dans les tissus adipeux péri-rénaux comprise entre 3 et 650 µg CLD.kg⁻¹ MG) et en 2011, près de 12 % des carcasses examinées présentaient des valeurs supérieures au seuil réglementaire fixé par l'UE.

Dans un récent rapport, l'ANSES indique que ce sont les circuits non contrôlés qui contribuent majoritairement à l'exposition à la CLD de la population par comparaison aux circuits contrôlés. Afin d'estimer les niveaux d'exposition de l'Homme à la CLD après consommation de produits végétaux ou animaux contenant de la CLD, différentes études d'exposition ont été menées. Ces études ont permis de mettre en évidence les populations à risque, de fournir à la population des recommandations sur leur mode consommation ou encore de définir des LMR. Aux Antilles Françaises, 15 % de la SAU reste contaminée par la CLD et le sera pendant encore plusieurs décennies pour les terres les plus contaminées. Il est donc indispensable de pouvoir maîtriser la contamination des animaux afin de d'obtenir des DAOA respectant les LMR en vigueur et par conséquent protéger la santé du consommateur. Etant donné l'importance de l'élevage pour l'économie antillaise, il apparaît indispensable de proposer des stratégies de décontamination des animaux avant abattage. La proposition de ces stratégies nécessite une meilleure compréhension du devenir de la CLD dans l'organisme animal et en particulier de son élimination.

PARTIE 2:**Toxicocinétique de la chlordécone chez les ruminants**

Dans cette partie, les connaissances acquises sur le devenir de la chlordécone chez les ruminants seront présentées. Au préalable les différentes voies d'exposition à la CLD puis la toxicocinétique connue de la molécule seront détaillées. Etant donné qu'il existe des manquements et des lacunes chez les ruminants, les connaissances présentées dans cette partie seront élargies à différentes espèces animales. La toxicocinétique se décline en quatre grandes étapes dite ADME pour Absorption, Distribution, Métabolisme et Excrétion. Une attention particulière sera portée aux étapes de métabolisme et d'excrétion qui sont au cœur de cette thèse. À l'issue de ce chapitre les lacunes concernant le devenir de la CLD chez les ruminants seront résumées.

1. Voies d'exposition des animaux à la chlordécone

Différentes voies d'expositions des animaux à la CLD peuvent être envisagées : exposition par voie orale, par voie cutanée, par inhalation ou encore un transfert via le lait maternel. Comme indiqué précédemment, la CLD a été épandue sur les sols aux Antilles Françaises. Trois types de sols sont présents aux Antilles Françaises : le nitisol, le ferralsol et l'andosol. Ces sols sont de types volcaniques et contiennent des argiles de type allophane ayant des caractéristiques d'échange particulières et complexes avec la matière organique (Cabidoche *et al.*, 2009). Etant donnée sa faible volatilité dans l'air, sa faible solubilité dans l'eau et sa forte affinité pour la matière organique, la molécule reste séquestrée dans les sols (Cabidoche *et al.*, 2009). La persistance de la CLD varie cependant en fonction des sols. En effet, les travaux de Cabidoche *et al.* (2009) ont montré que la décontamination des sols à la chlordécone prendrait des décennies pour le nitisol, plusieurs siècles pour le ferralsol et plus d'un demi-millénaire pour l'andosol. Ces différences de rétention seraient en partie expliquées par des différences de teneurs en carbone organique des différents sols (Cabidoche *et al.*, 2009; Levillain *et al.*, 2012). Ainsi, dans le cas de la chlordécone, étant donné que ce polluant a une forte rétention pour le sol et une faible volatilité, il est possible de faire l'hypothèse que la voie orale est la voie principale d'exposition des animaux d'élevage. L'exposition des animaux à la CLD peut provenir d'une ingestion du polluant via l'eau, les plantes ou encore le sol. Aux Antilles Françaises, la contribution du sol dans l'exposition des animaux d'élevage antillais est d'autant plus importante que les animaux de rente sont connus pour ingérer des quantités importantes de sol (jusqu'à 10 % de la ration quotidienne dans les pays tempérés et antillais pour les ruminants (Jurjanz *et al.*, 2012, 2017) (Tableau 6)). Le niveau d'ingestion de sol peut être favorisé par des facteurs divers tels que les conditions environnementales (pluviométrie, sécheresse), la nature des sols et les types de fourrage, les caractéristiques des animaux d'élevage (race, état et statut physiologique) et les pratiques d'élevage.

Tableau 6: Quantités de sol ingérées par différentes espèces de rente (Bouveret, 2012)

Espèce	Ingestion moyenne de fourrage (kg jour ⁻¹)	Ingestion de fourrage (% poids vif)	Ingestion de sol (kg jour ⁻¹)	Ingestion de sol (% de quantité ingérée)	Références
Vache	13,1	2,47	1,3	10,4	Jurjanz <i>et al.</i> , 2012
	13,8	2,75	0,83	6,0	Adams and Morales-Garcia, 2008
	—	—	—	1,0 à 18 (en juin et avril)	Thornton and Abrahams, 1983
	—	—	—	14 et 20 % (juin et août)	Mayland, H., Shewmaker, G., & Bull, 1977)
Chèvre	1,18	4,00	0,12	10	Adams and Morales-Garcia, 2008
Mouton	1,98	3,50	0,20	10	Adams and Morales-Garcia, 2008
Porc	—	—	—	8,0	Fries <i>et al.</i> , 1982
Poule pondeuse	—	—	0,03	—	Waegeneers <i>et al.</i> , 2009
	—	—	0,03	25	Jondreville <i>et al.</i> , 2011

En plus d'une possible ingestion de sol, la CLD peut être ingérée via l'eau par les animaux de rente. Différentes sources d'approvisionnement peuvent être utilisées pour abreuver un animal. L'eau potable n'est pas une source d'exposition à la CLD étant donné que la concentration maximale autorisée est de 0,1 µg L⁻¹ (Arrêté du 11 janvier 2007). Cependant, les cours d'eaux locaux (étangs, eau de pluie) sont généralement contaminées à des niveaux inférieurs à 0,4 µg L⁻¹ (Godard, 2007) et certains peuvent atteindre des concentrations jusqu'à 30 µg L⁻¹ (Jannoyer *et al.*, 2016) mais ne seraient pas utilisés pour l'abreuvement des animaux.

Concernant l'exposition des animaux via les plantes, celle-ci est jugée faible. En effet, des concentrations inférieures à 0,2 µg kg⁻¹ Matière Sèche (MS) sont retrouvées dans les organes aériens et fourrages (Jannoyer *et al.*, 2016). A contrario, dans les cucurbitacées et les racines des végétaux, des concentrations bien supérieures peuvent être retrouvées en CLD comme par exemple dans la dachine (>200 µg kg⁻¹ PF), dans l'igname (jusqu'à 130 µg kg⁻¹ PF) et la patate douce (jusqu'à 100 µg kg⁻¹ PF) comme indiqué dans les travaux de Clostre *et al.* (2014a). Ce sont principalement des sources d'exposition pour les animaux monogastriques qui se nourrissent de racines et de légumes. Le tableau 7 ci-dessous présente

l'estimation de l'exposition d'un animal d'élevage après ingestion d'eau, de plantes ou de sol contaminé. A l'aide de ce tableau, il est possible de conclure que le sol est la voie majeure d'exposition des animaux à la chlordécone. Il est important de préciser qu'il est possible que des particules de sols se déposent dans l'eau et sur les plantes. Par conséquent, ce dépôt de sol peut constituer une source supplémentaire d'exposition des animaux à la CLD (Jannoyer *et al.*, 2016).

Tableau 7 : Estimation de l'exposition des animaux via l'eau, les plantes et le sol
(extrait de Jannoyer *et al.*, 2016)

Espèce animale	MS ingérée (kg jour ⁻¹)	Exposition journalière à la CLD (µg jour ⁻¹)			
		Via l'eau ^a	Via l'herbe	Via le sol	
		(0,4 µg CLD L ⁻¹) ^b	(0,2 µg CLD kg ⁻¹ MS)	(0,1 mg CLD kg ⁻¹ sol sec)	
				1 % de MS ingérée	10 % de MS ingérée
Boeuf	7	11	1,4	7	70
Petit ruminants	2	3,2	0,4	2	20
Porc en croissance	2,5	4	- ^c	2,5	25
Poules	0,1	0,16	- ^c	0,1	1

^a Basé sur 4 L d'eau par kg de MS ingérée
^b Observatoire des Résidus de Pesticides, n.d.
^c Ces animaux vont ingérer de très faible quantité d'herbe

Enfin, hormis la consommation de sol, d'eau ou de plantes, le lait maternel chez les mammifères peut aussi être un vecteur de contamination à la CLD. Dans le cadre de l'étude HIBISCUS menée par l'INSERM U625 sur 115 femmes enceintes guadeloupéennes, de la CLD a été détectée dans près de 90 % des prélèvements de sang maternel et du cordon ombilical ("[Evaluation de l'exposition alimentaire au chlordécone des enfants guadeloupéens](#)," 2011). Ces travaux mettent en avant un transfert possible de la CLD à travers la barrière placentaire et le lait maternel chez l'Homme. Cependant, dans l'avis du 15 septembre 2008, l'ANSES indique que l'allaitement maternel peut-être maintenu mais qu'il est important de minimiser l'exposition des femmes enceintes à la CLD. Chez les animaux, ce transfert est aussi présent. En effet, après 52 jours d'exposition, les vaches laitières qui ont absorbé 1 mg CLD kg⁻¹ d'aliments j⁻¹ produisent du lait contaminé à la CLD et qui est 4 fois plus concentré en CLD que celui des vaches qui n'ont ingéré que 0,25 mg CLD kg⁻¹ d'aliments frais j⁻¹ (Smith and Arant, 1987). Actuellement, il n'existe pas de données de transfert de la chlordécone depuis les animaux d'élevage vers leurs progénitures.

2. Biodisponibilité relative

Après ingestion involontaire de sol contaminé par de la chlordécone, il est possible de déterminer quelle fraction de chlordécone est extraite du sol lors de processus digestifs. L'approche qui permet d'évaluer cette fraction est appelée la biodisponibilité relative. Etant donné la forte affinité de la chlordécone pour les sols volcaniques argileux antillais, la capacité des processus digestifs des monogastriques (poules pondeuses et porcelets) et des polygastriques (agneaux) à extraire la chlordécone depuis le sol a été évaluée. Des travaux ont montré que la biodisponibilité relative de la chlordécone dans l'andosol et le nitisol était de 100 % (Jondreville *et al.*, 2012; Bouveret *et al.*, 2013 ; Jurjanz *et al.*, 2014). La chlordécone est donc totalement extraite depuis la matrice sol par les animaux malgré sa forte affinité pour les sols antillais.

3. Biodisponibilité absolue

La biodisponibilité absolue est le pourcentage de la fraction de CLD ingérée qui atteint la circulation sanguine générale après une exposition par voie orale. La biodisponibilité absolue permet d'évaluer l'absorption qui est le processus qui conduit au passage du composé de la lumière intestinale à la circulation générale et/ou à la lymphe (Baldi *et al.*, 2013). Après ingestion de la chlordécone, plus de 90 % de la molécule est absorbée au niveau intestinal chez le rat et chez la chèvre (Egle *et al.*, 1978; Fournier *et al.*, 2017). Peu de données sont disponibles sur les mécanismes de passage de la chlordécone de la lumière intestinale à la circulation sanguine. Trois types de mécanismes régissent l'absorption par voie orale (McQueen, 2017):

- La diffusion passive de la molécule
- L'entrée de la molécule à l'aide des systèmes de transports médiateurs ne nécessitant pas d'énergie ou de transports actifs nécessitant de l'énergie
- L'endocytose

Il est possible de faire l'hypothèse que la chlordécone, une molécule lipophile (coefficient eau-octanol K_{ow} entre 4,50 et 5,41), hydrophobe ("Comité d'étude des polluants organiques persistants," 2006) et de masse molaire $490,6 \text{ g mol}^{-1}$, emprunterait des transports facilités à l'aide de protéines afin de pouvoir traverser la barrière intestinale (Baldi *et al.*, 2013).

4. Distribution de la chlordécone

i. Organotropisme de la chlordécone

Après passage de la barrière intestinale, la chlordécone arrive au niveau de la circulation sanguine et/ou de la lymphe. Son transport dans le sang est assuré par l'albumine et les HDL (High-Density Lipoproteins) (Skalsky *et al.*, 1979; Soine *et al.*, 1982). Cette liaison aux protéines est assez spécifique à la chlordécone et lui confère une distribution particulière dans l'organisme qui diffère des autres POPs tels

que les Polychlorobiphényles (PCBs). En effet, le principal lieu de stockage de la plupart des POPs est le tissu gras. *Skalsky et al. (1979)* indique par exemple que le ratio de concentration de DDT tissu gras/sang est de 280/1. A contrario, celui de la chlordécone est de 7/1 (*Skalsky et al., 1979*). Le DDT est aussi une molécule qui se lie à l'albumine. Cependant, contrairement à la chlordécone, elle se lie aux β -lipoprotéines (Low Density Lipoproteins, LDL) alors que la chlordécone se lie aux HDL. Cette fixation expliquerait aussi la concentration importante de chlordécone dans la bile (*Skalsky et al., 1979*) et le foie comparativement à sa concentration dans le sang. Le ratio de concentration de chlordécone (de MG ou PF non précisé) foie/sang est de 15/1 chez l'Homme (*Cohn et al., 1978*). Ce ratio est deux fois plus important que celui du tissu gras/sang. En effet, *Soine et al. (1982)* explique qu'une molécule comme la chlordécone ira préférentiellement se stocker dans des tissus comme le foie qui possède des récepteurs aux HDL. Les HDL sont des lipoprotéines produites par le foie et sont après formation relarguées dans la circulation sanguine (*Lamant, 2006*). Ce sont principalement des molécules acceptrices de cholestérol d'où la possible modification des concentrations de cholestérol si la chlordécone se fixe aux HDL à sa place (*Soine et al., 1984*). Les HDL circulantes sur lesquelles la chlordécone s'est potentiellement fixée peuvent être retirées de la circulation au niveau du foie. Cela permet de confirmer le stockage particulier de la chlordécone dans le foie et non pas dans les tissus adipeux. De plus, afin de recueillir des données de répartition de la CLD chez des bovins élevés dans des zones antillaises polluées par la CLD, 37 bovins ont été sélectionnés pour analyse. Les résultats ont montré qu'en termes de concentration tissulaire exprimée en $\mu\text{g CLD kg}^{-1}$ PF le foie était en moyenne 4 ± 1 fois plus concentré en CLD que les tissu adipeux péri-rénaux et 8 ± 4 fois plus concentré que la hampe (*Lastel, 2016*). Ces données indiquent que le niveau de contamination diffère d'une matrice animale à une autre et qu'il existe un lien entre les concentrations de CLD dans le foie, le muscle et les tissus adipeux des animaux.

ii. Corrélation entre les concentrations de CLD sanguine et tissulaire

Des études ont permis d'établir des ratios de concentration entre le foie, les muscles, le tissu gras et le sang (sous sa forme plasma ou sérum) de volaille (canards) de porcins et de bovins (*Jondreville et al., 2014b; Lastel, 2016; Soine et al., 1983*). Les ratios foie/tissu gras retrouvés chez la volaille et les bovins était de 4/1 tandis que les ratios foie/muscle était de 8/1 (unité de PF). *Soine et al. (1983)* ont obtenu des ratios foie/plasma de concentration 20/1 et 40/1 après administration péritonéale de chlordécone à deux doses : 20 et 40 mg kg^{-1} PV. *Lastel, (2016)* a montré que chez les bovins, un ratio de 18/1 (unité de PF) est retrouvé entre les concentrations de CLD dans le foie et celles dans le sérum.

L'établissement de ces dernières corrélations est une étape importante pour la mise en place d'une stratégie de décontamination des animaux. En effet, l'objectif serait qu'à partir d'un prélèvement de sang il soit possible d'indiquer la valeur de la concentration de CLD dans un tissu et déterminer si les produits animaux sont consommables : c'est-à-dire que la valeur retrouvée de CLD dans le tissu soit inférieure à la LMR fixée.

5. Métabolisation de la chlordécone

La métabolisation est un processus qui permet la conversion de la molécule mère en métabolites et ultérieurement en dérivés conjugués, rendant les molécules plus hydrosolubles et donc plus facilement éliminées par les urines (Amiard, 2011). La métabolisation a un rôle de détoxification pour l'organisme animal. Les publications de Fariss *et al.* (1980), Houston *et al.* (1981), Soine *et al.* (1983) suggèrent un métabolisme important de la chlordécone.

i. Généralités sur le métabolisme des xénobiotiques

Un xénobiotique est une substance étrangère à l'organisme. Après l'entrée d'un xénobiotique dans une cellule, il y a une prise en charge rapide de celui-ci afin de le transformer en un métabolite qui sera plus facilement éliminé de l'organisme. La figure 4 ci-dessous permet de récapituler les étapes de métabolisation du xénobiotique.

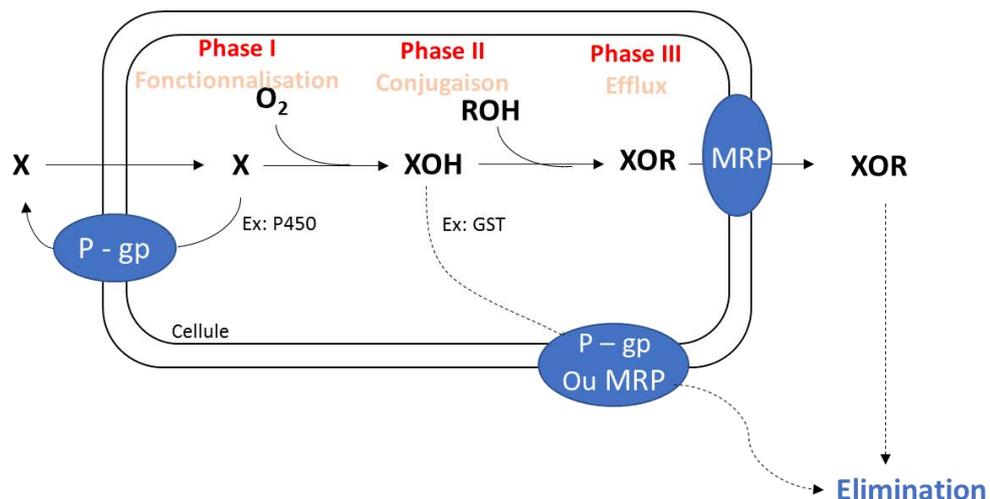


Figure 4: Métabolisme des xénobiotiques (Baldi *et al.*, 2013)
(P-gp : glycoprotéine, MRP : protéine de multi-résistance aux médicaments)

Le processus de métabolisation débute par une phase I de fonctionnalisation de la molécule. Cette phase conduit à la formation d'intermédiaires électrophiles hautement réactifs. Par la suite, la phase II de conjugaison permet la formation de métabolites conjugués plus polaires qui seront facilement éliminés via les urines. La sortie de la cellule de ces molécules s'effectue à l'aide de pompes à efflux ou transports membranaires, c'est la phase III d'efflux.

ii. Voies suggérées de métabolisation de la chlordécone

La figure 5 présente un premier schéma de métabolisation de la CLD basé sur les travaux de [Fariss *et al.* \(1980\)](#) et proposé par les auteurs. Les mécanismes de transfert de la chlordécone au sein des cellules ne sont pas encore connus. Après l'entrée de la chlordécone dans la cellule, les mécanismes de biotransformation sont similaires à ceux décrits sur la figure 5. Dans un premier temps, il y a une fonctionnalisation de la chlordécone qui subit une réaction de réduction de sa fonction cétone en alcool permettant la formation du chlordécol. Par la suite il y a formation de métabolites conjugués plus polaires de la chlordécone et du chlordécol : la chlordécone glucuronée et/ou sulfatée et le chlordécol glucuroné et/ou sulfaté ([Fariss *et al.*, 1980](#)). La formation des formes chlordécone glucuronée et/ou sulfatée proposées par les auteurs est discutable et très peu probable (mécanisme de conjugaison à partir d'une fonction cétone). Il sera possible au travers de ce manuscrit de vérifier les formes retrouvées de la CLD et d'invalider les structures chlordécone glucuronée et/ ou sulfatée (flèches en pointillées sur la figure 5).

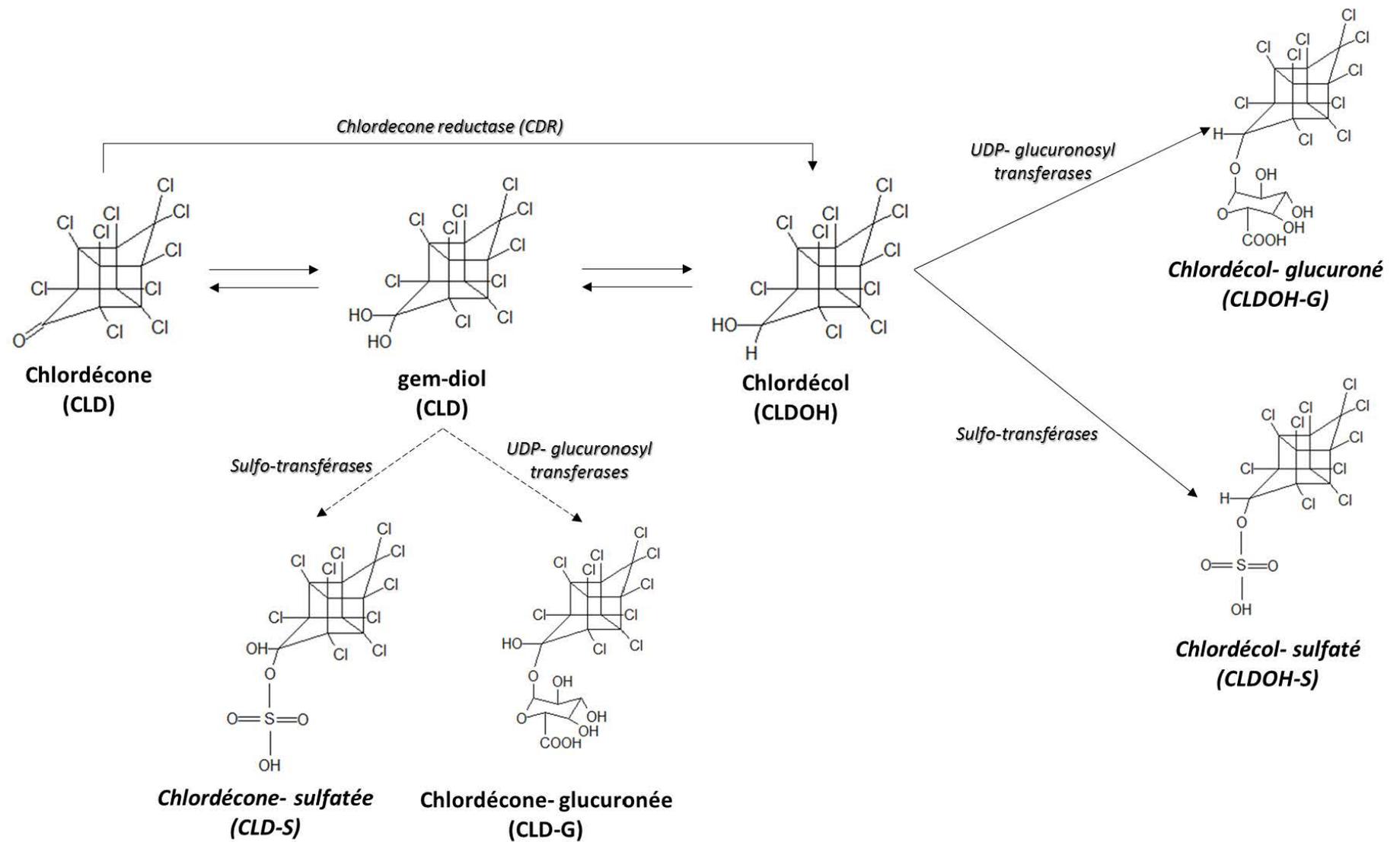


Figure 5: Voies suggérées de métabolisation de la chlordécone proposées par Fariss *et al.* (1980) chez l'Homme

iii. Métabolisme de phase I : une enzyme espèce dépendante

Différentes enzymes peuvent être impliquées dans le métabolisme de phase I des xénobiotiques comme le montre le tableau 8. Les trois principales réactions de phase I sont l'oxydation, la réduction et l'hydrolyse (Amiard, 2011).

Tableau 8 : Enzymes impliquées dans la biotransformation des xénobiotiques (Amiard, 2011)

Phase I	Phase II
Cytochromes P450	Glutathion S-transferases
NADPH-cytochrome P450 reductase	UDP-glucuronosyl transferases
Flavin-containing monooxygenase	Sulfotransferases
Alcohol dehydrogenase	N-Acetyltransferases
Carbonyl reductase	O-Metyltransferases
Dihydrodiol dehydrogenase	N-Methyltransferases
Glutathione peroxidase	S-Methyltransferases
Monoamine oxidase	Thiol transferase
Aldehyde oxidase	Acetyltransacetylase
Xanthine oxidase	Amino acid transferases
D-amino acid oxidase	
Quinone oxidoreductase	
Epoxide hydrolase	
Esterases	
Amidases	
Rhodanases	

(iii-1). Identification d'une aldo-céto reductase de la chlordécone

Dans le cas de la chlordécone, la molécule est réduite en chlordécol à l'aide d'une enzyme cytosolique hépatique nommée chlordécone réductase (CDR). Cette enzyme appartient à la famille des aldo -céto reductases (AKR) (Molowa *et al.*, 1986a, 1986b). Les enzymes de la famille des AKR ont un poids moléculaire qui se situe entre 30,000 et 40, 000 g/mol (Bachur, 1976). Dans le cas de la CDR, elle appartient à la famille des AKR1C4 (Penning *et al.*, 2000). Chez l'Homme, les familles AKR1C1 à AKR1C4 jouent un rôle essentiel dans le métabolisme de toutes les hormones stéroïdiennes, dans la biosynthèse des neuro-stéroïdes et acides biliaires, le métabolisme des stéroïdes conjugués et des stéroïdes synthétiques thérapeutiques. Ces enzymes catalysent des réductions de type nicotinamide adénine

dinucleotide phosphate (NADPH) - dépendante (coenzyme de la réaction) aux positions C3, C5, C17 et C20 du noyau du stéroïde et de la chaîne latérale. Le mécanisme est de type acido-basique et la tyrosine est utilisée en tant que catalyseur acido-basique (Oppermann and Maser, 2000). Ces enzymes sont exprimés dans différents tissus alors que l'AKR1C4 est principalement spécifique du foie (Penning *et al.*, 2000). Ces enzymes partagent un haut pourcentage de ressemblance dans leurs séquences d'acides aminés allant de 84 à 98 %. Les gènes AKR1C1-AKR1C4 sont présents sur le chromosome 10p15-p14 (Rizner and Penning, 2014). La chlordécone réductase a été caractérisée chez différentes espèces animales à l'aide d'un test de type Western-Blot (Molowa *et al.*, 1986b). En effet, les auteurs ont tout d'abord obtenu des anticorps anti-chlordécone réductase en injectant à des lapins la chlordécone réductase. Le poids moléculaire de la CDR retrouvée était de 37,4 kDa. Par la suite, à l'aide des anticorps synthétisés, ils ont effectué des Western-Blot chez la souris, le rat, le hamster, le cochon d'Inde, la gerbille, le lapin et l'Homme. A l'aide de ces tests, il a été possible d'identifier la présence la chlordécone réductase chez le cochon d'Inde, la gerbille, le lapin et l'Homme. Cette enzyme n'a pas été identifiée chez la souris, le rat et le hamster. De même, à l'aide d'anticorps de type AKR1C4 et d'une méthode de quantification de type ELISA, une CDR a été détectée et quantifiée chez *M. rosenbergii*, crevette géante d'eau douce (Vassaux *et al.*, 2013). Actuellement, la CDR n'a jamais été identifiée chez les ruminants.

(iii-2). Activité spécifique

La biotransformation de la chlordécone en chlordécol n'a pas lieu avec la même intensité chez toutes les espèces (Molowa *et al.*, 1986a, 1986b). En effet, différents facteurs de variation peuvent influencer la nature et l'intensité des réactions enzymatiques. Ces facteurs de variation sont biologiques (génétiques, physiologiques et pathologiques) et/ou externes (nature du polluant, dose, voie d'exposition, environnement, induction ou inhibition enzymatique) (Amiard, 2011). La figure 6 ci-dessous résume la réaction de réduction de la chlordécone en chlordécol à l'aide de la chlordécone réductase.

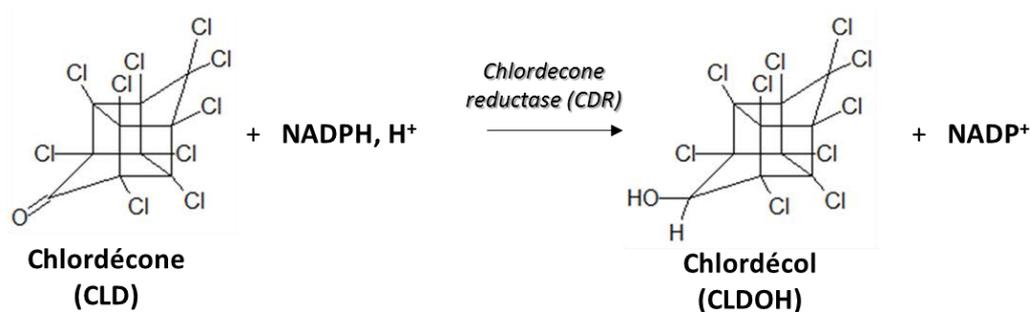


Figure 6: Equation de la réaction enzymatique de métabolisation de la chlordécone en chlordécol

L'activité spécifique de la chlordécone réductase a été mesurée chez l'Homme, le lapin et la gerbille (Molowa *et al.*, 1986b, 1986a). Ainsi, des cytosols ont été préparés à partir des foies des différentes espèces. La réaction *in vitro* de réduction de la chlordécone a été mimée et par la suite le produit de la réaction à savoir le chlordécol a été dosé par chromatographie en phase gazeuse. Une mesure de l'activité spécifique chlordécone réductase a été possible chez la gerbille, le lapin et l'Homme. Chez la souris, le rat, le hamster et le cochon d'Inde, aucune mesure de l'activité n'a été possible car le chlordécol n'a pas été détecté. Chez la gerbille, le lapin et l'Homme des activités spécifiques enzymatiques entre 74 et 81, 33 et 37, 18 et 23 pmol de CLDOH formés par minutes et par mg de protéine cytosoliques ont été respectivement mesurées. A l'aide de ces travaux, il est possible d'observer que certains animaux peuvent posséder l'enzyme comme par exemple le hamster et le cochon d'Inde mais sans pour autant posséder une activité chlordécone réductase. De plus, les auteurs ont comparé la valeur de l'activité spécifique entre des gerbilles non contaminées par la CLD et des gerbilles contaminées par la CLD. Une différence significative a été observée entre les deux traitements. L'activité spécifique enzymatique des animaux traités était 38 % plus élevée que celle des animaux non traités. Ces résultats indiquent que la chlordécone réductase serait induite par son substrat. Actuellement, il n'existe pas de mesures de l'activité spécifique de la chlordécone réductase dans les foies des ruminants.

(iii-3). Une répartition majoritairement hépatique de la chlordécone réductase

Molowa *et al.* (1986b) ont comparé l'activité spécifique de la chlordécone réductase dans différents tissus de gerbille à savoir le foie, l'intestin, le rein, le poumon, le cœur, la rate et le cerveau. Le tableau 9 ci-dessous résume les résultats obtenus. Ces travaux confirment que le foie est le site de métabolisation de la CLD car l'activité de la chlordécone réductase est la plus élevée dans cet organe et montrent que d'autres tissus possèdent l'enzyme capable de réduire la chlordécone en chlordécol chez la gerbille.

Tableau 9: Comparaison de l'activité spécifique chlordécone réductase chez la gerbille dans différents tissus (Réadapté de Molowa *et al.* (1986b))

Tissus	Activité spécifique chlordécone réductase en pmol de CLDOH min ⁻¹ mg ⁻¹ de protéines
Foie	67-66
Intestin	35-33
Rein	36-29
Poumon	24-22
Rate	22-14
Cœur	18-15
Cerveau	18-13

(iii-4). Réversibilité de la réaction de métabolisation du chlordécol

Des travaux ont montré l'existence d'une réversibilité de la réaction de réduction de la chlordécone en chlordécol. En effet, après administration unique de CLDOH par voie intrapéritonéale à des rats et des gerbilles, des ratios de concentrations de CLD/CLDOH entre 6/1-10/1 et 13/1-15/1 ont été retrouvés respectivement dans les foies de rats et de gerbilles (Houston *et al.*, 1981). Ces travaux montrent que le CLDOH peut être oxydé chez le rat et la gerbille par une enzyme non identifiée. Cette enzyme contrairement à la chlordécone réductase serait non espèce spécifique (Houston *et al.*, 1981).

iv. Métabolisme de phase II

Les réactions de phase II sont des réactions de conjugaison. De nombreuses réactions sont possibles comme le montre le Tableau 8. A l'issue de la réaction enzymatique de *phase I*, selon Fariss *et al.* (1980), la chlordécone et le chlordécol peuvent être conjugués à l'aide d'UDP-glucuronosyl transférases et de sulfo-transférases. Ainsi il serait possible à partir de la chlordécone et du chlordécol de former la chlordécone- et le chlordécol- glucuronés mais aussi la chlordécone- et le chlordécol- sulfatés (Figure 5). Les UDP glucuronosyl transférases catalysent le transfert d'un acide glucuronique depuis l'UDP- acide glucuronique et les sulfotransférases catalysent le transfert d'un groupement sulfate depuis le 3'- adénosine phosphate 5'-phospho sulfate (McQueen, 2017). Des métabolites plus polaires et plus hydrophiles sont formés à l'issue de cette réaction. Ce métabolisme de phase II a aussi été démontré chez l'Homme, la gerbille et le porc (Boylan *et al.*, 1979; Fariss *et al.*, 1980; Houston *et al.*, 1981; Soine *et al.*, 1983) après quantification de métabolites conjugués dans la bile des animaux comme le montre le Tableau 10. A l'aide du tableau 10, il est possible d'observer des différences entre les pourcentages de métabolites conjugués retrouvés dans la bile selon les espèces. Ainsi, tout comme pour les réactions de phase I, l'intensité des réactions de phase II dépendent des facteurs précédemment énoncés. Par conséquent, certaines espèces pourraient par exemple plus rapidement métaboliser la chlordécone que d'autres en raison de leur équipement enzymatique. Actuellement, il n'existe aucune donnée concernant le métabolisme de phase II chez les ruminants.

Tableau 10: Comparaison des ratios CLD-totale (CLD-t) / CLDOH-total (CLDOH-t) et pourcentages de métabolites conjugués dans la bile de différentes espèces animales

(CLD-C : Chlordécone conjuguée, CLDOH-C : Chlordécol conjugué)

	Gerbille	Homme	Porc	Rat
Ratios CLD-t/CLDOH-t	1/2	1/1.3 – 1/4	1/0.5 – 1/1.4	> 60/1
% de conjugués	0 % CLD-C 65-70 % CLDOH-C	10-58 % CLD-C 90-98 % CLDOH-C	7-17 % CLD-C 65-85 % CLDOH-C	Pas de conjugués
Sources	Houston <i>et al.</i> , 1981	Fariss <i>et al.</i> , 1980 Boylan <i>et al.</i> , 1979	Soine <i>et al.</i> , 1983	Houston <i>et al.</i> , 1981

v. Phase III d'efflux

Les métabolites issus des phases I et II peuvent être repris par des enzymes dits de phase III. L'élimination se fait principalement par transport membranaire à l'aide de P-glycoprotéines ou de protéines multidrogues-résistantes (multidrug- resistance associated proteins) (Roméo and Giambérini, 2008). Concernant la chlordécone, il n'existe pas de données sur cette phase III d'efflux.

vi. Métabolisme du microbiote intestinal

Des populations bactériennes considérables sont présentes dans le microbiote intestinal des mammifères (Eckburg *et al.*, 2005; Gill *et al.*, 2006; McQueen, 2017). Ces bactéries sont capables de biotransformer les xénobiotiques présents dans le microbiote intestinal en augmentant parfois leurs toxicités. Elles peuvent en effet réactiver les xénobiotiques qui avaient été détoxifiés. Les métabolites conjugués excrétés depuis la bile peuvent être hydrolysés à l'aide d'enzymes : des β -lyases et/ou des β -glucuronidases (McQueen, 2017). Cela entraîne la libération de métabolites de type Phase I. Ces derniers peuvent ensuite être réabsorbés et suivre le cycle entéro-hépatique. L'âge, le régime alimentaire, des maladies pré-existantes peuvent altérer la composition du microbiote intestinal. Chez le porc, la gerbille et l'Homme, du chlordécol sous forme libre a été retrouvé dans les fèces alors que dans la bile la majeure partie du chlordécol est sous forme de conjugués (Fariss *et al.*, 1980; Houston *et al.*, 1981; Soine *et al.*, 1983). L'hypothèse la plus probable est la déconjugaison du chlordécol conjugué par le microbiote intestinal des animaux (Soine *et al.*, 1983).

vii. Répartition des métabolites de la chlordécone dans l'organisme animal

Peu de données sont disponibles concernant la répartition tissulaire des métabolites de la chlordécone. Dans le sang, il n'y a pas eu de détection ou de quantification de chlordécol chez l'Homme (Fariss *et al.*, 1980). De plus, Soine *et al.* (1983) indiquent que 20 % de la chlordécone était conjuguée dans le plasma des porcs et que le CLDOH était absent dans cette matrice. Les métabolites de la chlordécone ont à ce jour été recherchés uniquement chez le porc, l'Homme et la gerbille. Dans le foie, de faibles concentrations de métabolites de la chlordécone ont été retrouvées. En effet, chez la gerbille, un ratio de chlordécone/chlordécol de 31/1 a été retrouvé. Chez le porc, moins de 3 % de la chlordécone était conjuguée et il n'y avait pas de présence de chlordécol dans le foie (Soine *et al.*, 1983). La bile est la matrice qui contiendrait les plus fortes concentrations de métabolites principalement sous la forme de chlordécol conjugué (Fariss *et al.*, 1980; Houston *et al.*, 1981; Soine *et al.*, 1983). De faibles concentrations de chlordécone conjuguée y seraient présentes. A contrario, du chlordécol et des proportions plus importantes en chlordécol conjugué y sont retrouvées. Actuellement, il n'existe pas de données de distribution tissulaire des métabolites de la chlordécone chez les ruminants (bovins, ovins et caprins).

6. Excrétion de la chlordécone

i. Elimination sanguine de la chlordécone

Les temps de demi-vies moyens de la CLD rapportés dans la littérature pour différentes espèces sont de : $t_{1/2}$ Homme = 96 ± 24 (moyenne \pm écart-type), $t_{1/2}$ Homme = 153 jours, 165 ± 27 jours $t_{1/2}$ porcin = 12-22 jours $t_{1/2}$ volaille = 5.1 ± 0.7 jours (moyenne \pm écart-type de la moyenne), $t_{1/2}$ bovin = 43 jours, $t_{1/2}$ caprin = 20.1 ± 1.7 (moyenne \pm écart-type de la moyenne) jours (Adir *et al.*, 1978; Cohn *et al.*, 1978; Fournier *et al.*, 2017; Guzelian, 1982; Jondreville *et al.*, 2014a; Mahieu *et al.*, 2015; Soine *et al.*, 1983). Jusqu'à maintenant, étant donné que les métabolites de la CLD n'ont pas été recherchés dans le compartiment sanguin des ruminants, il n'existe aucune cinétique d'élimination sanguine des métabolites de la chlordécone dans le sang.

ii. Elimination urinaire et fécale de la chlordécone

L'élimination de la chlordécone se fait majoritairement par les fèces chez le rat, l'Homme, la gerbille et le porc (Cohn *et al.*, 1978; Egle *et al.*, 1978; Houston *et al.*, 1981; Soine *et al.*, 1983). Egle *et al.* (1978) indiquent que chez le rat, au bout de 84 jours, 65.5 % de la dose administrée de chlordécone avait été excrétées dans les fèces. A contrario, dans les urines, de faibles concentrations de chlordécone sont excrétées chez le rat, l'Homme et la gerbille (Egle *et al.*, 1978; Cohn *et al.*, 1978; Houston *et al.*, 1981). Chez le rat, au bout de 84 jours, 1.6 % de la dose administrée de la CLD avait été excrété via les urines (Egle *et al.*, 1978). Selon Amiard, (2011), après avoir subi des biotransformations, généralement des conjugaisons à des constituants endogènes, le polluant peut être éliminé par voie urinaire ou biliaire. Les molécules de masse relative inférieure à 300 Da sont éliminées préférentiellement via la voie urinaire tandis que pour celles dont la masse est supérieure à 500 kDa, la voie biliaire prédomine. Dans le cas des métabolites conjugués de la chlordécone, des quantités importantes de chlordécol conjugué (de poids molécule $>$ à 500 kDa) sont retrouvées dans la bile porcine, humaine et de gerbille. Chez l'Homme, la gerbille et le porc qui sont capables de métaboliser la chlordécone, le chlordécol sous forme libre est éliminé via les fèces (Cohn *et al.*, 1978; Houston *et al.*, 1981; Soine *et al.*, 1983). Le tableau 11 qui suit résume les ratios chlordécone/chlordécol retrouvés dans les fèces de gerbille, Homme et porc. Actuellement, il existe peu de données d'élimination fécale et urinaire de la CLD et de ses métabolites chez les ruminants. En effet, les seules données à notre disposition sont la quantification de CLD dans des fèces de bovins contaminés aux Antilles Françaises (Mahieu *et al.*, 2015).

Tableau 11 : Comparaison des ratios CLD-totale (CLD-t) /CLDOH-total (CLDOH-t) et pourcentage de métabolites conjugués dans les fèces de différentes espèces animales

	Gerbillé	Homme	Porc
Ratio CLD-t/CLDOH-t	2.4/1	0.25/1	8/1-10/1
% de conjugués	Pas indiqué	Pas de conjugués	0-3 % CLD-conjuguée 4-15 % CLDOH-conjugué
Sources	Houston <i>et al.</i>, 1981	Boylan <i>et al.</i>, 1979	Soine <i>et al.</i>, 1983

iii. Autres voies d'excrétion de la chlordécone

Hormis les urines et les fèces, il existe des voies supplémentaires d'excrétion de la chlordécone chez les animaux d'élevage tel qu'un transfert de la molécule vers les œufs ou le lait.

Les cinétiques de décontamination de la CLD décrites chez la poule pondeuse, la cane de Barbarie ([Jondreville *et al.*, 2014a, 2014b](#)) et la vache laitière ([Smith and Arant, 1987](#)) indiqueraient que sa disparition rapide de l'organisme (demi-vie de 5 à 24 jours en fonction des matrices considérées) serait due aux voies d'excrétion importantes de la CLD que sont la ponte et la lactation ([Naber and Ware, 1964](#); [Smith and Arant, 1987](#); [Jondreville *et al.*, 2014a, 2014b](#)). Le tableau 12 suivant résume les différentes formes de la chlordécone retrouvées (molécule mère ou métabolites) dans le sang, le foie, la bile, le tissu gras, les urines, les fèces et dans les voies supplémentaires tel que l'œuf et le lait chez différentes espèces animales. Actuellement, les métabolites de la CLD n'ont jamais été recherchés dans les voies supplémentaires d'élimination de la CLD que sont les œufs et le lait.

Afin de mieux visualiser les formes retrouvées de la CLD et de ses métabolites, un schéma global par espèces est présenté sur les figures 7, 8 et 9 ci-dessous. Les figures 7, 8, et 9 présentent les formes retrouvées de la CLD et de ses métabolites respectivement chez deux rongeurs, deux monogastriques et un polygastrique.

Tableau 12 : Répartition connue de la CLD et de ses métabolites dans les matrices de différentes espèces animales

	PLASMA	FOIE	BILE	MUSCLE	TISSU GRAS	REINS	FECES	URINES	OEUF	LAIT
CLD	Présence Homme, Rat, Porc (Cohn <i>et al.</i> , 1978; Egle <i>et al.</i> , 1978; Soine <i>et al.</i> , 1983)	Présence Homme, Rat, Porc, Gerbille, Bovin, (Cohn <i>et al.</i> , 1978; Egle <i>et al.</i> , 1978; Soine <i>et al.</i> , 1983; Houston <i>et al.</i> , 1981; Lastel, 2016)	Présence Rat, Homme, Gerbille, Porc (Egle <i>et al.</i> , 1978; Fariss <i>et al.</i> , 1980; Houston <i>et al.</i> , 1981; Soine <i>et al.</i> , 1983)	Présence Rat, Homme, Bovin (Cohn <i>et al.</i> , 1978; Egle <i>et al.</i> , 1978; Lastel, 2016)	Présence Rat, Homme, Bovin (Cohn <i>et al.</i> , 1978; Egle <i>et al.</i> , 1978; Lastel, 2016)	Présence Rat (Egle <i>et al.</i> , 1978)	Présence Porc, Homme, Gerbille, Rat, Bovin (Egle <i>et al.</i> , 1978; Houston <i>et al.</i> , 1981; Mahieu <i>et al.</i> , 2015; Soine <i>et al.</i> , 1983)	Présence Rat, Homme, Gerbille (Cohn <i>et al.</i> , 1978; Egle <i>et al.</i> , 1978; Houston <i>et al.</i> , 1981)	Présence Poule, Canard (Jondreville <i>et al.</i> , 2014a, 2014b)	Présence Vache (Smith and Arant, 1987)
CLDOH	Absence Homme, Porc (Fariss <i>et al.</i> , 1980; Soine <i>et al.</i> , 1983)	Présence Gerbille (Houston <i>et al.</i> , 1981)	Présence Homme, Gerbille, Porc (Fariss <i>et al.</i> , 1980; Houston <i>et al.</i> , 1981; Soine <i>et al.</i> , 1983)	Aucune donnée	Aucune donnée	Aucune donnée	Présence Homme, Gerbille, Porc (Fariss <i>et al.</i> , 1980; Houston <i>et al.</i> , 1981; Soine <i>et al.</i> , 1983)	Aucune donnée	Aucune donnée	Aucune donnée
CLD-C	Présence Porc (Soine <i>et al.</i> , 1983)	Aucune donnée	Présence Porc (Soine <i>et al.</i> , 1983)	Aucune donnée	Aucune donnée	Aucune donnée	Présence Porc (Soine <i>et al.</i> , 1983)	Aucune donnée	Aucune donnée	Aucune donnée
CLDOH-C	Absence Porc (Soine <i>et al.</i> , 1983)	Présence Porc (Soine <i>et al.</i> , 1983)	Présence Homme, Gerbille, Porc (Fariss <i>et al.</i> , 1980; Houston <i>et al.</i> , 1981; Soine <i>et al.</i> , 1983))	Aucune donnée	Aucune donnée	Aucune donnée	Présence Porc (Soine <i>et al.</i> , 1983)	Aucune donnée	Aucune donnée	Aucune donnée

Espèce : Rongeur

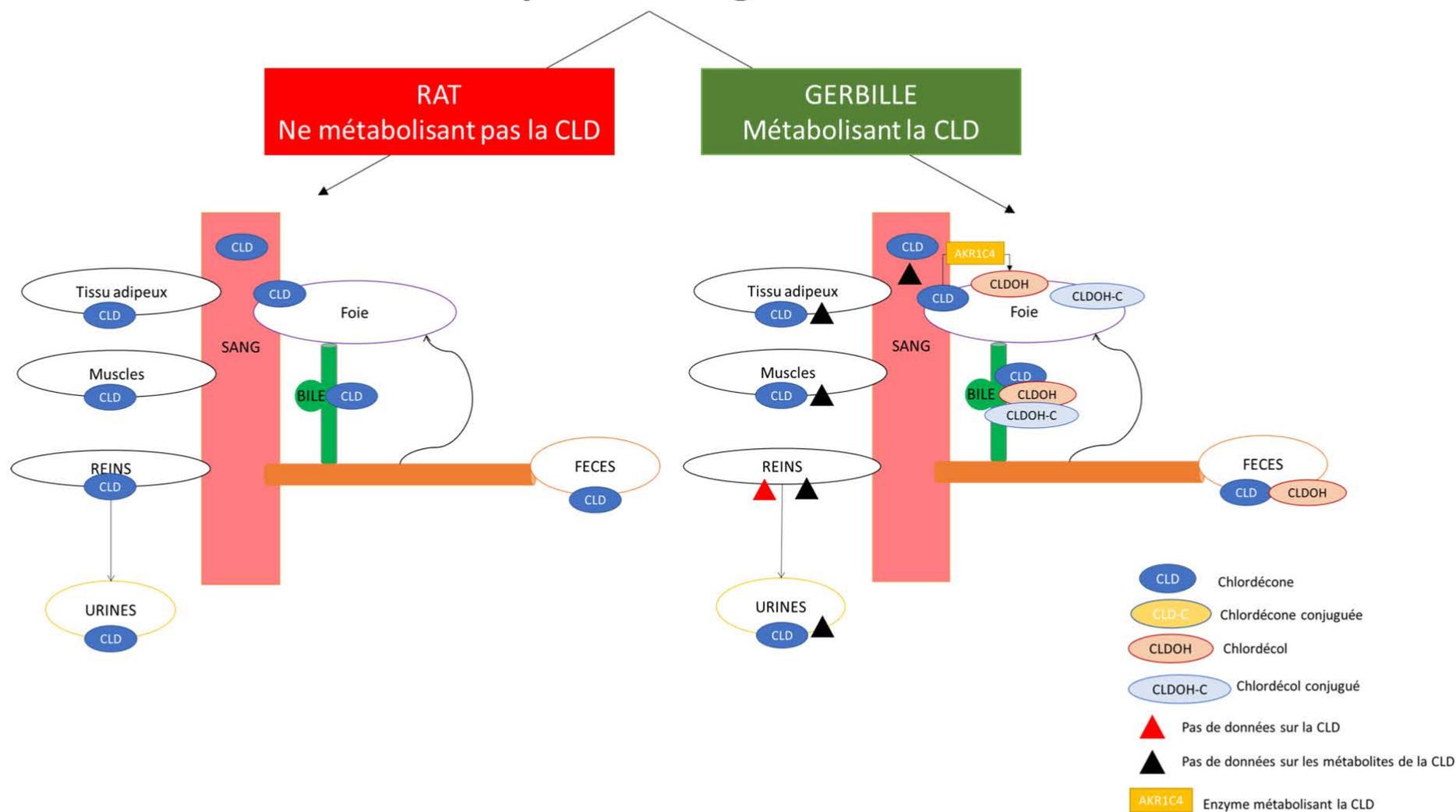


Figure 7 : Schéma récapitulatif de la répartition de la CLD et de ses métabolites chez deux rongeurs : le rat et la gerbille

Espèce : Monogastrique

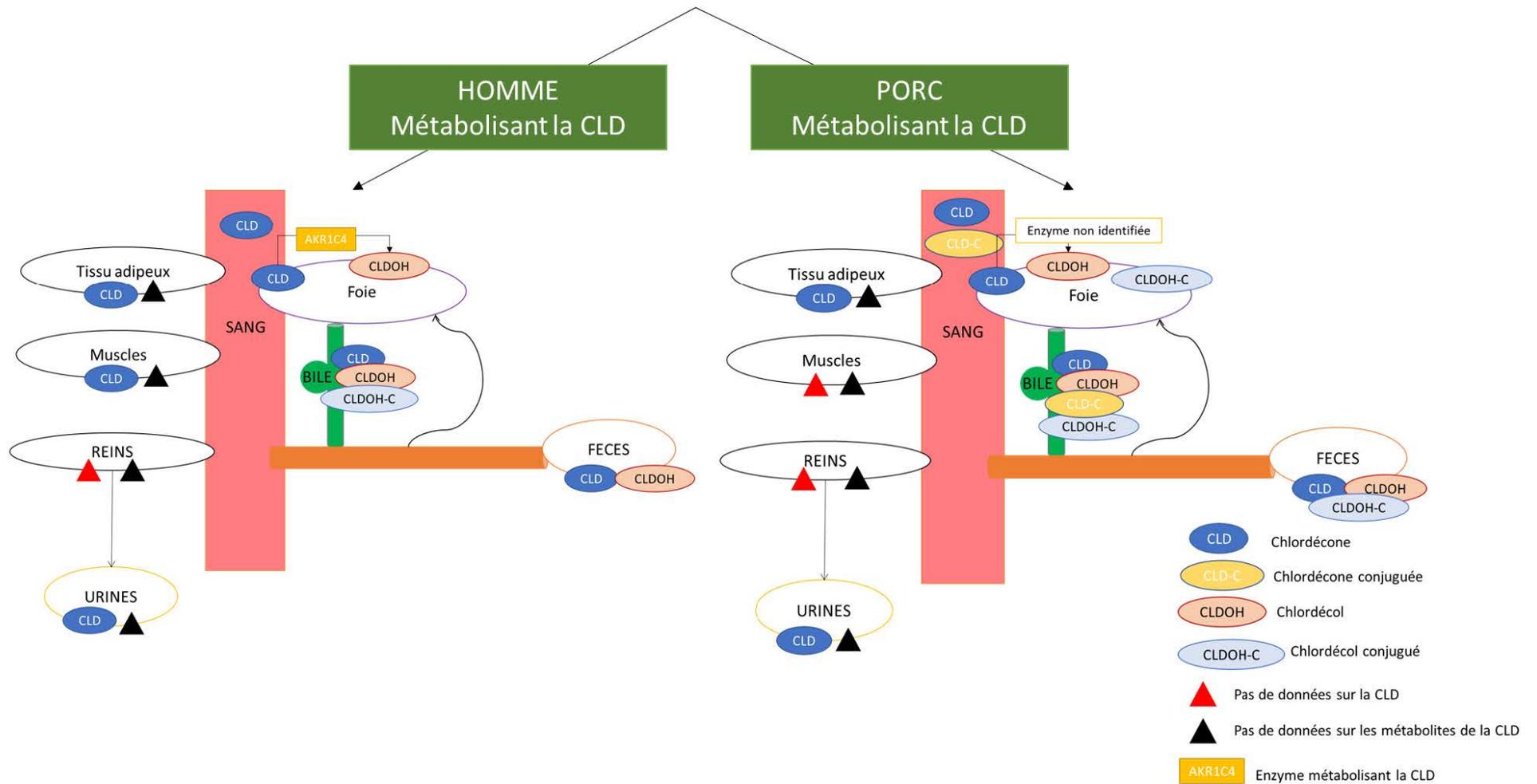


Figure 8 : Schéma récapitulatif de la répartition de la CLD et de ses métabolites chez deux monogastriques : l'Homme et le porc

Espèce : Polygastrique

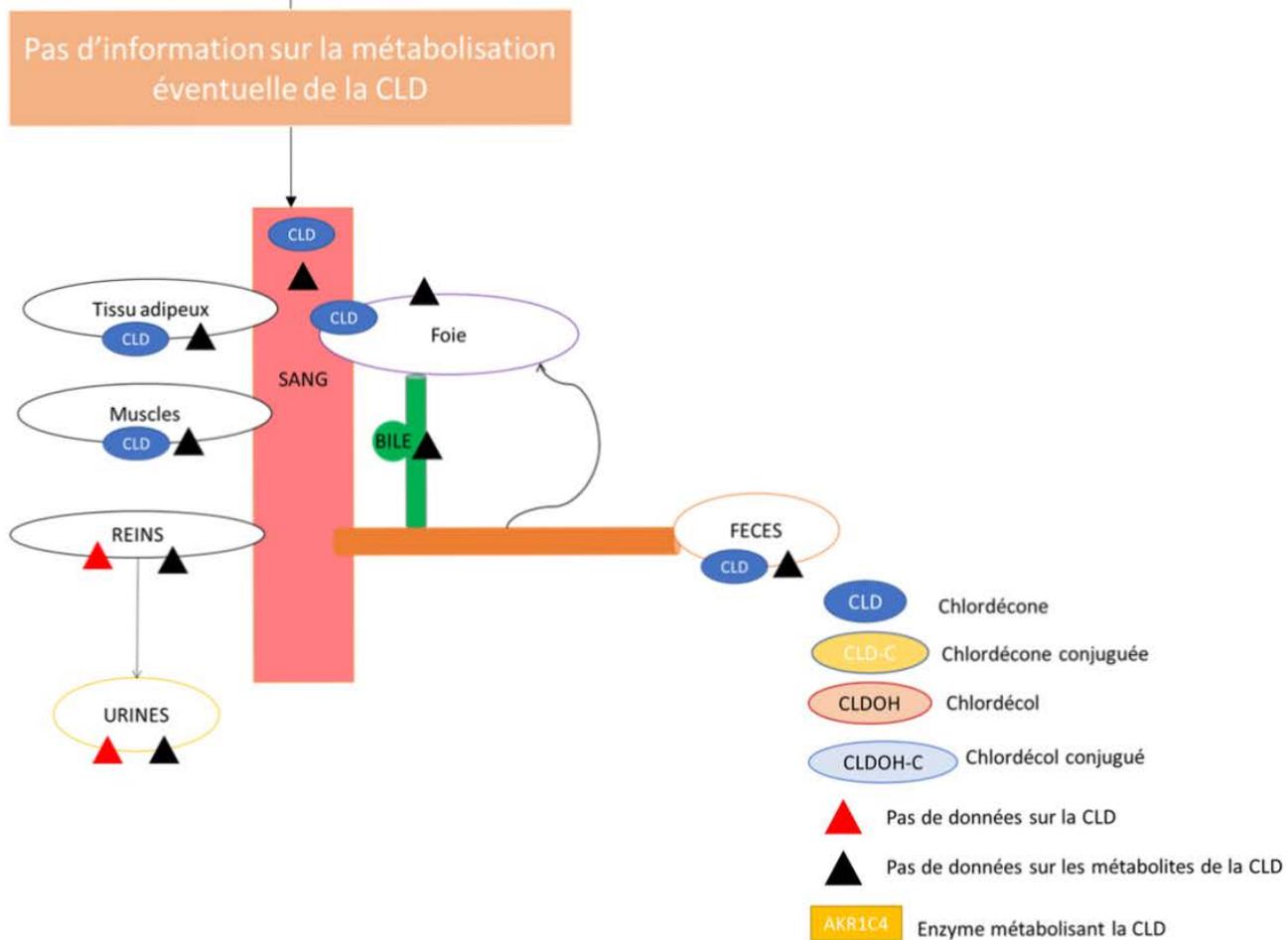


Figure 9 : Schéma récapitulatif de la répartition de la CLD et de ses métabolites chez un polygastrique

La figure 7 récapitule les connaissances sur l'élimination de la CLD et de ses métabolites chez deux rongeurs : le rat et la gerbille. Le rat ne métabolise pas la CLD, ainsi la molécule retrouvée dans les différentes matrices est uniquement de la CLD. La CLD se distribue chez le rat dans toutes les matrices et s'élimine via les fèces et les urines. La gerbille est un animal qui contrairement au rat métabolise la CLD. En effet, il possède l'enzyme responsable de la métabolisation de la CLD et des travaux ont montré que celle-ci est active. Ainsi, il est possible d'observer sur la figure 7 qu'il existe des données sur la répartition de la CLD dans le foie, le muscle, le sang, la bile et le tissu gras. Concernant les métabolites de la CLD, ils ont été recherchés et retrouvés dans le foie, la bile et les fèces. Actuellement, il n'existe pas de données sur la répartition des métabolites de la CLD chez la gerbille dans le sang, le tissu gras, le muscle et les reins. L'élimination de la CLD se fait majoritairement chez la gerbille via les fèces sous forme de CLD et de CLDOH. Dans les urines, a été retrouvée de la CLD mais actuellement, il n'existe aucune donnée sur l'élimination urinaire des métabolites de la CLD chez la gerbille.

La figure 8 récapitule les données sur la répartition et l'élimination de la CLD et de ses métabolites chez deux monogastriques : l'Homme et le porc qui métabolisent la CLD. En effet, l'Homme possède l'enzyme responsable de la métabolisation de la CLD et des travaux ont montré que celle-ci est active. Cependant, chez le porc, il n'existe pas de preuve de présence ou d'activité de la chlordécone reductase dans la littérature, cependant, la présence de métabolites dans le corps de l'animal suggère un métabolisme actif chez cette espèce. Chez l'Homme, la CLD se répartie dans le foie, le sang, la bile, le tissu gras et les muscles. Il n'existe pas de données de répartition de la CLD dans les reins. Les métabolites de la CLD ont été retrouvés dans la bile de l'Homme sous la forme de CLDOH et CLDOH-C. Concernant l'élimination de la CLD, elle se fait tout comme pour la gerbille principalement via les fèces sous la forme de CLD et de CLDOH. Les métabolites de la CLD n'ont jamais été recherchés dans les urines et les reins de l'Homme. Chez le porc, la CLD se repartie dans le foie, le sang, la bile et le tissu gras. Actuellement, il n'existe pas de données concernant la répartition des métabolites de la CLD dans le tissu gras, le muscle et les reins. La CLD-C a été retrouvée dans le sang. Dans la bile du CLD, CLD-C, CLDOH et CLDOH-C ont été retrouvés. La CLD, le CLDOH et le CLDOH-C s'éliminent dans les fèces et actuellement uniquement la forme CLD libre a été recherchée et retrouvée dans les urines. La figure 9 récapitule les données sur la répartition et l'élimination de la CLD et de ses métabolites chez les ruminants. La CLD a été retrouvée dans le foie, le sang, le tissu gras, les muscles et les fèces. Actuellement, il n'existe aucune donnée concernant la métabolisation de la CLD chez les ruminants ni sur la répartition et l'élimination des métabolites. Ainsi, à l'aide des figures décrites précédemment, sont mises en évidence des lacunes concernant le devenir de la CLD chez les animaux d'élevage et en particulier chez les ruminants dont le schéma d'élimination est le moins connu (Figure 9). Or, ces animaux tiennent une place importante dans le paysage agricole et économique des Antilles Françaises. Ainsi, il est important de pouvoir compléter cette figure afin de disposer de données d'élimination de la CLD et de ses métabolites chez les ruminants.

RESUME DE LA PARTIE 2

Après ingestion de chlordécone par voie orale, la molécule est absorbée, à un niveau proche de 100 % au niveau intestinal chez le rat et la chèvre. Les temps de demi-vies moyens de la CLD rapportés dans la littérature pour différentes espèces sont de : $t_{1/2}$ Homme = 96 ± 24 jours (moyenne \pm écart-type), $t_{1/2}$ porc = 12-22 jours, $t_{1/2}$ volaille = 5.1 ± 0.7 jours (moyenne \pm écart-type de la moyenne), $t_{1/2}$ bovin = 43 jours, $t_{1/2}$ caprin = 20.1 ± 1.7 (moyenne \pm écart-type de la moyenne) jours.

La molécule se distribue principalement dans le foie, puis dans le tissu gras et les muscles.

La chlordécone est métabolisée en chlordécol dans le foie des animaux. L'enzyme responsable de la métabolisation de la CLD nommée AKR1C4, a été identifiée à l'aide de tests immunoblots chez l'Homme, le cochon d'Inde, la gerbille et le lapin et des mesures d'activités enzymatiques ont pu être effectuées chez l'Homme, la gerbille et le lapin. Actuellement au niveau hépatique, aucune connaissance concernant la présence de l'enzyme ou encore de son activité n'est disponible chez les ruminants et il sera nécessaire de combler les lacunes en termes de métabolisation de la CLD. A l'issue de la première étape de réduction de la chlordécone, cette dernière et son métabolite principal, le chlordécol, peuvent ensuite être conjugués à l'aide d'enzymes nommées UDP- glucuronosyl-transférases ou de sulfo-transférases. Dans le foie des porcs, 3 % de la chlordécone serait retrouvée sous sa forme conjuguée et il n'y aurait pas de détection de chlordécol. Dans le sang, de la chlordécone conjuguée a été retrouvée chez le porc. Les métabolites de la chlordécone n'ont jamais été recherchés dans le sang des ruminants. La bile est la matrice qui contiendrait le plus de métabolites de la chlordécone principalement sous la forme de chlordécol conjugué mais aussi du chlordécol et de la chlordécone conjuguée.

La chlordécone s'élimine principalement via les fèces chez le rat, le porc et l'Homme. De faibles quantités de chlordécone seraient éliminées via les urines chez la gerbille et le rat. L'élimination urinaire de la chlordécone a été peu étudiée et est une voie mineure d'élimination du polluant. Chez les bovins, de la CLD a été retrouvé dans les fèces. Concernant les métabolites, le chlordécol s'élimine dans les fèces chez l'Homme, le porc et la gerbille. De faibles quantités de chlordécone et de chlordécol conjugués seraient retrouvées dans les fèces des porcs. L'élimination biliaire, fécale et urinaire des métabolites de la chlordécone n'a jamais été étudiée chez les ruminants.

Ainsi, des lacunes concernant les connaissances sur la métabolisation et l'élimination de la chlordécone et de ses métabolites chez les ruminants subsistent. Cependant, pour progresser dans ce domaine, il est indispensable de disposer des méthodes analytiques pour doser la chlordécone et ses métabolites dans les différentes matrices biologiques animales.

PARTIE 3: Etat des lieux sur les méthodes de dosage de la chlordécone et de ses métabolites dans les compartiments biologiques

Cette partie a pour ambition de présenter un état des lieux des méthodes connues de dosage de la chlordécone et de ses métabolites dans différentes matrices animales. Ainsi, les méthodes et/ou les manquements analytiques dans les matrices animales qui serviront à obtenir des données sur la métabolisation et l'élimination de la CLD et de ses métabolites seront exposées. Dans le cadre de la thèse, l'étude sur l'élimination de la CLD se fera chez la brebis non gestante, non lactante et à des stades physiologiques proches. L'objectif sera de compléter la figure 9 présentée précédemment. Par conséquent, les méthodes existantes de dosage de la CLD dans les matrices supplémentaires que sont les œufs et le lait ne seront pas présentées dans cette partie car non étudiées dans cette thèse. A la fin de ce chapitre seront détaillées les lacunes concernant le dosage de la CLD et de ses métabolites dans les différents compartiments biologiques ainsi que les démarches envisagées pour palier à ces limites.

1. Généralités sur le dosage des pesticides dans différentes matrices : Développement, validation et analyse

Le développement d'une méthode analytique s'effectue généralement en trois étapes importantes :

- Une première étape d'extraction des molécules souhaitées
- Une seconde étape de purification de l'extrait (élimination des interférents)
- Une dernière étape de détection des molécules

La première étape d'extraction doit permettre d'extraire les molécules souhaitées tout en extrayant le moins d'interférents matriciels possibles (Chung and Chen, 2011). Cette extraction s'effectue selon la polarité de la molécule. Généralement, une partie non négligeable de la matrice est extraite en même temps que l'analyte. Une étape dite de « clean-up » permet d'éliminer les interférents et donc d'effectuer une analyse sélective de la molécule recherchée. Par exemple, pour les composés organochlorés, un solvant organique va permettre leur extraction depuis une matrice alimentaire tout en extrayant des lipides (Chung and Chen, 2011). Cette étape de nettoyage de l'extrait est donc primordiale pour la détection et éventuellement la quantification de l'analyte. La détection des analytes d'intérêts est la dernière étape après l'étape d'extraction et de « clean-up » de la matrice. A l'issue du développement de la méthode, un processus de validation peut être initié. Ainsi, différents paramètres doivent être vérifiés pour garantir les résultats apportés par cette méthode et disposer des critères de performance de la méthode. Plusieurs référentiels existent dans le domaine des pesticides : le guide ICH (International Conference on Harmonisation), le guide SANTE/EU, (2015) et la norme V03-110, (2010) permettant d'effectuer la validation de méthodes analytiques dans le domaine des pesticides.

2. Méthodes de dosages de la chlordécone et de ses métabolites dans les matrices biologiques animales

i. Dosage dans la bile, les urines et les fèces

Il existe actuellement une méthode unique de dosage de la chlordécone et de ses métabolites dans la bile, les urines et les fèces des animaux. Celle-ci a été développée par Fariss *et al.* (1980) initialement pour le dosage de la CLD dans la bile. Cette méthode est issue d'une première méthode de dosage de la chlordécone dans les matrices biologiques (Blanke *et al.*, 1977) et a été par la suite améliorée. Les auteurs précisent que la méthode était longue, coûteuse et que les taux de récupération de la CLD à l'aide de l'ancienne méthode étaient corrigés par du ^{14}C -CLD mais ne permettait pas de corriger les taux de récupération du chlordécol. La méthode développée par Fariss *et al.* (1980) dans la bile a ensuite été appliquée à différentes matrices notamment dans les urines et les fèces de gerbilles (Houston *et al.*, 1981) et de porcs (Soine *et al.*, 1983). Les étalons internes utilisés étaient la mono-hydrochlordécone et le mono-hydrochlordécol. Ces étalons étaient utilisés car leurs comportements lors de l'extraction étaient similaires à celles de la chlordécone et du chlordécol et parce qu'ils n'avaient pas été détectés dans des matrices humaines ou animales. Etant donné que les métabolites glucuronés et sulfatés de la chlordécone et du chlordécol n'étaient pas disponibles dans le commerce, une étape d'hydrolyse des fonctions glucuronées et sulfatées était effectuée. Cette hydrolyse correspond à une étape dite de déconjugaison et est faite en amont de l'étape d'extraction. Elle était permise par l'ajout d'un mélange d'enzymes : la β -glucuronidase et la sulfatase (*Helix Pomatia*) à pH = 5 et par une incubation du milieu réactionnel à 37°C pendant 16h. La β -glucuronidase permet d'hydrolyser les composés glucuronés dérivants de la réaction de conjugaison effectuées par les UDP – glucuronosyltransférases dans différents fluides biologiques (urine et plasma par exemple) (McQueen, 2017). La sulfatase permet d'hydrolyser les composés sulfonés ou sulfatés dérivants de réactions de sulfatation et/ou sulfonation effectuées par les sulfotransférases dans différents fluides biologiques. La figure 10 ci-dessous présente le schéma général d'hydrolyse par la β -glucuronidase et la figure 11, le schéma général d'hydrolyse par la sulfatase.

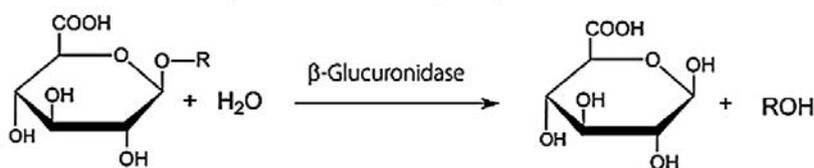


Figure 10 : Schéma général d'hydrolyse de la β -glucuronidase

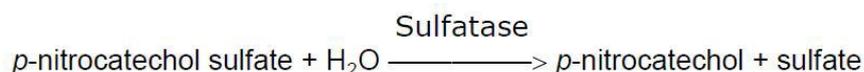


Figure 11 : Schéma général d'hydrolyse de la sulfatase

Selon [Fariss et al. \(1980\)](#), l'hydrolyse d'autres fonctions plus résistantes pourrait aussi être effectuée par l'ajout d'acide concentré. Ainsi, dans cette méthode les échantillons de bile, d'urines et de fèces peuvent subir trois traitements en amont de l'extraction :

- Un ajout de tampon acétate (0.1 M) permettant d'obtenir la CLD et le CLDOH libre
- Un ajout de tampon acétate (0.1 M) et de 1000 unités de β -glucuronidase + sulfatase permettant d'obtenir la CLD et le CLDOH totaux (libre et conjugués)
- Un ajout de tampon acétate (0.1 M) de 1000 unités de β -glucuronidase + sulfatase et d'acide permettant d'obtenir la CLD et le CLDOH totaux (libre, conjugués et des molécules issues d'autres fonctions). L'ajout du tampon acétate permet de tamponner les échantillons à pH= 5. En effet dans la notice des spécifications sur l'utilisation des enzymes β -glucuronidase et sulfatase, l'activité optimale de la β -glucuronidase se situe entre 4,5 et 5 tandis que celle de la sulfatase se situerait aux environs de 6,2 ([Sigma-Aldrich, 2009](#)). Par la suite, à l'issue de ces traitements préliminaires à l'extraction, les échantillons sont extraits à l'aide d'un mélange hexane/acétone (85/15, v/v) et subissent une hydrolyse acide à l'acide sulfurique concentré. Le solvant d'injection est constitué de 2 % de méthanol dans du benzène et l'analyse est effectuée par Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS). La figure 12 ci-dessous résume les différentes étapes de dosage.

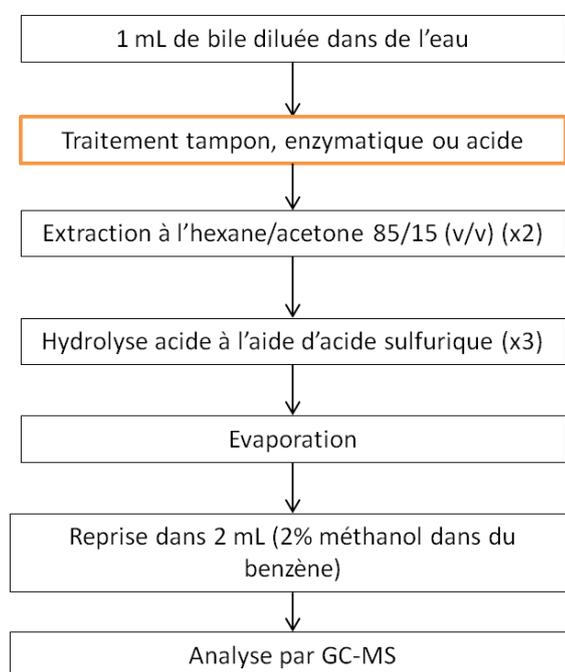


Figure 12: Schéma de dosage de la CLD et des métabolites dans la bile ([Fariss et al., 1980](#))

A l'issue des analyses, il est possible de déterminer les concentrations de métabolites conjugués par différence entre l'échantillon hydrolysé et l'échantillon non-hydrolysé. Ce mode de traitement enzymatique ne permet pas de faire la distinction entre les métabolites glucuronés et sulfatés mais fournit uniquement une valeur de concentration qui est la somme retrouvée des métabolites glucuronés et sulfatés que l'on nomme métabolites conjugués.

ii. Dosage dans le sang, le sérum et le plasma

La comparaison entre les méthodes de dosage de la chlordécone dans les différentes matrices sanguines (sang, sérum et plasma) a été effectuée à l'aide de cinq méthodes issues de la littérature et présentées dans le tableau 13 ci-dessous. Ce dernier résume quelques paramètres importants des méthodes analytiques mises en œuvre et permet aussi de visualiser l'évolution des méthodes au cours du temps.

Tableau 13: Comparaison des différentes méthodes de dosage de la chlordécone dans le sang

SANG, SERUM, PLASMA			
Sources	<i>Fariss et al., (1980)</i>	Méthode du CART Méthode interne	<i>Bichon et al., (2015)</i>
Molécules recherchées	CLD, CLDOH et conjugués	CLD	CLD
Espèces	Gerbille (<i>Houston et al., 1981</i>) Porc (<i>Soine et al., 1983</i>)	Chèvre (<i>Lastel, 2016; Lastel et al., 2016; Fournier et al., 2017</i>) Homme (<i>Multigner et al., 2010</i>)	Homme (<i>Bichon et al., 2015</i>)
Prise d'essai	Non précisé	2 mL sérum ou plasma	1 mL de sérum
Etalon interne	MonohydroCLD et monohydro-CLDOH	5b-monohydroCLD	Etalon interne CLD (¹³ C-CLD)
Préparation des échantillons	Non précisé	Dénaturation des protéines : Triéthylamine + acide formique	Hydrolyse à l'acide formique
Méthode d'extraction	-Déconjugaison enzymatique -Extraction liquide/liquide	Extraction par SPE	Extraction par SPE
Solvant d'extraction	Hexane/Acétone (85/15)	Diethyl ether/n-hexane (85/15)	Acétonitrile
Solvant d'injection		n-hexane	Acétonitrile
Technique analytique	GC-ECD GC-MS	GC-ECD	LC-MS/MS
Colonne	OV-101	-	C30 Coreshell
Validation de la méthode	Méthode non validée	Méthode validée	Méthode validée
LQ*	Non précisé	60 pg g ⁻¹ PF	25 pg g ⁻¹ PF

*LQ = Limite de Quantification

Entre 1980 et 2015, différentes méthodes d'extraction et d'analyse de la chlordécone ont été développées dans les matrices sanguines. Ces méthodes ont été appliquées pour les dosages sanguins chez le porc, la gerbille, l'Homme, la chèvre. Dans les années 1970, l'extraction était de type liquide-liquide à l'aide d'un mélange hexane/acétone (85/15). Depuis 2010, le Centre Analytique de Recherche Technologique, Université (CART) de Liège a développé une méthode utilisant l'Extraction sur Phase Solide dite SPE.

L'étalon interne utilisé dans la méthode est la monohydrochlordécone. Au préalable à cette extraction une étape de dénaturation des protéines est effectuée. La dénaturation protéique des échantillons alliée à l'étape de SPE permet d'éliminer un grand nombre d'interférents matriciels et ainsi d'améliorer la sensibilité des méthodes. Enfin en 2015, le LABERCA a développé une méthode d'extraction de la chlordécone dans le serum en utilisant comme dans la méthode du CART une extraction basée sur la technique SPE. Cependant, l'élution de la molécule était effectuée non plus à l'aide d'un mélange polaire/apolaire mais d'acétonitrile. De plus, l'étalon interne utilisé était le ^{13}C -CLD. Ce mode de correction des taux de récupération permet d'obtenir des méthodes de dosage fiables et précises. Concernant les techniques d'analyses, la technique utilisée de 1970 à 2010 a été la GC-MS ou la Chromatographie en phase gazeuse couplée un détecteur à capture d'électron (GC-ECD). Cependant, la technique par chromatographie en phase liquide couplée à de la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) étant plus sensible que la GC-MS, elle est de plus en plus utilisée pour les dosages de la CLD (Moriwaki and Hasegawa, 2004; Bichon *et al.*, 2015; He *et al.*, 2015). Aucune LQ sanguine ou critères de validation ne sont disponibles pour les méthodes de dosages de la CLD dans les années 1980 contrairement aux méthodes récemment développées. Concernant les dosages de métabolites de la chlordécone, il existe une unique méthode de Fariss *et al.* (1980) développée dans la bile qui a tout comme pour les urines et les fèces été appliquée au sang (Soine *et al.*, 1983). Le schéma de la figure 12 est le même utilisé pour les dosages des métabolites de la chlordécone dans le sang.

3. Méthode de dosages de la chlordécone et des métabolites dans les foies, le tissu gras et le muscle

Le tableau 14 présente les différentes méthodes de dosage de la CLD et ses métabolites qui ont été développées entre 1980 et 2015 dans le foie, le muscle et le tissu gras. Ces méthodes ont été appliquées à des dosages chez le porc, la gerbille, le rat, le hamster, le cochon d'Inde, les oiseaux, l'Homme, la chèvre et les bovins. Concernant les extractions de la CLD dans le foie et le muscle, la première étape est une extraction de type liquide/liquide à l'aide d'un mélange de solvants polaire/apolaire. Par la suite, dans certaines méthodes, la soude était utilisée en deuxième étape. La dernière étape est une purification acide de la matrice. Concernant les extractions dans le tissu gras, la première étape était une étape d'extraction liquide/liquide suivie (i) d'ajout de soude et d'une purification acide ou (ii) d'une purification par perméation de gel. Concernant les méthodes d'analyses, comme pour la matrice sanguine, les anciennes méthodes d'analyses étaient effectuées par GC-MS. Actuellement, elles s'effectuent par LC-MS/MS. De plus, un changement important a été réalisé concernant le solvant d'analyse pour la phase mobile utilisé en chromatographie en phase liquide. En présence de méthanol la chlordécone réagit et se transforme en hémicétal. Ainsi, pour éviter cette réactivité due au méthanol, ce dernier a été remplacé par l'acétonitrile (ACN). Concernant les dosages des métabolites de la chlordécone dans le foie, l'unique méthode existante est la méthode de Fariss *et al.* (1980). Aucune recherche de métabolites de la CLD n'a été récemment effectué dans le foie, le muscle et le tissu gras des ruminants.

Tableau 14 : Comparaison des différentes méthodes de dosage de la chlordécone dans le foie, le tissu gras et le muscle des animaux

FOIE, TISSU GRAS, MUSCLE						
Sources	Fariss <i>et al.</i> (1980)	Stafford <i>et al.</i> (1978)	ANSESPOP04 (Méthode interne)	Bordet <i>et al.</i> (2007)	Bichon <i>et al.</i> (2015)	ANSES PBM Pest LSA-INS-0164- Version 05 (Méthode interne)
Molécules recherchées	CLD, CLDOH et conjugués	CLD	CLD	CLD	CLD	CLD
Matrices et Espèces	Foie de porc (Soine <i>et al.</i> , 1983) Foies de Gerbille, Rat, Hamster, Cochon d'Inde (Houston <i>et al.</i> , 1981)	Foies et carcasse d'oiseaux (Stafford <i>et al.</i> , 1978)	/	/	/	Foie et tissu gras de chèvres (Lastel, 2016; Lastel <i>et al.</i> , 2016) Foies, tissu gras et muscles de bœufs (Lastel, 2016)
Prise d'essai	x g de foie (non précisé)	5 g Carcasse, Foie	2 g de viande ou 0,5 g de graisse	2 g de viande ou 0,5 g de graisse	1 g de tissu gras	2 g de foie et muscle ou 0,5 g de tissu gras
Etalon interne	MonohydroCLD et monohydro- CLDOH	Non précisé	Transnonachlor	Non précisé	¹³ C-CLD	¹³ C-CLD
Préparation des échantillons	Non précisé	Homogénéisation	Broyage et homogénéisation	Broyage et homo- généisation	Lyophilisation	Broyage et homogénéisation
Méthode d'extraction	Extraction solide/liquide	Extraction solide/liquide	Extraction solide/liquide	Extraction solide/liquide	Extraction solide/liquide	Extraction solide/liquide
Extraction	Hexane-Acétone (85/15) Soude Purification acide H ₂ SO ₄	Benzène-isopropanol Purification acide H ₂ SO ₄	Hexane-Acétone (85/15) Soude Purification acide H ₂ SO ₄	Hexane-Acétone (85/15) Soude Purification acide H ₂ SO ₄	Toluène/acétone (70/30) Purification par Chro- matographie par Per- méation de Gel (GPC)	Acétonitrile/Dichlorométhane (75/25) pour le tissu gras Reprise Hexane/Acétone (85/15) Soude puis Purification acide Hexane/Acétone (85/15) pour les foies et muscles Soude puis Purification acide
Solvant d'injection	1 % Méthanol dans du Benzène	Acétone	n-hexane	n-hexane	ACN	Méthanol
Technique analy- tique	GC-ECD et GC-MS	GC-ECD et GC-MS	GC-ECD	GC-ECD	LC-MS/MS	LC-MS/MS
Colonne	OV-210 50 % trifluoropropyl, methyl	4% SE-30/6 % QF-1	Pré-colonne : Silice fondue désactivée Colonne : 5 % phényl, 95 % diméthyl	Colonne : 5 % phényl, 95 % diméthyl	C30 Coreshell	Pré-colonne et colonne : Phenomenex Aqua C18
Validation de la méthode	Méthode non validée	Méthode non validée	Méthode validée	Méthode validée	Méthode validée	Méthode validée
LQ	Non précisé	LD = 0.1 ppm	18, 5 ng g ⁻¹ (N.I)	5 ng g ⁻¹ PF	0,2 ng g ⁻¹ lw	3 ng g ⁻¹ PF (muscle et foie) 3 ng g ⁻¹ MG (graisse)

4. Méthodes supplémentaires de dosage de la chlordécone et du chlordécol

Hormis les publications existantes des méthodes d'extraction et de dosage de la chlordécone et de ses métabolites dans différentes matrices biologiques, il existe une publication de [Moriwaki and Hasegawa, \(2004\)](#) traitant du dosage LC-MS/MS de la chlordécone et une autre publication de [He et al. \(2015\)](#) traitant du dosage LC-MS/MS simultanée de la chlordécone et du chlordécol dans l'eau et les sols. Dans la publication de [Moriwaki and Hasegawa, \(2004\)](#), aucun protocole d'extraction n'est précisé, les auteurs présentent uniquement une méthode LC-MS/MS. Dans la publication de [He et al. \(2015\)](#), l'extraction est effectuée dans les matrices eau et sols. La publication de [He et al. \(2015\)](#) est la seule publication récente présentant le dosage simultané de la chlordécone et du chlordécol par LC-MS/MS. Le tableau 15 ci-dessous récapitule les deux méthodes.

Tableau 15 : Méthodes supplémentaires de dosage de la CLD et du CLDOH par LC-MS/MS

Sources	Moriwaki and Hasegawa, (2004)	He et al. (2015)
Molécules recherchées	CLD	CLD et CLDOH
Matrices	-	Eau, Sols
Quantité prélevée	-	100 mL d'eau 100 g de sol
Etalon interne	¹³ C-CLD	Non précisé
Préparation des échantillons	-	Non précisé
Méthode d'extraction	-	Extraction liquide/liquide
Extraction	-	Eau : Extraction au chlorforme et séchage Na ₂ S ₀₄ Filtration et évaporation du solvant Reprise dans 1 mL d'ACN Centrifugation 15 min à 12 000 rpm Sols : Elution du sol sur colonne ouverte à l'aide de 100 mL d'acétonitrile et extraction se poursuivant comme dans la matrice eau
Solvant d'injection	Méthanol	Acétonitrile
Technique analytique	LC-MS/MS	LC-MS/MS
Colonne	Develosil C30-UG-5	Acquity HPLC BEH C18
Validation de la méthode	Méthode non validée	Méthode validée
LQ	Pas d'indication de LQ LD à 7 ng L ⁻¹	2 µg L ⁻¹ pour la chlordécone (eau et sols) 30 µg L ⁻¹ pour le chlordécol (eau et sols)

A l'aide des travaux de [He et al. \(2015\)](#) une méthode simultanée de dosage de CLD et du CLDOH a été développée dans l'eau et les sols. Par conséquent, le métabolite de la CLD peut être tout comme la CLD dosé par LC-MS/MS. La publication de [He et al. \(2015\)](#) est actuellement la seule publication traitant du dosage simultané de la CLD et du CLDOH. Cependant, la limite de quantification obtenue pour le CLDOH à l'aide de cette méthode est très élevée et vaut 15 fois la LQ du CLD. Cette faible sensibilité est une limite pour la recherche de traces du métabolite de la CLD. De plus, en comparant la méthode de [He et al. \(2015\)](#) aux méthodes actuelles de dosage de la CLD par LC-MS/MS, il est possible d'observer qu'aucun étalon interne n'est utilisé dans cette méthode de dosage simultané de la CLD et du CLDOH.

La tableau 16 récapitule les différentes méthodes de dosages existantes de la chlordécone (molécule mère ou métabolites) dans le sang, le foie, la bile, le tissu gras, les urines et les fèces chez différentes espèces animales. Les méthodes supplémentaires dans l'eau et le sol de dosage de la CLD et du CLDOH par LC-MS/MS ont été ajoutées. Pour chacune des méthodes il a été précisé si cette dernière a été validée c'est-à-dire si l'on dispose des performances de la méthode analytique.

Tableau 16 : Récapitulatif des méthodes connues pour le dosage de la chlordécone et de ses métabolites

	SERUM/ PLASMA	FOIE	BILE	TISSU GRAS	FECES	URINES	EAU ET SOLS
CLD	Bichon et al., 2015 Extraction SPE LC-MS/MS Méthode validée LQ = 25 pg g ⁻¹ PF	Méthode ANSES interne Extraction solide/liquide LC-MS/MS Méthode validée LQ = 3 ng g ⁻¹ PF	Fariss et al., 1980 Extraction liquide/liquide GC-MS ou GC-ECD Méthode non validée Pas de LQ	Bichon et al., 2015 Extraction solide/liquide LC-MS/MS Méthode validée LQ = 0.2 ng g ⁻¹ lw	Fariss et al., 1980 Extraction solide/liquide GC-MS ou GC-ECD Méthode non validée Pas de LQ	Fariss et al., 1980 Extraction liquide/liquide GC-MS ou GC-ECD Méthode non validée Pas de LQ	He et al. (2015) Extraction liquide/liquide (eau) et solide/liquide (sols) LC-MS/MS Méthode validée LQ = 2 ng mL ⁻¹
	Méthode du CART Extraction SPE GC-ECD Méthode validée LQ = 60 pg g ⁻¹ PF			Méthode ANSES interne Extraction solide/liquide LC-MS/MS Méthode validée LQ = 3 ng g ⁻¹ MG			
CLD-OH	Fariss et al., 1980 Extraction liquide/ liquide GC-MS ou GC-ECD Méthode non validée Pas de LQ	Fariss et al., 1980 Extraction solide/liquide GC-MS ou GC-ECD Méthode non validée Pas de LQ	Fariss et al., 1980 Extraction liquide/liquide GC-MS ou GC-ECD Méthode non validée Pas de LQ	Aucune donnée	Fariss et al., 1980 Extraction solide/liquide GC-MS ou GC-ECD Méthode non validée Pas de LQ	Fariss et al., 1980 Extraction liquide/liquide GC-MS ou GC-ECD Méthode non validée Pas de LQ	He et al. (2015) Extraction liquide/liquide (eau) et solide/liquide (sols) LC-MS/MS Méthode validée LQ = 30 ng mL ⁻¹
CLD-C CLDOH-C	Fariss et al., 1980 Extraction liquide/liquide GC-MS ou GC-ECD Méthode non validée Pas de LQ	Fariss et al., 1980 Extraction solide/liquide GC-MS ou GC-ECD Méthode non validée Pas de LQ	Fariss et al., 1980 Extraction liquide/liquide GC-MS ou GC-ECD Méthode non validée Pas de LQ	Aucune donnée	Fariss et al., 1980 Extraction solide/liquide GC-MS ou GC-ECD Méthode non validée Pas de LQ	Fariss et al., 1980 Extraction liquide/liquide GC-MS ou GC-ECD Méthode non validée Pas de LQ	Aucune donnée

Pour les matrices sang, foie et tissu gras, il existe des méthodes de dosage de la CLD dont on dispose des critères de performance. Ces méthodes s'appuient sur des extractions de type liquide/liquide et une analyse par GC-ECD ou LC-MS/MS qui sont les deux méthodes d'analyses permettant d'obtenir les meilleures sensibilités pour l'analyse de la CLD. Concernant les matrices bile, urines et fèces, actuellement la seule méthode existante de dosage de la CLD est la méthode de [Fariss *et al.* \(1980\)](#). Cette méthode se base sur une extraction de type liquide/liquide et une analyse par GC-ECD ou GC-MS. Aucun critère de validation de la méthode n'est disponible. De plus, concernant le dosage des métabolites de la CLD, pour toutes les matrices biologiques animales présentées, l'unique méthode existante est aussi celle de [Fariss *et al.* \(1980\)](#). Dans les matrices eau et sols, il existe une méthode simultanée de dosage de CLD et du CLDOH par LC-MS/MS. Cette méthode a été validée et est actuellement l'unique méthode par LC-MS/MS permettant le dosage simultané de la CLD et du CLDOH. Cependant, la limite de quantification obtenue pour le CLDOH est très élevée (15 fois plus élevée que celle de la CLD). De plus, aucun étalon interne n'est ajouté aux processus d'extraction par comparaison aux actuelles méthodes de dosage de la CLD par LC-MS/MS.

Comme indiqué dans la partie II, l'objectif de cette étude est de compléter le schéma d'élimination de la CLD chez les ruminants. Pour combler ces manquements il est nécessaire de disposer d'outils analytiques performants de dosage de la CLD et de ses métabolites dans le foie, le sang, la bile, le tissu gras, les muscles, les urines et les fèces. Actuellement, ces outils analytiques ne sont pas disponibles ou présentent des lacunes à combler et en particulier pour le dosage du chlordécol.

La partie 3 de la synthèse bibliographique a présenté les connaissances actuelles en matière de dosage de la CLD et de ses métabolites dans les différentes matrices biologiques. Actuellement, il existe des méthodes sensibles et validées de dosage de la chlordécone dans le foie, le gras, les muscles et la matrice sanguine des animaux. Ces méthodes s'appuient sur l'analyse LC-MS/MS et l'utilisation d'étalon interne isotopique. La méthode de dosage de la CLD dans les organes des animaux s'effectue après une extraction solide-liquide et dans la matrice sanguine après une extraction de type Extraction sur Phase Solide. Dans la bile, les fèces et les urines, il existe une méthode de dosage de la CLD mise au point en 1980. L'extraction est de type liquide/liquide et l'analyse par GC-ECD ou GC-MS. Concernant les dosages des métabolites de la chlordécone (chlordécol et conjugués), pour toutes les matrices biologiques, ces dosages s'effectuent à l'aide de la méthode de dosage de la CLD et de ses métabolites dans la bile. Afin d'obtenir les métabolites conjugués de la chlordécone, les fonctions étaient hydrolysées à l'aide d'enzymes de déconjugaison. Hormis dans les méthodes biologiques animales, il existe une unique méthode de dosage simultané de la CLD et du CLDOH dans l'eau et les sols. La méthode d'extraction s'effectue à l'aide d'une extraction liquide/liquide et une analyse par LC-MS/MS. Cette méthode a été validée et permet d'obtenir des limites de quantification de 2 ng mL^{-1} et de 30 ng mL^{-1} respectivement pour la CLD et CLDOH dans l'eau et le sol.

Cette partie met donc en évidence des lacunes en termes de développement analytique pour le dosage de la CLD et de ses métabolites dans les différentes matrices biologiques. En effet, afin d'assurer les résultats qui seront obtenus lors de la réalisation des études toxicocinétiques, les projets portant sur la chlordécone ou encore les plans de surveillance, il est indispensable de disposer de méthodes fiables et sensibles de dosage de la chlordécone et de ses métabolites. Par conséquent, il est essentiel d'utiliser la technique actuelle la plus sensible pour le dosage de la CLD à savoir la LC-MS/MS en l'alliant à l'utilisation d'étalons internes qui apporte une plus grande confiance dans les résultats obtenus. La méthode par LC-MS/MS de He *et al.* (2015) présente des lacunes en termes de sensibilité et aucun étalon interne n'est utilisé. De plus, concernant l'extraction de la CLD et de ses métabolites dans les matrices biologiques animales, l'unique méthode connue est celle de Fariss *et al.* (1980) pour lesquelles aucunes valeurs de Limites de Quantification (LQ) ou critères de validation de méthodes ne sont disponibles. Ainsi, ce chapitre met en évidence l'importance de développer de nouvelles méthodes de dosages de la CLD et de ses métabolites dans le foie, le sang, les muscles, le tissu gras, la bile, les urines et les fèces des animaux.

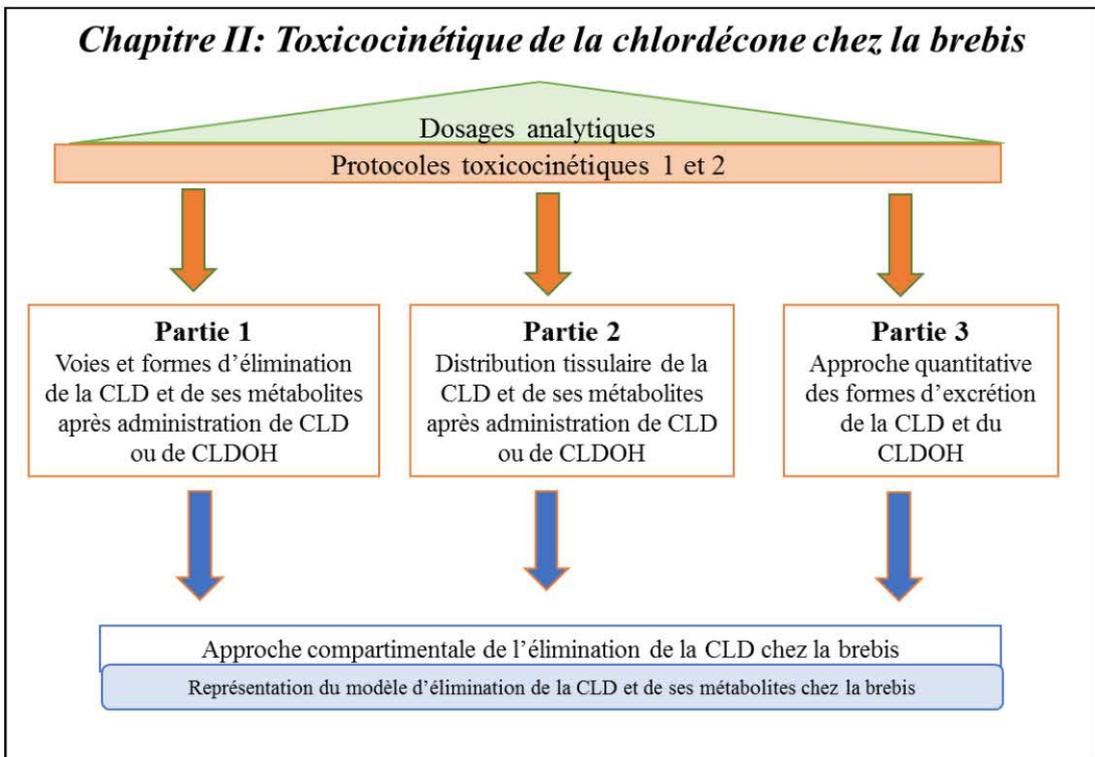
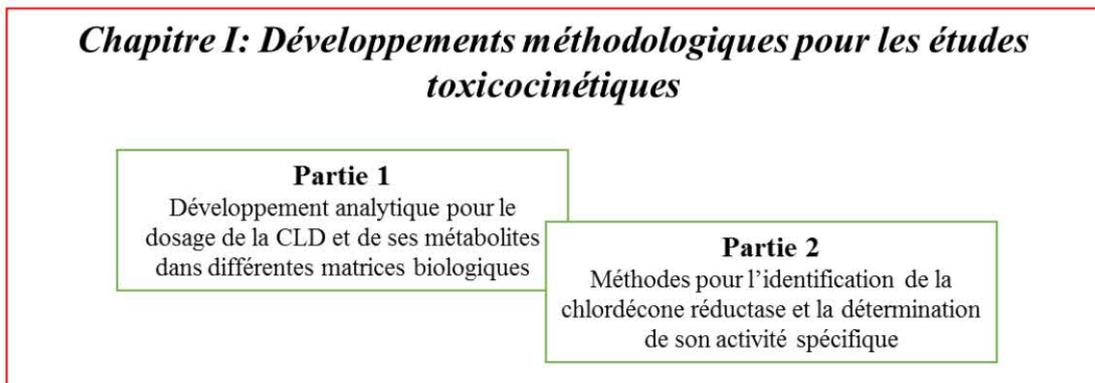
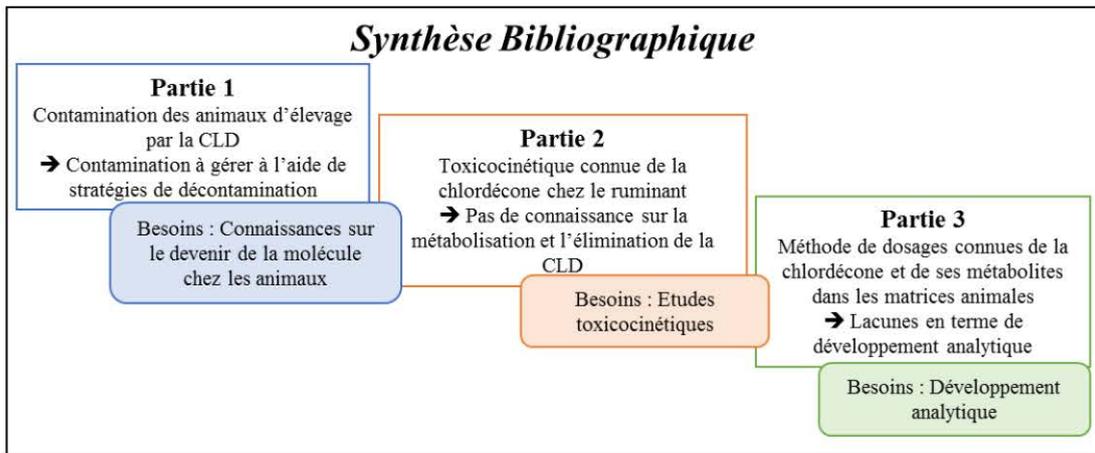
CONCLUSION DE L'APPROCHE BIBLIOGRAPHIQUE

La chlordécone est un polluant organique persistant dans les sols des Antilles Françaises et qui le sera encore pour plusieurs siècles. Cette molécule aux effets toxiques pour l'être vivant est en effet très stable dans les sols et peu soluble dans l'eau. Les animaux d'élevage présents sur des sols contaminés peuvent être involontairement exposés à la CLD après ingestion involontaire de sol. Ainsi, entre 2008 et 2010, les contrôles réalisés à l'abattoir départemental du Moule en Guadeloupe ont démontré la présence de bovins contaminés à fortement contaminés dans l'île (concentration de CLD dans les tissus adipeux péri-rénaux comprise entre 3 et 650 $\mu\text{g CLD kg}^{-1}$ MG). 15 % de la SAU des Antilles Françaises reste contaminée par la CLD. Etant donné l'importance de l'élevage pour l'économie antillaise, il apparaît indispensable de disposer d'outils pour gérer au mieux la contamination des ruminants par la CLD. Cette sécurisation passe par la proposition de stratégies de décontamination des animaux. Afin de pouvoir mener à bien ce projet et donc de répondre aux objectifs de la thèse, **il est nécessaire de disposer de données sur le devenir de la CLD chez les ruminants et de son élimination et ici, en particulier, chez la brebis**. L'approche bibliographique a mis en évidence des lacunes en termes de connaissance sur la métabolisation et l'élimination de la chlordécone chez les ruminants. Par conséquent, il sera nécessaire de mettre en place des études toxicocinétiques visant à combler les lacunes présentées. Cependant, ces études toxicocinétiques reposent sur des méthodes d'analyses de la CLD et de ses métabolites. Or, comme l'a montré la synthèse bibliographique, il y a également des manquements en termes de développements méthodologiques pour les études toxicocinétiques. Les deux chapitres suivants de la thèse ont pour objectif de compléter et d'apporter de nouvelles connaissances en termes de (1) développements méthodologiques pour les études toxicocinétiques chez la brebis et (2) toxicocinétique de la CLD chez la brebis.

3

Chapitre 1 : Développements méthodologiques pour les études toxicocinétiques

Introduction Générale
Comment s'élimine la chlordécone (CLD) chez la brebis ?



Discussion générale et Perspectives

Conclusion générale

La réalisation des études toxicocinétiques de la chlordécone nécessite de disposer de méthodes analytiques fiables et sensibles afin de doser à la fois la molécule parent et ses métabolites dans différentes matrices biologiques. Ces analyses permettront de caractériser les étapes de métabolisation et d'élimination de la chlordécone. Ce chapitre 1 s'articule autour de deux grandes parties : (1) une première partie traitant du développement analytique de méthodes de dosages de la chlordécone et de ses métabolites dans différentes matrices biologiques (foie, sang, urines, fèces, muscle, tissu gras et bile) et (2) une deuxième partie présentant des méthodes pour l'identification et la mesure de l'activité spécifique chlordécone réductase dans le foie de brebis.

Dans la partie 1, les travaux concernant le développement analytique des méthodes de dosage de la chlordécone et de ses métabolites dans les différentes matrices biologiques seront présentés. Ce premier travail de recherche s'est effectué en collaboration avec le Laboratoire de Sécurité des Aliments (LSA1) de l'ANSES de Maisons-Alfort (France) et plus précisément au sein de l'unité Pesticides et Biotoxines Marines (PBM). La réalisation des études toxicocinétiques de ces travaux de thèse nécessite de disposer de méthodes de dosage qui permettront de comprendre (1) la métabolisation, (2) la distribution et (3) l'élimination de la chlordécone et de ses métabolites chez la brebis. Par conséquent, pour chacune des étapes de la toxicocinétique, il y a des matrices d'intérêts clairement identifiées. Pour la compréhension de (1) la métabolisation, le foie est la matrice d'intérêt, pour celle de (2) la distribution, le sang, le foie, le tissu gras et le muscle sont les matrices d'intérêts et pour (3) l'élimination, le sang, les urines, la bile et les fèces sont les matrices d'intérêts. La matrice foie a été la matrice de départ à ce développement analytique. Ce dernier repose sur une extraction dite Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe (QuEChERS) simultanée de la chlordécone et du chlordécol. L'analyse s'effectue par LC-MS/MS avec l'utilisation d'étalons internes isotopiques de la chlordécone (CLD) et du chlordécol (CLDOH). Afin de quantifier les métabolites conjugués de la CLD et du CLDOH, un traitement enzymatique à l'aide de la β -glucuronidase et de la sulfatase est effectué au préalable à l'étape d'extraction. La méthodologie d'extraction QuEChERS a ensuite été adaptée dans les différentes matrices d'intérêts. A l'issue de l'étape de développement analytique, les méthodes dans les matrices foie, urines et fèces ont été validées en s'appuyant sur le guide [SANTE/EU, \(2015\)](#) et la norme [V03-110, \(2010\)](#).

Dans la partie 2, des méthodes pour l'identification et la mesure de l'activité spécifique chlordécone réductase dans le foie de brebis seront présentées. Comme indiqué dans la synthèse bibliographique, la chlordécone peut être métabolisée en chlordécol à l'aide d'une aldo-cétoréductase (AKR1C4) mais cette réaction n'est pas possible chez toutes les espèces. La présence de l'enzyme a été mise en évidence par Western-Blot chez l'Homme, le cochon d'Inde, la gerbille et le lapin et des mesures d'activités enzymatiques ont pu être effectuées chez l'Homme, la gerbille et le lapin mais pas chez le cochon d'Inde. Actuellement au niveau hépatique, aucune connaissance concernant la présence de l'enzyme ou encore de son activité n'est disponible chez la brebis. L'objectif de cette partie est donc de combler les

lacunes en termes d'identification et de caractérisation de l'enzyme responsable de la métabolisation de la chlordécone en chlordécol chez la brebis. Afin de répondre à cet objectif, ces travaux de thèse se sont appuyés sur des méthodes présentées dans deux publications de [Molowa *et al.* \(1986a\)](#) et [\(1986b\)](#) et sur le travail de développement analytique réalisé dans le foie des animaux (partie 1).

A l'issue de ce premier chapitre, une conclusion sera effectuée.

PARTIE 1: Développement analytique pour le dosage de la chlordécone et de ses métabolites dans les différentes matrices biologiques

Les travaux analytiques effectués dans cette thèse seront présentés dans la partie 1. Dans un premier temps, les choix analytiques retenus pour ce développement seront justifiés, puis les méthodes de dosages de la CLD et de ses métabolites dans les différentes matrices seront présentées. Ces travaux analytiques ont fait l'objet de deux valorisations analytiques dans les revues *Food Chemistry* et *Journal of Chromatography B*.

1. Choix analytiques retenus et mise au point

Cette sous-partie s'appuie sur l'article 1 de ces travaux de thèse : « Development and validation of an HPLC-MS/MS method with QuEChERS extraction using isotopic dilution to simultaneously analyze chlordacone and chlordacol in animal livers » publié dans *Food Chemistry*.

i. La technique d'analyse par LC-MS/MS

La première partie de ce travail de recherche a consisté à la mise au point d'une méthode analytique de dosage simultané de la chlordécone (CLD) et du chlordécol (CLDOH) dans les foies d'animaux d'élevage. L'objectif était de développer une méthode sensible, rapide, pratique et robuste de la chlordécone et du chlordécol. Comme indiqué dans la synthèse bibliographique, les deux techniques d'analyse les plus sensibles pour le dosage de la CLD sont la GC-ECD et la LC-MS/MS. L'unique développement analytique récent concernant le dosage simultané de la CLD et du CLDOH a été effectué par LC-MS/MS (He *et al.*, 2015). En effet, l'avantage de cette technique est que contrairement à la GC-ECD, l'utilisation d'étalons internes isotopiques est possible, permettant d'obtenir des méthodes d'analyses fiables corrigeant les taux de récupération des molécules et facilitant l'identification des molécules recherchées. Dans le cadre de ces travaux de thèse, la technique d'analyse retenue a été la LC-MS/MS. Avant de présenter les choix retenus lors du développement de la méthode LC-MS/MS, le principe de cette technique d'analyse sera présenté.

(i-1). La spectrométrie de masse en tandem (MS/MS)

(i-1-a). Choix analytiques

La spectrométrie de masse est une technique physique d'analyse qui permet de détecter et d'identifier des molécules d'intérêt par mesure de leur rapport masse/charge (m/z). Pour être détectées, les molécules doivent passer sous forme gazeuse et être ionisées. Un spectromètre de masse classique est constitué d'une source d'ionisation, d'un analyseur et d'un détecteur. La source d'ionisation permet d'ioniser

et de faire passer les molécules sous forme gazeuse. L'analyseur va permettre de sélectionner et de séparer les ions en fonctions de leurs rapport m/z et le détecteur permet de convertir le signal ionique en un signal numérique interprétable par l'ordinateur. Il est possible de choisir différents modèles de spectromètre de masse en tandem. Deux modes d'ionisation sont utilisés dans la littérature pour l'analyse de la CLD : l'electrospray (ESI) et l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI). A l'aide de la synthèse bibliographique, il a été possible de déterminer que le mode d'ionisation de la CLD est l'ESI en mode négatif (Moriwaki and Hasegawa, 2004; Bichon *et al.*, 2015). C'est aussi le mode d'ionisation qui a été choisi par He *et al.*, (2015) pour le CLDOH. Par conséquent, l'ESI en mode négatif a été retenu pour ce développement analytique. Ce choix concernant le mode d'ionisation peut s'expliquer par rapport à la structure de la CLD et du CLDOH. Les nombreux atomes de chlore présents sur les composés polarisent la liaison entre l'atome d'oxygène et l'atome d'hydrogène des fonctions hydroxyles rendant ainsi l'atome d'hydrogène labile ce qui favorise l'ionisation en mode négatif. Afin de quantifier la CLD, la plupart des auteurs utilisent un analyseur de type quadripolaire en mode Multiple Reaction Monitoring (MRM) car c'est le mode privilégié lorsqu'une quantification est nécessaire (Moriwaki and Hasegawa, 2004; Bichon *et al.*, 2015; He *et al.*, 2015). Comme indiqué dans la synthèse bibliographique, cette technique permet de réaliser une quantification à l'aide d'étalons internes isotopiques. Cela est possible, en utilisant des étalons internes marqués de formule chimique identique à nos molécules d'intérêt mais dont un certain nombre de carbones sont substitués par des carbones 13 (^{13}C) qui sont des isotopes stables du carbone 12 (^{12}C) mais avec un neutron supplémentaire. La masse des étalons internes augmente de 1 dalton (Da) par carbone substitué par rapport à la molécule non substituée, ils seront donc différenciables de nos molécules d'intérêts en spectrométrie de masse (m/z différents) mais élués aux mêmes temps de rétention. L'utilisation d'étalons internes de formule chimique identiques à nos molécules d'intérêts permet de s'affranchir d'éventuelles pertes de nos molécules durant les différentes étapes pré-analytiques (extraction, évaporation, dilution ...) et aussi de faciliter l'identification des molécules d'intérêts.

(i-1-b). Principe de l'ESI-MS/MS

La source d'ionisation en electrospray (ESI) a été mise au point en 1984 (Yamashita and Fenn, 1984). C'est un mode d'ionisation doux qui permet l'observation des ions pseudo-moléculaires et également la formation d'ions multichargés. L'ESI repose sur l'introduction d'une solution aqueuse du composé à analyser par un capillaire très fin porté à un haut potentiel électrique. Cette tension crée des charges dans la solution à la sortie du capillaire et un nébulisat de fines gouttelettes est formé (Laprévote, 2001). Les gouttelettes ainsi formées arrivent dans la source à pression atmosphérique au niveau du capillaire. Un premier gaz nommé gaz de nébulisation permet de focaliser le spray et un second gaz de désolvatation (généralement de l'azote (N_2)) permet de sécher le spray et d'éliminer l'éluant résiduel. La contre-électrode permet de créer une différence de potentiel, permettant ainsi d'attirer les ions vers la zone de vide.

Les gaz chauds vont permettre l'évaporation des molécules de solvant ce qui entraîne la diminution du diamètre des gouttelettes et le rapprochement des charges. Lorsque les charges sont très rapprochées, il y a une répulsion de celles-ci. Lorsque l'effet de répulsion électrostatique devient supérieur à la tension de surface du solvant, le phénomène d'explosion coulombienne a lieu et il y a alors formation d'une multitude de gouttelettes multichargées contenant les molécules d'intérêts (Laprévote, 2001). Les gouttelettes formées deviennent de plus en plus petites et la densité de charges électriques devient tellement intense qu'il se produit une désorption des ions sous l'effet du champ électrique. On obtient donc des ions en phase gazeuse qui vont pouvoir porter une ou plusieurs charges électriques. L'interface entre la source et l'analyseur de masse est réalisée par une série de lentilles électrostatiques (skimmer) qui vont permettre d'achever la désolvatation complète des ions et éventuellement leur fragmentation. Les ions formés dans la source ESI sont ensuite séparés par un analyseur, le triple quadripôle. Cet analyseur est constitué de trois quadripôles en série dont le second est utilisé comme une cellule de collision. Un quadripôle est constitué de quatre électrodes généralement cylindriques dont le potentiel oscille entre une tension continue U et une tension alternative V (Laprévote, 2001). Les ions qui entrent dans le premier quadripôle vont subir l'effet du champ quadripolaire et selon les valeurs de U et de V imposées, certains ions vont avoir une trajectoire stable dans le quadripôle et vont pouvoir être détectés tandis que d'autres vont venir se décharger contre les électrodes et ne seront pas détectés. Au niveau du second quadripôle, des collisions avec un gaz inerte (en général N_2) permettent de former des ions fragments. En fonction du potentiel appliqué au niveau du second quadripôle, l'énergie cinétique des ions sera plus ou moins élevée et les collisions avec les molécules de gaz inerte seront plus ou moins intenses. Plus les collisions sont fortes, plus l'énergie interne transmise aux ions sera importante et donc la fragmentation sera importante. La figure 13 permet de récapituler le devenir d'un ion à travers un triple quadripôle.

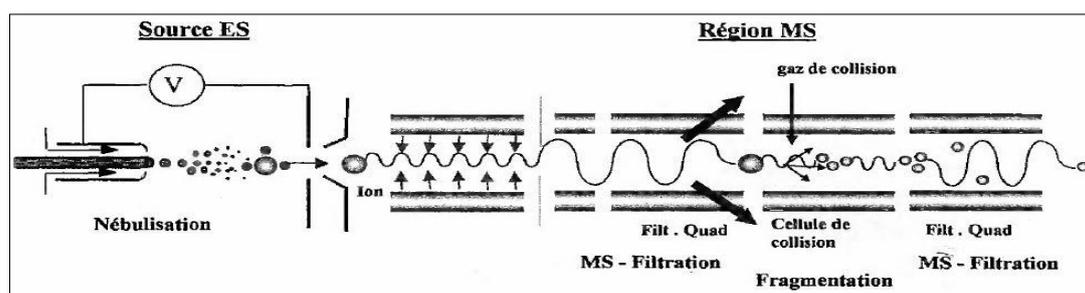


Figure 13 : Schéma illustrant le devenir d'un ion à travers un triple quadripôle (Marquet, 2005)

(i-1-c). Mise au point

Etant donné qu'il existe une méthode dite de référence de dosage de la CLD dans le foie par LC-MS/MS initialement développée par l'ANSES (LSA-INS-0164 v5 – Méthode interne), elle a été le point de départ à ce développement de méthode. Dans cette thèse, les travaux ont été réalisés à l'aide d'un 5500 Q-trap de chez AB Sciex.

Afin de mener à bien ce développement analytique, la chlordécone, le chlordécol et leurs étalons internes isotopiques respectifs $^{13}\text{C}_8\text{-CLD}$ et $^{13}\text{C}_8\text{-CLDOH}$ ont été commandés au laboratoire *Azur Isotopes*. Initialement la méthode de référence de l'ANSES utilise le méthanol. Cependant étant donné les connaissances sur la réactivité entre la chlordécone et le méthanol ([Moriwaki and Hasegawa, 2004](#); [Bichon et al., 2015](#); [He et al., 2015](#)), l'acétonitrile a été choisi comme solvant de travail. Les paramètres de masse des quatre molécules ont été optimisés dans l'acétonitrile sur le spectromètre de masse et sont présentés dans l'article 1 qui suit. Ce premier travail d'optimisation a permis de confirmer la pureté de chacune des 4 molécules. Les spectres de masse des quatre molécules sont présentées à l'aide de la figure 14 suivante.

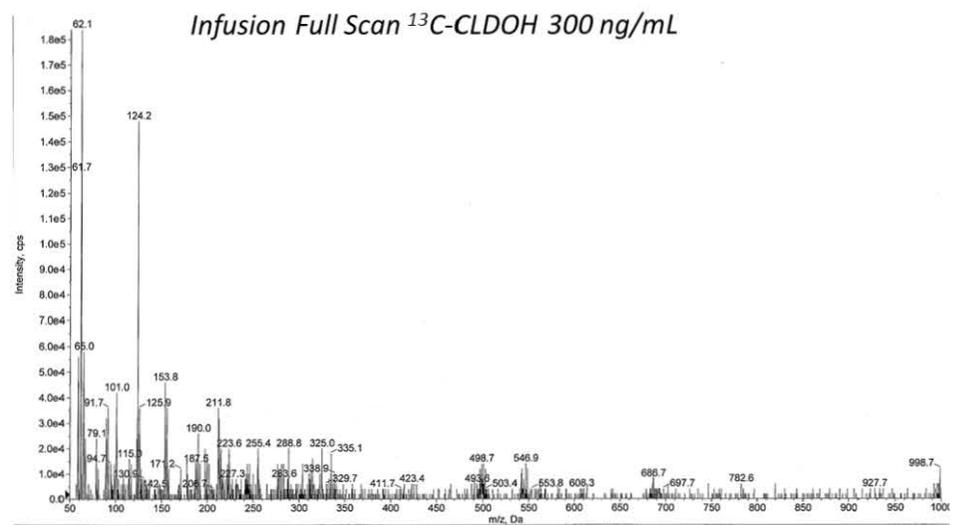
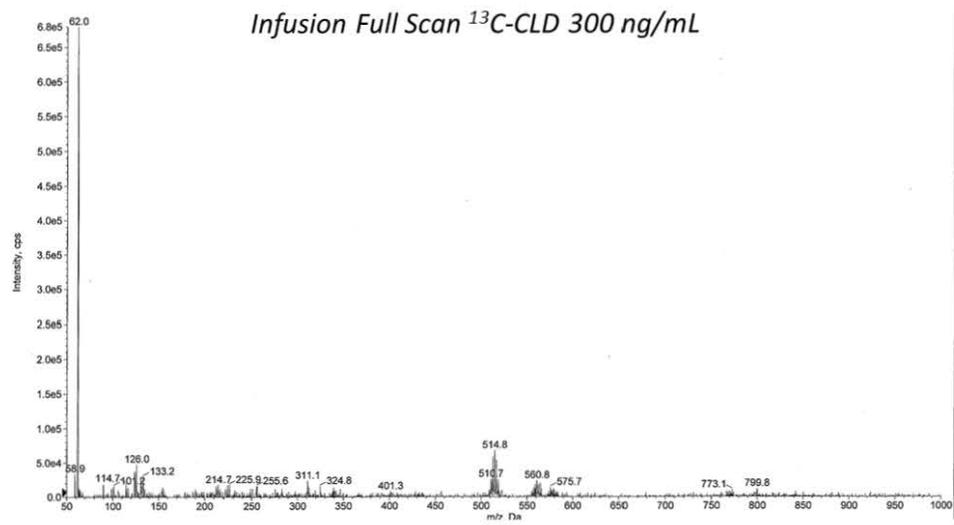
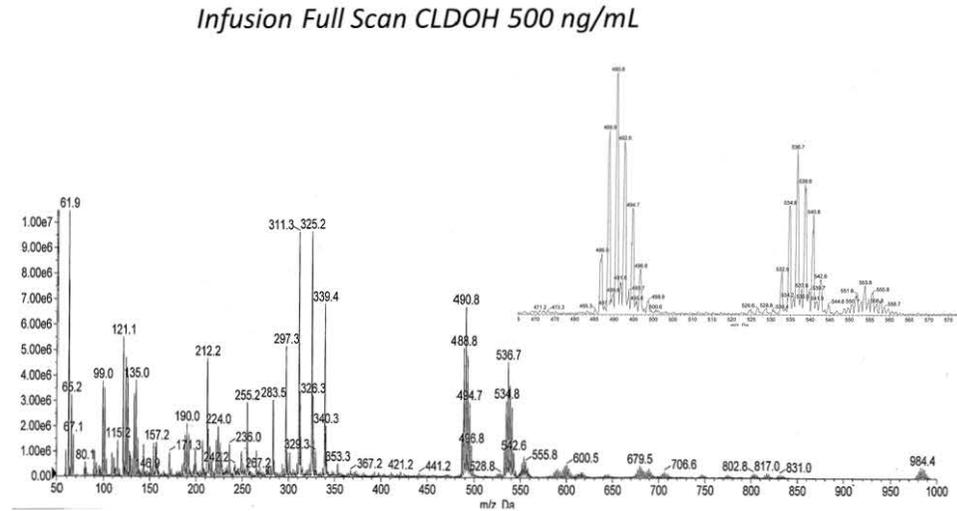
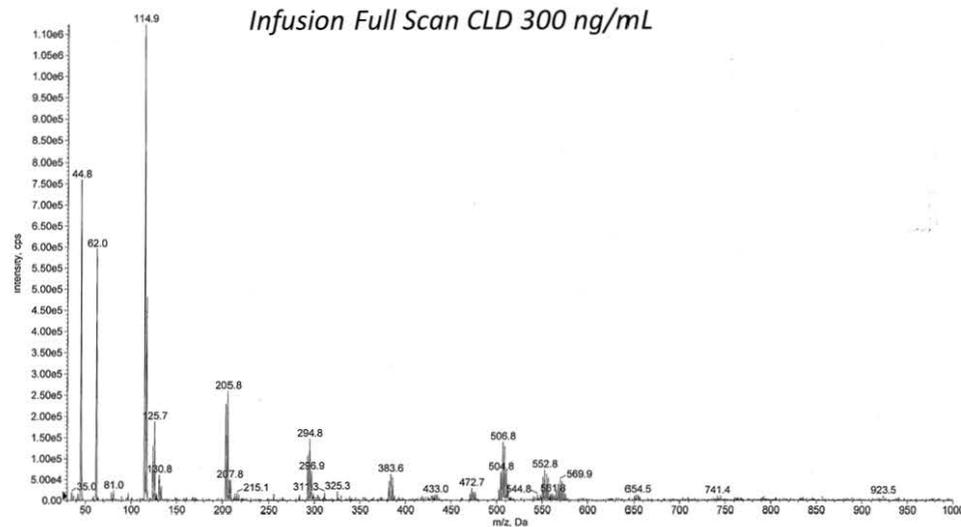


Figure 14 : Spectres de masse [M-H]⁻ en mode Full Scan de la chlordécone, du chlordécol et de leurs étalons internes respectif

(i-2). La Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP)

(i-2-a). Choix analytiques

La chromatographie liquide est une méthode de séparation de molécules présentes dans un mélange à l'aide de deux phases non miscibles (Rouessac and Rouessac, 2000).

- Une phase stationnaire emprisonnée dans une colonne
- Une phase mobile se déplaçant au contact de la première

La séparation chromatographique s'effectue à l'aide d'une colonne dans laquelle se trouve une phase stationnaire et un liquide nommé phase mobile qui permettra l'élution des composés. Concernant l'analyse de la CLD, deux phases stationnaires sont utilisées dans la littérature. Moriwaki and Hasegawa, (2004) utilisent une silice greffée d'une chaîne de 30 atomes de carbones C₃₀ et d'autres auteurs, utilisent une phase hydrophobe greffée en C₁₈ (Bichon *et al.*, 2015; He *et al.*, 2015). Une phase stationnaire de type C₁₈ est utilisée dans ce travail en accord avec la méthode de référence qui a servi de point de départ. Concernant le choix de la phase mobile, comme indiqué dans le paragraphe (i-3) le méthanol utilisé dans la méthode de référence pour éluer la CLD n'a pas été retenu. En effet, la CLD peut réagir avec le méthanol (MeOH) pour former un héli-cétal de formule : [M.CH₃OH-H]⁻ (Bichon *et al.*, 2015). La formation de cet héli-cétal entraîne une baisse de la résolution du pic chromatographique (CLD et héli-cétal sont coélus) et de la sensibilité de la CLD. Pour éviter la formation de l'héli-acétal, la phase mobile utilisée est constituée d'acétonitrile et d'eau comme préconisé dans les publications les plus récentes (Bichon *et al.*, 2015; He *et al.*, 2015).

(i-2-b). Principe de la Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP)

La séparation chromatographique s'effectue à l'aide d'une chaîne de type CLHP constituée de différents modules permettant l'acheminement de la phase mobile au niveau de la colonne contenant la phase stationnaire après injection de l'échantillon dans le système.

Une chaîne CLHP est constituée :

- De solvants (phase mobile)
- D'un dégazeur
- D'une pompe
- D'un injecteur
- D'une colonne (phase stationnaire) reliée directement à un détecteur

La phase mobile est constituée de solvants organiques. Un système de dégazeur permet d'équilibrer le système et d'éviter des variations de pressions lors des analyses. Cette phase mobile est entraînée sur la phase stationnaire enfermée dans une colonne à l'aide d'une pompe. Cette dernière permet de fournir un éluant de composition fixe (mode isocratique) ou une composition en phase mobile variable (gradient d'élution). La phase stationnaire en chromatographie en phase normale est le plus souvent un gel de

silice. En chromatographie en phase inverse, des chaînes de carbone plus ou moins longues (C₄, C₈, C₁₈...) sont greffées sur ce gel de silice et plus précisément au niveau des fonctions silanols conférant à la phase son caractère apolaire. Après injection, les molécules présentes dans le mélange à séparer effectueront des interactions avec la phase stationnaire. La phase mobile permettra l'élution des composés initialement piégés sur la phase stationnaire. Le choix de la phase stationnaire et de la phase mobile s'effectue donc selon les différentes fonctions chimiques présentes sur les molécules à séparer. Les molécules seront donc éluées dans le temps selon la force des interactions phase-stationnaire/molécule/phase mobile. La molécule qui aura le plus d'interactions avec la phase stationnaire sera éluee en dernière. A l'issue de la séparation du mélange sur la colonne, est obtenu un chromatogramme correspondant au tracé des variations de composition de la phase éluee au cours du temps (Rouessac and Rouessac, 2000).

(i-2-c). Mise au point

Concernant la méthode utilisée pour éluer la CLD et le CLDOH, le mode gradient comme dans la méthode de référence ANSES a été utilisé. Une légère modification a été effectuée et le gradient final est présenté dans l'article 1 qui suit. A l'aide de la méthode d'analyse simultanée de la CLD et du CLDOH et de leurs étalons internes, il a été possible de vérifier que la contribution isotopique des étalons internes étaient < à 2 %.

ii. Extraction de la chlordécone et du chlordécol dans le foie

L'extraction correspond à l'étape qui permet d'extraire sélectivement le ou les composés d'intérêt depuis la matrice. L'objectif était d'extraire la chlordécone et le chlordécol depuis la matrice foie de manière à obtenir des taux de récupération des molécules satisfaisants. Ce taux de récupération peut être défini à travers deux modes de quantification ; l'étalonnage externe ou l'étalonnage interne. L'étalonnage externe est une quantification directe de la ou les molécules sans correction des taux de récupération par une molécule dite étalon interne. L'étalonnage interne permet d'obtenir des taux de récupération corrigés par un étalon interne. Lorsque les étalons internes sont des isotopes des molécules recherchées, on parle de quantification à l'aide d'un étalon interne isotopique. Dans ces travaux, la quantification a été réalisée à l'aide d'étalons internes isotopiques. L'objectif de ce développement de méthode était d'obtenir en étalonnage externe des taux de récupération supérieurs à 30 % et en étalonnage interne des taux de récupération entre 70 et 120 % (SANTE/EU, 2015).

(ii-1). Etapes préliminaires

Lors de cette mise au point, la première étape a été d'appliquer la méthode d'extraction de référence développée au laboratoire de l'ANSES pour le dosage de la CLD dans le foie au dosage simultané de la

CLD et du CLDOH pour ces travaux. La figure 15 ci-dessous résume les différentes étapes d'extraction de la méthode de référence de l'ANSES.

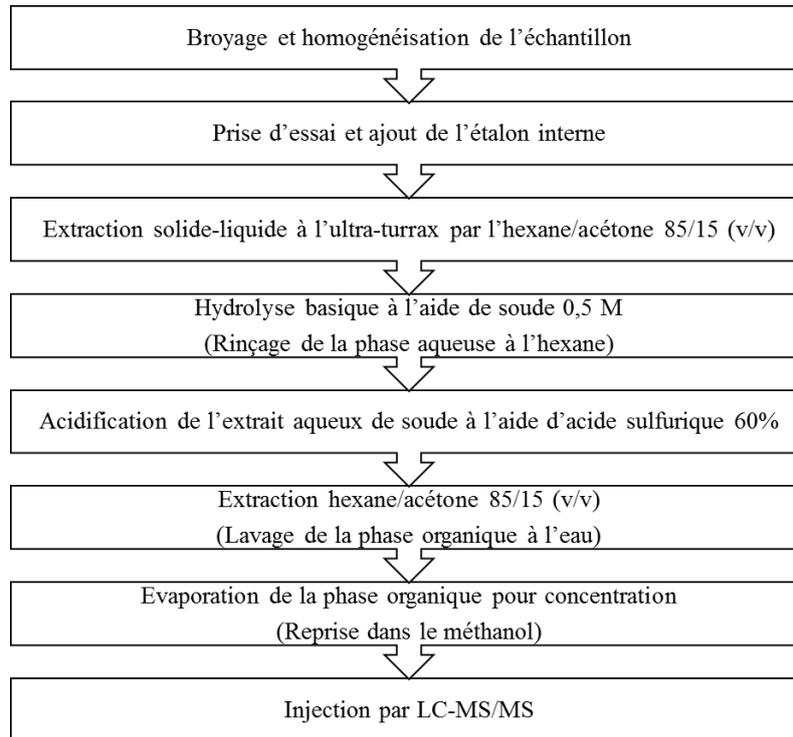


Figure 15 : Récapitulatif des étapes d'extraction de la méthode de référence de dosage de la CLD (LSA-INS-0165 v5, Méthode interne)

Ainsi, à l'aide de cette méthode d'extraction, les taux de récupération en étalonnage externe (sans correction par l'étalon interne) ont été déterminés après supplémentation de CLD et CLDOH de 5 échantillons de foies de brebis. L'unique modification effectuée pour tester l'extraction du CLDOH à l'aide de cette méthode a été la reprise de l'échantillon dans l'acétonitrile après évaporation de la phase organique au lieu du méthanol. Les taux de récupération en étalonnage externe obtenus pour le CLDOH étaient d'environ 5 %. La méthode d'extraction de la méthode de référence ne permettait donc pas d'obtenir des taux de récupération satisfaisants du CLDOH. L'obtention de ces faibles taux de récupération pourrait être dûe à l'utilisation de l'acide sulfurique, de la soude ou aux étapes successives d'ajout d'acide puis de soude qui pourraient dégrader le CLDOH. Par conséquent, à l'issue de ces résultats, une méthode d'extraction de la CLD et du CLDOH plus « douce » et avec moins d'étapes d'extractions si possible devait être mise au point.

(ii-2). Choix analytique

La méthode d'extraction à développer dans ces travaux devait être sensible, simple, répétable, fiable et devait permettre d'obtenir des taux de récupération satisfaisants. Afin de répondre à ces différents critères, la méthode QuEChERS a été testée et choisie. Cette méthode d'extraction est de plus en plus utilisée dans le domaine de l'analyse des pesticides et offre l'avantage d'être simple, rapide, peu coûteuse, fiable et répétable (Anastassiades *et al.*, 2003).

(ii-3). Principe de l'extraction QuEChERS

La méthode QuEChERS est une méthode d'extraction mise au point par [Anastassiades *et al.* \(2003\)](#) initialement utilisée pour l'analyse des végétaux puis appliquée à l'analyse des pesticides ([González-Curbeloa *et al.*, 2014](#)), des mycotoxines ([Yogendrarajah *et al.*, 2013](#)) et des médicaments ([Gressler *et al.*, 2016](#)). C'est une méthode d'extraction liquide-liquide ou liquide-solide douce, rapide qui permet l'analyse d'un grand nombre d'échantillons. Cette méthode d'extraction repose sur deux grandes étapes :

- Une étape d'extraction et salting-out à l'aide d'ACN et de sels inorganiques ;
- Une étape de purification à l'aide de phases dispersives

Ainsi, à l'issue de l'homogénéisation et de la pesée de l'échantillon, la première étape est réalisée. Le principe de cette première étape repose sur une extraction solide/liquide ou liquide/liquide à l'aide d'un mélange ACN et de sels inorganiques en grandes quantités permettant de créer le phénomène de salting-out. En effet, les sels vont saturer la phase aqueuse contenant les analytes à extraire et favoriser leur transfert vers la phase organique ACN. Les sels utilisés sont le sulfate de magnésium anhydre (MgSO_4) pour piéger l'eau et le chlorure de sodium (NaCl) pour saturer la phase aqueuse. Si la matrice qui contient les composés à extraire n'est pas riche en eau (moins de 80 %), il est nécessaire d'ajouter de l'eau pour hydrater la matrice et ainsi favoriser l'extraction liquide-liquide avec le solvant organique ([Anastassiades *et al.*, 2003](#)). En plus des sels inorganiques, il est possible d'ajouter des sels tampons (citrate ou acétate de sodium) pour maintenir le pH aux alentours de 5 et ainsi empêcher la dégradation de certains pesticides sensibles à des pH acides ou basiques ([Anastassiades *et al.*, 2003](#)). A l'issue de cette première étape, il est possible de réaliser une deuxième étape consistant à purifier l'extrait à l'aide d'une phase dite dispersive. Cette phase va piéger les interférents matriciels coextraits lors de la première étape. Cette étape n'est pas obligatoire et dépend de la matrice ainsi que de la nature des molécules à extraire. Différentes phases dispersives existent dans le commerce et permettent d'éliminer les interférents matriciels. Il est indispensable de sélectionner la phase la plus adaptée pour piéger les interférents sans que cette dernière ne piège les molécules d'intérêts. La figure 16 présente les deux grandes étapes de la méthode QuEChERS.

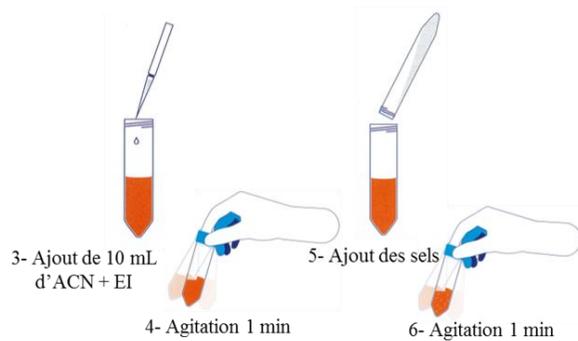
Homogénéisation et pesée



1- Homogénéisation de l'échantillon avec de l'eau

2- Prise d'essai 10g

Extraction et Salting-Out



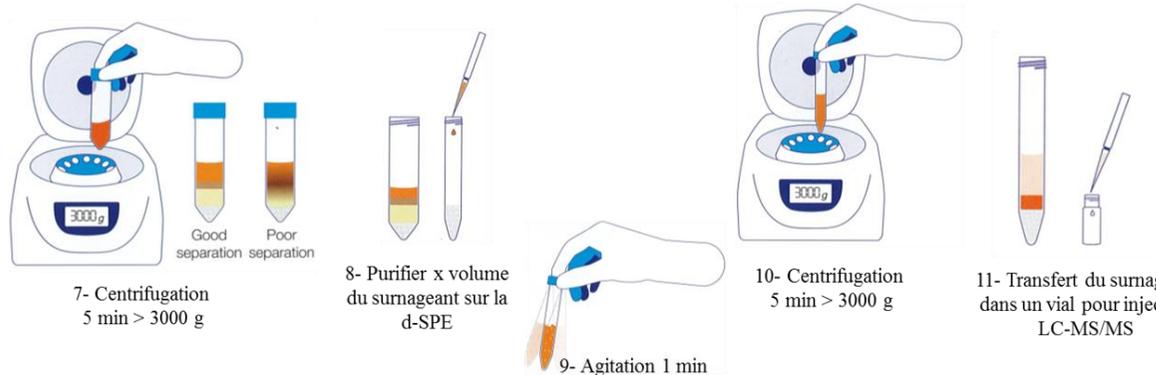
3- Ajout de 10 mL d'ACN + EI

4- Agitation 1 min

5- Ajout des sels

6- Agitation 1 min

Purification par la d-SPE



7- Centrifugation 5 min > 3000 g

8- Purifier x volume du surnageant sur la d-SPE

9- Agitation 1 min

10- Centrifugation 5 min > 3000 g

11- Transfert du surnageant dans un vial pour injection LC-MS/MS

Figure 16 : Récapitulatif des deux grandes étapes de la méthode QuEChERS (fait à partir de http://ftp.mn-net.com/english/Flyer_Catalogs/Chromatography/SPE/KATEN200134_CHROMABOND_QuEChERS_EN_www.pdf)

(ii-4). Mise au point

A l'aide de la méthodologie QuEChERS a été mise au point une méthode d'extraction simultanée de la CLD et du CLDOH dans le foie des animaux. Cette mise au point est détaillée dans l'article 1. La figure 17 ci-dessous permet de visualiser les résultats des deux grandes étapes d'extractions effectuées dans la matrice foie.

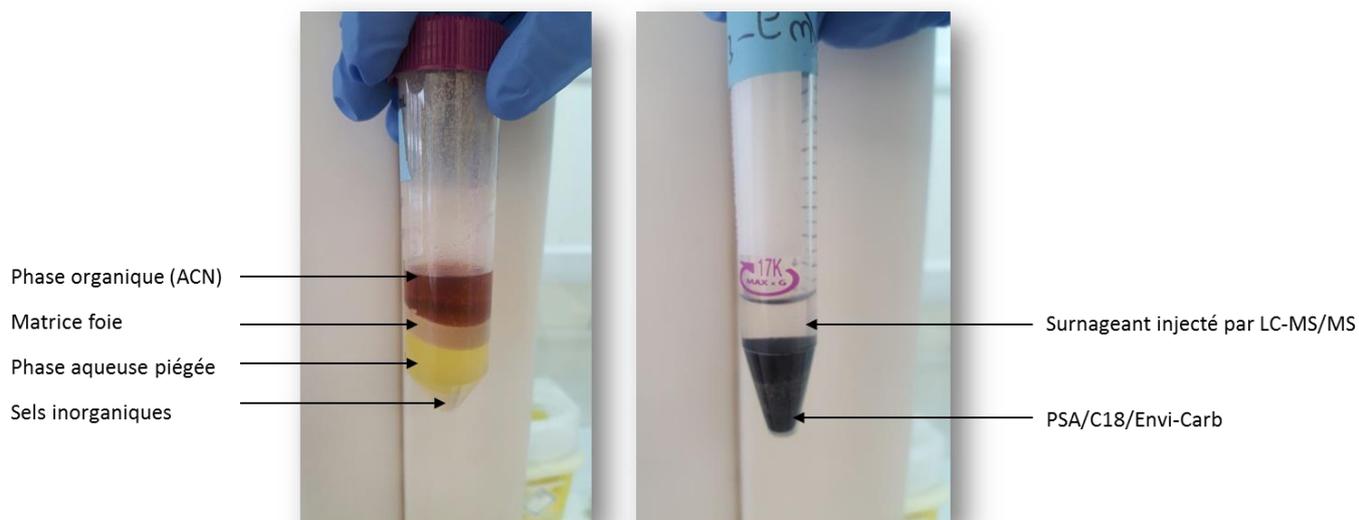


Figure 17 : Etapes d'extraction et de salting-out (à gauche) et de purification du surnageant par la PSA/C18/Envi-Carb (à droite) d'un foie de bovin

iii. Extraction de la chlordécone, du chlordécol et de ses métabolites conjugués dans le foie

Comme indiqué dans la littérature, les métabolites conjugués de la CLD et du CLDOH ne sont pas disponibles dans le commerce. Par conséquent, les métabolites conjugués de la CLD et du CLDOH ont été recherchés à l'issue d'un traitement enzymatique à l'aide de la β -glucuronidase et de la sulfatase détaillé dans la partie 3 de la synthèse bibliographique. Différents échantillons de foies d'animaux présentés dans l'article 1 avaient été analysés et aucun métabolite conjugué n'avait pu être quantifié. Etant donné que l'étape de déconjugaison est longue et coûteuse, la validation de la méthode dans la matrice foie a été uniquement effectuée pour la CLD et le CLDOH comme présenté dans l'article 1.

iv. Validation de la méthode d'analyse

Pour caractériser une nouvelle méthode de dosage, différents paramètres doivent être vérifiés pour garantir les résultats apportés par cette méthode. Dans le domaine des pesticides, différents référentiels existent tel que le guide [SANTÉ/EU, \(2015\)](#) et la norme [V03-110, \(2010\)](#). Deux stratégies sont proposées pour la validation d'une méthode : une stratégie basée sur la construction d'un profil d'exactitude ou une approche dite « critère ».

- L'approche « profil » est un outil de décision basé sur l'évaluation de l'exactitude (fidélité intermédiaire + justesse) d'une méthode analytique de manière globale, décrit par la norme V03-110, (2010). La fidélité de mesure exprime l'étroitesse de l'accord entre les valeurs mesurées obtenues par des mesurages répétés du même objet ou d'objets similaires dans des conditions précisées. La fidélité est estimée en termes de répétabilité et de reproductibilité interne. La justesse mesure l'étroitesse de l'accord entre la moyenne d'un nombre infini de valeurs mesurées répétées et une valeur de référence. La justesse de la méthode en fonction des concentrations est calculée sous la forme de biais.

- L'approche dite par « critère » est une approche où chaque paramètre (fidélité, linéarité...) va être étudié séparément. Le guide SANTE/EU, (2015) apporte quant à lui des limites d'acceptabilité pour caractériser la méthode.

Dans ce travail, une approche dite « profil » a été réalisée. Elle présente de nombreux avantages : c'est une approche globale, visuelle, synthétique et qui permet facilement d'estimer à l'aide du profil tracé la limite de quantification (LQ) et les incertitudes de mesures associées aux résultats.

Pour construire le profil, deux paramètres sont à définir :

- La limite d'acceptabilité qui correspond à une valeur seuil globale permettant de chiffrer les objectifs de la méthode. Elle s'exprime sous la forme d'un pourcentage autour de la valeur de référence.

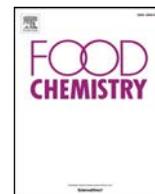
Dans ce travail, nous avons pris comme référence le critère de justesse du guide SANTE/EU, (2015) qui préconise un biais compris entre 70 et 120 % par rapport à la valeur de référence. L'approche profil est plus stricte car elle prend en compte l'estimation de l'exactitude, c'est-à-dire fidélité plus justesse tandis que l'approche critère ne prend en compte que la justesse.

- L'intervalle de tolérance β permet de prédire le pourcentage de futures mesures, obtenues avec la méthode validée, comprises entre les limites d'acceptabilité. La proportion β habituellement utilisée dans le domaine des pesticides est de 80 %.

2. Article 1 : Développement et validation de la méthode de dosage simultané de la chlordécone et du chlordécol dans les foies d'animaux

L'article scientifique qui suit permet de présenter en détail le travail de développement et validation analytique dans le foie des animaux. (<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.092>).

**ARTICLE 1 DEVELOPMENT AND VALIDATION OF AN HPLC-MS/MS METHOD
WITH QUECHERS EXTRACTION USING ISOTOPIC DILUTION TO SIMULTANE-
OUSLY ANALYZE CHLORDECONE AND CHLORDECOL IN ANIMAL LIVERS**



Development and validation of an HPLC-MS/MS method with QuEChERS extraction using isotopic dilution to simultaneously analyze chlordecone and chlordecol in animal livers



Mailie Saint-Hilaire^a, Chanthadary Inthavong^b, Thomas Bertin^b, Gwenaëlle Lavison-Bompard^b, Thierry Guérin^b, Agnès Fournier^a, Cyril Feidt^a, Guido Rychen^a, Julien Parinet^{b,*}

^a UR AFPA – INRA USC 340 – Université de Lorraine, 2 avenue de la Forêt de Haye, TSA 40602, 54518 Vandœuvre-lès-Nancy Cedex, France

^b Université de Paris-Est, ANSES, Laboratory for Food Safety, F94700 Maisons-Alfort, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Chlordecone
Chlordecol
Livers
QuEChERS
HPLC-MS/MS
Metabolism
Livestock

ABSTRACT

A QuEChERS extraction method followed by HPLC-MS/MS analysis was developed to simultaneously analyze chlordecone and its metabolite chlordecol in animal livers. The overall method was validated with accuracy profiles according to the French Standard NF V03-110 and European Union guidelines. The validation was performed on bovine, ovine and porcine liver samples. Linearity, matrix effect, accuracy, within-laboratory repeatability, specificity, LOQ, Q/q relative ion intensities, and uncertainty were reported. Recoveries were between 70% and 120%. LOQs of 1.36 µg chlordecone kg⁻¹ and 2.50 µg chlordecol kg⁻¹ of fresh liver were found. Twelve contaminated livers of bovine, ovine and porcine origin from the French West Indies or samples from *in vivo* studies were analyzed. In these liver samples from contaminated animals, chlordecone was quantified at concentrations higher than the maximum residue limit and chlordecol in very low amounts in all the samples. In addition, these results confirm that chlordecone can be metabolized in ruminant species.

1. Introduction

Chlordecone (CLD) is an organochlorine pesticide that was extensively used to fight against the black banana weevil (*Cosmopolites sordidus*) from 1972 to 1993 in the French West Indies (Le Déaut & Procaccia, 2009). CLD was banned in 1990 and was used under exemption until 1993 (French Government Order, 1990). This synthetic organochlorine pesticide is highly toxic (Boucher et al., 2013; Multigner et al., 2010), very stable, poorly soluble in water, and can strongly bind to soil and sediment particles where it can remain for years with a low release rate (Cabidoche et al., 2009). This pesticide is considered as a persistent organic pollutant (POP) and was included in the Stockholm Convention substances in 2009. CLD is known to be carcinogenic in mice and rats (IARC, 1979). In humans, studies have demonstrated a causal relationship between CLD exposure and increased risk of prostate cancer (Multigner et al., 2010). CLD also has adverse effects on the cognitive and motor development of infants exposed during prenatal or postnatal periods (Dallaire et al., 2012). CLD is persistent in the soil: more than 8% of Martinique and Guadeloupe soils are highly contaminated (Le Déaut & Procaccia, 2009). In these areas, CLD

concentrations are above 1 mg kg⁻¹ of dry matter. Consequently, farm animals can be contaminated following involuntary soil ingestion.

Contrary to other lipophilic POPs, fat is not the target tissue for CLD, which is mainly stored in the liver (Bouveret, Rychen, Lerch, Jondreville, & Feidt, 2013; Guzelian, 1982; Lastel et al., 2016; Soine, Blanke, & Schwartz, 1983). It has been demonstrated that CLD concentrations in livers can be higher than the maximum residue limit (MRL) of 100 µg CLD kg⁻¹ fat matter set by the European Union (Commission Regulation) (Personal communication, French Ministry of Agriculture, French Directorate General for Food (DGAL)). CLD is known to be metabolized in the liver in humans, gerbils and pigs (Fariss, Blanke, Saady, & Guzelian, 1980; Houston, Mutter, Blanke, & Guzelian, 1981; Soine et al., 1983). It is reduced to chlordecol (CLDOH), its main metabolite *via* aldo-ketoreductase. Only one publication has mentioned the potential toxicity of CLDOH (Soileau & Moreland, 1983): CLDOH seems to be particularly active, being equally as potent or more potent than CLD in all the assays on mitochondria.

In France, a reference method is used for CLD monitoring in food products of animal origin (Bordet et al., 2007). Regarding sample preparation, extraction is performed with a binary solvent mixture of

* Corresponding author.

E-mail addresses: mailie.saint-hilaire@univ-lorraine.fr (M. Saint-Hilaire), chantadary.inthavong@anses.fr (C. Inthavong), thomas.bertin@anses.fr (T. Bertin), gwenaelle.lavison-bompard@anses.fr (G. Lavison-Bompard), thierry.guerin@anses.fr (T. Guérin), agnes.fournier@univ-lorraine.fr (A. Fournier), cyril.feidt@univ-lorraine.fr (C. Feidt), guido.rychen@univ-lorraine.fr (G. Rychen), julien.parinet@anses.fr (J. Parinet).

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.092>

Received 16 October 2017; Received in revised form 9 January 2018; Accepted 11 January 2018

Available online 12 January 2018

0308-8146/ © 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

hexane/acetone, initially used by Fariss et al. (1980). Then, after addition of sodium hydroxide, the matrix is cleaned up with concentrated sulfuric acid. Currently, the analysis of CLD is performed by HPLC-MS/MS. Methods to analyze CLD were originally based on gas chromatography (Fariss et al., 1980) but HPLC-MS/MS exhibited higher sensitivity than GC-MS (Moriwaki & Hasegawa, 2004). Liquid chromatography is also recommended for confirmation purposes when a preliminary GC with electron capture detector (ECD) analysis indicates a contamination level close to the LOQ (Bichon et al., 2015). HPLC-MS/MS is performed using electronegative ionization since no CLD peaks were present in positive mode (He, Xia, Liu, Ding, & Zhou, 2015). Various authors (Bichon et al., 2015; He et al., 2015) have advised the use of acetonitrile for extraction and for the mobile phase, instead of methanol, in order to avoid the formation of hemiketal.

To our knowledge, the only described extraction method to analyze CLDOH in the liver is the one mentioned above, published by Fariss et al. (1980). The matrix was extracted with a binary solvent mixture of hexane/acetone (85/15, v/v) and then cleaned up with sulfuric acid. He et al. (2015) developed a method by HPLC-MS/MS to analyze CLD and CLDOH simultaneously in electronegative ionization since, like for CLD, CLDOH ionized only in this mode.

To summarize, in the literature and to our knowledge, the only existing method to simultaneously extract CLD and CLDOH from livers was developed in 1980 (Fariss et al., 1980). However, this method has some limitations. The extraction was performed using a liquid/liquid technique with matrix clean-up using sulfuric acid. However, Chung and Chen (2011) found that CLD degrades under sulfuric acid conditions. No information about the stability of CLDOH in sulfuric acid treatment is available.

The main objective of this study was to develop an easy-to-use, sensitive and rapid method that can be used routinely to simultaneously extract and analyze CLD and CLDOH in animal livers. In this study, an HPLC-MS/MS method and a new extraction protocol are presented. The extraction method is based on the Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe (QuEChERS) methodology (Anastassiades, Lehotay, Štajnbaher, & Schenck, 2003), described in the European Standard EN 15662. This method was initially selected because of its characteristics. Moreover, this protocol does not require acid matrix clean-up, thus reducing the risk of degradation.

The second objective was to apply this validated method to liver samples of porcine, ovine, and bovine origin to confirm CLD metabolism in pigs (Soine et al., 1983), and to determine whether ruminants are also able to metabolize CLD into CLDOH, based on the half-life obtained in goats (Fournier et al., 2017). This is a key issue since the metabolism of CLD in these commonly consumed species in the French West Indies has not been studied to date.

2. Materials and methods

2.1. Chemical substances

Chlordecone, chlordecol, $^{13}\text{C}_8$ -chlordecone and $^{13}\text{C}_8$ -chlordecol (purity > 98%) were supplied by Azur Isotopes SAS (Marseille, France); the isotope-labeled standards were used as internal standards (IS). Working solutions of these compounds were prepared in LC-MS-grade acetonitrile obtained from VWR (Radnor, PA) at 300, 450, 100 and $100\ \mu\text{g mL}^{-1}$, respectively, and stored at $4\ ^\circ\text{C}$ in amber vials until use. Ultrapure water ($18.2\ \text{M}\Omega\cdot\text{cm}$) for mobile phases and sample preparation was obtained by purifying distilled water with a Milli-Q system (Merck Millipore, Saint-Quentin-en-Yvelines, France). Formic acid (purity 98%) used for mobile phase preparation was supplied by Fisher Scientific (Illkirch, France). QuEChERS extraction kits were purchased from Agilent Technologies (Santa Clara, CA): kits contain 4.0 g of magnesium sulfate (MgSO_4), 1.0 g of sodium chloride (NaCl), 1.0 g of sodium citrate and 0.5 g of sodium citrate sesquihydrate. Supel™ QuE PSA/C18/ENVI-Carb (50 mg of PSA, 50 mg of C18, 50 mg of Envi-Carb

and 150 mg of MgSO_4), Supel™ QuE PSA/C18 (150 mg of PSA, 150 mg of C18 and 900 mg of MgSO_4), and Supel™ QuE ZSep/C18 (300 mg of PSA, 120 mg of C18) were obtained from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany).

2.2. Equipment and apparatus

An Agilent 1200 series composed of a binary pump and autosampler (Santa Clara, CA) hyphenated to a 5500 Q-Trap AB SciEX mass spectrometer (Darmstadt, Germany) with an electrospray ionization source (ESI) was used for all experiments. An Aqua C18 column (150 mm 2.0 mm; $3.0\ \mu\text{m}$) and an Aqua C18 precolumn (4.0 mm 2.0 mm; $3\ \mu\text{m}$) supplied by Phenomenex (Torrance, CA) were used for the chromatographic separation. An Eppendorf centrifuge 5810 (Hamburg, Germany) and a Genie 2 vortex supplied by Scientific Industries (Bohemia, NY) were used for the extraction. An IKA Ultra-turrax T25 digital and a GM 200 Grindomix supplied by Retsch Technology (Haan, Germany) were used for sample preparation. A Mettler Toledo XS 204 balance was used to weigh the samples.

2.3. Bovine, ovine and porcine liver samples

Bovine, ovine and porcine livers were purchased from a local supermarket (Maisons-Alfort, France) and on analysis were found to be CLD- and CLDOH-free (blank). Bovine liver samples were used for the optimization step and bovine, ovine and porcine liver samples for method validation.

Twelve livers were selected in order to apply the method. Four bovine livers originating from a monitoring plan in Martinique were selected. This monitoring plan sampled 200 bovine livers. The livers were sampled in 2016. We also obtained four porcine and four ovine liver samples sourced from *in vivo* animal studies carried out at UR AFPA (Nancy, France) in 2016. Livers with CLD concentration higher than $200\ \mu\text{g CLD kg}^{-1}$ of fresh liver were selected in order to increase the chance of quantifying CLDOH. In fact, in gerbil livers, a CLD/CLDOH ratio of 31/1 was found (Houston et al., 1981).

2.4. Extraction and clean-up

The whole fresh liver was cut into pieces and ground for 1.0 min at 7000 rpm with the GM 200 Grindomix, then homogenized with the IKA Ultra-turrax T25 at 5000 rpm for 5.0 min. Then, 4 g (4.000 ± 0.001 g) of fresh liver were weighed into a 50-mL centrifuge tube. Ultrapure water (6 mL) was added to the fresh liver tube and the sample was stirred for 1 min; $50\ \mu\text{L}$ of both internal standards at $5\ \mu\text{g mL}^{-1}$ were added to the sample. The mixture was vortexed for 30 s and kept in contact for 1 h. Then, 10 mL of acetonitrile were added and the tube was stirred with the Genie 2 vortex for 1.0 min before addition of the QuEChERS extraction kit. The mixture was stirred for 1.0 min with the Genie 2 vortex and then centrifuged at 4000 rpm for 5.0 min with the Eppendorf centrifuge 5810. One milliliter of the supernatant organic phase was collected and deposited into a 15-mL centrifuge tube containing 50 mg of PSA, 50 mg of C18, 50 mg of Envi-Carb and 150 mg of MgSO_4 . The tube was vortexed for 1.0 min and then centrifuged at 4000 rpm for 5.0 min. The supernatant was deposited in a 2.0-mL amber vial and then injected into the HPLC-MS/MS.

2.5. HPLC-MS/MS conditions

A gradient using Milli-Q water (Solvent A) and acetonitrile (Solvent B), each containing 0.1% formic acid, was used at a constant flow rate of $0.2\ \text{mL min}^{-1}$. The gradient started from 60% solvent B for 5.0 min of equilibration, then increased to 98% solvent B over the next 4.0 min. The gradient was held for 11 min and was then decreased to 60% solvent B for 5.0 min. The injection volume was $5.0\ \mu\text{L}$ and column temperature was set at $40\ ^\circ\text{C}$. The ion spray voltage of the 5500 Q-trap was

Table 1
Monitored transitions for CLD, CLDOH and internal standards (IS).

Compound	Formula	Transition	Precursor ion (m/z)	Product ions (m/z)	Dwell time (ms)	Collision energy (V)	CXP (V)	Ion ratios
Chlordecone	$C_{10}Cl_{10}O$	1 (Q)	506.7	426.7	130	–25	–15	N.A
		2 (q)	508.7	428.7	130	–25	–15	1.33 (Q/q)
Chlordecol	$C_{10}H_2Cl_{10}O$	1 (Q)	490.7	35.0	130	–66	–17	N.A
		2 (q1)	492.7	35.0	130	–68	–5	1.46 (Q/q1)
		3 (q2)	490.7	490.7	130	–12	–10	
$^{13}C_8$ -chlordecone	$C_2^{13}C_8Cl_{10}O$	1 (Q)	514.7	433.7	130	–28	–10	
		2 (q1)	516.7	435.7	130	–28	–10	
$^{13}C_8$ -chlordecol	$C_2^{13}C_8H_2Cl_{10}O$	1 (Q)	498.7	35.0	130	–62	–7	
		2 (q1)	500.7	35.0	130	–66	–15	
Position								Horizontal 6
CUR (curtain gas)								Vertical 6
GS 1 (nebulization gas)								25 psi
GS 2 (desolvation gas)								40 psi
IS (Tension Spray)								60 psi
Source T°C								–4500 V
CAD								600 °C
								Medium

Source parameters for CLD, CLDOH and IS.

set at 4.5 kV in ESI. The source temperature was set at 600 °C and the desolvation gas used was air. The 5500 Q-trap was used in multiple reaction monitoring mode (MRM), and the collision energy (CE) and the collision cell exit potential (CXP) were optimized for CLD, CLDOH, $^{13}C_8$ -CLD and $^{13}C_8$ -CLDOH, with individual infusion solutions. Equipment control and data acquisition were performed with Analyst 1.5.1 software (AB Sciex, Les Ulis, France).

2.6. Validation

The developed method for the analysis of CLD and CLDOH in liver samples was validated with accuracy profiles (NF V03-110, 2010; Mermet & Granier, 2012) and followed European Union guideline specifications (SANTE/EU, 2015). In the absence of certified reference materials to determine CLD and CLDOH in the liver, the accuracy profiles were constructed using spiked CLD and CLDOH samples. The following parameters were evaluated: linearity, accuracy, limit of quantification (LOQ), precision, uncertainty, specificity and Q/q, with Q for quantification and q for qualification, and relative ion intensities of the MRM used for confirmation purposes. As we worked in isotopic dilution, the matrix effect was normalized by the relative abundance of CLD and CLDOH (corrected by the abundance of the $^{13}C_8$ -CLD and $^{13}C_8$ -CLDOH) (Bichon et al., 2015). Accuracy, LOQ, precision and uncertainty were evaluated through CLD and CLDOH accuracy profiles (NF V03-110, 2010; Mermet & Granier, 2012).

The profiles were constructed with three validation series, and repeated on three different days over three weeks using three different liver specimens: ovine, bovine and porcine. For each series, four concentration levels were tested for CLD (1.36, 4.09, 136 and 545 μg CLD kg^{-1} of fresh liver) and three for CLDOH (2.5, 25 and 125 μg CLDOH kg^{-1} of fresh liver). Each level was analyzed in replicate. The acceptance limit (λ) was set between 70% and 120%, which is the trueness imposed by the reference guide SANTE/EU (2015). Probability β was set to 85% for both profiles, which means that the risk of future expected results falling outside this limit is below 15% (Mermet & Granier, 2012).

Specificity was confirmed by comparing the signals at the expected retention time for the blank liver bovine, free of CLD and CLDOH, and for fortified bovine liver. The use of internal standards confirmed the retention time of CLD and CLDOH. MRM ratios between the quantification and qualification transitions were calculated with standards of CLD and CLDOH compared to experimentally spiked samples at the

LOQ and at the higher level of the exactitude profile.

3. Results and discussion

3.1. Optimization of analysis conditions for HPLC-MS/MS

All the recent publications related to CLD analysis by HPLC-MS/MS use negative electrospray ionization (Bichon et al., 2015; Cimetiere et al., 2014; He et al., 2015; Moriwaki & Hasegawa, 2004). The only publication regarding the analysis of CLDOH by HPLC-MS/MS also reported analysis with negative electrospray ionization (He et al., 2015). This mode was chosen for optimization of CLD and CLDOH MRM transitions.

In order to determine the most suitable transition for quantification (Q) and qualification (q), standards of CLD and CLDOH were diluted in acetonitrile and infused separately into the mass spectrometer. Acetonitrile was chosen as the dilution solvent for CLD and CLDOH to avoid the formation of a hemiketal that occurs with methanol (Bichon et al., 2015). For CLD, the same transitions in acetonitrile were selected as already observed by Moriwaki and Hasegawa (2004), Cimetiere et al. (2014), Bichon et al. (2015) and He et al. (2015). Hence, the transition 506.7 \rightarrow 426.7 (Q) was chosen for quantification, and the transition 508.7 \rightarrow 428.7 (q) for qualification. The precursor ion corresponded to deprotonated hydrated CLD $[M-H_2O-H]^-$ and the product ion was the result of CO_2 and HCl neutral losses $[H-H_2O-CO_2-HClH]^-$ (Bichon et al., 2015). Regarding CLDOH, only one publication described the optimization in acetonitrile by HPLC-MS/MS (He et al., 2015). The authors used the pseudo-MRM transition 491 \rightarrow 491 for the quantification of CLDOH since the molecule was not fragmented even with high collision energy (He et al., 2015). In this study, the product ion was scanned from m/z 30 to 500. Thus, the transition 490.7 \rightarrow 35.0 (Q) was identified and then chosen because it was more sensitive than the pseudo-MRM transition. The signal-to-noise (S/N) ratio for the transition 490.7 \rightarrow 35.0 in a spiked sample at 0.5 $ng\ mL^{-1}$ was three times higher than the S/N ratio for the transition 490.7 \rightarrow 490.7. The transition 490.7 \rightarrow 35.0 was chosen for quantification (Q), transitions 492.7 \rightarrow 35.0 (q1) and 490.7 \rightarrow 490.7 (q2) were kept for qualification. IS $^{13}C_8$ -CLD and IS $^{13}C_8$ -CLDOH transitions were also optimized. Table 1 shows the transitions monitored and the optimized parameters for CLD, CLDOH, $^{13}C_8$ -CLD and $^{13}C_8$ -CLDOH. The source parameters were optimized in flow injection analysis (FIA) mode for CLDOH since it is less sensitive than CLD. The source parameters are also listed in Table 1.

Regarding the chromatographic method, the in-house method (ANSES) was used as a basis. An Aqua C18 column was chosen based on He et al. (2015) for the elution of CLD and CLDOH. The ANSES method uses water and methanol, both added with 0.1% formic acid as mobile phases whereas in the present work, methanol was replaced by acetonitrile to avoid hemiketal formation. The gradient program was also slightly modified as mentioned above. Finally, CLD eluted at 9.19 min and CLDOH at 10.93 min.

The method was considered to be specific, as no interferences were observed by monitoring the traces of CLD (m/z 506.7 \rightarrow 426.7, m/z 508.7 \rightarrow 428.7) and CLDOH (m/z 490.7 \rightarrow 35.0, m/z 492.7 \rightarrow 35.0) in reagent blank and in CLD and CLDOH-free liver samples, using HPLC-MS/MS.

3.2. Optimization of sample treatment

The former extraction methods of CLD from livers were usually performed with liquid-liquid extraction, followed by acid hydrolysis with concentrated sulfuric acid (Bordet et al., 2007; Fariss et al., 1980). Recently, Chung and Chen (2011) highlighted that CLD is not resistant to sulfuric acid treatment. In our preliminary tests, after 15 min. contact between a CLDOH standard and 60% sulfuric acid, only 20% of the initial CLDOH was quantified. In order to obtain a less aggressive, quicker and updated extraction method, the QuEChERS methodology was applied to the extraction of CLD and CLDOH from liver matrices. QuEChERS methods are increasingly used to analyze pesticides in animal matrices and show satisfactory recoveries (Nuapia, Chimuka, & Cukrowska, 2016).

For extract cleaning, after the partitioning using QuEChERS commercial salt mixes, three commercial dispersive (d-SPE) phases were evaluated. These dispersive phases were selected in order to trap most interferences from the liver matrix, such as proteins, fatty acids, sugars and minerals (Souci, Fachmann, & Kraut, 1994). The three d-SPE phases were: 1) PSA/C18 (150 mg of PSA, 150 mg C18 of and 900 mg of $MgSO_4$) which can trap polar pigments, sugars and fatty acids, 2) Zsep/C18 (300 mg of PSA and 120 mg of C18) which can trap fatty acids, and 3) PSA/C18/Envi-Carb (200 mg of PSA, 200 mg of C18, 200 mg of Envi-Carb and 600 mg of $MgSO_4$) which can trap polar pigments, hydrophobic interferences, fatty acids and sugars. Under the same extraction and chromatographic conditions, d-SPE was evaluated for both molecules and the results are presented in Fig. 1. The highest S/N response for CLD was almost the same using the three dispersive phases. However, CLDOH S/N was the best after using the PSA/C18 or the PSA/C18/Envi-Carb purification. On the basis of these results and for practical reasons, the PSA/C18/Envi-Carb was chosen.

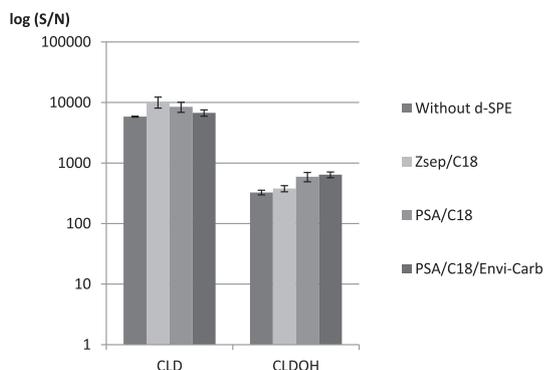


Fig. 1. Comparison of three commercial d-SPE phases for bovine liver with Zsep/C18, PSA/C18 and PSA/C18/Envi-Carb. The error bars correspond to the standard deviation ($n = 3$) for the response measured.

3.3. Methodology validation

The accuracy profiles obtained for CLD and CLDOH and the performance criteria calculated are presented in Fig. 2 and Table 2. For both profiles, the β -expectation tolerance intervals were within the acceptability limits. To highlight the result with isotopic dilution, recoveries without IS and with IS were presented. Recoveries without IS varied from 52% to 67% for CLD and from 78% to 83% for CLDOH. Recoveries with IS varied from 93% to 105% for CLD and from 102% to 112% for CLDOH. The estimated repeatability (coefficient of variation CV_r) varied from 0.5% to 2.0% for CLD and from 1% to 4% for CLDOH; they were below the 20% recommended in the SANTE/EU guideline (2015). The intermediate precision (coefficient of variation CV_R) varied from 2.6% to 7.0% for the CLD and from 1.3% to 4.5% for CLDOH, below the 20% recommended in the SANTE/EU guideline (2015). The LOQs validated for CLD and CLDOH ($1.36 \mu\text{g CLD kg}^{-1}$ and $2.50 \mu\text{g CLDOH kg}^{-1}$ of fresh liver) corresponded to the lowest experimental validated levels of CLD and CLDOH accuracy profiles. The LOQ found for CLD in the liver was almost three times lower than the LOQ of $3 \mu\text{g CLD kg}^{-1}$ indicated in the internal ANSES method. No LOQ was presented by Fariss et al. (1980) for CLD and CLDOH.

Therefore, the validity domain of the analytical method can be considered valid from the LOQ ranges of 0.5 ng mL^{-1} to 250 ng mL^{-1} , and 1 ng mL^{-1} to 100 ng mL^{-1} for CLD and CLDOH, respectively. For routine analysis, the CV_R was set at 7% for CLD (the highest value of the corresponding spiked level), and 4.5% for CLDOH (the highest value of the corresponding spiked level). Using the accuracy profiles, it is possible to calculate the standard deviation of the tolerance interval and then to estimate the uncertainty. The uncertainty was estimated at 16% for CLD and 10% for CLDOH. Q/q ratios were calculated and compared between a solvent standard and an experimentally spiked matrix sample. The ratios were lower than the permitted tolerances: 0% for CLD, and 3% for CLDOH, far below the 30% recommended in the SANTE/EU European Standard (2015).

3.4. Applications

3.4.1. Analytical quality assurance

Each sample batch included quality controls: a matrix blank, a reagent blank calibration standard, and two recovery check samples (1.5 times the LOQ and the highest validated level). Calibration was performed before and after sample analysis, and the response factor of bracketing calibration standards at each level should not differ by more than 20% (taking the higher response as 100%), according to the European Union Guidelines (SANTE/EU, 2015). A reagent blank and a matrix blank were prepared and analyzed under the same conditions to check any cross-contamination, with the maximum signal tolerance corresponding to 30% of the LOQ. All the recoveries of the supplemented matrix were between 70% and 120%. All the analyses respected these criteria.

3.4.2. CLD and CLDOH in bovine, porcine and ovine liver samples

Once the method was validated, 4 bovine, 4 porcine and 4 ovine CLD-contaminated livers (with CLD higher than $2 \times$ MRL minimum) were analyzed. In all samples, CLD was quantified at high concentrations and CLDOH was detected ($S/N > 3$) below the LOQ for 10 samples (Fig. 3) and quantified in 2 samples, as shown in Table 3. A comparison on the same sample (spiked at the LOQ) was made between the MRM and the pseudo-MRM transition for CLDOH. Fig. SM 1 in the supplementary material illustrates the higher specificity of the MRM transition. Soine et al. (1983) examined porcine liver samples and no CLDOH was observed (without indication of the LOQ value). Thus, contrary to the previous method, our newly developed method enabled detection of CLDOH in 10 samples and quantification in 2 ovine samples (3 and 4). These preliminary results confirmed that pigs are able to metabolize CLD and demonstrated ovine and bovine CLD metabolism,

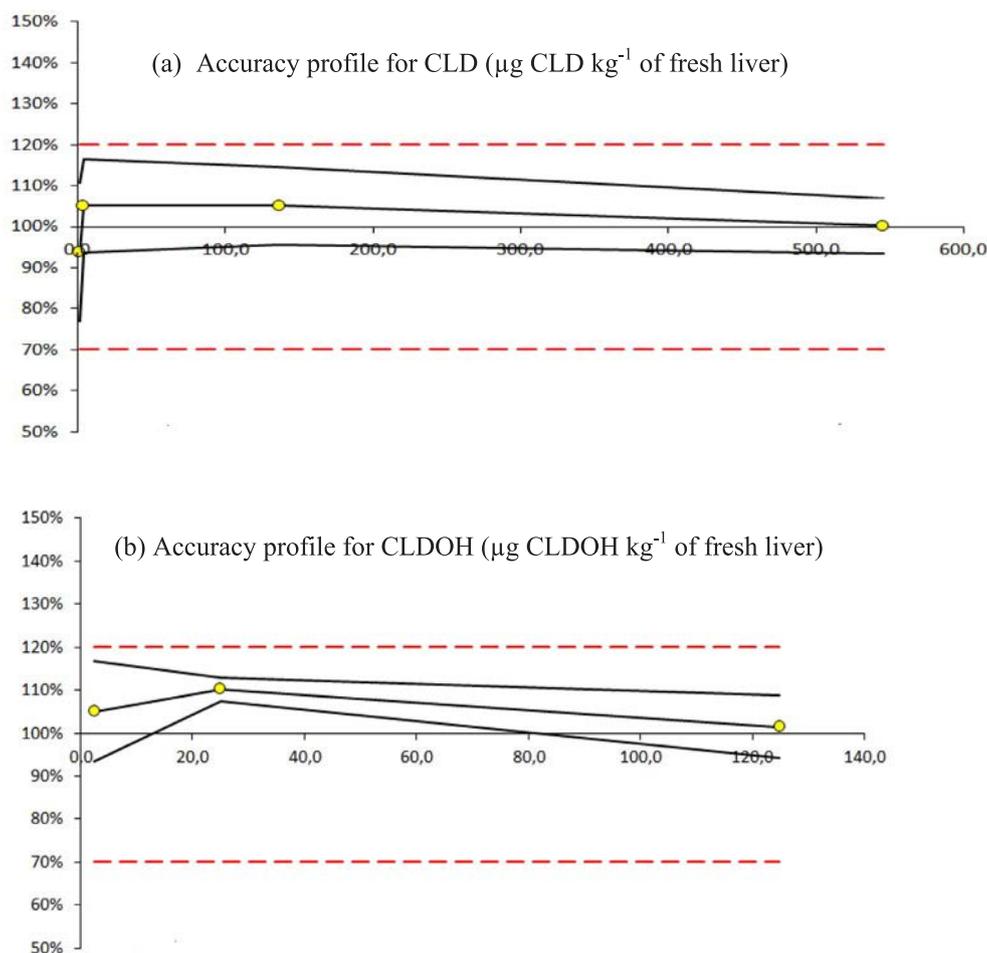


Fig. 2. Accuracy profiles for CLD (a) and CLDOH (b) with a probability β set at 85%. Acceptance limits are represented with a dotted line.

Table 2
Performance criteria of the analytical method for CLD and CLDOH.

Compound	Concentration levels ($\mu\text{g kg}^{-1}$ of fresh liver)	Recoveries ^a (%) without IS/with IS (mean \pm SE ^{**})	Accuracy			
			Trueness (relative bias %)	Precision		LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$ of fresh liver)
				Repeatability (%)	Intermediate precision (%)	
CLD	1.36	52 \pm 7/93 \pm 5	-6.3	1.6	7.0	1.36
	4.09	67 \pm 7/105 \pm 3	5.1	2.0	4.5	
	136	65 \pm 7/105 \pm 2	5.0	1.5	3.7	
	546	67 \pm 5/100 \pm 2	4.0	0.5	2.6	
CLDOH	2.50	83 \pm 3/106 \pm 5	5.1	0.9	4.3	2.50
	25.0	82 \pm 4/112 \pm 4	10	1.3	1.3	
	125	78 \pm 5/102 \pm 2	1.4	3.8	3.8	

^a Recoveries with $n = 6$.

^{**} SE = standard error.

at least partly. Contrary to CLD, very low amounts of CLDOH were found in the animal liver which is, according to Fariss et al. (1980), the site of CLD metabolism.

One perspective of this method would be its direct application to other animal matrices, such as kidneys and muscles. According to the accreditation guide for pesticides analysis LAB GTA 26, 2017, to apply this method in those matrices, recoveries should be checked for each matrix at the LOQ and at the MRL value. The application of the method in these matrices would provide information about the metabolites distribution of CLD in the animal body. Secondly, this method could also be applied in biological matrices such as blood, urine and feces, in order to collect toxicokinetic information about CLD and its

metabolites. These data would help to understand the fate of CLD in the animal, which is a perspective of our work. Since QuEChERS extraction can be used to extract a large range of analytes, another perspective of this method would be the extraction of known or unknown metabolites. Hydrochlordecone and dihydrochlordecone are relevant metabolites from microbial transformation of CLD in contaminated soils (Chaussonnerie et al., 2016; George & Claxton, 1988; Orndorff & Colwell, 1980). Because these metabolites are chemically similar to CLD, it would be possible to extract and analyze them with our method. Moreover, in order to detect or quantify new metabolites, it would be interesting to analyze liver samples from the French West Indies by HPLC with high resolution MS/MS (after QuEChERS extraction).

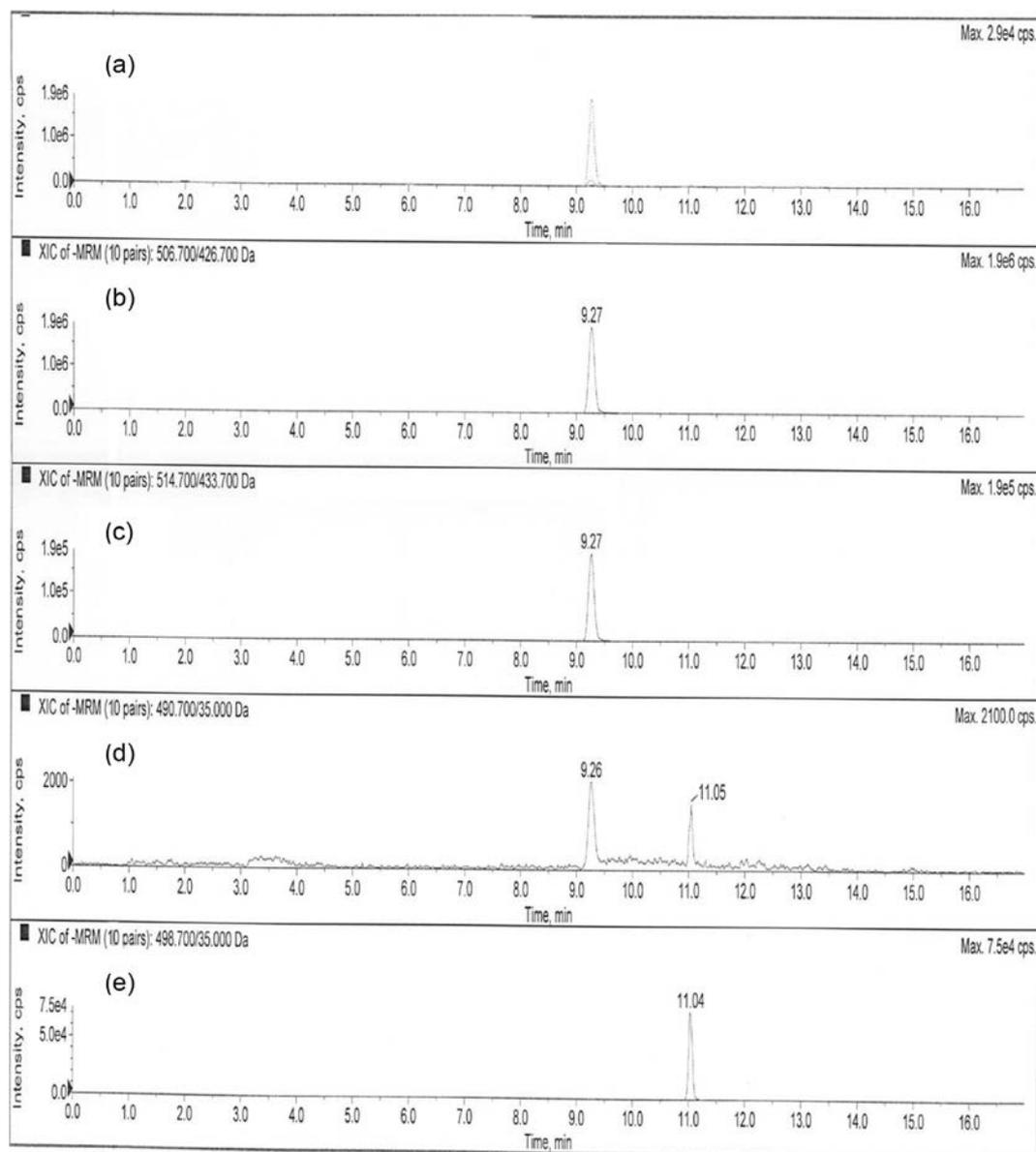


Fig. 3. Chromatograms of liver samples showing the detection of CLDOH: (a) Chromatogram for CLD and CLDOH from a bovine liver sample from the French West Indies. The finding concentration of CLD in the liver was $359 \pm 57 \mu\text{g kg}^{-1}$; (b) MRM transition for CLD; (c) MRM transition for IS CLD; (d) MRM transition for CLDOH; and (e) MRM transition for IS CLDOH.

Table 3

CLD and CLDOH concentrations with the associated uncertainty in liver samples (in $\mu\text{g kg}^{-1}$ of fresh liver).

Species	Sample	CLD	CLDOH
Porcine	1	360 ± 58	Traces*
	2	308 ± 49	Traces
	3	363 ± 58	Traces
	4	319 ± 51	Traces
Bovine	1	808 ± 129	Traces
	2	359 ± 57	Traces
	3	336 ± 54	Traces
	4	231 ± 37	Traces
Ovine	1	8070 ± 1291	Traces
	2	9870 ± 1579	Traces
	3	7733 ± 1237	5.61 ± 0.56
	4	$14\,485 \pm 2318$	3.62 ± 0.36

* S/N = 3 < traces < LOQ.

4. Conclusion

A new HPLC-MS/MS method with QuEChERS extraction was developed to simultaneously analyze CLD and CLDOH in liver samples (bovine, ovine and porcine). This method was validated on the basis of accuracy profiles. The analytical performances and quality controls also met the requirements of the European Union guidelines (SANTE/EU, 2015). In contaminated bovine, ovine and porcine liver samples ([CLD] > $2 \times$ MRL) originating from the French West Indies and from *in vivo* studies ($n = 12$), CLDOH was detected below the LOQ in 10 samples and quantified in 2 samples. These preliminary results in ovine and bovine liver samples demonstrated that CLD can be metabolized in these species, which has not been demonstrated previously. In the future, this method could be used to analyze other animal organs (such as muscles) or biological matrices (blood, urine and feces) to determine the possible presence of metabolites.

Acknowledgements

The authors are highly grateful to the MENESR (*Ministère de l'Éducation Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche*, France) and the PITE State Interventional Program (Prefecture of Martinique) for funding the research project.

Conflicts of interest

The authors have no conflicts of interest.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.092>.

References

- AFNOR NF V03-110 (2010). *Analyse des produits agricoles et alimentaires - Protocole de caractérisation en vue de la validation d'une méthode d'analyse quantitative construction du profil d'exactitude*. Saint Denis.
- Anastassiades, M., Lehotay, S. J., Štajnbaher, D., & Schenck, F. J. (2003). Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC International*, 86(2), 412–431.
- Bichon, E., Guiffard, I., Vénisseau, A., Marchand, P., Antignac, J. P., & Le Bizec, B. (2015). Ultra-trace quantification method for chlordecone in human fluids and tissues. *Journal of Chromatography A*, 1408, 169–177.
- Bordet, F., Thieffine, A., Mallet, J., Heraud, F., Bateau, A., & Inthavong, D. (2007). In-house validation for analytical methods and quality control for risk evaluation of chlordecone in food. *International Journal of Environmental and Analytical Chemistry*, 87(13–14), 985–998.
- Boucher, O., Simard, M. N., Muckle, G., Rouget, F., Kadhel, P., Bataille, H., ... Multigner, L. (2013). Exposure to an organochlorine pesticide (chlordecone) and development of 18-month-old infants. *Neurotoxicology*, 35, 162–168.
- Bouveret, C., Rychen, G., Lerch, S., Jondreville, C., & Feidt, C. (2013). Relative bioavailability of tropical volcanic soil-bound chlordecone in piglets. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(38), 9269–9274.
- Cabidoche, Y. M., Achard, R., Cattani, P., Clermont-Dauphin, C., Massat, F., & Sansoulet, J. (2009). Long-term pollution by chlordecone of tropical volcanic soils in the French West Indies: A simple leaching model accounts for current residue. *Environmental Pollution*, 157(5), 1697–1705.
- Chaussonnerie, S., Saaidi, P.-L., Ugarte, E., Barbance, A., Fossey, A., Barbe, V., ... Le Paslier, D. (2016). Microbial degradation of a recalcitrant pesticide: Chlordecone. *Frontiers in Microbiology*, 7(33), 2025. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2016.02025>.
- Chung, S. W., & Chen, B. L. (2011). Determination of organochlorine pesticide residues in fatty foods: A critical review on the analytical methods and their testing capabilities. *Journal of Chromatography A*, 1218(33), 5555–5567.
- Cimetiere, N., Giraudet, S., Papazoglou, M., Fallou, H., Amrane, A., & Le Cloirec, P. (2014). Analysis of chlordecone by LC/MS–MS in surface and wastewaters. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2(2), 849–856.
- Dallaire, R., Muckle, G., Rouget, F., Kadhel, P., Bataille, H., Guldner, L., ... Thomé, J. P. (2012). Cognitive, visual, and motor development of 7-month-old Guadeloupean infants exposed to chlordecone. *Environmental Research*, 118, 79–85.
- Fariss, M. W., Blanke, R. V., Saady, J. J., & Guzelian, P. S. (1980). Demonstration of major metabolic pathways for chlordecone (kepone) in humans. *Drug Metabolism and Disposition*, 8(6), 434–438.
- Fournier, A., Feidt, C., Lastel, M. L., Archimède, H., Thome, J. P., Mahieu, M., & Rychen, G. (2017). Toxicokinetics of chlordecone in goats: Implications for risk management in French West Indies. *Chemosphere*, 171, 564–570.
- French Government Order. (1990). Concerning the conditions of issue and use, in agriculture of poisonous and hazardous substances (relatif aux conditions de délivrance et d'emploi, en agriculture, de substances vénéneuses et dangereuses). JORF n°197 du 26 août 1990 page 10406, NOR : ECOC900070A. https://www.legifrance.gouv.fr/jo_pdf.do?id=JORFTEXT000000708664. Accessed 6 September 2016 (in French).
- George, S. E., & Claxton, L. D. (1988). Biotransformation of chlordecone by *Pseudomonas* species. *Xenobiotica*, 18, 407–416.
- Guzelian, P. S. (1982). Chlordecone poisoning: A case study in approaches for detoxification of humans exposed to environmental chemicals. *Drug Metabolism Reviews*, 13(4), 663–679.
- He, D., Xia, B., Liu, J., Ding, L., & Zhou, Y. (2015). Determination of kepone and its metabolite in water and soil by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Analytical Letters*, 48(1), 1–8.
- Houston, T. E., Mutter, L. C., Blanke, R. V., & Guzelian, P. S. (1981). Chlordecone alcohol formation in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*): A model for human metabolism of chlordecone (Kepone). *Fundamental and Applied Toxicology*, 1(3), 293–298.
- IARC (1979). Chlordecone. *Some halogenated hydrocarbons. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to humans: vol. 20*, (pp. 67–81). Lyon, France: International Agency for Research on Cancer.
- LAB GTA 26 (2017). *Guide technique d'accréditation-analyses physico-chimiques de résidus de pesticides et de contaminants*. <https://www.cofrac.fr/documentation/LAB-GTA-26>.
- Lastel, M. L., Lerch, S., Fournier, A., Jurjanz, S., Mahieu, M., Archimède, H., ... Rychen, G. (2016). Chlordecone disappearance in tissues of growing goats after a one month decontamination period effect of body fatness on chlordecone retention. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(4), 3176–3183.
- Le Déaut, J. Y., & Procaccia, C. (2009). *Pesticide use in the Antilles: Current situation and perspectives for change: OPECST report n 487 (2008–2009)*. French Senat ISBN: 9782111267688.
- Mermet, J. M., & Granier, G. (2012). Potential of accuracy profile for method validation in inductively coupled plasma spectrochemistry. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 76, 214–220.
- Moriwaki, H., & Hasegawa, A. (2004). Detection of chlordecone by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 18(11), 1243–1244.
- Multigner, L., Ndong, J. R., Giusti, A., Romana, M., Delacroix-Maillard, H., Cordier, S., ... Blanchet, P. (2010). Chlordecone exposure and risk of prostate cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 28(21), 3457–3462.
- Nuapia, Y., Chimuka, L., & Cukrowska, E. (2016). Assessment of organochlorine pesticide residues in raw food samples from open markets in two African cities. *Chemosphere*, 164, 480–487.
- Orndorff, S. A., & Colwell, R. R. (1980). Microbial transformation of Kepone. *Applied and Environmental Microbiology*, 39, 398–406.
- SANTE, EU. 11945/2015 guidance document.
- Soileau, S. D., & Moreland, D. E. (1983). Effects of chlordecone and its alteration products on isolated rat liver mitochondria. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 67(1), 89–99.
- Soine, P. J., Blanke, R. V., & Schwartz, C. C. (1983). Chlordecone metabolism in the pig. *Toxicology Letters*, 17(1–2), 35–41.
- Souci, S. W., Fachmann, W., & Kraut, W. (1994). *Food composition and nutrition tables* (5th revised and completed edition). Stuttgart, Germany: Medpharm.

3. Article 2 : Validation de la méthode de dosage de la CLD et de ses métabolites dans les urines et les fèces des brebis

L'article 2 qui suit présente la validation de méthodes de dosages de la CLD et de ses métabolites dans les urines et les fèces des brebis. La méthode QuEChERS développée dans la matrice foie a été réadaptée aux urines et aux fèces. La même méthode d'analyse LC-MS/MS développée dans la matrice foie a été utilisée pour la méthode de dosage de la CLD et de ses métabolites dans les urines et les fèces.

**ARTICLE 2 VALIDATION OF ANALYTICAL METHODS FOR CHLORDECONE AND
ITS METABOLITES IN THE URINE AND FECES OF EWES**



Validation of analytical methods for chlordecone and its metabolites in the urine and feces of ewes



Mailie Saint-Hilaire^a, Thomas Bertin^b, Chanthadary Inthavong^b, Gwenaëlle Lavison-Bompard^b, Thierry Guérin^b, Agnès Fournier^a, Cyril Feidt^a, Guido Rychen^a, Julien Parinet^{b,*}

^a UR AFPA – INRA USC 340 - Université de Lorraine, 2 avenue de la Forêt de Haye - TSA 40602, 54518 Vandœuvre-lès-Nancy Cedex, France

^b Université de Paris-Est, ANSES, Laboratory for Food Safety, F 94700 Maisons-Alfort, France

ARTICLE INFO

Keywords:
Chlordecone
Chlordecol
Metabolites
Urine
Feces
QuEChERS

ABSTRACT

Chlordecone (CLD) is a Persistent Organic Pollutant used between 1972 until 1993 in the French West Indies (FWI). Due to its persistence and extensive application, a quarter of the total local agricultural acreage is still moderate to heavily polluted. In consequence, livestock may be contaminated at various levels. This is a major public health concern, particularly for local consumers. In order to better understand the fate of CLD in livestock organisms, *in vivo* studies are required. There is no information available about its metabolism and elimination in ruminants, common livestock in the FWI.

To be able to monitor the fate of chlordecone and its metabolites in livestock and to assess if the compounds could be released in the environment, urinary and fecal samples were logically targeted. In order to reach this goal, robust and validated analytical methods are required. For this purpose, Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe (QuEChERS) extraction methods were validated to analyze CLD and its metabolites in the urine and feces. The analysis was carried using liquid phase chromatography with tandem mass spectrometry and validated according to French standard NF V03-110 and SANTE guidelines. Matrix effect, Accuracy, within-laboratory repeatability, specificity, Q/q relative ion intensities and uncertainty were reported. Recoveries between 70% and 120% were obtained from urine and feces. The limits of quantification (LOQ) in urine samples were 0.1 µg CLD L⁻¹, 0.1 µg total CLD (CLD and its conjugates) L⁻¹, 1.3 µg CLDOH L⁻¹ and 2.4 µg total CLD (chlordecol and its conjugates) L⁻¹ of urine. LOQ in fresh feces were 3.2 µg CLD kg⁻¹ and 5.8 µg CLDOH kg⁻¹. Contaminated urinary and fecal samples from ewes were analyzed to confirm the relevance of the methods. In urine, CLD and conjugated CLDOH could be quantified whereas only free CLD and free CLDOH were found in feces. These methods are essential for future toxicokinetic studies and also to estimate the environmental contamination.

1. Introduction

Chlordecone (CLD) is an organochlorine pesticide used from 1972 to 1993 [1] to control the black banana weevil (*Cosmopolites sordidus*) in the French West Indies (FWI). It is considered as a Persistent Organic Pollutant (POP) and was added to the Stockholm convention in 2009. Nowadays, this molecule persists in the FWI soils, and in contaminated areas CLD concentrations are above 1 mg kg⁻¹ of dry matter (DM) [1]. One of the main consequence is a contamination of farm animals

resulting from involuntary soil ingestion [2]. In consequence, animal products may represent an important source of CLD exposure for local consumers. Moreover, contaminated animal may reject CLD through the environment and consequently induce contamination of environmental compartments such as soil and water (due to soils lixiviation). To ensure safe food for consumers the national-funded INSSICCA (Innovative Strategies to establish Safe livestock rearing systems In Chlordecone Contaminated Areas) project was set up aiming at proposing innovative and sustainable strategies for local farmers. The

Abbreviations: CLD, Chlordecone; CLD-C, conjugated chlordecone; CLD-t, Total chlordecone; CLDOH, Chlordecol; CLDOH-t, Total chlordecol; CLDOH-C, conjugated chlordecol; GC-ECD, Gas Chromatography-Electron Capture Detection; DM, Dry Matter; GC-MS, Gas Chromatography-Mass Spectrometry; HPLC-MS/MS, High-Performance Liquid Chromatography with tandem Mass Spectrometry; IS, Internal Standard; N/A, Not Analyzed; POP, Persistent Organic Pollutant; QuEChERS, Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe; S/N, Signal to Noise; v/v, Volume to Volume

* Corresponding author.

E-mail addresses: mailie.saint-hilaire@univ-lorraine.fr (M. Saint-Hilaire), thomas.bertin@anses.fr (T. Bertin), chantadary.inthavong@anses.fr (C. Inthavong), gwenaelle.lavison-bompard@anses.fr (G. Lavison-Bompard), thierry.guerin@anses.fr (T. Guérin), agnes.fournier@univ-lorraine.fr (A. Fournier), cyril.feidt@univ-lorraine.fr (C. Feidt), guido.rychen@univ-lorraine.fr (G. Rychen), julien.parinet@anses.fr (J. Parinet).

<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.06.058>

Received 23 April 2018; Received in revised form 31 May 2018; Accepted 29 June 2018

Available online 03 July 2018

1570-0232/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

establishment of these strategies need a better understanding of the metabolization and elimination of chlordecone in the animal organism and especially in ruminants, farm animals where no data is available. About the environmental contamination of CLD, a recent study about the transfer of CLD and its metabolites from soil to water were conducted [3]. Furthermore, a study about the CLD and its metabolites transfer from soil to plant were also lead [4]. Nowadays there is no information about the transfer of CLD and its metabolites from animal to environmental compartments such as soil and water.

Chlordecone is known to be metabolized in humans, gerbils and pigs [5–7]. CLD is reduced on chlordecol (CLDOH) by the *chlordecone reductase* [5] then CLD and CLDOH can be conjugated by *UDP glucuronosyl – or sulfonyl- transferases* enzymes [5]. CLDOH seems to be particularly active, being equally as potent or more potent than CLD in all the assays on mitochondria [8–10]. In this study the attention was focused on urine and feces because it is important to know if ruminants can metabolize CLD, in which forms (free or conjugated), by which way and in how much amount CLD and its metabolites are eliminated from the animal and consequently rejected through the environment. In fact, CLDOH, the major metabolite eliminated from gerbils, humans and pigs is one of the monitored metabolite found in the water and plants. To be able to monitor CLD and its metabolites in the urine and feces of ruminants, sensitive, reliable and validated method must be available.

Actually, there is a unique developed method presented by Fariss et al. [5] to analyze CLD and its metabolites in urine and feces of animals. Because conjugated metabolites were not commercially available, the urine and feces were pretreated with the β -glucuronidase plus sulfatase enzymes (in order to hydrolyze the conjugated functions) and then extracted in an acetate buffer with hexane/acetone (85/15, v/v) followed by purification with sulfuric acid. The analysis was carried out by Gas-Chromatography Mass Spectrometry (GC-MS) or Gas Chromatography with Electron Capture Detection (GC-ECD). This method was initially developed for the analysis in animal's bile and was then apply in the urine and feces of animals [6, 7]. Validation step is missing which is an issue to disseminate the method to the monitoring laboratories. No Limit Of Quantifications (LOQs) or validation data were presented as expected by the validation guide for pesticides [11]. Secondly, sensitive methods for CLD and its metabolites are required. In consequence an updating of the method was necessary. In fact nowadays, CLD analysis is made by High Performance Liquid Chromatography with tandem Mass Spectrometry (HPLC-MS/MS) thanks to its better sensitivity compared to GC-MS [12]. Thus, for confirmation purposes and to obtain a reliable method, isotopic dilution is more and more used for CLD analysis [12–14]. In consequence, sensitive, reliable and validated methods must be set up in the urine and feces of ewes. The improvement and validation of the analytical method for CLD and its metabolites in biological matrices is essential for future developments envisage by the INSSICCA project and also because it is an expressed request of the French National Assembly. In fact, they advise to develop rapid, cheap, reliable and sensitive extraction and quantification method in order to permit future studies on CLD (http://www.assemblee-nationale.fr/13/rap-off/i1778.asp#P998_119464).

Recently, a new analytical development based on a Quick, Easy, Cheap, Rugged and Safe (QuEChERS) extraction and an analysis by HPLC-MS/MS was performed [14]. This method was validated in accordance with the NF V03-110 [15] and SANTE guidelines [11] for CLD and CLDOH analysis in animal's liver. In this present work; the main objective is to adapt the extraction protocol and validate the whole new analytical methods in order to quantify efficiently CLD and its metabolites, particularly the conjugates ones, in the urine and feces of ewes. Indeed, as no conjugated metabolites are commercially available, an adaptation of the method already developed by Saint-Hilaire and

colleagues [14] is required. Then, the analysis was carried out by HPLC-MS/MS. The whole analysis was performed by isotopic dilution (^{13}C labeled CLD and CLDOH) providing a reliable method. At the end, to ensure the values for our future toxicokinetic protocols and future environmental studies, the methods were validated according to the French standard NF V03-110 [15] and SANTE guidelines [11]. To verify the hypothesis of CLD metabolism in ruminants and also to prepare future researches on toxicokinetic and environmental studies, urinary and fecal samples of contaminated ewes were analyzed.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and reagents

Chlordecone, chlordecol, $^{13}\text{C}_8$ -chlordecone and $^{13}\text{C}_8$ -chlordecol (purity > 98%) were supplied by Azur Isotopes SAS (Marseille, France). Isotope-labeled standards were used as Internal Standards (IS). Working solutions of 300, 450, and 100 mg L $^{-1}$ were prepared in LC-MS-grade acetonitrile obtained from VWR (Radnor, Pennsylvania, United States) respectively for CLD, CLDOH and their corresponding IS. The solutions were stored at 4 °C in amber vials until use. Ultrapure water (18.2 M Ω -cm) for the mobile phases and sample preparation was obtained by purifying distilled water with a Milli-Q system (Merck Millipore, Saint-Quentin-en-Yvelines, France). Formic acid (purity 98%) used for preparing the mobile phases and acetic acid (purity 98%) for the deconjugation step and acetate buffer preparation were both supplied by Fisher Scientific (Illkirch, France). Sodium acetate anhydrous (purity > 99%) from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany) was also used for acetate buffer preparation. QuEChERS extraction kits for the EN 15662 method were provided by Agilent Technologies (Santa Clara, USA): each kit contained 4.0 g of magnesium sulfate (MgSO $_4$), 1.0 g of sodium chloride (NaCl), 1.0 g of sodium citrate, and 0.5 g of sodium citrate sesquihydrate. QuEChERS extraction kits for the original method were supplied by Agilent Technologies (Santa Clara, USA): each kit contained 4.0 g of magnesium sulfate (MgSO $_4$) and 1.0 g of sodium chloride (NaCl). Supel $^{\text{TM}}$ QuE PSA/C18/Envi-Carb [50 mg of PSA, 50 mg of C18, 50 mg of Envi-Carb, and 150 mg of MgSO $_4$], Supel $^{\text{TM}}$ QuE PSA/C18 [150 mg of PSA, 150 mg of C18, and 900 mg of MgSO $_4$], Supel $^{\text{TM}}$ QuE ZSep/C18 [300 mg of PSA and 120 mg of C18] were obtained from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Sulfatase from *Helix pomatia* type H-2 (aqueous solution ≥ 2000 units mL $^{-1}$ for the sulfatase activity and $\geq 100,000$ units mL $^{-1}$ for the β -glucuronidase activity) was obtained from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany) for urine deconjugation.

2.2. Apparatus

An Agilent 1200 series binary pump and autosampler (Santa Clara, USA) coupled with a 5500 Q-Trap AB SciEX mass spectrometer (Darmstadt, Germany) with an electrospray ionization source (ESI) was used for all the experiments. An Aqua C18 column (150 mm \times 2.0 mm; 3.0 μm) and an Aqua C18 pre column (4.0 \times 2.0 mm; 3.0 μm) supplied by Phenomenex (California, USA) were used for chromatographic separation. An Eppendorf 5810 centrifuge (Hamburg, Germany) and a Genie 2 vortex supplied by Scientific Industries (Bohemia, USA) were used for extraction. A Mettler Toledo XS 204 analytical balance was used to weigh the samples. An Agitelec Intelli-Mixer RM-2 supplied by Dominique Dutscher (Brumath, France) was used for sample preparation. A GM 200 Grindomix supplied by Retsch Technology GmbH (Haan, Germany) and an Alpha 1-4 LSC Lyophilizer from Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH (Osterode am Harz, Germany) were used for feces preparation. An MMM Medcenter $^{\text{TM}}$ Durocell Heating Oven supplied by Fisher Scientific (Illkirch, France) and an 827 pH lab

pH meter from Metrohm (Herisau, Switzerland) were used for the deconjugation. A syringe filter CHROMAFIL® Xtra PTFE 45/25 (0.45 µm) from Macherey-Nagel (Hoerd, France) was used for the urine extraction step.

2.3. Urinary and fecal sample collection

In order to elucidate if the metabolization occurs or not in ruminant and also to collect information on CLD's elimination in feces and urine, an *in vivo* protocol was carried out at UR AFPA (Nancy, France). Indeed, the monitoring of CLD and its metabolites in controlled conditions were necessary. For this reason, five ewes were intravenously administered 1 mg CLD kg⁻¹ body weight and were decontaminated for 84 days. Before the contamination, pooled blank urine and pooled blank feces were collected to assess the validation of our methods.

To optimize the methods in the urine and feces, contaminated urines and feces samples after 2 days of decontamination were used because the highest concentrations were found in these samples by comparison with day 1 (personal data). For the method validation, contaminated urines and feces samples after 2 days and after 84 days of decontamination were selected in order to estimate the highest and the lowest expected concentrations. In fact, after 2 days decontamination, CLD and metabolites maximum concentrations were reached. Regarding the choice of 84 days, this period allows the elimination of around 90% of the administrated dose from the animal body CLD (personal data). Blank samples or contaminated feces samples were lyophilized with the Alpha 1–4 LSC Lyophilizer and stored in amber vials at ambient temperature. In fact, in order to avoid molecules degradation and for future environmental studies which can be lead in FWI, the lyophilization process was used. The pressure applied for lyophilization was 0.220 mbar. The temperature trays were set to 0 °C to avoid any degradation of metabolites and the lyophilization time for all the samples was 72 h. Blank samples and contaminated urine samples were filtrated and stored in amber vials at –20 °C before analysis.

2.4. Extraction of CLD and CLDOH from feces

Zero point six grams (0.600 g ± 0.001 g) of lyophilized feces were weighed into a 50 mL centrifuge tube before adding 9.4 mL of ultrapure water. The mixture was then agitated with the Agitelec for 1 h to ensure the total rehydration of the lyophilized feces. The mixture was then extracted with the QuEChERS method described in Saint-Hilaire et al. [14] for the extraction of CLD and CLDOH from liver samples.

2.5. Extraction of CLD and its metabolites from urine

- Deconjugation step

Four milliliters of urine (4.00 ± 0.04 mL) was placed in a 50 mL centrifuge tube named “1” for the extraction of CLD and CLDOH. Another 4 mL of urine (4.00 ± 0.04 mL) was added to a second 50 mL centrifuge tube named “2” for the extraction of total CLD (abbreviated CLD-t to stand for extraction of both CLD and conjugated chlordecone CLD-C) and the extraction of total CLDOH (abbreviated CLDOH-t to stand for extraction of both CLDOH and conjugated chlordecol CLDOH-C). Fifty microliters of both ISSs at 500 µg L⁻¹ was added to tubes 1 and 2. The pH of tube 2 was then adjusted with an acetic acid solution (4 M) to between 4.5 and 5.0, measured with the 827 pH lab pH meter. Furthermore, 4 mL of acetate buffer (0.2 M and adjusted to pH 4.75) was added to tubes 1 and 2 before being mixed during a 1 min rotation cycle. After that, 100 µL of *sulfatase* from *Helix pomatia*

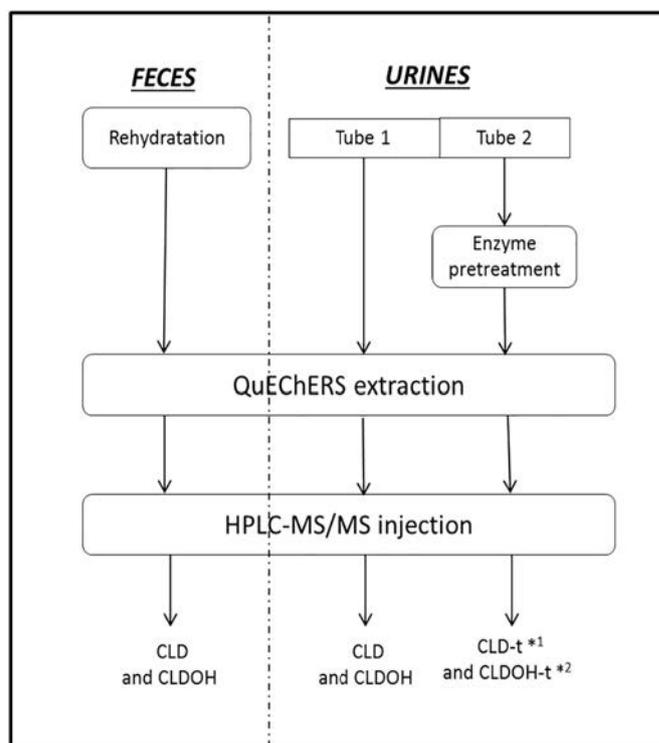


Fig. 1. Extraction methods of CLD and its metabolites in the urine and feces with or without enzyme pretreatment.

*1CLD-t = CLD + CLD-C.

*2CLDOH-t = CLDOH + CLDOH-C.

(≥ 100 units µL⁻¹ of *β-glucuronidase* and ≥ 2 units µL⁻¹ of *sulfatase*) was added to tube 2. Tubes 1 and 2 were mixed in the oven for 16 h (overnight) at 37 °C with the Agitelec.

- Extraction step

According to Anastassiades et al. [16], ten milliliters of acetonitrile was added to each tube, which were then stirred for 1 min with the Genie 2 vortex. The QuEChERS extraction kit for the original method was then added to tubes 1 and 2. The two mixtures were stirred for 1 min with the Genie 2 vortex and then centrifuged at 4000 rpm for 5 min with the Eppendorf 5810 centrifuge. The supernatant of tubes 1 and 2 (10 mL in each) was evaporated under a nitrogen flow at 37 °C. After evaporation, 1 mL of ACN was added to the residues of each tube. The 1 mL residue of each tube was filtered with the 0.45 µm syringe filter before being placed in a 2 mL amber vial and analyzed by HPLC-MS/MS. Tube 1 was used to determine CLD and CLDOH in urine. Tube 2 was used to measure CLD-t and CLDOH-t. Fig. 1 summarizes the method for extracting CLD and its metabolites from urine.

2.6. LC-MS/MS conditions

The LC-MS/MS conditions used in this research are detailed in Saint-Hilaire et al. 2018 [14]. In brief, the elution was performed with a gradient using Milli-Q water (Solvent A) and acetonitrile (Solvent B), each containing 0.1% formic acid. The electrospray source (ESI) was used in negative mode and the mass and source parameters were optimized for CLD, CLDOH, ¹³C₈-CLD and ¹³C₈-CLDOH.

2.7. Calculation

No conjugated CLD or CLDOH standards were being available that is why an enzymatic pretreatment was made with the β -glucuronidase plus sulfatase enzymes. It allows the glucuronosyl or sulfonyl functions to be hydrolyzed. By subtracting the free CLD measured in tube 1 from total CLD (CLD-t) measured in tube 2 (respectively CLDOH from CLDOH-t), it was possible to calculate the conjugated metabolites concentrations (CLD-C or CLDOH-C) with Eqs. (1) and (2):

$$\text{CLD} - \text{C} = \text{CLD} - \text{t} - \text{CLD} \quad (1)$$

$$\text{CLDOH} - \text{C} = \text{CLDOH} - \text{t} - \text{CLDOH} \quad (2)$$

Feces were extracted on its lyophilized form. For each sample the percentage of DM was calculated by weighting the feces mass before and after the lyophilization. The following equations (Eqs. (3) and (4)) allow to convert the CLD concentration of lyophilized feces to the CLD concentration of fresh feces and respectively for CLDOH.

$$[\text{CLD}]_{(\text{fresh feces})} = \%DM \times [\text{CLD}]_{(\text{lyophilized feces})} \quad (3)$$

$$[\text{CLDOH}]_{(\text{fresh feces})} = \%DM \times [\text{CLDOH}]_{(\text{lyophilized feces})} \quad (4)$$

2.8. Validation

The methods developed for the analysis of CLD and its metabolites in urine and feces were validated according to French standard NF V03-110 [15] and followed SANTE guidelines [11]. In the absence of certified reference material for determining CLD and CLDOH in the urine and feces, the accuracy profiles were constructed using spiked pooled blank urinary and pooled blank fecal samples. The accuracy profiles for CLD, CLDOH, CLD-t and CLDOH-t (with the enzyme pretreatment) in the urine were thus constructed. No conjugated metabolites were found in contaminated feces, so only accuracy profiles for CLD and CLDOH were established. The following parameters for each profile were evaluated: linearity, accuracy, Limit Of Quantification (LOQ), precision, uncertainty, specificity and Q/q, with Q for quantification transition and q for qualification transition, and finally the relative ion intensities of the MRM were verified for confirmation purposes. As the method is based on isotopic dilution, matrix effects were normalized by the relative abundance of CLD and CLDOH (corrected by the abundance of IS $^{13}\text{C}_8$ -CLD and $^{13}\text{C}_8$ -CLDOH). Accuracy, LOQ, precision and uncertainty were evaluated through the accuracy profiles of CLD and its metabolites [11, 15, 17]. The acceptance limits (λ) were set between 70% and 120%, which is the trueness imposed by the SANTE reference guide (2015). Probability β was set to 90%, 95%, 85% and 85% respectively for CLD, CLD-t, CLDOH and CLDOH-t in urine. These values mean that the risk of future expected results lying outside this limit is below 10%, 5%, 15% and 15% respectively for CLD, CLD-t, CLDOH and CLDOH-t. The profiles also made it possible to define the validity domain for CLD and its metabolites (between the LOQ and the highest concentration tested).

The accuracy profiles for feces were constructed with three validation series, repeated on three different days over three weeks. For each series, four concentration levels were tested for CLD (3.2, 9.5, 317 and 1272 $\mu\text{g kg}^{-1}$ of fresh feces) and for CLDOH (5.8, 17.4, 58.1, 291 $\mu\text{g kg}^{-1}$ of fresh feces). Each level's analysis was duplicated. The accuracy profiles for urine were constructed with three validation series, repeated on three different days over three weeks. For each series, four concentration levels were tested for CLD (0.1, 0.2, 2.4 and 7.4 $\mu\text{g L}^{-1}$ of urine) and CLD-t (0.1, 0.2, 2.4 and 7.4 $\mu\text{g L}^{-1}$ of urine).

Three concentration levels were tested for CLDOH (1.3, 3.6, 7.2 $\mu\text{g L}^{-1}$ of urine) and for CLDOH-t (2.4, 7.2, 25.1 $\mu\text{g L}^{-1}$ of urine). Probability β was respectively set to 90% and 80% for CLD and CLDOH in feces. These values mean that the risk of future expected results lying outside these limits is below 10% and 20% respectively for CLD and CLDOH.

Specificity is based on the measurement of the variation in chromatographic retention time and the quantification and qualification transition ratios for mass spectrometry. Thereby, the specificity of the chromatographic method was confirmed by the use of IS ^{13}C -CLD and ^{13}C -CLDOH. The retention time between IS ^{13}C -CLD and the CLD analyte (solvent or sample) should be similar according to the SANTE guidelines (respectively for CLDOH) [11]. Moreover, the mass spectrometry's specificity was confirmed by comparing the signals at the selected transitions [17] for the ewes' blank urine (respectively blank feces) free of CLD and CLDOH and for fortified urine (respectively fortified feces). Furthermore, the ratios between the quantification and qualification transitions were calculated with standards of CLD and CLDOH in solvent compared to experimentally spiked samples, the difference (standards versus spiked samples) being lower than 30%, a criterion mentioned in the SANTE guidelines [11] to provide the method's specificity.

3. Results and discussion

3.1. Optimization of sample preparation methods

3.1.1. Fecal sample preparation

The previous extraction method for simultaneously analyzing CLD and CLDOH in feces was a liquid-liquid extraction followed by acid hydrolysis with concentrated sulfuric acid [5]. Recently, Chung and Chen [18] highlighted that CLD is not resistant to sulfuric acid treatment. In order to obtain a gentler, rapid and updated extraction method, the QuEChERS methodology developed in Saint-Hilaire et al. [14] was applied to the extraction of CLD and CLDOH from feces. The three same dispersive phases were tested for feces and as for the liver; PSA/C18/Envi-Carb gave the best recoveries in feces. Recoveries around 70% were found for CLD and CLDOH in external calibration.

Before extracting CLD and CLDOH from lyophilized feces, the first step entailed rehydrating the feces by mechanical agitation using the Agitelec. Thanks to the optimized method, two rehydration times were tested: 1 h and 16 h. We chose 1 h for the rehydration because this is a reasonable time to wait before routine extraction and compare it with 16 h which is a very long time to rehydrate completely the lyophilized feces. The comparison between the two rehydration times was based on the finding mean concentrations ($n = 5$) of contaminated fecal samples from the *in vivo* study after 2 days of decontamination. No significant differences were found when comparing the CLD and CLDOH mean concentrations at 1 h and 16 h. This explains why we chose 1 h for the lyophilized feces rehydration step of our protocol.

3.1.2. Urinary sample preparation

In 1980, Fariss et al. [5] described an extraction procedure from bile for measuring CLD, CLDOH and their conjugated forms. This method was applied to urine by Houston et al. [6] and Soine et al. [7]. Briefly, CLD and CLDOH were extracted from urine treated with sodium acetate buffer (pH = 5.0) by using hexane/acetone (85/15, v/v). To measure CLD, CLD-t, CLDOH and CLDOH-t, the urine matrix was pretreated by incubation with β -glucuronidase plus sulfatase for 16 h at 37 °C. The mixture was then subjected to sulfuric acid hydrolysis (60%). The amounts of conjugated metabolites of CLD was obtained by difference

between the amounts of the total CLD or and the amount of free CLD, respectively for CLDOH. The same strategy, but this time using β -glucuronidase with a sulfatase activity was applied to quantify the amounts of conjugated metabolites. However, as for the feces, the extraction was based on the QuEChERS methodology in order to improve the extraction method. Preliminary tests were made with urine for the analysis of CLD and CLDOH using the QuEChERS extraction method plus salting out step (addition of ACN and the kit for the original method). Recovery percentages for CLD and CLDOH ($n = 5$) in urine samples were between 70 and 120%. By this point, the extraction method for the analysis of free CLD and free CLDOH had been optimized.

In order to improve the deconjugation protocol for determining conjugated metabolite concentrations in urine, three tests were carried out (enzyme concentration, deconjugation time, and pH adjustment of urine). The urine from three ewes contaminated with CLD (after 2 days of decontamination) were used to optimize our protocol because no conjugated metabolite standards were available for the optimization process.

In the previous method developed by Fariss et al. [5], no information about the concentration of β -glucuronidase added to urine samples was given. The product information supplied by Sigma-Aldrich [19] about the enzyme used in our protocol indicated that between 1 and 20 units of glucuronidase should be used per μL of urine. For this test, two concentrations were tested on the three urine samples: 1.25 units μL^{-1} and 10 units μL^{-1} . The highest concentrations of conjugated metabolites were obtained for the three urine samples with a β -glucuronidase concentration of 1.25 units μL^{-1} . This concentration was therefore selected for our protocol and was confirmed by Bisswanger [20]. The amount of enzyme used for the enzyme reaction should in fact be as low as possible [20].

The second test entailed testing the enzyme's reaction time. In Fariss et al. [5], 16 h at 37 °C were necessary for the enzyme activity. In order to optimize this parameter, two reaction times for the deconjugation were tested: 16 h and 24 h. No difference was noticed between the two reaction times. In our protocol, as in Fariss et al. [5], the enzyme reaction time chosen was of 16 h.

The last test was designed to determine how to adjust the pH of urine. According to the product information supplied by Sigma-Aldrich [19], the pH has to be between 4.5 and 5.0. The pH of ewe urine is initially around 8. In the literature, urine pH can be adjusted by using only an acetate buffer [5] or more recently, the combination of concentrated acid (acetic or hydrochloric acid) and an acetate buffer [21–23]. In order to compare the best way of adjusting the urine pH, a comparison was made on the three contaminated urinary samples. An acetate buffer (0.2 M) was prepared as in Fariss et al. [5] and compared with the acetic acid solution of 4 M plus acetate buffer 0.2 M [21].

Following Fariss et al.'s [5] protocol, between 12 and 16 mL of acetate buffer (0.2 M) was added to adjust the pH of 2 mL of ewe urine to between 4.5 and 5.0. However, by using the new deconjugation protocol, between 100 and 200 μL of acetic acid 4 M was added to adjust the pH of 2 mL of ewe urine to between 4.5 and 5.0. After the addition of acetic acid, 2 mL of acetate buffer 0.2 M was added to maintain the pH. After the QuEChERS extraction (extraction plus salting-out), the highest conjugated concentrations were obtained with acid plus acetate buffer. To conclude, in this protocol, the pH was adjusted by adding acetic acid plus acetate buffer.

3.2. Method validation

3.2.1. Validation for CLD and CLDOH in feces

The accuracy profiles obtained for CLD and CLDOH in feces and the performance criteria calculated are presented in Table 1 and Appendix A. The LOQ and the highest validation level were set and validated for their relevance toward toxicokinetic investigation. In fact, feces samples after 2 days and 84 days of decontamination were analyzed. Thus, only accuracy profiles for CLD and CLDOH were constructed because no conjugated metabolites were found in keeping with the previous literature [6, 7]. For both profiles, the β -expectation tolerance intervals were within the acceptability limits. The estimated repeatability (coefficient of variation CV_r) varied from 0.5 to 1.5% for CLD and from 1.7 to 4.7% for CLDOH; they were thus below the 20% CV_r recommended by SANTE guidelines (2015) [11]. The intermediate precision (coefficient of variation CV_R) varied from 2.8 to 3.6% for CLD and from 2.6 to 5.9% for CLDOH, again below the 20% CV_R recommended by SANTE guidelines (2015) [11]. For routine analysis, CV_R was set at 3.6% (the highest value of the corresponding spiked level) for CLD and 5.9% (the highest value of the corresponding spiked level) for CLDOH. Using the accuracy profiles, it is possible to calculate the standard deviation of the tolerance interval and then to estimate the extended uncertainty. The uncertainty was estimated to be 8% for CLD and 13% for CLDOH. The validated LOQs (3.2 $\mu\text{g CLD kg}^{-1}$ and 5.8 $\mu\text{g CLDOH kg}^{-1}$ of fresh feces) for CLD and CLDOH corresponded to the lowest experimental validated levels of the CLD and CLDOH accuracy profiles.

Therefore, the validity domain of the analytical method can be declared as valid from the LOQ range (0.5 $\mu\text{g CLD}\cdot\text{L}^{-1}$ and 1 $\mu\text{g CLDOH}\cdot\text{L}^{-1}$) up to 220 $\mu\text{g CLD}\cdot\text{L}^{-1}$ and 50 $\mu\text{g CLDOH}\cdot\text{L}^{-1}$. The validity linearity domain of the analytical method is declared as valid from the range (0.5 $\mu\text{g CLD}\cdot\text{L}^{-1}$ and 1 $\mu\text{g CLDOH}\cdot\text{L}^{-1}$) up to 250 $\mu\text{g CLD}\cdot\text{L}^{-1}$ and 100 $\mu\text{g CLDOH}\cdot\text{L}^{-1}$. To our knowledge, no LOQ values for CLD and CLDOH in feces were available until now. The specificity assessment values mentioned earlier were verified and the

Table 1
Performance criteria for CLD and CLDOH in feces.

Compound	Concentration levels ($n = 3$) ($\mu\text{g kg}^{-1}$ of fresh feces)	Accuracy		Precision	
		Relative bias (%)	Repeatability (%CV)	Intermediate precision (%CV)	LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$ of fresh feces)
CLD	3.2	-3.8	0.5	3.6	3.2
	9.5	5.5	0.8	3.2	
	317	4.2	1.5	2.8	
	1272	-1.9	1.4	2.8	
CLDOH	5.8	3.9	4.7	5.9	5.8
	17.4	8.9	1.9	4.2	
	58.1	13.0	1.7	2.6	
	291	4.8	4.2	5.2	

Table 2
Performance criteria for CLD and its metabolites in the urine.

Compound	Concentration levels@(n = 3)@(µg L ⁻¹ of urine)	Accuracy		Precision	
		Relative Bias@(%)	Repeatability@(%CV)	Intermediate@Precision (%CV)	LOQ@(µg L ⁻¹ of urine)
CLD	0.1	-1.3	2.4	5.1	0.1
	0.2	-0.1	1.2	3.2	
	2.4	2.8	0.9	2.3	
	7.4	0.9	2.1	2.5	
CLD-t	0.1	-1.7	1.1	1.8	0.1
	0.2	0.2	3.0	4.5	
	2.4	1.0	0.6	2.5	
	7.4	-1.3	0.9	3.1	
CLDOH	1.3	2.0	1.3	5.3	1.3
	3.6	7.9	1.7	2.7	
	7.2	7.4	5.2	5.2	
	2.4	7.8	1.7	3.5	
CLDOH-t	7.2	8.0	0.9	3.1	2.4
	25.1	-6.5	1.2	1.5	

criterion was below 30%: 1.5% for CLD, 19% for CLDOH according to the SANTE guidelines [11].

3.2.2. Validation for CLD and its metabolites in the urine

The accuracy profiles obtained for CLD, CLD-t, CLDOH, and CLDOH-t and the performance criteria calculated are presented in Table 2 and Appendix B. The LOQ and the highest validation level were set and validated for their relevance toward toxicokinetic investigation. In fact, the urine samples after 2 days and 84 days of decontamination were analyzed. For each profile, the β -expectation tolerance intervals were within the acceptability limits. The estimated repeatability (coefficient of variation CV_r) varied from 0.9 to 2.4% for CLD, from 0.6 to 3.0% for CLD-t, from 1.3 to 5.2% for CLDOH and 0.9 to 1.7% for CLDOH-t, in other words they were all below the 20% CV_r recommended by SANTE guidelines (2015) [11]. The intermediate precision (coefficient of variation CV_R) varied from 2.3 to 5.1% for CLD, from 1.8 to 4.5% for CLD-t, from 2.7 to 5.3% for CLDOH and from 1.5 to 3.5% for CLDOH-t, again below the 20% CV_R recommended by SANTE guidelines (2015) [24]. The validated LOQs (0.1 µg CLD L⁻¹, 0.1 µg CLD-t L⁻¹, 1.3 µg CLDOH L⁻¹, and 2.4 µg CLDOH-t L⁻¹ of urine) for CLD, CLD-t, CLDOH and CLDOH-t corresponded to the lowest experimentally validated levels of the accuracy profiles. For routine analysis, CV_R was set at 5.1% (the highest value of the corresponding spiked level) for CLD, 4.5% for CLD-t, 5.3% for CLDOH, and 3.5% for CLDOH-t. Using the accuracy profiles, it is possible to calculate the standard deviation of the tolerance interval and then to estimate the extended uncertainty. The

uncertainties were estimated to be 12%, 10%, 12% and 8% respectively for CLD, CLD-t, CLDOH, and CLDOH-t. Therefore, the validity domain of the analytical method can be declared as valid from the LOQ range (0.5 µg CLD L⁻¹ and 5.2 µg CLDOH L⁻¹) up to 29.6 µg CLD L⁻¹ and 28.8 µg CLDOH L⁻¹ and (0.5 µg CLD-t L⁻¹ and 9.6 µg CLDOH-t L⁻¹) to 29.6 µg CLD-t L⁻¹ and 100 µg CLDOH-t L⁻¹. The validity linearity domain of the analytical method is declared as valid from the range (0.5 µg CLD L⁻¹ and 1 µg CLDOH L⁻¹) up to 250 µg CLD L⁻¹ and 100 µg CLDOH L⁻¹. To our knowledge, this is the first time that LOQ values for CLD, CLD-t, CLDOH and CLDOH-t in urine have been presented. The specificity assessment values mentioned earlier were verified and the criterion was below 30%: 1% for CLD, 2% for CLD-t, 3% for CLDOH, and 9% for CLDOH-t according to the SANTE guidelines [11].

3.3. Applicability of the methods for metabolism and environmental studies

3.3.1. Analytical quality assurance control

Each sample batch for the urine and feces analysis included quality controls: a matrix blank, a reagent blank for calibration, two recovery control samples for feces (1.5 times the LOQ and the highest validated level) and four recovery control samples for urine (1.5 times the LOQ and the highest validated level respectively for free molecules and total molecules). Calibration was performed before and after analyzing samples, and the response factor for bracketing calibration standards at each calibration level should not differ by > 20% (taking the higher

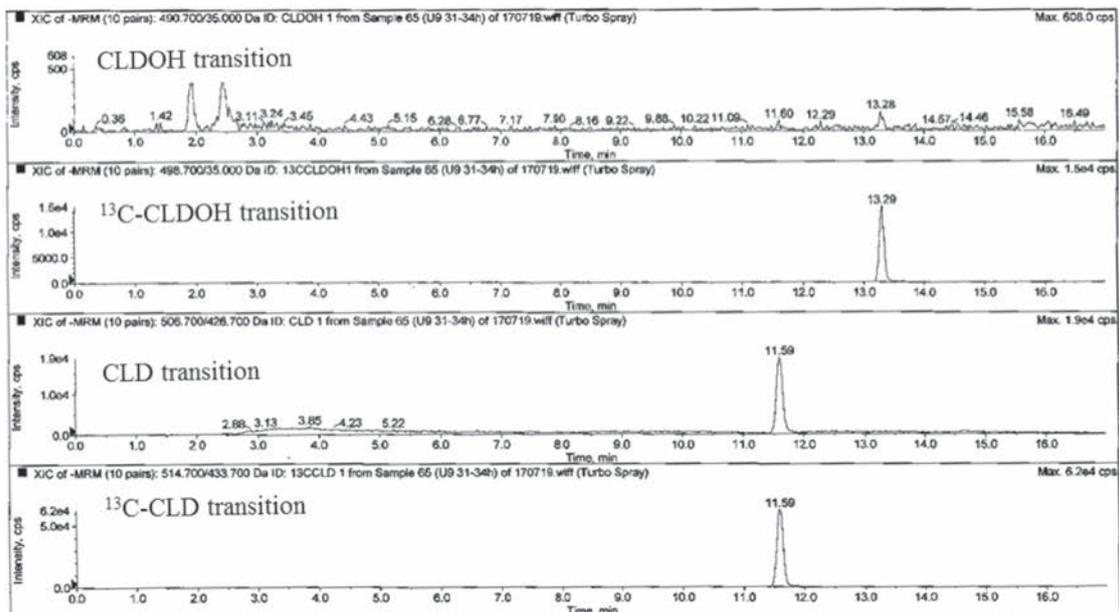
Table 3

CLD and its metabolites concentrations with the associated uncertainty in feces and the urine samples of ewes (in µg kg⁻¹ of fresh feces and µg L⁻¹ of urine).

Matrix	Sample	CLD	CLDOH	CLD-t	CLDOH-t	Conjugated CLD	Conjugated CLDOH
µg kg ⁻¹ of fresh feces							
µg L ⁻¹ of urine							
Feces	1	387 ± 31	158 ± 21	N/A	N/A	N/A	N/A
	2	466 ± 37	218 ± 28	N/A	N/A	N/A	N/A
	3	426 ± 34	228 ± 30	N/A	N/A	N/A	N/A
	4	388 ± 31	234 ± 30	N/A	N/A	N/A	N/A
Urines	5	404 ± 32	226 ± 29	N/A	N/A	N/A	N/A
	1	4.9 ± 0.6	Traces*	5.5 ± 0.6	61.8 ± 4.9	0.6 ± 1.2**	61.8 ± 4.9
	2	7.4 ± 0.9	Traces	7.9 ± 0.8	52.2 ± 4.2	0.5 ± 1.7	52.2 ± 4.2
	3	1.1 ± 0.1	Traces	1.5 ± 0.2	22.7 ± 1.8	0.4 ± 0.3	22.7 ± 1.8
	4	4.8 ± 0.6	Traces	5.1 ± 0.5	15.4 ± 1.2	0.3 ± 1.1	15.4 ± 1.2
5	1.1 ± 0.1	Traces	1.3 ± 0.1	21.0 ± 1.7	0.2 ± 0.2	21.0 ± 1.7	

LOQ/3 < traces* < LOQ, ** uncertainty sum of CLD and CLD-t, N/A = Not Analyzed.

- (a) Chromatogram of ewes' urine without enzyme pretreatment (CLD + CLDOH extraction),
 $[\text{CLD}] = 1.1 \mu\text{g L}^{-1}$, $[\text{CLDOH}] < \text{LOQ}$



- (b) Chromatogram of ewes' urine with enzyme pretreatment (CLD-t + CLDOH-t extraction),
 $[\text{CLD-t}] = 1.5 \mu\text{g L}^{-1}$, $[\text{CLDOH-t}] = 22.7 \mu\text{g L}^{-1}$

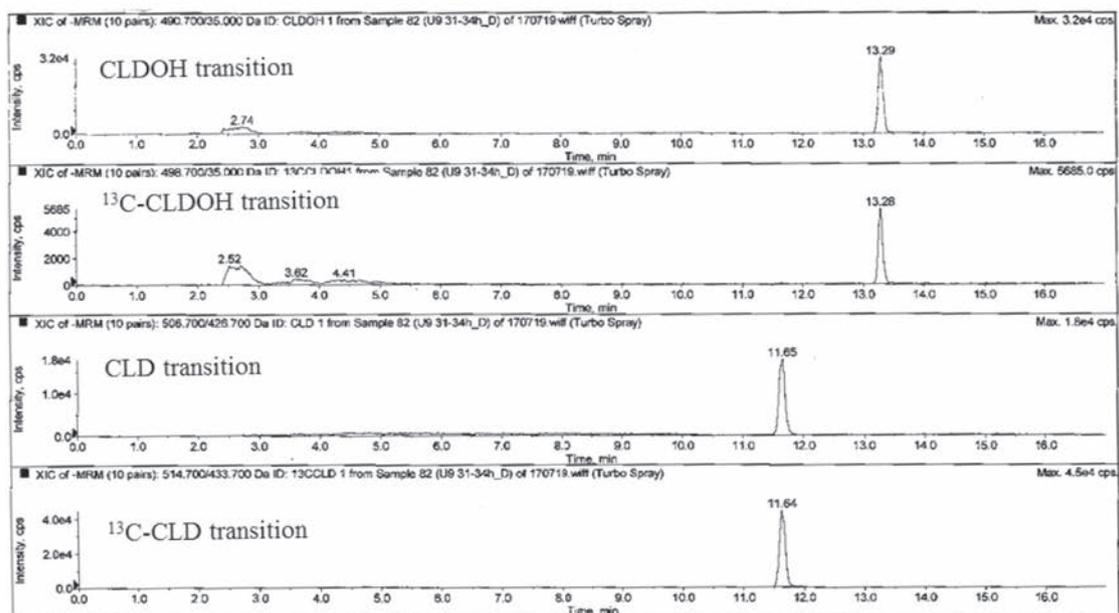


Fig. 2. Chromatograms of ewes' urine (sample 5) without (a) and with enzyme pretreatment (b).

response as 100%) according to THE sante guidelines [11]. A reagent blank and a matrix blank for urine and feces were prepared and analyzed in the same conditions to check any cross-contamination, the maximum signal tolerance corresponding to 30% of the LOQ. All the

recovery percentages from the supplemented matrix were between 70 and 120%. All the analyses complied with these criteria. In urine, the conjugated CLD concentration (or conjugated CLDOH concentration) was determined by subtracting the CLD (or CLDOH) concentration

found from CLD-t (or CLDOH-t).

3.3.2. Determination of CLD and its metabolites in the urine and feces of animals

- *In vivo* study

Once the methods had been validated, five urinary and five fecal samples (after 2 days of decontamination) from CLD contaminated ewes were analyzed. The results are presented in Table 3.

In all the fecal samples, free CLD and free CLDOH were quantified. In the urinary samples, CLD and conjugated CLDOH were quantified. Regarding conjugated CLD, the concentration was obtained by difference between the total CLD concentration and the free CLD concentration. The associated uncertainty to the CLD conjugated concentration was obtained by summing the CLD uncertainty and the total CLD uncertainty. For all the CLD conjugated concentration found, because the uncertainty value was higher than the finding concentration, conjugated CLD quantified cannot be quantified. In all the fecal samples from ewes, CLD and CLDOH were quantified as for pigs [7], gerbils [6], and humans [24]. Moreover, in the urine, quantification of CLD is consistent with the literature. CLD had previously been found in rat urine after treatment with ^{14}C -CLD at 40 mg kg^{-1} [25]. No CLD metabolites were found in rat urine because this species cannot metabolize CLD [6, 25]. No CLD or metabolites were found in gerbil urine. In fact, Houston et al. [6] thought that the conjugated form of CLDOH might also be detected in urine, but following an injection of ^{14}C -CLD, their study failed to reveal the presence of CLD, CLDOH or their conjugated metabolites as measured by gas-liquid chromatography. In our work, CLD and CLDOH-C were found in the urine of ewes which is in accordance with the bibliography as shown in Fig. 2. The best hypothesis for the non-quantification of CLD and CLDOH-C in gerbil's urine is probably linked to the use of gas-liquid chromatography for the analysis. In conclusion about the elimination forms of CLD in ewes: free CLD and free CLDOH are excreted in feces and free CLD, conjugated CLD and conjugated CLDOH are excreted in the urine.

In feces, CLD concentration between 387 and $466\text{ }\mu\text{g kg}^{-1}$ of fresh feces and CLDOH concentration between 158 and $234\text{ }\mu\text{g kg}^{-1}$ of fresh feces were quantified. The CLD/CLDOH ratio found is $2.5/1$. In gerbil this feces ratio is $2.4/1$ [6] which closed to the ewe's one. However, in human this ratio is $0.25/1$ [24], and in pigs between $8/1$ and $10/1$ [7]. This highlighted the difference of elimination between species.

In the urine, CLD concentration between 1.1 and 7.4 ng/mL and total CLD concentration between 1.3 and 7.9 ng/mL were found. Regarding free CLDOH, no quantification was possible however, CLDOH conjugated concentration between 15.4 and 61.8 ng/mL were found. Because urine metabolites were never quantified before, no comparison can be done with our results. In the urine the CLDOH conjugated concentration was almost 9 times higher than the CLD concentration. However, in feces the CLD concentration was almost 2 times higher than the CLDOH concentration. Feces are a non-polar matrix however urine is a polar one. In consequence, our results are consistent with the elimination of CLD and CLDOH *via* the feces and the elimination of conjugated CLDOH (a more polar compound than CLD and CLDOH) through the urine. Moreover, there is almost 20 times more CLD and metabolites in feces than in the urine. This result is consistent with the bibliography: 65.5% of the dose had been eliminated in rat's feces however only 1.6% was eliminated in the urine [25].

Since no conjugated standards are commercially available, the concentration of conjugated metabolites was based on the difference between the total and free concentration of CLD, respectively for CLDOH (as shown in calculation). As perspective, the deconjugation

efficiency should be checked in the urine. However, because the deconjugation protocol was optimized, the maximum amounts of conjugated molecules should be release. However, it is the first time that chlordecone and its metabolites could be quantified with validated methods in the urine and feces of ruminants. Those methods will be applied in a near future for the toxicokinetic protocol on ewes lead by the INSSICCA project. This study will allow to ensure depuration strategies in ruminants which were exposed to CLD. Indeed, when the animal is kept out of contaminated areas it will excreted CLD and its metabolites through the urine and feces.

- *Fields investigations*

The main route of CLD elimination is the feces [25]. The quantified concentrations of CLD and CLDOH in ewe's feces confirmed this result (Table 3). Recent studies about the transfer of CLD from soil to water were done [3] and indicated that 86.5% of the pesticides found in the analyzed basins of Guadeloupe (Basse-Terre) was chlordecone, 5b-hydrochlordecone and chlordecol. Based on 62 analyzed basins, chlordecone was found in 40 basins, 5b hydrochlordecone on 24 and chlordecol on 12 basins. Because CLDOH is eliminated from animal body, these results highlight the importance of the monitoring of CLD and CLDOH coming from farm animal feces.

The results of the *in vivo* study were compared to a former study lead by INRA URZ of Guadeloupe (Personal communication, Maurice Mahieu), where soil and feces samples of contaminated bovine were collected. Feces samples were analyzed by using the extraction method to analyze chlordecone in non-fat products. These animals were bred on two different types of soils: nitisol and andosol, contaminated from $0.005\text{ mg CLD kg}^{-1}$ to $6.7\text{ mg CLD kg}^{-1}$ dry soil ($n = 18$). The method used for CLD analysis in feces was not validated for feces analysis but allowed to obtain CLD concentrations between 7 and $102\text{ }\mu\text{g CLD kg}^{-1}$ of fresh feces ($n = 27$). The CLD values found in this field study are in the range of the accuracy profile of our method validated (from 3.2 to $1272\text{ }\mu\text{g CLD kg}^{-1}$ of fresh feces). In consequence, our method is suitable and could be useful for fields investigations, especially because CLD and particularly CLDOH seemed to be coming from the transfer from animal to environmental compartment (soil and water). In fact, actually there is no study about the quantification of the transfer of CLD and CLDOH from ruminants to the environment, which is a lack.

In consequence, these methods will be useful to understand the metabolism and elimination CLD in ruminant organism and other species. This will lead to new scientific knowledge on the amounts of CLD and CLDOH rejected from the animal to the environment which is an important prospect for the human exposure. Finally, this study also highlights the possible use, after dedicated studies, of urine and feces as biomonitoring matrix for the following of the animal contamination. Moreover, because blood is a choice matrix for human and animal exposure, it would be useful to directly apply the urine method in blood.

4. Conclusion

Sensitive analytical methods based on a QuEChERS extraction and a LC/MS-MS analysis were validated to analyze chlordecone and its metabolites in the urine and feces of ewes. The validation was made according to the SANTE Guidelines, the French Standard NF V03-110 and by using isotopic dilution providing reliable methods. Free chlordecone and conjugated chlordecol were quantified in contaminated ewe's urine. Free chlordecone and free chlordecol were found in contaminated ewe's feces. These results confirmed the CLD metabolism in ovine. Thanks to these validated method, it will be possible to lead toxicokinetic investigations to understand better the fate of CLD from

ruminant's organism. These data will help to ensure the decontamination strategies in the French West Indies for local farmers and estimate which amounts of CLD and metabolites are excreted in the environment. In fact, chlordecone and chlordecol can be found in the environment compartment and these validated methods will help to evaluate the transfer from animal to the environment and consequently the human exposure. These methods will also be useful for future research projects on animal decontamination strategies, on the potential transfer of CLD from the animal to the environment and on the dissemination of the contaminant.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

Appendix A

Acknowledgments

The authors are most grateful to the MENESR (Ministère de l'Education National, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche), PITE (Préfecture de la Martinique) and the French Agence National pour la Recherche (ANR), contract no. ANR-16-CE21-0008 INSSICCA (INnovative Strategies to establish Safe livestock rearing systems In Chlordecone Contaminated Areas) for funding this research project <http://inssicca.fr/>.

They would also like to thank Karelle Huby (ANSES, Maisons-Alfort) for technical support. The authors warmly thank Maurice Mahieu (INRA URZ, Guadeloupe) for sharing with us his feces data on contaminated bovine.

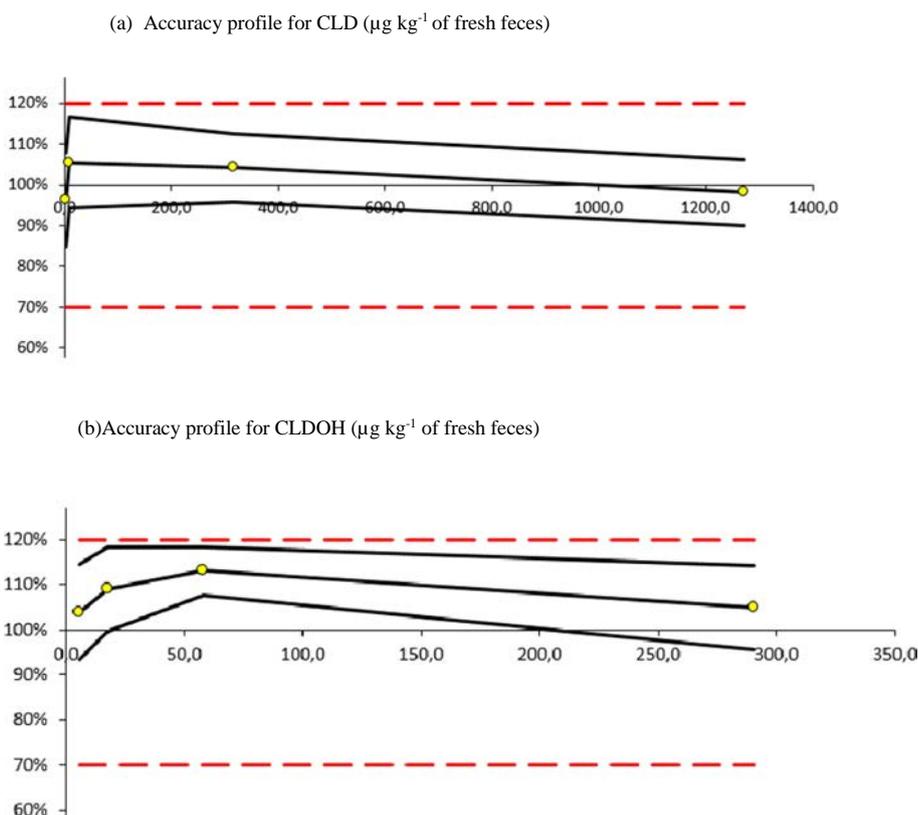


Fig. 3. Accuracy profile for CLD (a) and CLDOH (b) in fresh feces with a probability β set at 90% for CLD and 80% for CLDOH. Acceptance limit are represented with dotted line.

Appendix B

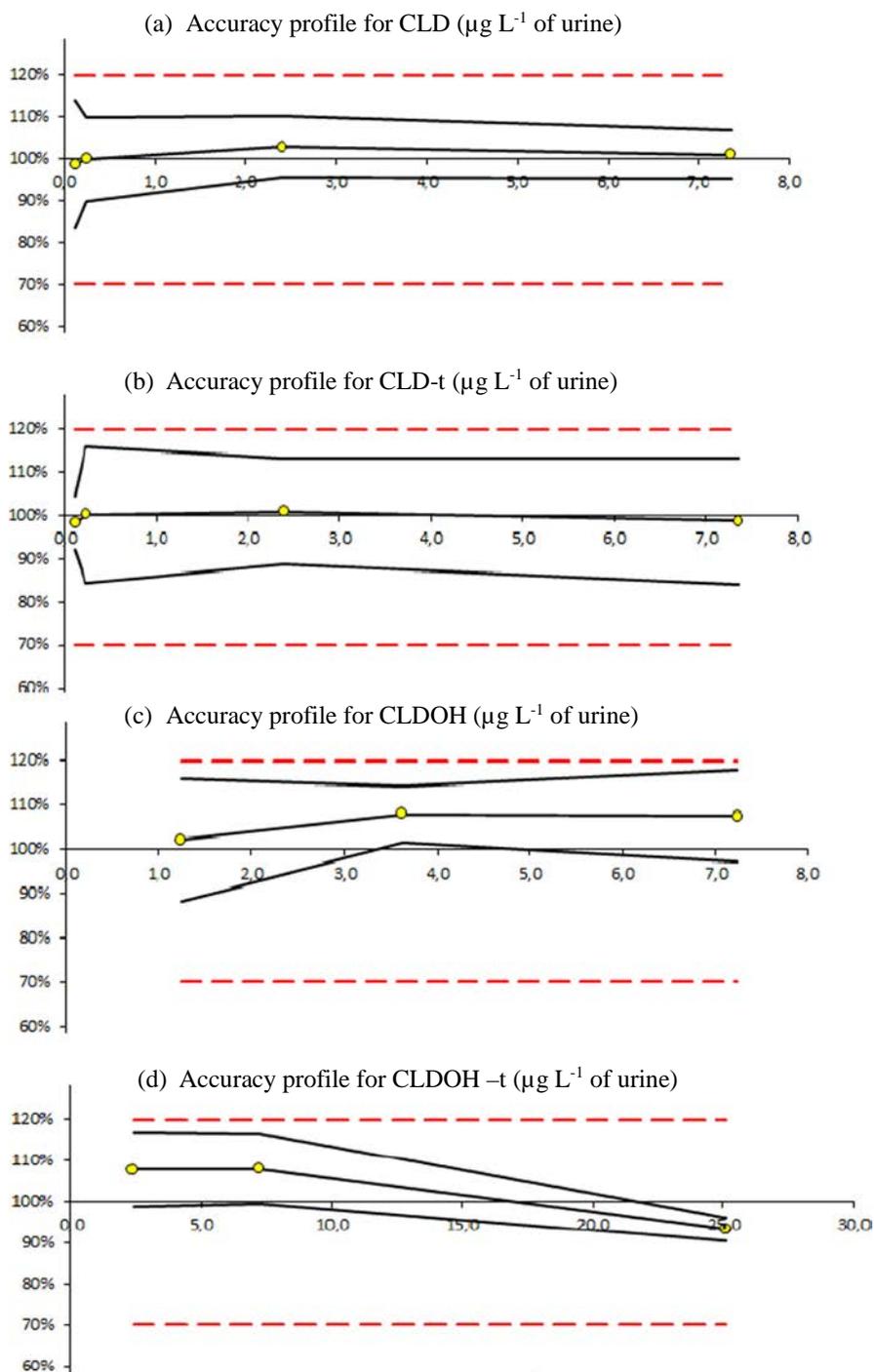


Fig. 4. Accuracy profile for CLD (a), CLD-t (b), CLDOH (c) and CLDOH-t (d) in urine with a probability β set respectively at 90%, 95%, 85% and 85%. Acceptance limit are represented with dotted line.

References

- [1] Le Déaut, Procaccia, Report on the Impact of the Use of Chlordecone and Pesticides in the West Indies: Assessment and Future Prospects (Rapports sur les impacts de l'utilisation de la chlordécone et des pesticides aux Antilles: bilan et perspectives d'évolution) OPECST, Par, (2009), p. 223.
- [2] C. Bouveret, G. Rychen, S. Lerch, C. Jondreville, C. Feidt, Relative bioavailability of tropical volcanic soil-bound chlordecone in piglets, *J. Agric. Food Chem.* 61 (2013) 9269–9274, <http://dx.doi.org/10.1021/jf400697r>.
- [3] R. Rochette, P. Andrieux, V. Bonnal, P. Cattani, Contamination des bassins versants de la Guadeloupe continentale par la chlordécone - actualisation des connaissances et cartographie des zones à risque de contamination, Proj. ChlEau Terre, 2017.
- [4] C. Mouvet, S. Bristeau, Comparaison du transfert sol-plantes entre la chlordécone et ses produits de dégradation formés par déchloration réductive (Rapp. Final. BRGM/RP-65275-FR. 50 p.,11 f), (2016).
- [5] M.W. Fariss, R.V. Blanke, J.J. Saady, P.S. Guzelian, Demonstration of major metabolic pathways for chlordecone (kepone) in humans, *Drug Metab. Dispos.* 8 (1980) 434–438.
- [6] T.E. Houston, L.C. Mutter, R.V. Blanke, P.S. Guzelian, Chlordecone alcohol formation in the mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*): a model for human metabolism of chlordecone (kepone), *Toxicol. Sci.* 1 (1981) 293–298, <http://dx.doi.org/>

- 10.1093/toxsci/1.3.293-d.
- [7] P.J. Soine, R.V. Blanke, C.C. Schwartz, Chlordecone metabolism in the pig, *Toxicol. Lett.* 17 (1983) 35–41, [http://dx.doi.org/10.1016/0378-4274\(83\)90032-2](http://dx.doi.org/10.1016/0378-4274(83)90032-2).
- [8] D.E. Moreland, S.D. Soileau, Effects of chlordecone and chlordecone alcohol on isolated ovine erythrocytes, *J. Toxicol. Environ. Health* 24 (1988) 237–249.
- [9] S.D. Soileau, D.E. Moreland, Effects of chlordecone and its alteration products on isolated rat liver mitochondria, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 67 (1983) 89–99, [http://dx.doi.org/10.1016/0041-008X\(83\)90247-8](http://dx.doi.org/10.1016/0041-008X(83)90247-8).
- [10] D. Desaiyah, R.B. Koch, Inhibition of ATPases activity in channel catfish brain by Kepone and its reduction product, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 13 (1975) 153–158, <http://dx.doi.org/10.1007/BF01721729>.
- [11] SANTE/EU, Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed. SANTE/11945/2015, Leg. Depos. 11945 (2015) 1–42 https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_11945.pdf.
- [12] H. Moriwaki, A. Hasegawa, Detection of chlordecone by liquid chromatography with tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18 (2004) 1243–1244, <http://dx.doi.org/10.1002/rcm.1474>.
- [13] E. Bichon, I. Guiffard, A. V?nisseau, P. Marchand, J.P. Antignac, B. Le Bizec, Ultra-trace quantification method for chlordecone in human fluids and tissues, *J. Chromatogr. A* 1408 (2015) 169–177, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2015.07.013>.
- [14] M. Saint-Hilaire, C. Inthavong, T. Bertin, G. Lavison-Bompard, T. Guérin, A. Fournier, C. Feidt, G. Rychen, J. Parinet, Development and validation of an HPLC-MS/MS method with QuEChERS extraction using isotopic dilution to simultaneously analyze chlordecone and chlordecol in animal livers, *Food Chem.* 252 (2018) 147–153, <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.092>.
- [15] A.N. V03-110, Analyse des produits agricoles et alimentaires- Protocole de caractérisation en vue de la validation d'analyse quantitative par construction du profil d'exactitude, (2010).
- [16] M. Anastasiades, S.J. Lehotay, D. Stajnbaher, F. Schenck, Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile, *J. AOAC Int.* 86 (2003) 412–431.
- [17] A. Kruve, R. Rebane, K. Kipper, M.L. Oldekop, H. Evard, K. Herodes, P. Ravio, I. Leito, Tutorial review on validation of liquid chromatography-mass spectrometry methods: part II, *Anal. Chim. Acta* 870 (2015) 8–28, <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2015.02.016>.
- [18] S.W.C. Chung, B.L.S. Chen, Determination of organochlorine pesticide residues in fatty foods: a critical review on the analytical methods and their testing capabilities, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 5555–5567, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2011.06.066>.
- [19] Sigma-Aldrich, <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Datasheet/7/g0876dat.pdf> 3–4 (2009).
- [20] H. Bisswanger, Enzyme assays, *Perspect. Sci.* 1 (2014) 41–55, <http://dx.doi.org/10.1016/j.pisc.2014.02.005>.
- [21] N. Grova, F. Monteau, B. Le Bizec, C. Feidt, F. Andre, G. Rychen, Determination of phenanthrene and hydroxyphenanthrenes in various biological matrices at trace levels using gas chromatography-mass spectrometry, *J. Anal. Toxicol.* 29 (2005) 175–181, <http://dx.doi.org/10.1093/jat/29.3.175>.
- [22] Y. Wang, W. Zhang, Y. Dong, R. Fan, G. Sheng, J. Fu, Quantification of several monohydroxylated metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in urine by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection, *Anal. Bioanal. Chem.* 383 (2005) 804–809, <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-005-0066-x>.
- [23] Y.P. Guiavarc'h, A. Chahin, M.A. Dziurla, H. Toussaint, C. Feidt, G. Rychen, Evaluation of small dairy ruminant exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: a biomarker approach, *Small Rumin. Res.* 91 (2010) 141–152, <http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2010.02.016>.
- [24] J.J. Boylan, W.J. Cohn, J.L. Egle, R.V. Blanke, P.S. Guzelian, Excretion of chlordecone by the gastrointestinal tract: evidence for a nonbiliary mechanism, *Clin. Pharmacol. Ther.* 25 (1979) 579–585.
- [25] J.L. Egle, Distribution and excretion of chlordecone (kepone) in the rat, *Drug Metab. Dispos.* 6 (1978).

4. Extraction de la CLD et de ses métabolites dans le sérum, le tissu gras, la bile et les organes des animaux

i. Extraction de la CLD et de ses métabolites dans le sérum

Concernant le dosage de la CLD et de ses métabolites dans le sérum, comme indiqué dans la bibliographie, deux méthodes de dosages sensibles et validées permettent de l'effectuer : la méthode du CART présentée dans Fournier *et al.* (2017) et la méthode de Bichon *et al.* (2015). Cependant, ces méthodes ne permettent pas d'analyser les métabolites de la CLD. Par conséquent, la méthode développée et validée dans la matrice urinaire pour le dosage de la CLD et de ses métabolites (présentée dans l'article 2) a été appliquée pour la recherche des métabolites dans le sérum. Cependant, afin d'effectuer les dosages dans le sérum, quelques modifications à la méthode dans les urines ont été effectuées étant donné que le sérum contient un haut pourcentage de protéines. La méthode finalement développée pour ces travaux est présentée dans les paragraphes suivants.

2 mL de sérum ont été prélevés et 2 mL d'eau ont été additionnés à la matrice. Chacune des prises d'essai de sérum a été faite en double à l'aide de deux tubes notés 1 et 2. Par la suite 50 μL de ^{13}C -CLD et 50 μL de ^{13}C -CLDOH respectivement à 500 ng mL^{-1} ont été ajoutés à chacune des prises d'essai.

- Etape de déconjugaison des échantillons

L'étape de déconjugaison dans le sérum a été effectuée comme indiqué dans la partie 2.5 *Deconjugaison step* de la partie Matériels et Méthodes de l'article 2.

- Etape d'extraction

A l'issue des traitements, 10 mL d'ACN sont ajoutés à chacun des tubes. L'ensemble matrice et ACN est ensuite agité au vortex pendant 1 minute puis mis à centrifuger pendant 5 minutes à 4000 rpm. Cette étape permet de faire précipiter les protéines sanguines. Par la suite, le surnageant est récupéré et 4,0 g de sulfate de magnésium (MgSO_4) et 1,0 g de chlorure de sodium (NaCl) sont ensuite ajoutés à chacun des tubes. Les tubes sont ensuite agités au vortex 1 minute puis mis à centrifuger pendant 5 minutes à 4000 rpm. Après centrifugation, les surnageants des tubes 1 et 2 sont évaporés et repris dans 1 mL d'ACN avant analyse par LC-MS/MS à l'aide de la méthode développée dans ces travaux pour le dosage simultané de la CLD et du CLDOH.

ii. Extraction de la chlordécone et du chlordécol dans le tissu gras

0.3 g de tissus gras sont pesés et fondus à 50°C au bain marie. Par la suite 50 μL de ^{13}C -CLD et 50 μL de ^{13}C -CLDOH respectivement à 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ont été respectivement ajoutés à la prise d'essai. 5 mL d'un mélange acétonitrile/dichlorométhane (v/v, 75/25) est ensuite ajouté au tube et l'ensemble est agité au vortex pendant 1 minute. Par la suite, l'ensemble est centrifugé à -20°C à 3000 rpm pendant 20 minutes. Le surnageant issu de l'extraction est recueilli dans un second tube et l'étape d'extraction à l'ACN sur le tissu gras restante est effectuée une seconde fois. A l'issue des deux extractions successives, 4 mL du surnageant ACN est ajouté sur une phase dispersive de type PSA/C18 (900 mg MgSO_4 , 150 mg PSA,

150 mg C18). Le mélange est agité au vortex pendant 1 minute puis mis à centrifuger 5 min à 4000 rpm. Le surnageant issu de la centrifugation est ensuite analysé par LC-MS/MS à l'aide de la méthode développée dans ces travaux pour le dosage simultané de la CLD et du CLDOH.

iii. Extraction de la chlordécone et de ses métabolites dans les organes et la bile

0,3 g d'organes sont pesés et mis à agiter pendant 1h (Intelli-Mixer) à l'aide de 4,7 mL d'eau MilliQ permettant de réhydrater les échantillons. 2 mL de bile ont été prélevés et 2 mL d'eau ont été additionnés à la matrice. Chacune des prises d'essais d'organes ou de bile a été faite en double à l'aide de deux tubes notés 1 et 2. Par la suite 50 μL de ^{13}C -CLD et 50 μL de ^{13}C -CLDOH respectivement à 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ont été ajoutés à chacune des prises d'essai.

- *Etape de déconjugaison des échantillons*

A l'aide de la première prise d'essai de chacun des doubles entre 10 et 20 μL d'acide acétique 4 M ont été additionnés aux biles et entre 30 et 50 μL d'acide acétique 4 M ont été additionnés aux organes afin que le pH des matrices se situent entre 4,5 et 5,0. Par la suite, afin de tamponner les matrices, 4 et 5 mL de tampon acétate (0.2 M, pH = 4.75) ont été respectivement additionnés aux biles et aux organes. Enfin 100 μL et 125 μL de Sulfatase type H-2 (≥ 100 unités μL^{-1} pour l'activité β -glucuronidase et ≥ 2 unités μL^{-1} pour l'activité sulfatase) ont été respectivement additionnés aux biles et aux organes. Cette première prise d'essai permettra d'obtenir les concentrations totales de CLD et de CLDOH après l'étape de déconjugaison (soit CLD-t et CLDOH-t). A l'aide de la seconde prise d'essai de chacun des doubles, 4 et 5 mL de tampon acétate (0.2 M, pH = 4.75) ont été respectivement additionnés aux biles et aux organes. Cette seconde prise d'essai permettra d'obtenir les concentrations libres de CLD et de CLDOH à l'issue de l'étape de déconjugaison. La soustraction entre les concentrations de CLD-t et de CLD (respectivement pour le CLDOH) permettra de déterminer les concentrations de métabolites conjugués de la CLD et du CLDOH. A l'issue de ces traitements, les échantillons sont mis à l'étuve à 37°C pendant 16h.

- *Etape d'extraction*

A l'issue des traitements, 10 mL d'acétonitrile (ACN) sont ajoutés à chacune des prises d'essai. L'ensemble matrice et ACN est ensuite agité au vortex pendant 1 minute. 4,0 g de sulfate de magnésium (MgSO_4) et 1,0 g de chlorure de sodium (NaCl) sont ensuite ajoutés et l'ensemble est agité au vortex 1 minute puis mis à centrifuger pendant 5 minutes à 4000 rpm. Après centrifugation, 1 mL du surnageant est déposé sur la phase dispersive PSA/C18/Envi-Carb (50 mg de PSA, 50 mg de C18 et 50 mg d'Envi-Carb). Le mélange est agité au vortex pendant 1 min puis mis à centrifuger 5 minutes à 4000 rpm. Le surnageant issu de la centrifugation est ensuite analysé par LC-MS/MS à l'aide de la méthode développée dans ces travaux pour le dosage simultané de la CLD et du CLDOH.

iv. Vérification des performances des méthodes complémentaires de dosage de la chlordécone

Afin d'assurer les valeurs de concentrations obtenues à l'aide des méthodes développées mais non validées dans le sérum, le tissu gras, la bile et les organes pour le dosage de la CLD et de ses métabolites, ce travail s'est appuyé sur l'utilisation des étalons internes ^{13}C -CLD et ^{13}C -CLDOH. Lors des analyses, des contrôles qualités étaient effectués et les taux de récupération obtenus en étalonnage interne se situaient tous entre 70 et 120 %.

Ce travail de développement analytique permet de disposer de méthodes de dosage de la CLD et de ses métabolites dans les différentes matrices d'intérêts pour les études toxicocinétiques. La partie qui suit présentera les travaux effectués concernant les méthodes enzymatiques utiles à la démonstration du métabolisme chez la brebis.

PARTIE 2: Méthodes pour l'identification de la chlordécone réductase et de son activité spécifique

Afin de d'identifier par Western-Blot la chlordécone réductase et de mesurer son activité spécifique chez la brebis, des mises au point de méthodes ont été effectuées. Ainsi, dans un premier temps sera détaillé le protocole de préparation des cytosols à partir des foies de brebis. Par la suite, seront présentés les choix (en se basant sur la synthèse bibliographique) et la mise au point effectuée concernant l'identification de l'enzyme métabolisant la chlordécone et la détermination de son activité spécifique dans le foie de brebis. Pour finir, les résultats obtenus ainsi que les conclusions de ces travaux seront exposés. A l'aide de ce travail de mise au point enzymatique, il a été de plus possible de travailler en plus de la brebis sur différentes espèces animales susceptibles d'être consommées aux Antilles Françaises.

1. Extraction des protéines du foie des animaux : préparation du cytosol

Afin d'effectuer les tests d'identification et d'activité spécifique, il est nécessaire à partir des foies d'animaux d'extraire l'enzyme en question. Une enzyme est une protéine qui possède des propriétés catalytiques envers un ou plusieurs substrats particuliers. La première étape de ces travaux a été l'extraction des protéines (et donc des enzymes) en réalisant des cytosols à partir des foies d'animaux.

L'extraction des protéines cytosoliques des cellules hépatiques s'est effectuée en se basant sur la méthode décrite dans les publications de [Molowa *et al.* \(1986a\)](#) et [\(1986b\)](#). Après la mort de l'animal, le foie prélevé est directement placé dans un tampon phosphate glacé (pH = 7,6) permettant sa conservation. Par la suite, le foie est découpé, émincé et homogénéisé. X g de foie sont ensuite placés dans 2X g de tampon phosphate 0,1 M (pH = 6,5) et l'ensemble est broyé à l'ultra-turrax. Le mélange foie et tampon est ensuite centrifugé pendant 20 min à 20 000 g puis le surnageant issu de la première centrifugation est ultracentrifugé pendant 60 min à 105 000 g. Le surnageant issu de l'ultracentrifugation est appelé le cytosol. A l'issue des différentes étapes, une étape de dialyse est réalisée permettant d'éliminer les molécules parasites qui resteraient dans le cytosol et un dosage de la quantité de protéines présentes dans l'échantillon est réalisée. Dans ces travaux, les protéines des échantillons ont été quantifiées par colorimétrie à l'aide du spectrophotomètre BMG labtech FLUOstar Galaxy OPTIMA et d'un kit nommé protéines BCA de chez Thermo Fisher (<http://www.thermofisher.com/order/catalog/product/23225>). A l'issue de la préparation des cytosols dialysés, ceux-ci étaient conservés à -20°C dans des eppendorfs avant les tests d'identification et de mesure d'activité spécifique. La figure 18 permet de visualiser les étapes de préparation du cytosol.



Figure 18 : Préparation d'un cytosol de foie de brebis dans du tampon phosphate (de gauche à droite : mélange foie + tampon phosphate, homogénat après ultracentrifugation, dialyse du cytosol, cytosol dialysé pour les mesures enzymatiques)

2. Identification de l'aldo-céto reductase AKR1C4 par Western-Blot dans des foies d'animaux

i. Principe du Western-Blot

La chlordécone réductase a été identifiée à l'aide de la méthode dite immunoblot ou encore Western-Blot dans les travaux de [Molowa *et al.* \(1986a\)](#). Cette méthode permet de déterminer la présence et le niveau d'expression de façon semi-quantitative d'une protéine présente dans un échantillon après avoir réalisé une séparation de ses constituants protéiques en fonction de sa masse moléculaire par une électrophorèse en gel de type SDS-PAGE. Ainsi, dans un premier temps, l'échantillon est déposé sur le gel et les protéines migrent sur celui-ci en fonction de leur masse moléculaire à l'aide d'un courant électrique. A l'issue de la migration, le gel est transféré sur une membrane. Cette membrane est ensuite mise à incuber avec les anticorps spécifiques de la protéine d'intérêt. On parle d'anticorps primaire. A l'issue de l'incubation, la membrane est lavée afin que les anticorps non liés à la protéine d'intérêt soient éliminés. Par la suite, les bandes protéiques présentes sur la membrane sont révélées par immunomarquage. En effet, un anticorps secondaire couplé à la peroxydase (HRP) va être ajouté et permet de reconnaître l'anticorps primaire fixé sur la protéine d'intérêt. La révélation du complexe antigène/anticorps primaire/anticorps secondaire se fait par chimioluminescence à l'aide du substrat de la peroxydase (l'eau oxygénée) ([Burnette, 1982](#); [Ochiai, 1982](#); [Jensen, 2012](#)).

ii. Mise au point du Western-Blot à partir d'un foie de brebis

La mise au point du test Western-Blot a été réalisée à partir d'un foie de brebis. Ce foie provenait d'une brebis sur laquelle une expérimentation avait été réalisée au laboratoire UR AFPA. Le cytosol du foie de brebis a été préparé comme indiqué dans la partie « préparation du cytosol ». Afin de mettre au point ce test, ces travaux de thèse se sont appuyés sur la publication de [Molowa *et al.* \(1986a\)](#). Dans la publication est indiquée que 10 µg de protéines cytosoliques avaient été déposés sur le gel pour réaliser le Western-Blot. Le gel utilisé était composé de 10 % de polyacrylamide contenant du SDS et le transfert

du gel avait été réalisé à l'aide d'une membrane en nitrocellulose. L'enzyme a été identifiée à un poids moléculaire de 37.4 kDa dans le foie humain. Dans ces travaux de thèse, un anticorps primaire AKR1C4 anti goat de type polyclonal de chez Sigma-Aldrich (<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/sab2500055?lang=fr®ion=FR>) a été acheté. Cet anticorps primaire est à son tour reconnu par un anticorps secondaire couplé à la peroxydase (HRP). La composition du gel utilisé était la même que celle indiquée dans la publication *Molowa et al. (1986a)*. La membrane utilisée pour l'étape de révélation était de type PVDF (Polychlorure de vinylidène). Afin de vérifier que la quantité de protéines à déposer sur le gel est aussi de 10 µg pour le cytosol de foie de brebis (*Molowa et al., 1986a*), un premier Western-Blot a été effectué en comparant différentes quantités de dépôt de protéines cytosoliques à 9 µg, 17 µg et 29 µg. La figure 19 présente les résultats obtenus.

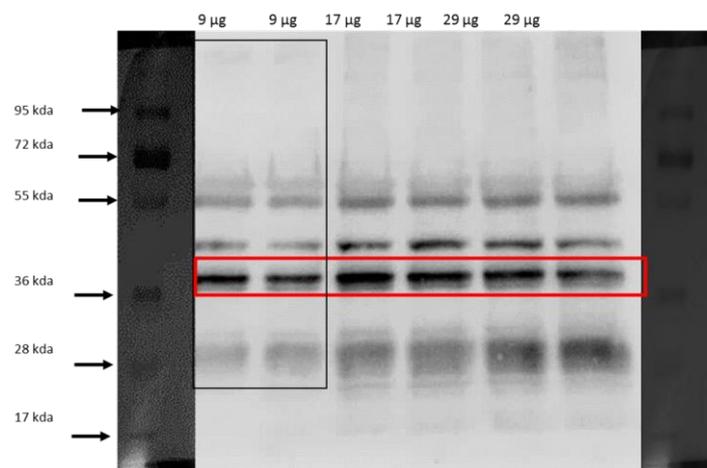


Figure 19 : Optimisation de la quantité de protéines totales à déposer depuis le cytosol de foie de brebis afin d'identifier l'AKR1C4 par Western-Blot

A l'aide de la figure 19, il est possible d'observer par Western-Blot des bandes correspondant au poids moléculaire de l'AKR1C4 (37,4 kDa). Ce premier résultat permet de conclure que cette enzyme est présente dans les foies des brebis. De plus, il est possible de constater que comme pour l'Homme, un dépôt de 9 µg de protéines totales issues du cytosol hépatique de brebis permet d'obtenir un signal suffisamment intense pour identifier voire quantifier l'AKR1C4. Dans la suite des tests, la quantité de protéines totales déposée à partir des cytosols préparés sera de 9 µg.

iii. Application du Western-Blot à différentes espèces animales

Afin d'identifier la présence de l'AKR1C4 chez différentes espèces animales, des cytosols de foie de perche, de porc, de canard, de brebis et de chevreau ont été préparés comme indiqué précédemment. Les cytosols proviennent d'animaux non contaminés par la CLD. L'application de ce test à d'autres espèces animales permet d'ouvrir cette étude à des animaux présents aux Antilles Françaises et qui sont susceptibles d'être consommés par la population. A l'aide du dosage des protéines totales de chacun des

cytosols, il a été possible de définir le volume de cytosol à déposer sur le gel afin de faire migrer pour chacune des espèces la même quantité de protéines totales à savoir 9 µg. Le résultat est présenté à l'aide de la figure 20.



Figure 20 : Identification de l'AKR1C4 responsable de la métabolisation de la CLD dans des cytosols de foies de différents animaux

Al'aide de la figure 20, il a été possible d'identifier l'AKR1C4 dans les cytosols des foies de toutes les espèces testées. Par conséquent, il est possible d'affirmer qu'elles possèdent l'enzyme capable de métaboliser la chlordécone. Comme indiqué précédemment, la même quantité de protéines totales a été déposée sur le gel pour chacun des espèces. Par conséquent, il est possible d'observer des différences entre les quantités d'AKR1C4 dans les foies des animaux. La chèvre et la brebis posséderaient de plus fortes quantités d'AKR1C4 (bandes plus intenses) dans leur foie que le canard, le porc et la perche. De plus, le Western-Blot permet d'identifier deux bandes de l'AKR1C4 chez la chèvre et la brebis contrairement à la perche, au porc et au canard où une unique bande est visible ce qui suggèrent la présence de deux isoformes chez le chevreau et la brebis. L'observation de différentes isoformes de l'AKR1C4 avaient été retrouvée dans la littérature. En effet, 3 différentes bandes avaient été identifiées pour l'AKR1C4 chez la gerbille alors qu'uniquement 2 bandes avaient été identifiées chez le lapin et l'Homme (Molowa *et al.*, 1986a). Les auteurs indiquent que la présence de trois isoformes de l'AKR1C4 pourrait être à l'origine d'une activité spécifique chlordécone réductase plus forte chez la gerbille comme retrouvé dans leurs travaux. Il sera donc intéressant de vérifier si la brebis et le chevreau possède des activités spécifiques chlordécone réductase plus fortes que la perche, le porc et le canard. De plus, pour définitivement démontrer le métabolisme de la CLD chez ces animaux, il est indispensable de prouver que l'enzyme est effectivement active, en dosant son activité spécifique chez les différents animaux où l'identification a été possible.

3. Dosage de l'activité spécifique de la chlordécone réductase

Dans ces travaux, l'activité spécifique sera mesurée c'est-à-dire, l'activité ramenée à la quantité (en mg) de protéines totales retrouvées dans les foies analysés. Afin d'effectuer des comparaisons entre les espèces, la même quantité de protéines totales par espèce sera donc utilisée pour les dosages. Le dosage de l'activité spécifique chlordécone réductase a été effectué par le passé par Molowa *et al.* (1986a) et (1986b). Ainsi, les auteurs ont mimé *in vitro* la réaction de métabolisation de la CLD en CLDOH. Cette réaction est rappelée à l'aide de la figure 21.

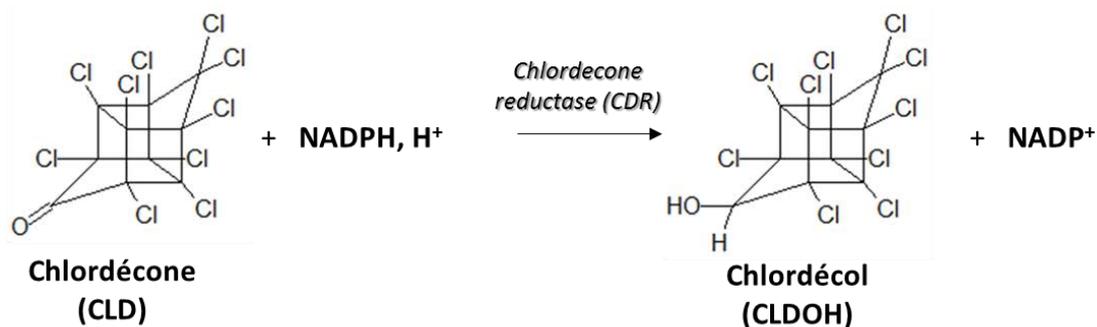


Figure 21 : Schéma de métabolisation de la chlordécone en chlordécol par la chlordécone réductase

La chlordécone en présence de chlordécone réductase et du coenzyme NADPH, H⁺ entraîne la formation du chlordécol. Par conséquent, afin de déterminer l'activité spécifique *in vitro* de la chlordécone réductase, il est potentiellement possible de :

- (1) Suivre par spectrophotométrie la consommation du NADPH, H⁺ au cours du temps
- (2) Doser l'apparition du CLDOH au cours du temps

Pour réaliser ces travaux, tout comme pour les tests Western-Blot, le cytosol (contenant l'enzyme à doser) utilisé pour la mise au point du dosage enzymatique provient d'un foie de brebis.

i. Tests préliminaires par spectrophotométrie

Afin de mesurer l'activité spécifique de la chlordécone réductase dans le foie de brebis, les conditions de dosages devaient dans un premier temps être recherchées. Des tests préliminaires ont donc été effectués à l'aide d'un spectrophotomètre double faisceau à 340 nm, valeur d'absorbance permettant de suivre la disparition du NADPH, H⁺ au cours du temps. La mesure doit être effectuée à l'aide d'une pente linéaire de disparition du NADPH, H⁺ au cours du temps, c'est-à-dire dans des conditions de vitesse initiale où le substrat et le cofacteur sont en excès par rapport à l'enzyme et où le produit de la réaction ne s'est pas encore accumulé. Cette linéarité est possible lorsque l'on se place dans les bonnes conditions de suivi enzymatique. Pour réaliser la réaction *in vitro*, il est nécessaire d'optimiser :

- La quantité de CLD
- La quantité de NADPH, H⁺
- Et la quantité de protéines totales

Pour ces travaux, la solution de CLD était préparée dans du méthanol car l'acétonitrile aurait précipité les protéines du cytosol. Le NADPH, H⁺ était en solution dans du Tris-HCl (pH = 8). Le cytosol utilisé était le même que pour les tests Western-Blot. Dans les publications de [Molowa *et al.* \(1986a\)](#) et [\(1986b\)](#), la concentration de CLD apportée était de 20 μM, celle de NADPH, H⁺ de 100 μM et la quantité de protéines cytosoliques totales se situaient entre 100 et 500 μg pour un volume final de 2 mL. De plus,

les auteurs précisent que la concentration finale du milieu réactionnel en méthanol devait être de 5 % afin d'obtenir la linéarité des mesures d'activité spécifique. Ainsi, dans un premier temps, les conditions de dosage enzymatique de la chlordécone réductase par spectrophotométrie ont été optimisées dans le cytosol de foie de brebis. La quantité de NADPH, H⁺ choisie pour tous les tests était de 150 µM afin de se placer dans des conditions où le coenzyme est en excès. Dans un premier temps, la quantité de protéines totales à ajouter pour la mesure de l'activité spécifique a été optimisée. Dans un second temps, l'effet de la quantité de CLD apportée sur la mesure de l'activité spécifique a été testé et dans un dernier temps l'effet du pourcentage de méthanol sur la réaction enzymatique a été testé également. Les tableaux 17, 18 et 19 permettent de résumer les tests effectués. Les tests ont été réalisés dans des cuves de 1 mL et le suivi de l'absorbance du NADPH, H⁺ a été réalisé pendant 5 min. La réaction a été initiée par l'ajout du cytosol dans la cuve.

- Optimisation de la quantité de protéines totales pour la mesure de l'activité spécifique

Afin de déterminer la quantité de protéines totales de cytosol à ajouter pour réaliser la réaction *in vitro*, deux tests à l'aide de 500 µg et 250 µg de protéines dans un volume final de 800 µL ont été réalisés comme indiqué sur le tableau 17. Ces quantités sont proches de l'intervalle de quantités de protéines totales utilisée pour les dosages de l'activité spécifique dans les foies de gerbille et de l'Homme (Molowa *et al.*, 1986b). Pour chacun des tests 1 et 2, les pentes d'absorbance de leurs références (sans ajout de CLD) ont été soustraites aux pentes d'absorbance obtenues. En effet, une activité de type oxydoréductase non spécifique pour la chlordécone a pu être observée au spectrophotomètre. Il a été possible de conclure qu'à l'aide de 500 µg de protéines totales dans un volume de 800 µL, une pente linéaire de disparition du NADPH, H⁺ au cours du temps plus élevée était obtenue. Par conséquent, la suite des tests a été réalisée à l'aide de 500 µg de protéines totales.

Tableau 17 : Optimisation de la quantité de protéines pour la mesure de l'activité spécifique

Conditions	Référence	1	Référence	2
Quantité de protéines (µg)	500	500	250	250
Quantité de CLD (µM)	-	20	-	20
% de méthanol	5	5	5	5

- Optimisation de la quantité de CLD pour la mesure de l'activité spécifique

Concernant la détermination de la quantité de protéines totales à ajouter, 4 quantités de CLD à ajouter ont été comparées entre elles comme indiqué sur le tableau 18. La pente la plus élevée a été obtenue après ajout de 12.5 μM de CLD. En effet, après ajout d'une quantité de CLD de 5 μM une pente trop faible était obtenue et à l'aide d'une quantité de 30 μM , un phénomène d'inhibition par le substrat a été observé.

Tableau 18 : Optimisation de la quantité de CLD pour la mesure de l'activité spécifique

Conditions	Référence	2	3	4	5
Quantité de protéines (μg)	500	500	500	500	500
Quantité de CLD (μM)		20	5	12.5	30
% de méthanol	5	5	5	5	5

- Optimisation du pourcentage de méthanol pour la mesure de l'activité spécifique

Comme indiqué dans la publication de [Molowa et al. \(1986b\)](#), la détermination de l'activité spécifique doit être effectuée à l'aide d'un milieu réactionnel contenant 5 % de méthanol. Dans ces travaux, la réaction *in vitro* a été réalisée à l'aide de 0 % et 5 % de méthanol comme le montre le tableau 19 afin de vérifier que ce milieu permettait aussi d'obtenir des pentes linéaires pour le dosage de l'activité spécifique chlordécone réductase dans les foies de brebis.

Tableau 19 : Optimisation du pourcentage de méthanol pour la mesure de l'activité spécifique

Conditions	Référence	5
Quantité de protéines (μg)	500	500
Quantité de CLD (μM)	12.5	12.5
% de méthanol	5	0

Lorsque la réaction *in vitro* est réalisée à l'aide de 0 % de méthanol, deux pentes d'absorbance du NADPH, H^+ sont visibles alors qu'avec 5 % de méthanol, une unique pente linéaire est obtenue. L'hypothèse à l'obtention de la double pente serait un changement de forme de la chlordécone. En effet, la réaction de métabolisation de la CLD est effectuée à partir de sa forme cétonique comme le montre la figure 21. Or, lorsque la CLD est dans un milieu biologique ou en présence de molécules d'eau, elle est majoritairement sous sa forme gem-diol hydratée. De plus, la synthèse bibliographique indique qu'en présence de méthanol, la CLD se transforme en un hémicétal ([Bichon et al., 2015](#)). Or, le méthanol est

le solvant de travail utilisé dans nos travaux. Par conséquent, lors de cette réaction *in vitro*, trois formes de la CLD coexisteraient : la forme cétonique, la forme gem-diol et la forme hémicétal (Figure 22). L'hypothèse d'obtention d'une pente linéaire à l'aide d'un milieu avec 5 % de méthanol serait que cet ajout favoriserait la stabilisation de la forme cétonique, forme qui est réduite par la chlordécone réductase en présence de NADPH, H⁺ en chlordécol.

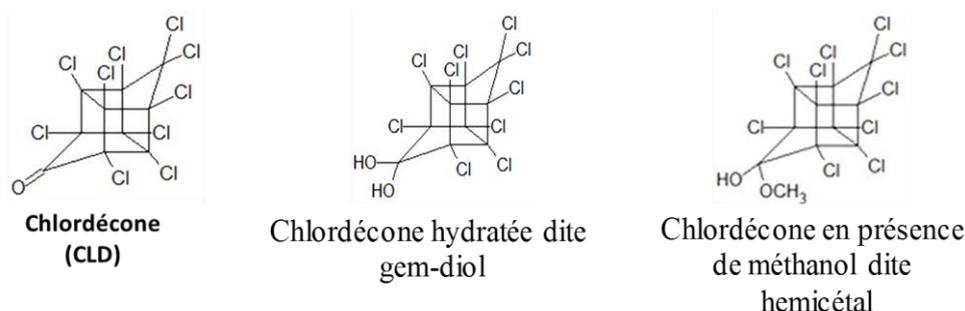


Figure 22 : Récapitulatif des différentes formes existantes de la chlordécone

Par conséquent les conditions optimisées pour la détermination de l'activité spécifique de la chlordécone réductase dans le cytosol de foie de brebis sont :

- 150 μM de NADPH, H⁺
- 500 μg de protéines totales
- 12.5 μM de CLD dans du méthanol
- 5 % de méthanol.

Cependant, à l'aide de cette technique, les différences de pentes mesurées restaient très faibles et il était difficile d'obtenir une répétabilité lors des différentes mesures. Par conséquent, comme préconisé par [Molowa *et al.* \(1986a\)](#) et [\(1986b\)](#), il est indispensable de travailler à l'aide d'une technique plus sensible telle que la spectrométrie de masse afin de mesurer une activité chlordécone réductase.

ii. Dosage de l'activité spécifique chlordécone réductase par LC-MS/MS

(ii-1). Contexte et objectif

Dans la partie 1 de cette thèse a été développée et validée une nouvelle méthode de dosage simultané de la CLD et du CLDOH par LC-MS/MS qui s'appuie sur un dosage à l'aide d'une extraction QuEChERS. Cette méthode mise au point dans la matrice foie a été utilisée dans ces travaux afin de doser l'activité chlordécone réductase au cours du temps. Cette méthode est spécifique du CLDOH permettant son dosage direct et par conséquent une amélioration de la sensibilité dans la mesure de l'activité spécifique. La figure 23 permet de récapituler comment la mesure de l'activité chlordécone réductase a été effectuée à l'aide de la méthode de dosage simultané de la CLD et du CLDOH.

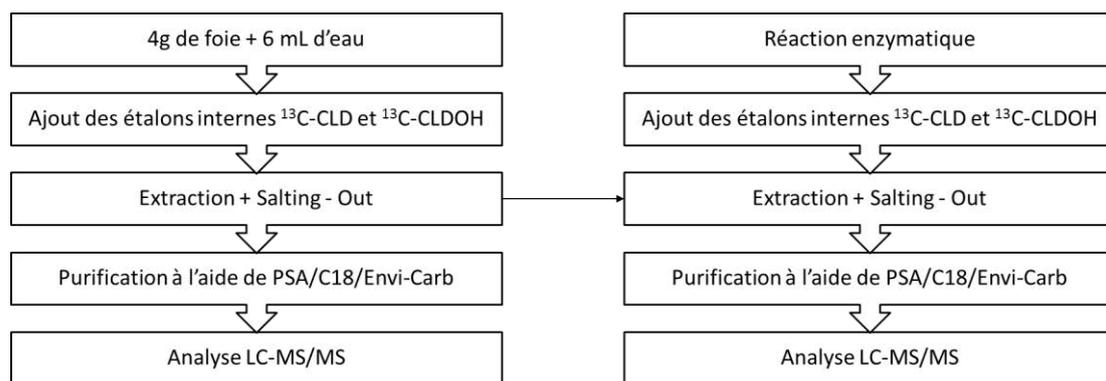


Figure 23 : Application de la méthode de dosage simultané de la CLD et du CLDOH par LC-MS/MS pour la détermination de l'activité spécifique chlordécone réductase

Comme indiqué à l'aide de la figure 23, la prise d'essai de 4g de foie dans 6 mL d'eau utilisée dans la matrice foie a été remplacée par la réaction enzymatique. L'objectif était de suivre l'apparition du chlordécol au cours de temps afin de mesurer l'activité spécifique chlordécone réductase. Afin de quantifier l'apparition du chlordécol au cours du temps, la réaction *in vitro* qui avait été réalisée lors des dosages spectrophotométriques a été effectuée dans les mêmes conditions optimisées au préalable. Cependant, les dosages spectrophotométriques s'effectuaient à l'aide d'un volume final de 800 μ L. Par conséquent, afin de disposer d'un volume suffisant pour réaliser les extractions, les volumes de CLD, NADPH, H^+ et de cytosol ont été multipliés par 10.

(ii-2). Mesure de l'activité spécifique dans un foie de brebis

Dans un premier temps, il était nécessaire de vérifier que l'application de la méthode de dosage simultané de la CLD et du CLDOH à la mesure de l'activité spécifique permettait bien de déterminer une activité chlordécone réductase : c'est-à-dire obtenir une pente linéaire d'apparition du CLDOH qui permettrait une détermination de l'activité spécifique. Par conséquent, comme indiqué en (ii-1), la réaction *in vitro* a été réalisée à l'aide de conditions optimisées par spectrophotométrie à 0 min (sans ajouter de CLD), 2 min, 5 min et 10 min. Chacun des points a été réalisé en double afin de s'assurer de la répétabilité des mesures. A l'aide des différents temps testés, il a été possible d'observer l'apparition du CLDOH au cours du temps. Ce premier résultat confirme que la brebis est capable de réaliser la réaction de métabolisation de la CLD. La figure 24 permet de visualiser le chromatogramme et les transitions MRM de la CLD, du CLDOH et leurs étalons internes respectifs à 0 min (sans ajout de CLD). Cette analyse sert de contrôle et permet de vérifier que le cytosol ne contient pas de CLD ou de CLDOH avant de réaliser la réaction *in vitro*. La figure 25 permet de suivre la transition MRM du CLDOH aux temps 2, 5 et 10 min de la réaction *in vitro*. Les analyses à 0, 2, 5 et 10 min ont mis en évidence l'apparition du CLDOH (aux temps de rétention 10.41-10.51 min) au cours du temps et ont permis de quantifier les concentrations de CLDOH pour chacun des temps (Figure 26).

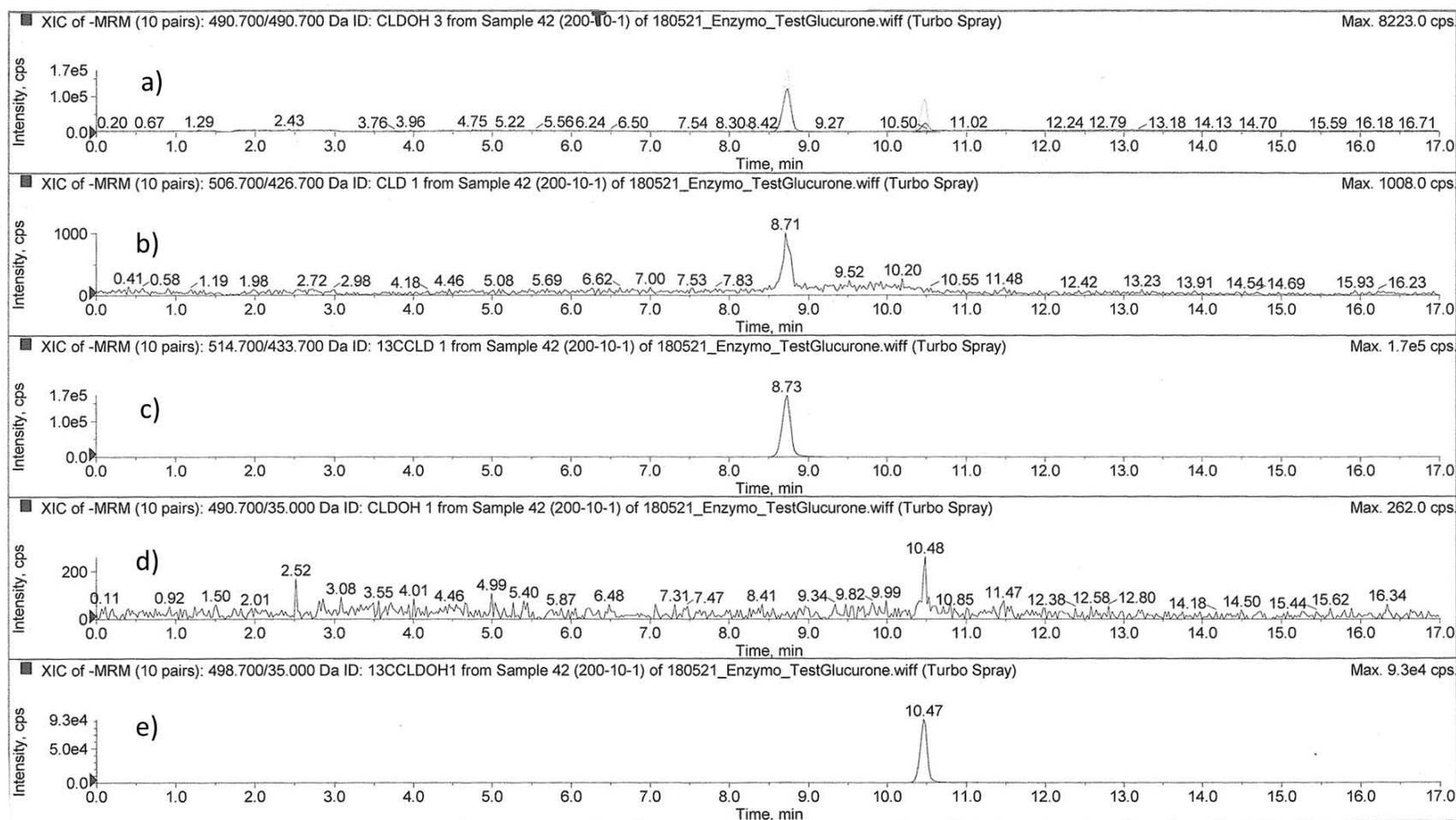


Figure 24 : Dosage LC-MS/MS du cytosol de foie de brebis sans ajout de CLD pour réaliser la réaction *in vitro*
a) chromatogramme obtenu à l'issue de l'injection, b) transition MRM de la chlordécone, c) transition MRM du 13C-CLD,
d) transition MRM du chlordécol et e) transition MRM du 13C-CLDOH

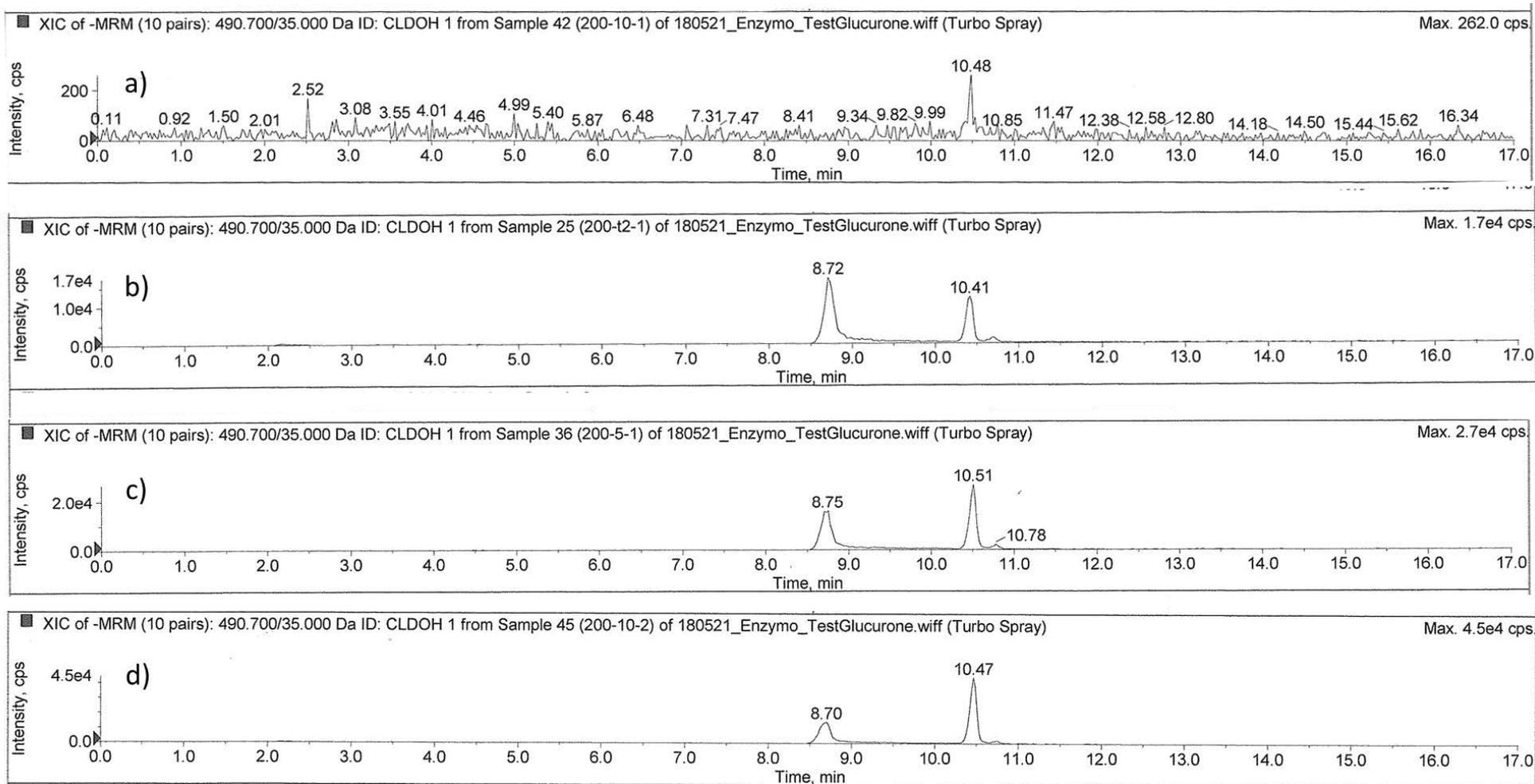


Figure 25 : Suivi de la transition MRM CLDOH montrant l'apparition du CLDOH au cours du temps
a) transition MRM du chlordécol après 0 min de réaction, b) transition MRM du chlordécol après 2 min de réaction, c) transition MRM du chlordécol après 5 min de réaction d) transition MRM du chlordécol après 10 min de réaction

La courbe reliant les concentrations de CLDOH apparues au cours du temps est présentée à l'aide de la figure 26.

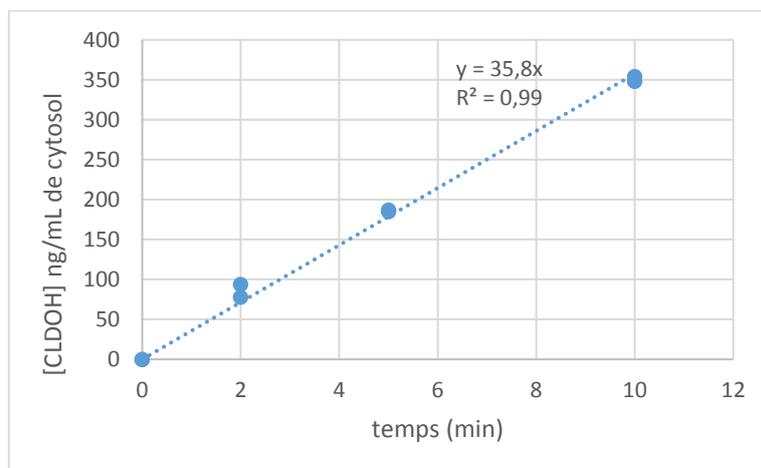


Figure 26 : Courbe représentant la concentration de CLDOH apparue lors de la réaction enzymatique en fonction du temps dans le cytosol de foie de brebis

Comme l'illustre la figure 26, une relation linéaire entre la concentration de CLDOH produite lors de la réaction enzymatique en fonction du temps est observée. A l'aide de la pente de cette droite, de la quantité de protéine présente dans le cytosol analysé et de la masse molaire du chlordécol, il a été possible de retrouver une valeur d'activité spécifique chlordécone réductase (CDR) de 11 pmol CLDOH⁻¹ min⁻¹ mg⁻¹ de protéines. Ce test de mesure de l'activité spécifique enzymatique a été réalisée de la même manière dans deux autres foies de brebis provenant d'une même expérimentation réalisée à l'UR AFPA. Les valeurs d'activités enzymatiques spécifiques chlordécone réductase retrouvées étaient de 5 et 7 pmol CLDOH⁻¹ min⁻¹ mg⁻¹ de protéines.

Activité spécifique CDR (pmol. min⁻¹ mg⁻¹ protéines totales)

$$= \frac{\text{Pente de CLDOH apparue au cours du temps (pg/ min dans } x \text{ mL de cytosol)}}{\text{nombre de protéines totales dans } x \text{ mL de cytosol (mg)} \times \text{masse molaire du CLDOH } \left(\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right)}$$

(ii-3). Mesure de l'activité spécifique chlordécone réductase dans des foies de différentes espèces

Afin de confirmer l'activité chlordécone réductase chez le porc, la perche et le canard, la mesure de l'activité spécifique chlordécone réductase a été réalisée aux temps 0 (sans ajout de CLD), 2, 5 et 10 min comme effectué chez la brebis. A l'issue des analyses pour ces trois espèces, il a été nécessaire de concentrer les extraits injectés par LC-MS/MS car les concentrations retrouvées de CLDOH étaient inférieures à la LQ de la méthode de dosage. Après avoir concentré les échantillons (facteur 3 de concentration), il a été possible de quantifier le CLDOH pour les 3 espèces testées aux temps 2, 5 et 10 min. Cependant, pour la perche et le canard, les activités mesurées sont très faibles : il n'a pas été possible

d'obtenir une pente linéaire d'apparition du CLDOH en fonction du temps et par conséquent les activités spécifiques n'ont pas été déterminées. Chez le porc, il a été possible de déterminer une activité spécifique chlordécone réductase de $2 \text{ pmol CLDOH}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de protéines et la courbe de concentration du CLDOH en fonction du temps est présentée sur la figure 27.

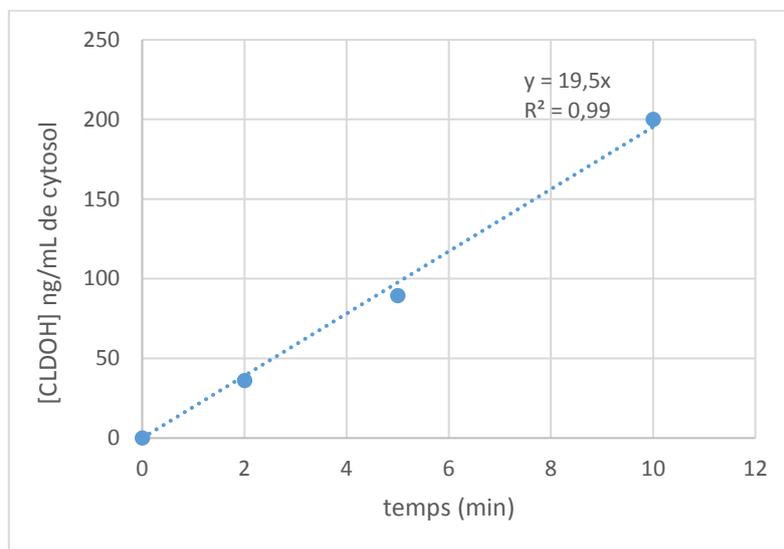


Figure 27 : Courbe représentant la concentration de CLDOH apparue lors de la réaction enzymatique en fonction du temps dans le cytosol de foie de porc

4. Discussion

Ces travaux sur la métabolisation hépatique de la chlordécone ont permis d'identifier par Western-Blot l'AKR1C4, responsable de la métabolisation de la CLD chez la perche, le porc, le canard, la brebis et le chevreau. De plus, il a été possible de doser l'apparition du chlordécol chez la brebis, la perche, le canard et le porc, à l'aide de la réaction *in vitro* de métabolisation de la CLD. Cependant, une activité chlordécone réductase spécifique n'a pu être mesurée que chez la brebis et le porc. En effet, pour la perche et le canard, les courbes d'apparition du CLDOH obtenues au cours du temps n'étaient pas linéaires. Cependant il est possible de conclure que la chlordécone réductase est active chez ces espèces étant donné que du CLDOH est apparu. Les valeurs obtenues d'activités spécifiques chlordécone réductase calculées par mg de protéines totales chez la brebis et le porc sont cohérentes avec l'intensité des bandes obtenues par Western-Blot indiquant que chez le porc, la réaction de métabolisation de la CLD est plus lente en raison d'une quantité d'enzyme moins importante. Des activités spécifiques avaient été déterminées chez l'Homme, la gerbille et le lapin (Molowa *et al.*, 1986b). Des différences d'activités spécifiques entre les espèces (pouvant aller jusqu'à un facteur 2 entre les activités mesurées chez l'Homme et la gerbille) étaient visibles. Ces différences d'activités spécifiques suggèrent que ces espèces n'élimineront pas la CLD à la même vitesse. Dans ces travaux de thèse, les résultats obtenus chez la brebis et le porc seraient à confirmer en comparant les activités spécifiques d'un plus grand nombre d'animaux mais

aussi en déterminant les vitesses d'élimination de la CLD chez ces espèces à l'aide par exemple des temps de demi-vies d'élimination sanguine de la molécule. Dans les travaux de [Molowa *et al.*, \(1986b\)](#), les auteurs avaient aussi mesuré l'effet de l'induction du substrat chlordécone sur la valeur de l'activité spécifique. Les activités spécifiques enzymatiques de 4 gerbilles, ayant reçues 20 mg kg⁻¹ de CLD par voie intrapéritonéale, dites traitées et 4 gerbilles, n'ayant pas reçues de CLD, dites non traitées ont été comparées. L'activité spécifique chlordécone réductase retrouvée chez les animaux traités était 38 % fois supérieure à celles des animaux non traités. Ainsi, l'enzyme serait induite par son substrat. Il sera intéressant de vérifier si cela s'applique aussi aux animaux d'élevage.

Ces travaux ont permis d'identifier l'AKR1C4 chez la perche, le porc, le canard, la brebis et le chevreau et de mesurer des activités spécifiques enzymatiques chez la brebis et le porc. Ces travaux permettent donc de conclure que les animaux d'élevage métabolisent la CLD en CLDOH et il serait intéressant à partir d'un nombre plus important d'animaux de comparer les activités spécifiques chlordécone réductase. En effet, des différences d'activité pourraient entraîner des différences en termes d'élimination de la molécule et permettrait de mieux comprendre comment s'élimine la molécule et de voir si cette activité pourrait expliquer les différences inter-individuelles et inter-espèces de vitesse d'élimination de la CLD.

Le premier chapitre de cette thèse présente les résultats des développements méthodologiques pour les études toxicocinétiques.

Dans la partie 1, des méthodes de dosages de la chlordécone et de ses métabolites ont été développées dans le foie, le tissu gras, le sérum, les urines, les fèces et la bile des animaux. Les développements dans le foie, les urines et les fèces ont fait l'objet d'une validation en s'appuyant sur le guide SANTE et la norme V03-110. Ces méthodes s'appuient sur une extraction QuEChERS, une analyse par LC-MS/MS et l'utilisation d'étalons internes isotopiques. Ces sont des méthodes rapides, fiables et précises qui seront un outil pour la réalisation des études toxicocinétiques de cette thèse chez la brebis mais qui serviront aussi pour des futurs projets portant sur la chlordécone ou encore des plans de surveillance. La figure 28 présente le récapitulatif des travaux de développement analytique effectués dans les différentes matrices animales.

Dans la partie 2, des méthodes d'identification de la chlordécone réductase et de la mesure de son activité spécifique ont été adaptées pour le suivi enzymatique chez la brebis. La méthode de détermination de l'activité spécifique s'appuie sur la méthode développée et validée pour l'analyse de la CLD et du CLDOH dans les foies de brebis. A l'aide de ces méthodes, un résultat important a été de plus démontré : la brebis métabolise la chlordécone en chlordécol. Cette métabolisation a été démontrée (1) au niveau tissulaire à l'aide de la quantification de chlordécol dans les foies et (2) au niveau enzymatique à l'aide de l'identification de l'AKR1C4 et de la mesure d'activités spécifiques chlordécone réductase. De plus, l'application de ces méthodes à d'autres espèces animales a permis d'élargir ces travaux de thèse et de comparer le métabolisme de la chlordécone à des espèces animales présentes aux Antilles Françaises. La figure 29 présente le schéma complété de l'élimination de la chlordécone chez la brebis avec les données acquises en termes de métabolisme.

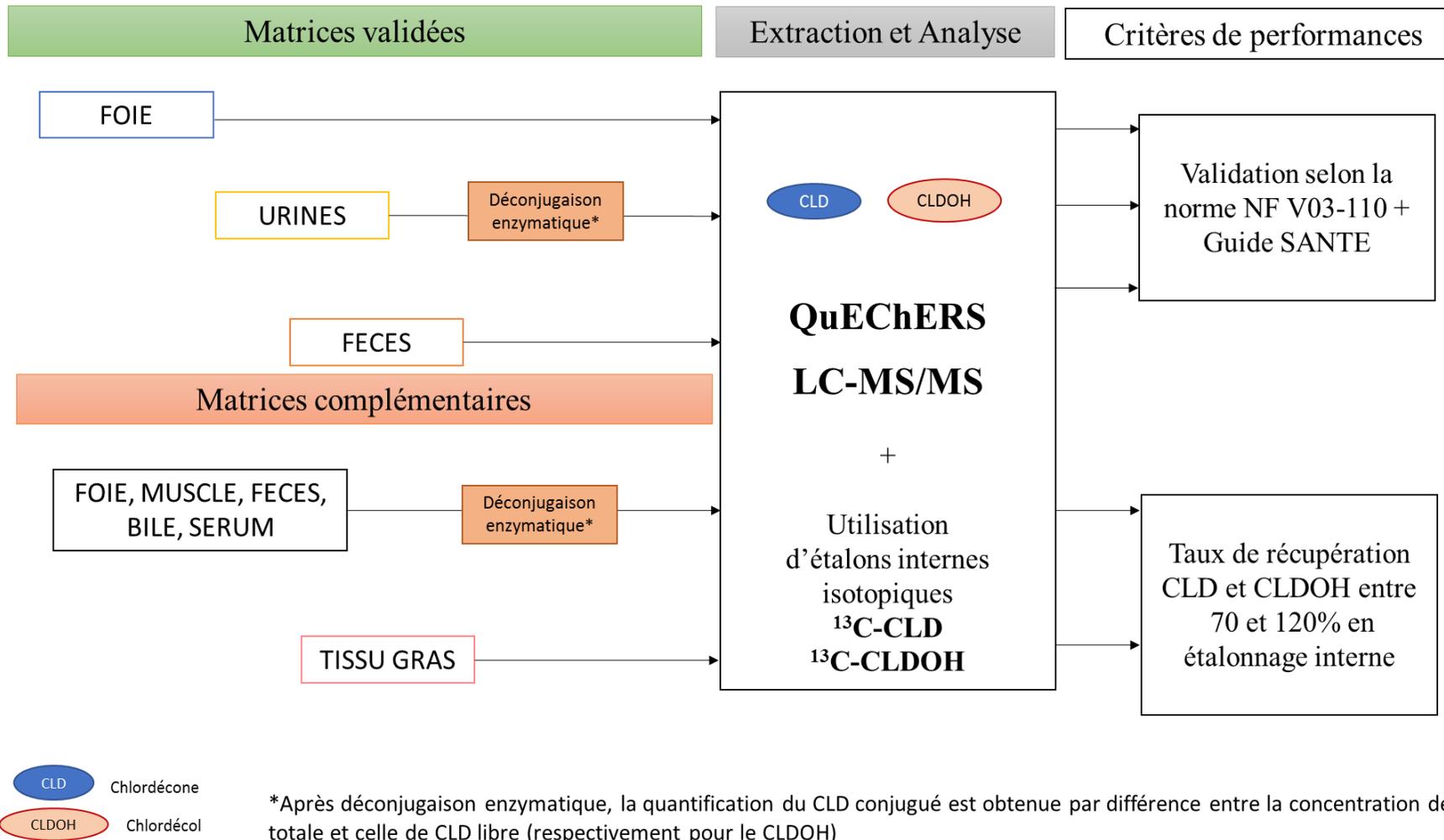


Figure 28 : Récapitulatif des travaux de développement analytique effectués dans les différentes matrices animales

Espèce : Polygastrique

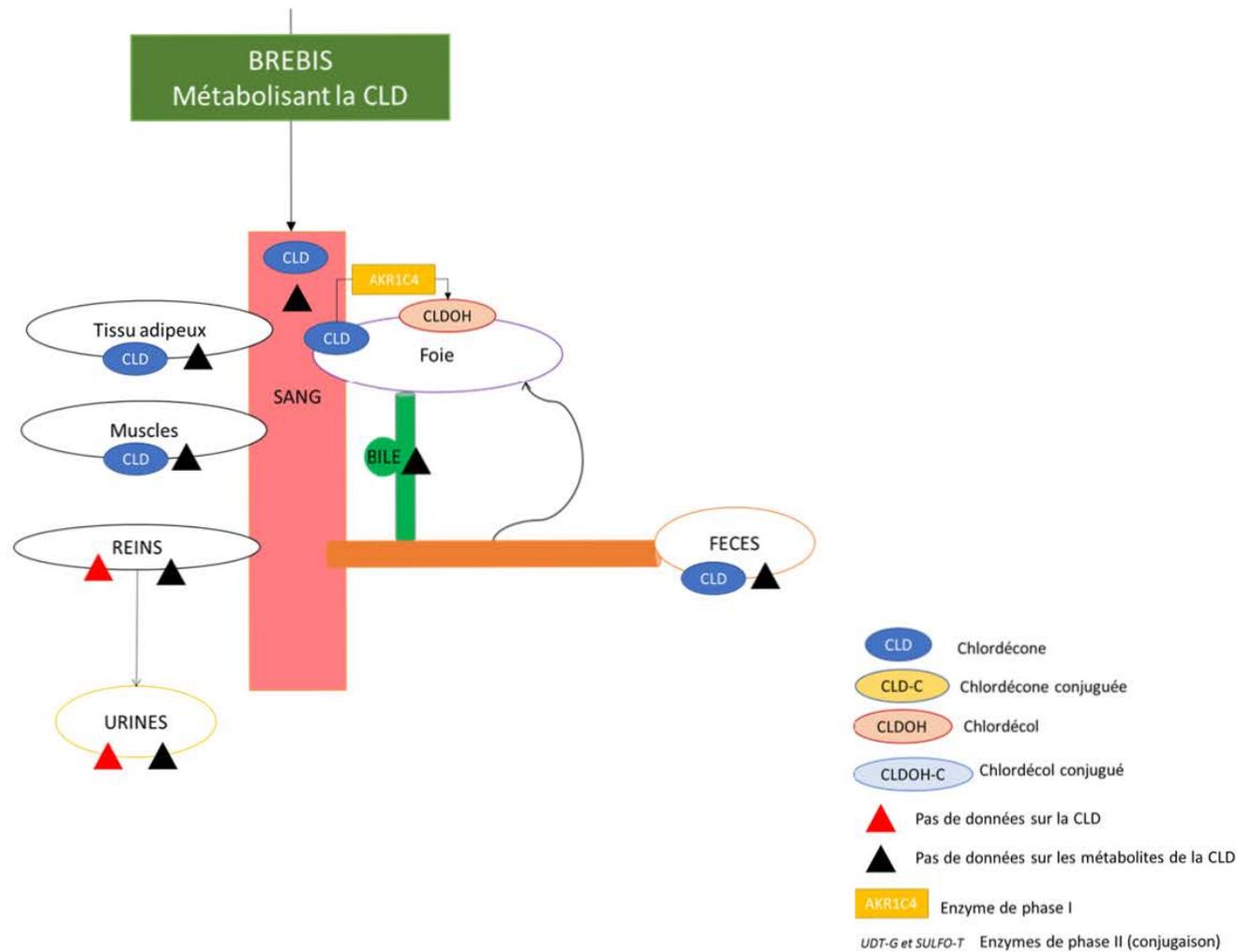
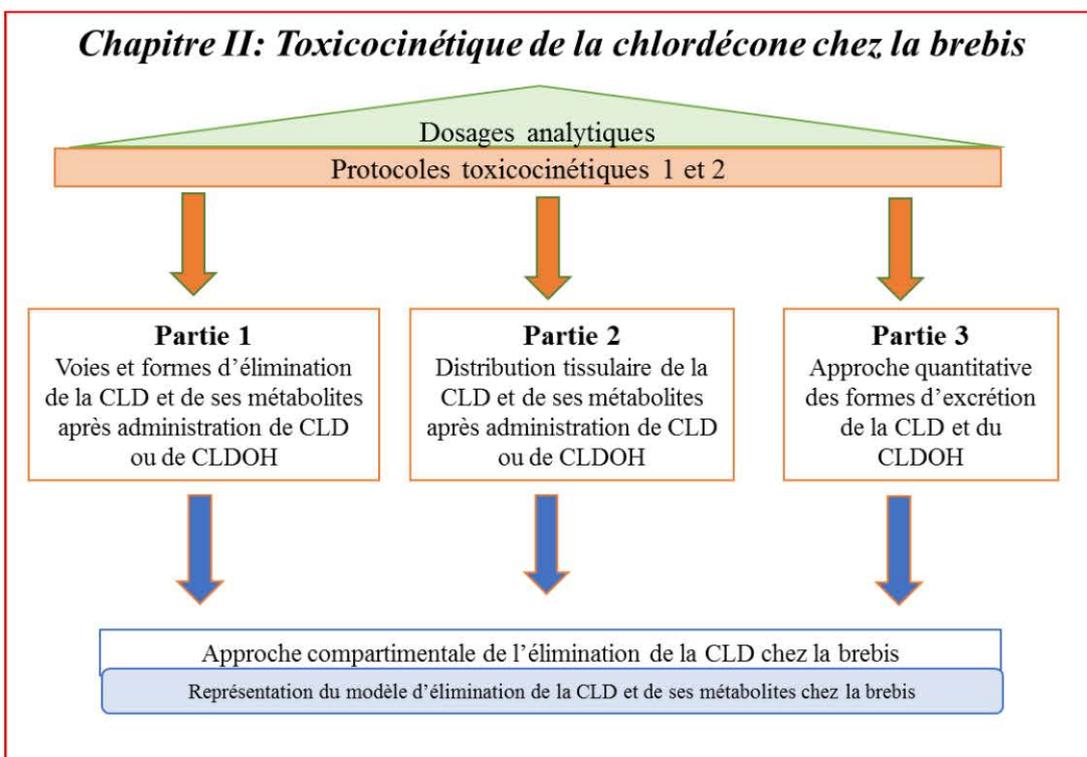
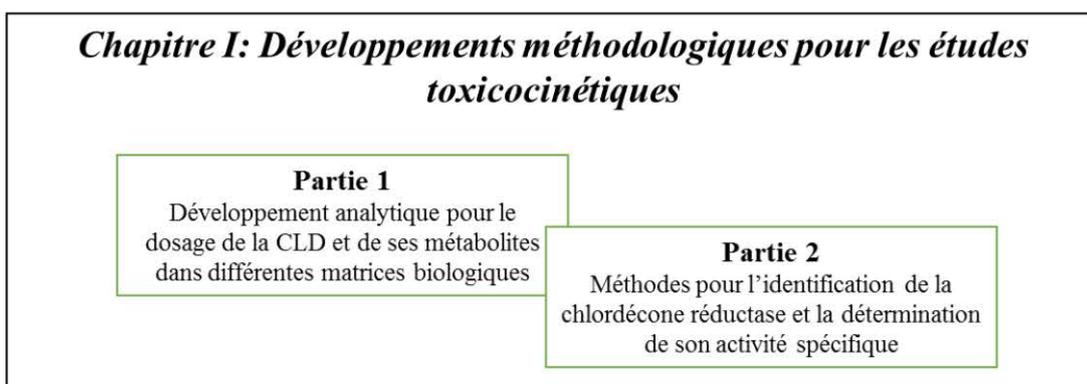
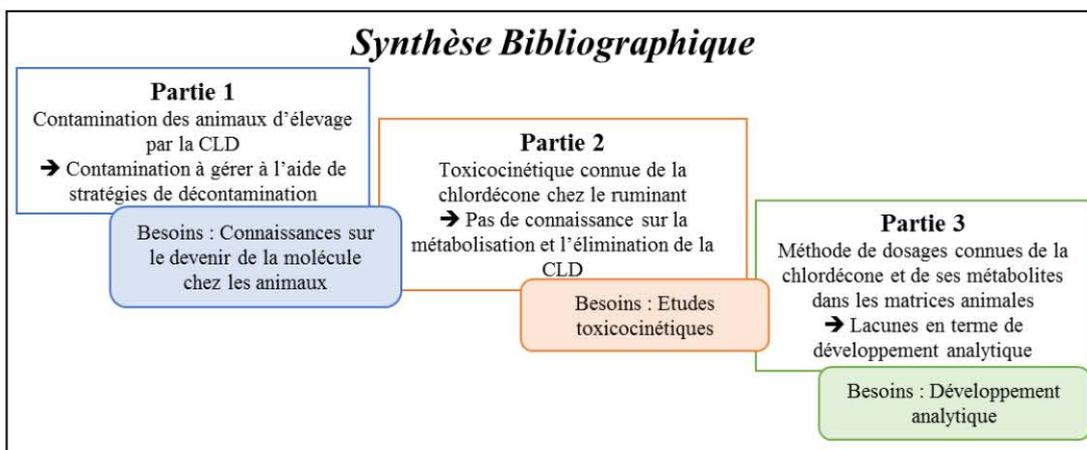


Figure 29 : Schéma d'élimination de la chlordécone chez la brebis complété à l'aide du chapitre 1

4

Chapitre 2 : Toxicocinétique de la chlordécone chez la brebis

Introduction Générale
Comment s'élimine la chlordécone (CLD) chez la brebis ?



Discussion générale et Perspectives

Conclusion générale

La synthèse bibliographique a mis en évidence des lacunes à combler sur l'élimination de la chlordécone chez la brebis. L'objectif du chapitre 2 est d'étudier la toxicocinétique de la chlordécone chez cette espèce. Cette étude permettra de déterminer les paramètres toxicocinétiques de distribution et d'élimination de la molécule qui seront utiles (1) à court terme pour la proposition de stratégies de décontamination animales et (2) à plus long terme à la construction d'un modèle toxicocinétique de la chlordécone chez l'ovin. Afin de répondre aux objectifs fixés, deux protocoles toxicocinétiques ont été dimensionnés autour de l'élimination de la chlordécone : (1) un premier protocole permettant une exploration globale de l'élimination (voies sanguine, urinaire et fécale) et (2) un second protocole présentant une exploration plus fine de l'élimination (distribution et transfert des molécules chez la brebis). Afin de dimensionner les protocoles toxicocinétiques de ces travaux, des hypothèses de travail ont été définies à partir de la synthèse bibliographique et par rapport aux manquements sur l'élimination de la molécule. L'élimination de la CLD n'a pas encore été étudiée chez la brebis, ni l'effet de la dose administrée de CLD sur l'élimination sanguine. Aux Antilles Françaises, les concentrations du sol sont hétérogènes. En effet, la persistance de la CLD dépend de la nature des sols et des concentrations inférieures à 0,005 ou supérieures à 1 mg kg⁻¹ de sol sec peuvent être retrouvées. Par conséquent, une des hypothèses à montrer est que l'élimination de la CLD ne dépend pas de la dose ingérée par l'animal. La synthèse bibliographique indique que la voie majeure d'élimination de la CLD s'effectue via les fèces sous forme de CLD et de CLDOH. Le chapitre 1 a démontré que la brebis métabolise la chlordécone. Par conséquent, il est possible de faire l'hypothèse que la voie majeure d'élimination de la chlordécone chez la brebis est la voie fécale et que les formes attendues sont la CLD et le CLDOH. Par conséquent, la voie urinaire devrait être minoritaire devant la voie fécale. Les figures 30 et 31 présentent les formes hypothétiques attendues dans les urines et les fèces. Les données de distribution de la CLD dans les différentes espèces animales montrent que la CLD se distribue majoritairement dans le foie, puis dans le tissu gras et enfin dans le muscle. L'hypothèse dans ces travaux est qu'une distribution tissulaire similaire devrait être obtenue chez la brebis. Les figures 30 et 31 présentent les formes hypothétiques attendues dans le foie, le muscle et le tissu gras. À l'aide de la synthèse bibliographique, il a été possible d'extraire des données sur les formes distribuées et éliminées connues de la CLD. L'excrétion biliaire est un phénomène important dans l'élimination de la molécule. Le chlordécol-conjugué a été quantifié dans la bile de porc, de gerbille et d'Homme. Cette matrice contient les plus fortes concentrations de métabolites conjugués. Ainsi, une première hypothèse est que la réaction de métabolisation de la CLD serait fortement déplacée vers la formation du métabolite CLDOH-conjugué. La figure 30 présente la première hypothèse de ces travaux. De plus, la synthèse bibliographique a montré que chez la gerbille, le CLDOH pouvait être réoxydé en CLD. Ainsi, une deuxième hypothèse est que la réaction de métabolisation de la CLD serait réversible chez la brebis. La figure 31 présente la deuxième hypothèse de ces travaux. Enfin, dans la synthèse bibliographique, du CLDOH sous forme libre a été quantifié dans les fèces alors

que dans l'organisme ce métabolite n'est quasiment jamais quantifié sous sa forme libre : le CLDOH est essentiellement présent dans la bile sous sa forme conjuguée. La synthèse bibliographique indique que l'apparition du CLDOH dans les fèces serait due à la présence d'enzymes intestinales de déconjugaison. La troisième hypothèse de ces travaux est donc que des déconjugaisons soient possibles dans l'intestin de la brebis. Les figures 30 et 31 présentent la dernière hypothèse de ces travaux.

Ce chapitre 2 s'articule autour de 2 parties : dans la première partie les dispositifs expérimentaux mis en place seront présentés et dans la deuxième partie, les résultats de cette étude seront détaillés. A l'issue de ces travaux, un premier modèle toxicocinétique chez la brebis sera présenté puis une conclusion globale sur l'élimination de la chlordécone sera faite.

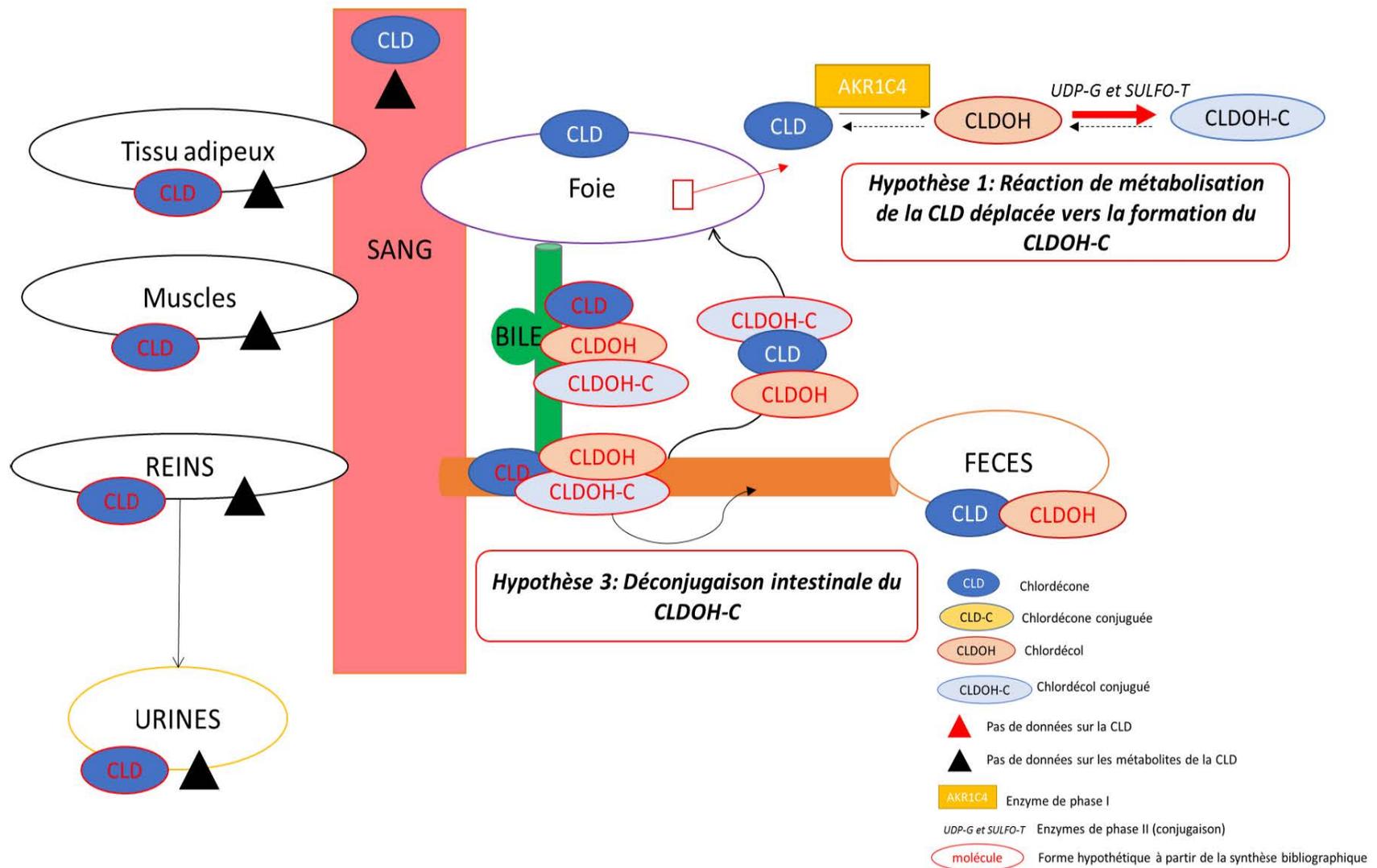


Figure 30 : Présentation des hypothèses pour les travaux de thèse (Hypothèses 1 et 2)

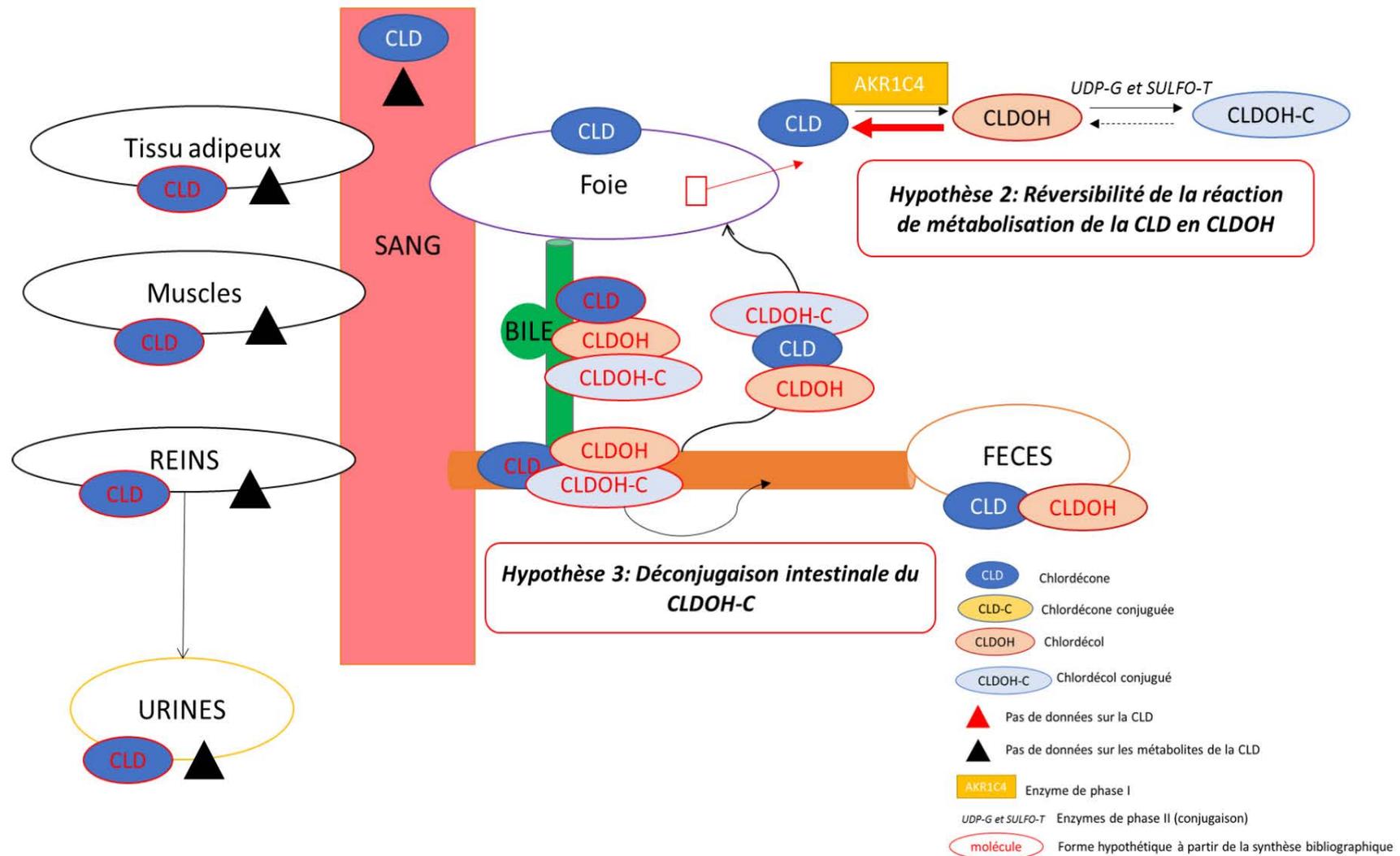


Figure 31 : Présentation des hypothèses pour les travaux de thèse (Hypothèses 2 et 3)

MATERIEL ET METHODES

1. Schémas expérimentaux

i. Protocole 1

La toxicocinétique de la chlordécone (CLD) chez la brebis a été étudiée après administration par voie intraveineuse (i.v) de CLD aux doses 0,04 ; 0,2 et 1 mg kg⁻¹ Poids Vif (PV). Afin d'obtenir des données sur l'élimination de la CLD, des prélèvements sanguins ont été effectués lors de la période de décontamination des animaux. Cette étude a été réalisée à l'aide de 3 lots de 5 adultes (*Ovis aries*) non lactantes, non gestantes et à des stades physiologiques proches. Ce premier protocole est détaillé sur la figure 32.

Les objectifs étaient de déterminer chez la brebis :

- (1) Les paramètres toxicocinétiques d'élimination de la CLD
- (2) L'effet de la dose d'exposition de la CLD sur sa cinétique d'élimination
- (3) Les formes d'élimination de la CLD
- (4) Les voies d'élimination de la CLD
- (5) Les quantités de CLD éliminées au bout d'un temps t de décontamination

Le schéma expérimental, la procédure expérimentale, le choix des doses, le protocole d'administration de la CLD ainsi que les temps de prélèvements sanguins aux 3 lots de 5 brebis sont présentés dans les parties 1.1 et 1.2 du Matériel et Méthodes du manuscrit de l'article 3 intitulé : « Linear pharmacokinetic of chlordecone in ewe's serum » et soumis dans *Chemosphere*.

Afin de collecter des données d'élimination urinaires et fécales, des recueils d'urines et de fèces ont été effectués sur les brebis ayant reçues une dose i.v de 1 mg kg⁻¹ PV de CLD de t = 0 (avant administration de la CLD) à t = 84 jours. Les urines ont été collectées aux intervalles de temps : 0-2, 2-4, 4-7, 7-25, 25-28, 28-34h et aux jours 3, 7, 36 et 84 après i.v de CLD. Aux jours 3, 7, 36, et 84, la période de collecte urinaire était de 8h/24h. Les fèces ont été recueillies à : 0, 1, 3, 7, 36 et 84 jours après i.v de CLD. Comme pour les urines, la période de collecte fécale était de 8h/24h sauf aux jours 0 et 1 où la totalité des fèces a été récoltée 24h/24h.

NB : Nous appelons jour « 0 » le 1^{er} jour de contamination lorsque cela ne fait pas encore un jour (24h) que les brebis ont reçu l'injection.

ii. Protocole 2

Un second protocole toxicocinétique a été mis en place chez la brebis afin d'apporter des éléments de compréhension sur le devenir de la CLD (distribution) et particulièrement les mécanismes d'élimination de la molécule. Ce protocole a été réalisé à l'aide de 3 lots de 3 brebis adultes (*Ovis aries*) non lactantes,

non gestantes et à des stades physiologiques proches. Une dose de 1 mg kg^{-1} PV de CLDOH a été administrée à 2 lots de 3 brebis (lot 1 et 2) et une dose de 1 mg kg^{-1} PV de CLD a été administrée au 3^{ème} lot (lot 3). La figure 33 résume le protocole réalisé.

Les objectifs étaient de déterminer chez la brebis :

- (1) La distribution tissulaire de la CLD et de ses métabolites après i.v de CLD ou de CLDOH
- (2) La réaction métabolique majoritairement réalisée chez la brebis : réversibilité du CLDOH ou déplacement de l'équilibre de la réaction vers la formation du CLDOH-conjugué
- (3) La répartition depuis le foie jusqu'au fèces de la CLD et de ses métabolites après i.v de CLD ou de CLDOH. Cela permettra de vérifier si des déconjugaisons sont possibles dans l'intestin de la brebis
- (4) Les paramètres toxicocinétiques d'élimination du CLDOH
- (5) Les formes et les voies d'élimination du CLDOH
- (6) Les quantités de CLDOH éliminées au bout d'un temps t de décontamination

Afin de collecter des données d'élimination du CLDOH, du sang, des urines et des fèces ont été prélevés de $t = 0$ (avant administration de CLDOH) à $t = 72\text{h}$ sur le lot 2 de brebis. Le sang a été collecté aux temps : 0, 30 min, 1, 3, 8, 12, 24h, 48h et 72h. Les urines et les fèces ont été collectés aux intervalles de temps 4-24, 24-45, 45-58 et 58-72h. Les brebis du lot 1 ont été abattues 24h après injection et celles des lots 2 et 3 après 72h. La bile, les organes et les contenus intestinaux ont été ensuite prélevés.

2. Prélèvements et traitements des échantillons

i. Sang

Les échantillons de sang ont été prélevés puis préparés comme indiqué dans la partie 1.2 de l'article 3 « Linear toxicokinetic of chlordecone in ewe's serum ».

ii. Urines

Les urines ont été prélevées dans des flacons ambrés à l'aide d'une sonde de foley et d'une seringue de 50 mL. Après collecte, les urines ont été pesées, filtrées puis aliquotées dans 3 flacons ambrés de 50 mL. Les aliquots ont ensuite été congelés et conservés à -20°C avant analyse.

iii. Fèces

Les fèces ont été prélevées à l'aide de couches en tissu régulièrement changées. A l'issue des collectes, les fèces sont pesées, lyophilisées puis broyées. A l'issue du broyage, chaque échantillon est conservé dans 3 flacons ambrés de 50 mL à température ambiante avant analyse.

iv. Bile

La bile a été prélevée depuis la vésicule biliaire à l'aide d'une seringue puis a été placée dans des tubes en verre et mis à congeler à -20°C avant analyse.

v. Organes et contenus intestinaux

Les organes (foie, tissu gras et hampe) et les contenus intestinaux ont été prélevés et pesés. Pour les lots 1 et 2, les contenus intestinaux du jéjunum (début et fin), du colon et du rectum ont été prélevés. Pour le lot 3, les contenus intestinaux du colon et du rectum ont été prélevés. Par la suite tous les échantillons (hormis le tissu gras) ont été lyophilisés puis broyés. A l'issue du broyage, chaque échantillon est conservé dans 3 flacons ambrés de 50 mL à température ambiante avant analyse. Le tissu gras prélevé a été découpé puis conservé dans 3 flacons ambrés de 50 mL à -20°C avant analyse.

3. Dosage des échantillons

Le dosage des échantillons a été effectué à l'aide des développements analytiques présentés dans le chapitre 1 et comme indiqué sur les figures 32 et 33. Les échantillons de sérum du protocole 1 permettant de vérifier la linéarité de l'élimination sanguine de la CLD chez l'ovine ont été analysés au laboratoire du CART (Liège, Belgique) comme indiqué dans la partie 1.3 de l'article 3 qui suit « Linear toxicokinetic of chlordecone in ewe's serum ».

4. Analyse des données**i. Données sériques**

L'analyse des données sanguines du protocole 1 est précisée dans la partie 1.4 du manuscrit de l'article 3 qui suit « Linear toxicokinetic of chlordecone in ewe's serum ».

L'analyse des données sanguines du protocole 2 a été réalisée à l'aide du logiciel [R Core team, 2017](#). Afin de déterminer les paramètres toxicocinétiques du chlordécol, un modèle monocompartimental a été appliqué (Equation 1). En effet, le chlordécol semble se distribuer rapidement dans l'organisme animal et il n'a donc pas été possible de déterminer le temps de demi-vie de distribution du chlordécol à l'aide de ces travaux.

$$\text{Eq (1) } C(t) = C_0 e^{-K_{10}t}$$

Avec $C(t)$ (ng mL⁻¹) représentant la concentration sérique de CLD au temps t , C_0 (ng mL⁻¹), la concentration extrapolée au temps $t = 0$ et K_{10} (h⁻¹), la constante d'élimination de premier ordre du chlordécol dans le sang. A l'aide de ce modèle, il a été possible de calculer les paramètres toxicocinétiques du chlordécol.

L'aire sous la courbe du temps ($AUC_{0 \rightarrow \infty}$) $t=0$ au temps $t = \infty$, a été calculée à l'aide de l'équation 2 ci-dessous :

$$\text{Eq (2) } AUC_{0 \rightarrow \infty} = C_0 / K_{10}$$

Le temps de demi-vie d'élimination du chlordécol ($t_{1/2\beta \text{ elim}}$) a été calculé à l'aide de l'équation 3 ci-dessous :

$$\text{Eq (3) } t_{1/2\beta \text{ elim}} = \ln(2) / K_{10}$$

La clairance sérique totale (Cl_{tot}) a été obtenue à l'aide de l'équation 4 :

$$\text{Eq (4) } Cl_{\text{tot}} = \text{Dose} / AUC_{0 \rightarrow \infty}$$

Enfin, le volume de distribution (V_c) a été obtenu à l'aide de l'équation 5 :

$$\text{Eq (5) } V_c = Cl_{\text{tot}} / K_{10}$$

Chacun des paramètres a été calculé individuellement pour chacune des brebis ($n=3$). A l'aide de ces paramètres individuels, il a été possible de déterminer la moyenne et l'écart-type de la moyenne pour chacun des paramètres calculés. Afin de comparer les paramètres toxicocinétiques du CLD et du CLDOH, un test de Student a été effectué en considérant la brebis comme une unité expérimentale. Une différence est significative entre deux paramètres lorsque la p-value retrouvée est inférieure à 0,05.

ii. Données urinaires et fécales

L'analyse des données fécales a permis de déterminer le pourcentage de la dose administrée de CLD ou de CLDOH éliminé via les fèces pour chacune des brebis. Concernant les données urinaires, il n'a pas été possible de déterminer ces pourcentages à cause de difficultés de prélèvement. Le pourcentage de la dose excrété de la molécule via les fèces est déterminé à l'aide du rapport entre la clairance fécale et la clairance sérique de la molécule (compartiment de référence). La clairance exprime la capacité d'un organe (ou de l'organisme) à éliminer un analyte (Toutain and Bousquet-Melou, 2007a). L'équation 6 permet de résumer le calcul de pourcentage de molécules excrétées respectivement via les fèces.

$$\text{Eq (6) } \% \text{ dose excrété de la molécule via les fèces} = \frac{Cl_{\text{fécale de la molécule}}}{Cl_{\text{sérique de la molécule}}}$$

La détermination de la clairance fécale est possible à l'aide d'une constante de proportionnalité reliant la vitesse d'élimination de la molécule (i.e l'évolution des quantités excrétées de la molécule dans les fèces sur un intervalle de temps donné) à une concentration sanguine donnée (i.e la concentration de la

molécule dans le sérum au temps moyen de l'intervalle du prélèvement fécal). L'équation permettant de déterminer la clairance est présentée par l'équation 7.

$$\text{Eq (7)} \frac{dQ_{\text{molécule excrétées via les fèces}}}{dT} = Cl_{\text{fécale}} * [\text{molécule}]_{\text{sérique}}$$

Avec $\frac{dQ_{\text{molécule excrétées}}}{dT}$ (ng h⁻¹) : le taux d'excrétion fécal ; [molécule]_{sérique} (ng mL⁻¹) : la concentration de la molécule dans le sérum correspondante au temps moyen de l'intervalle du prélèvement fécal ; et $Cl_{\text{fécale}}$ (mL h⁻¹) : la clairance fécale

- Calculs des pourcentages de CLD et de CLDOH excrétés après i.v de CLD

Pour chacune des brebis et après administration de CLD, l'évolution des quantités excrétées de CLD dans les fèces a été tracée en fonction des concentrations de la molécule dans le sérum.

La relation obtenue pour la détermination de la clairance fécale de la CLD était linéaire et celle-ci est résumée à l'aide de l'équation 8 :

$$\text{Eq (8)} \frac{dQ_{\text{CLD fécale}}}{dT} = Cl_{\text{fécale}} * [\text{CLD}]_{\text{sérique}}$$

Avec $\frac{dQ_{\text{CLD fécale}}}{dT}$ (ng h⁻¹) représentant le taux d'excrétion fécal de la CLD, [CLD]_{sérique} (ng mL⁻¹) : la concentration de la CLD dans le sérum correspondant au temps moyen de l'intervalle de prélèvement fécale et $Cl_{\text{fécale}}$ (mL h⁻¹) : la clairance fécale de la CLD.

Pour chacune des 5 brebis du protocole 1, les clairances fécales de la CLD ont été déterminées. Puis une valeur moyenne et un écart type de la moyenne ont été calculés à partir de ces données individuelles. A l'aide du ratio entre la moyenne des clairances fécales et sériques de la CLD, il a été possible de déterminer le pourcentage de CLD éliminé dans les fèces après administration de CLD.

Pour chacune des brebis et après administration de CLD, l'évolution des quantités excrétées de CLDOH-t dans les fèces a été tracée en fonction des concentrations de la molécule dans le sérum.

Après administration de CLD, la relation obtenue pour la détermination de la clairance fécale du CLDOH-t était linéaire et celle-ci est résumée à l'aide de l'équation 9 :

$$\text{Eq (9)} \frac{dQ_{\text{CLDOH-t}}^{\text{fécale}}}{dT} = Cl_{\text{fécale}} * [\text{CLDOH-t}]_{\text{sérique}}$$

Avec $\frac{dQ_{\text{CLDOH-t}}^{\text{fécale}}}{dT}$ (ng h⁻¹) représentant le taux d'excrétion fécale du CLDOH-t, $[\text{CLDOH-t}]_{\text{sérique}}$ (ng mL⁻¹) : la concentration de CLDOH-t dans le sérum correspondant au temps moyen de l'intervalle de prélèvement fécale et $Cl_{\text{fécale}}$ (mL h⁻¹) : la clairance fécale du CLDOH-t.

Pour chacune des 5 brebis du protocole 1, les clairances fécales du CLDOH-t ont été déterminées. Puis une valeur moyenne et un écart type de la moyenne ont été calculés à partir de ces données individuelles.

Concernant le CLDOH, le calcul du pourcentage de CLDOH éliminé dans les fèces après administration de CLDOH a été effectué comme indiqué par l'équation 10 :

$$\text{Eq (10) \% de CLDOH éliminé dans les fèces après i.v de CLD} = P \times \frac{Cl_{\text{fécale CLDOH-t}}}{Cl_{\text{sérique CLDOH-t}}}$$

Avec P représentant la part restante de CLD à éliminer et calculée en faisant la différence entre 1 et la part de CLD éliminée dans les fèces ; $Cl_{\text{fécale CLDOH-t}}$ (mL h⁻¹) : la clairance fécale du CLDOH-t et $Cl_{\text{sérique CLDOH-t}}$ (mL h⁻¹) : la clairance sérique du CLDOH-t. L'hypothèse permettant d'effectuer le calcul du pourcentage de CLDOH éliminé dans les fèces après i.v de CLD est que la CLD s'élimine exclusivement sous deux formes dans les fèces à savoir sous forme de CLD et de CLDOH.

- Calculs du pourcentage de CLDOH excrétés après i.v de CLDOH

Après administration de CLDOH, la relation obtenue pour la détermination de la clairance fécale était de type Michaelis-Menten et est résumée à l'aide de l'équation 11 (Toutain and Bousquet-Melou, 2007a) :

$$\text{Eq (11)} \frac{dQ_{\text{CLDOH-t}}^{\text{fèces}}}{dT} = \frac{V_{\text{max}}}{K_M + [\text{CLDOH-t}]_{\text{sérique}}} [\text{CLDOH-t}]_{\text{sérique}}$$

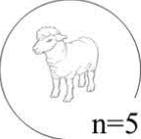
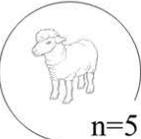
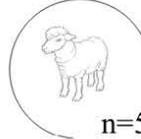
Avec $\frac{dQ_{\text{CLDOH-t}}^{\text{fèces}}}{dT}$ (ng h⁻¹) représentant le taux d'excrétion fécale du CLDOH-t, V_{max} (ng h⁻¹) la capacité maximale du système à éliminer la molécule et K_M (ng mL⁻¹) la concentration correspondant à $V_{\text{max}}/2$.

Le K_M est une mesure de l'affinité de la molécule pour le système d'élimination (par exemple une enzyme)

Pour chacune des 3 brebis du protocole 2, l'évolution du taux d'excrétion fécale du CLDOH-t en fonction de la concentration sérique de CLDOH-t. Après détermination des valeurs de V_{\max} et K_M à l'aide du logiciel [R Core team, 2017](#), les clairances fécales pour chacune des brebis ont été déterminées comme précisé par l'équation 12 et en faisant l'approximation que la valeur du K_M est très élevée par rapport à la valeur de concentration sérique de CLDOH-t et donc en fait en négligeant la concentration sérique :

$$\text{Eq (12) } Cl_{\text{fécale CLDOH-t}} = V_{\max}/K_M$$

Finalement, une valeur moyenne et un écart type de la moyenne ont été calculés à partir de ces données individuelles. A l'aide du ratio entre la moyenne des clairances fécales et sériques du CLDOH-t, il a été possible de déterminer le pourcentage de CLDOH éliminé dans les fèces après administration de CLDOH.

Protocole 1 TOXICOCINETIQUE DE LA CHLORDECONE		Matrices prélevées	Temps ou intervalles de prélèvement	Dosages analytiques
Période d'adaptation de 14 jours  n=5  n=5  n=5	IV/kg PV Dose unique	Période de décontamination		
	 n=5 0,04 mg CLD	SANG (3 doses)	0, 5, 30 min, 1, 3, 8, 12 h, 1, 3, 7, 15, 22, 29, 36, 44, 57, 71, 84 j	CLD (CART) 8H, 1, 3, 7, 36 et 84 j (dose 1 mg) CLD et ses métabolites (ANSES)
	 n=5 0,2 mg CLD	SANG		
	 n=5 1 mg CLD	SANG URINES FECES	URINES (dose 1 mg)	0-2, 2-4, 4-7, 7-25, 25-28, 28-34h et à 3*, 7*, 36* et 84* j après i.v de CLD
	t= 0j t= 84j	FECES (dose 1 mg)	0-24h, 24-48h, 3*, 7*, 36* et 84* j	CLD et CLDOH (ANSES)

* Temps de collecte de 8h

Figure 32 : Présentation du protocole toxicocinétique 1 réalisé chez la brebis

Protocole 2 <u>COMPREHENSION DE LA TOXICOCINETIQUE DE LA CHLORDECONE</u>		Matrices prélevées	Temps ou intervalles de prélèvement	Dosages analytiques
<p>Période d'adaptation de 14 jours</p> <p>IV/kg PV Dose unique</p> <p>Période de décontamination</p>	<p>Lot 1 n=3 1 mg CLDOH</p> <p>Lot 2 n=3 1 mg CLDOH</p> <p>Lot 3 n=3 1 mg CLD</p> <p>t=0j t=1j t=3j</p>	SANG	0, 30 min, 1, 3, 8, 12, 24h, 48, 72h (IV CLDOH)	<p>CLD et ses métabolites (ANSES)</p>
		URINES, FECES	4-24, 24-45, 45-58, 58-72h (IV CLDOH)	
		<p>BILE (A), ORGANES (A) [Foie, Muscle, Tissu gras] CONTENUS INTESTINAUX (A) IV CLD [Colon, rectum] IV CLDOH [début et fin du jéjunum, Colon, Rectum]</p>	<p>24h (IV CLD) 24h et 72h (IV CLDOH)</p>	

* (A) Abattage

Figure 33 : Présentation du protocole toxicocinétique 2 réalisé chez la brebis

RESULTATS

PARTIE 1: Cinétiques sanguines, urinaires et fécales après administration de chlordécone ou de chlordécol

1. Linéarité de l'élimination sanguine de la chlordécone

Un des objectifs du protocole 1 était de déterminer l'effet de la dose administrée de CLD sur l'élimination chez la brebis. Les résultats de cette étude sont présentés à l'aide du manuscrit de l'article intitulé « Linear Toxicokinetic of chlordecone in ewe's serum » et soumis dans la revue *Chemosphere*.

ARTICLE 3 LINEAR TOXICOKINETIC OF CHLORDECONE IN EWE'S SERUM

Linear toxicokinetic of chlordecone in ewe's serum

Maïlie Saint-Hilaire¹, Guido Rychen¹, Jean-Pierre Thomé², Célia Joaquim-Justo², Yves Le Roux¹,

Cyril Feidt¹, Agnès Fournier^{1*}

Mailie.saint-hilaire@univ-lorraine.fr; guido.rychen@univ-lorraine.fr; jp.thome@ulg.ac.be;

celia.joaquim-gusto@ulg.ac.be; yves.leroux@univ-lorraine.fr; cyril.feidt@univ-lorraine.fr;

agnes.fournier@univ-lorraine.fr

¹ Université de Lorraine, INRA, USC 340, UR AFPA, 2 avenue de la Forêt de Haye, TSA 40602,

54518, Vandœuvre-lès-Nancy Cedex, France

² Université de Liège, LEAE-CART, Allée du 6 Août, 11, 4000, Liège, Belgium

*Corresponding author: Agnès Fournier

E-mail address: agnes.fournier@univ-lorraine.fr

Tél: 03 72 74 41 60

33 **Abstract**

34
35 Chlordecone (CLD) is an organochlorine pesticide used in banana fields of the French West Indies
36 between 1972 and 1993. This use resulted in a long-term pollution of soils and the possible
37 contamination of farm animals. Indeed, after involuntary ingestion of soil, CLD is absorbed and
38 consequently leads to contaminated animals. The aim of this study was the determination of CLD half-
39 life and the establishment of the linearity of CLD disappearance kinetics in non-lactating adult's ewes.
40 CLD diluted in cremophor was intravenously administrated to ewes at different doses: 0.04; 0.2 or 1
41 mg kg⁻¹ body weight (n=5 for each dose). Blood samples were collected from time t = 0 to time t = 84
42 days. Serum samples were extracted with a solid-phase extraction and analyzed by electron capture
43 detection gas chromatography. A two-compartmental model was applied to the serum CLD kinetics. An
44 additional statistical analysis was applied to the observed elimination parameters in serum according to
45 the administrated dose and no significant differences were detected. The linear elimination of CLD
46 between 0.04 and 1 mg kg⁻¹ body weight allowed the possibility of ewe's extrapolation half-life in this
47 dose range. The estimated mean CLD half-life in ewes was 24 days. Overall, the results of this study
48 will be useful to establish decontamination strategies in small ruminants reared in contaminated CLD
49 areas.

50

51 Keywords: Ewe, Chlordecone, serum, linearity, elimination, half-life

52

53 **Highlights**

54

55

56

- Chlordecone elimination is linear between 0.04 and 1 mg kg⁻¹ body weight in serum

57

- The serum half-life of chlordecone is 24 ± 1 days in adult non-lactating ewe

58

- The obtained results will be useful to establish decontamination strategies in ewes

59

60

61

62

63

64

65 **Introduction**

66

67 Chlordecone (CLD) is an organochlorine pesticide considered as a Persistent Organic Pollutant (POPs)
68 (UNEP 2006) formerly used from 1972 to 1993 in the French West Indies (FWI) (Le Déaut and
69 Procaccia 2009). Because of its persistence in soils (Cabidoche et al. 2009), CLD can be accumulated
70 in food chain and consequently lead to a possible exposure of the local population (Kannari 2017). CLD
71 is a carcinogenic, mutagenic and reprotoxic molecule (Multigner et al. 2010; Dallaire et al. 2012). In
72 order to limit the exposure of the local population, it is important to manage this CLD contamination
73 (Kannari 2017). CLD residues in animal products is one contributor of the local population exposure to
74 CLD. In fact, based on surveys and monitoring programs in Martinique realized by Dubuisson et al.
75 (2007), without considering water, 18.7% of contaminated meat samples contained residues of CLD.
76 Moreover, in 2011, the CLD concentrations in peri-renal adipose tissues of 12% of slaughtered bovines
77 reared in contaminated areas were found to be higher than the expected Maximum Residue Limit
78 (MRL). The MRL is set up at 100 $\mu\text{g CLD kg}^{-1}$ of fresh matter (UE n°212/2013) and ensure the safety
79 of consumers. When the CLD concentration in animal products are higher than the MRL, the carcass
80 has to be destroyed and this fact leads to an important loss for local farmers. Because, ruminants
81 represent an important part of the food consumption (Agreste - Statistique Agricole Annuelle 2017) it
82 is important to produce safe animal products with CLD concentrations lower than the MRL. This would
83 allow to ensure the food safety of animal products and the livestock sustainably.

84 The research project INnovative Strategies to establish Safe livestock rearing systems In
85 Chlordecone Contaminated Areas (INSSICCA) aims at proposing solutions that would enable
86 maintenance of local animal production and production of safe animal products. One strategy proposed
87 in this project is the decontamination of ruminants before slaughtering. In fact, to produce safe animal
88 products, it would be possible thanks to a blood sampling and the CLD serum half-life in the animal, to
89 estimate a decontamination period allowing to obtain CLD concentrations in animal products lower than
90 the MRL. Consequently, this strategy would avoid destroying animal carcasses and in the same time
91 would reduce the local population exposure to CLD. To set up this strategy, toxicokinetics informations
92 are required about the fate of the molecule in the animal. The major way of CLD ruminants

93 contamination is by involuntary ingestion of non-negligible amounts of soil (Jurjanz et al. 2012, 2014,
94 2017). The persistence of CLD differs between soil types (Cabidoche et al. 2009) and concentrations
95 lower than 0.005 or higher than 1 mg kg⁻¹ of dry matter (DM) can be found (Rochette et al. 2017). In
96 consequence, depending on the areas where the animals are reared and the rearing practices (Jurjanz et
97 al. 2017), the exposure to CLD may vary between animals and could affect the elimination time of the
98 molecule: we don't know if the CLD half-life is depending of the dose ingested by the animal. In
99 consequence, to assess the decontamination strategy, it is necessary to evaluate the impact of the
100 ingested dose on kinetics parameters.

101 The aim of this study was to determine the toxicokinetics parameters for CLD in ewes at different
102 administrated doses. This dose comparison will allow checking the linearity of the response in serum.
103 Ewe was chosen because there is actually no data about the CLD toxicokinetics in this species and
104 because ewe is consumed by the local population (Agreste - Statistique Agricole Annuelle 2017).
105 This study is an important step for the establishment of the decontamination strategy proposed in the
106 INSSICCA research project.

107

108 **1. Material and Methods**

109

110 The following experimental protocol was in accordance with the general directive N°2010/63/UE on
111 animal care and approved by the Lorraine Ethics Committee (CELMEA) and the French Ministry of
112 Higher Education and Research (APAFIS 2016062217188805).

113

114 **1.1 Ewes and management**

115

116 Fifteen ewes (*Ovis aries*) 60.4 ± 7.8 kg (mean ± Standard Deviation (SD)) of body weight (BW) were
117 selected from a commercial farm (Pulligny, France) and were placed in individual boxes. In order to
118 have animal with a comparable and stable physiological status, non-lactating and non-pregnant adult
119 ewes were chosen. A 14-day adaptation period was applied before the experiment. Each day, ewes
120 received water, salt and meadow hay *ad libitum*. Each week, ewes were weighed. During the experiment,

121 no sign of physical stress or adverse effect on the body weight, physiological status and behavior were
122 reported after intravenous (i.v) administration of 0.04, 0.2 and 1 mg CLD kg⁻¹ BW.

123

124 1.2 Experimental procedure

125

126 After the adaptation period, three similar groups of five ewes were constituted on the base of their body
127 weight (group 1: 56.5 ± 10.5 kg, group 2: 61.0 ± 6.4 kg and group 3: 63.8 ± 4.9 kg (mean ± SD)). The
128 ewes from group 1, 2 and 3 received intravenously a single dose of 0.04; 0.2 and 1 mg CLD kg⁻¹ BW
129 respectively.

130

- 131 • *Choice of CLD doses*

132

133 The dose range used in this study (0.04 and 1 mg kg⁻¹ body weight) was set in order to cover the wide
134 level of animal exposure in FWI. The dose 1 mg kg⁻¹ BW is considered as a very high non toxic dose
135 which was already used in goats (Fournier et al. 2017) and had no adverse effects on the animals.
136 Furthermore, it will allow comparison between the two species. The lowest dose has been chosen in
137 order to be able to quantify the level of CLD in serum during the decontaminating process, i.e. 10 times
138 higher than limit of quantification (LOQ). The LOQ in serum is 0.06 µg CLD kg⁻¹ (Fournier et al. 2017).
139 The intermediate dose of 0.2 mg kg⁻¹ BW was set in order to have a factor of 5 between doses.

140

- 141 • *Protocol*

142

143 CLD (chlordecone purity > 98%) supplied by *Azur Isotopes SAS* (Marseille, France) was dissolved in
144 cremophor (Kolliphor® EL, Sigma-Aldrich) (polyethoxylated castor oil) before the intravenous
145 administration. For each ewe, two intravenous external catheters (B. Braun, Germany) were placed in
146 the jugular vein. One catheter was used for the CLD administration and the other one for the blood
147 sampling. After the CLD administration, an 84-day decontamination period occurred. Blood samples
148 (2 x 10 mL) were collected at set intervals for 12 weeks after the dosing as previously described by

149 Fournier et al. (2017) at 0, 5, 30 min, 1, 3, 8, 12 h, 1, 3, 7, 15, 22, 29, 36, 44, 57, 71, 84 days after CLD
150 i.v administration, using an intravenous external catheter for the 24 first hours and then by venepuncture
151 (Henke Sass Wolk GmbH, Germany). Blood samples were clotted for 2 h at ambient temperature and
152 then stored 24 h at 4°C before centrifugation at 1278 g for 15 min to obtain serum samples. Serum
153 samples were then stored at -20°C until analysis.

154

155 1.3 Analysis of CLD in serum

156

157 CLD analysis in serum was realized by the Center for Analytical and Research Technology at Liege
158 University (CART, Belgium). In brief, after proteins denaturation with triethylamine plus formic acid,
159 CLD was extracted with diethylether/ n-hexane (15/85, v/v) using a solid-phase extraction (SPE) and
160 then subjected to acid purification with concentrated sulfuric acid 98% w/v. The extract was then
161 analyzed by Gas Chromatography with Electron Captor Detection (GC-ECD). The LOQ was of 0.06 µg
162 kg⁻¹ fresh matter. The uncertainty of the method was of 6.5%. The whole method is detailed in Fournier
163 et al. (2017).

164

165 1.4 Calculations and statistical analysis

166

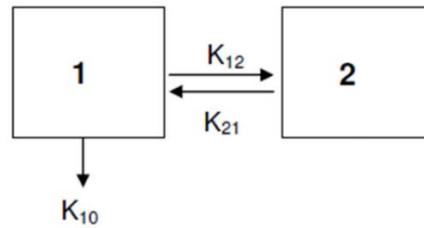
167 CLD concentration versus time curves in ewes were individually analyzed using R Core team, 2017
168 (nlstools library was used). To determine toxicokinetic parameters in blood for CLD, a dynamic
169 equilibrium between tissues and blood levels (blood and tissues levels evolving in parallel) was assumed
170 (Renwick 2008; Tornero-Velez et al. 2012; Khemiri et al. 2017). Following the results, the toxicokinetic
171 model applied to the data was a two-compartmental model providing the best-fitting in serum for CLD.
172 The established relation following the Eq. (1):

$$173 C(t) = Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t},$$

174 where C(t) (ng mL⁻¹) represents CLD serum concentration at time t, A (ng mL⁻¹) is the intercept of the
175 distribution phase, B (ng mL⁻¹) the intercept of the elimination phase, α (d⁻¹) is the distribution rate
176 constant and β (d⁻¹) the elimination rate constant.

177 The two-compartmental model corresponding to the Eq (1) is represented in Fig. 1.

178



179

180 Figure 1: Two-compartmental modelisation of the equilibrium between (1) the blood central
181 compartment and (2) a peripheral compartment

182

183 K_{10} is the first order elimination speed and K_{12} et K_{21} the first order exchange constants between the two
184 compartments. The relation between the microconstants K_{12} , K_{21} and K_{10} (Fig. 2) and the macroconstants
185 α , β , A and B (Eq.1) are detailed as follow:

186 K_{21} was calculated by Eq. (2):

187
$$K_{21} = \frac{A\beta + B\alpha}{A+B}$$

188 K_{10} was calculated by Eq. (3):

189
$$K_{10} = \frac{\alpha\beta}{K_{21}}$$

190 And K_{12} was calculated by Eq. (4):

191
$$K_{12} = \alpha + \beta - (K_{10} + K_{21})$$

192 To complete the description of the toxicokinetic, serum CLD distribution half-life ($t_{1/2\alpha}$) was calculated
193 by Eq. (5):

194
$$t_{1/2\alpha} = \ln(2) / \alpha$$

195 Serum CLD elimination half-life ($t_{1/2\beta}$) was calculated by Eq. (6):

196
$$t_{1/2\beta} = \ln(2) / \beta.$$

197 Area under the serum curve from zero to infinity ($AUC_{0 \rightarrow \infty}$) was calculated for the two-compartmental
198 model by Eq. (7):

199
$$AUC_{0 \rightarrow \infty} = A/\alpha + B/\beta$$

200 And when only a one-compartmental model was reached, the $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ was calculated by Eq (8):

201
$$AUC_{0 \rightarrow \infty} = B/\beta$$

202 Total body clearance (Cl_{tot}) was obtained by Eq. (9):

203 $Cl_{tot} = Dose/AUC_{0 \rightarrow \infty}$

204 The volume of the distribution (V_{ss}) at the equilibrium for each administrated dose was calculated by
205 Eq. (10):

206 $V_{ss} = \frac{Dose}{A+B} \left(1 + \frac{K_{21}}{K_{12}}\right)$

207 The apparent volume of the distribution ($V_{d\beta}$) for each administrated dose was calculated by Eq. (11):

208 $V_{d\beta} = Dose/B$

209

210 The toxicokinetic parameters were calculated for each administrated dose and ewe. Moreover, their
211 average value for each dose was calculated with the associated mean standard error (SE). In order to
212 compare the toxicokinetic parameters obtained after different levels of administration of CLD, one-way
213 analysis of variance (ANOVA) test was made followed by a Tukey's test. The ewe was considered as
214 the experimental unit. Moreover, to compare goat and ewe toxicokinetic parameters, a student test was
215 used. For Tukey and student tests, differences were considered significant for p- values ≤ 0.05 .

216 Due to difficulties for blood sampling during the distribution phase for three ewes (one contaminated at
217 0.04 mg kg⁻¹ BW CLD and the two others contaminated at 0.2 mg kg⁻¹ BW CLD) it wasn't possible to
218 obtain a two-compartmental model. Consequently, for those ewes a one compartmental model was
219 applying to only determine the elimination parameters.

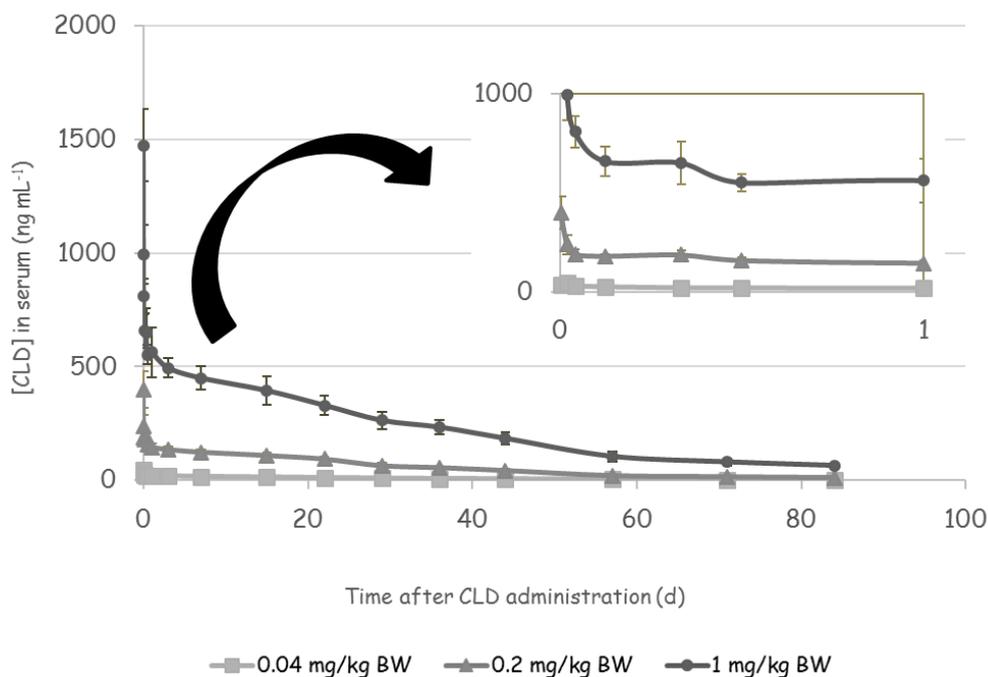
220

221 **2. Results**

222

223 Fig. 2 shows the CLD kinetics in ewe's serum over the 84-d period following intravenous administration
224 of 0.04, 0.2 and 1 mg CLD kg⁻¹ BW. The profile of the three-kinetics evolved in parallel. The modelling
225 approach revealed that the serum concentration-time curve of CLD was best fitted with a two-
226 compartmental model for the three CLD doses. After the CLD intravenous administration, serum
227 concentration declined from 1474 \pm 271 ng mL⁻¹ (mean \pm SE) at t =5 min to 563 \pm 176 ng mL⁻¹ at t =
228 1 d for the 1 mg kg⁻¹ CLD dose. In Fig.1 the rapid CLD distribution in the animal body was highlighted
229 from t = 0 d to t = 1 d. The second part of the curve corresponds to the elimination phase until 84-d.

230 During this period, the CLD concentrations declined from $563 \pm 176 \text{ ng mL}^{-1}$ at $t = 1 \text{ d}$ to $64 \pm 22 \text{ ng}$
 231 mL^{-1} at $t = 84 \text{ d}$.
 232



233 **Figure 2:** Chlordecone kinetic elimination in serum of adult ewes (n=5) after a single intravenous
 234 administrated dose (0.04, 0.2 and 1 mg kg⁻¹ BW) from $t = 0$ to $t = 84 \text{ d}$.
 235
 236

237 For each administrated dose, toxicokinetic parameters were determined and summarized in table 1.
 238 In order to determine if the CLD elimination in ewes follows a linear or a non-linear model, three
 239 important elimination parameters must be studied: the response of the area under the serum curve
 240 from zero to infinity ($AUC_{0 \rightarrow \infty}$), the clearance and the elimination half-lives (Ratain and Plunkett
 241 2003). In order to evaluate the linear elimination of CLD with doses between 0.04 and 1 mg kg⁻¹
 242 BW, a correlation was made between the mean area under the serum curve from zero to infinity
 243 ($AUC_{0 \rightarrow \infty}$). Thanks to the Pearson's product-moment correlation test, a correlation coefficient of
 244 0.97 between the dose and the $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ was found.

245 Since the volume of distribution (V_{ss}) and the clearance (Cl) are directly calculated with the AUC,
 246 no significative difference for these two parameters was observed whatever the administrated dose
 247 ($P > 0.05$ for V_{ss} and $P > 0.1$ for Cl). The volume of the distribution is a proportionality constant
 248 between total amount of CLD in the body and serum concentration. It can be interpreted in terms of

249 xenobiotic distribution having recourse to physiological models involving xenobiotic binding to
250 serum and tissues (Toutain and Bousquet-Melou 2004). This result indicates that the body is able to
251 eliminate in a same extend CLD doses between 0.04 and 1 mg kg⁻¹ BW. These conclusions are
252 consistent with the linear CLD elimination in serum.

253 The half-life of CLD elimination from the serum was estimated to 24.1 ± 1.5 days, 23.6 ± 2.0 days
254 and 23.9 ± 1.3 days (mean ± SE) after CLD administration at 0.04 mg kg⁻¹ BW, 0.2 mg kg⁻¹ BW
255 and 1 mg kg⁻¹ BW, respectively. The difference between these values is not significant (P > 0.1).

256 In conclusion, there is no effect of the administrated dose on the CLD elimination in ewe's blood:
257 the same half-life was found according to the dose, the relation between the $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ and the
258 administrated dose is linear plus there is no significant difference between the elimination
259 parameters and in particular for the clearance. Overall, the serum half-life in ewes (calculated with
260 n = 15) is 24 ± 1 and CLD elimination is not dose-dependent.

261 In addition, other parameters were investigated. Regarding K₂₁ and K₁₀ no significative difference
262 was found between the three administrated doses. However, for K₁₂ a significative difference was
263 found between the dose at 0.04 and the dose at 0.2 mg kg BW⁻¹. This is the result of a high dispersion
264 of the values for α . The distribution half-lives were found between 0.27 and 1.20 hours for the three
265 administrated doses. A significative difference was found (P < 0.01) for $t_{1/2\alpha}$ between the three tested
266 doses. This difference is possibly due to the interindividual difference. This allows to conclude than
267 in less than one hour and a half the equilibrium between blood and tissues was made in ewes.

268

269

270

271

272

273

274

275

276 **Table 1:** Toxicokinetic parameters for CLD (mean \pm SE) following intravenous administration of
 277 three different CLD doses (0.04, 0.2 and 1 mg kg⁻¹ BW)
 278

Parameters	0.04 mg kg ⁻¹ BW	n	0.2 mg kg ⁻¹ BW	n	1 mg kg ⁻¹ BW	n	P (ANOVA)
α (day ⁻¹)	16 \pm 7 ^{b*}	4	68 \pm 13 ^a	3	40 \pm 2 ^{ba}	5	< 0.01
A (ng mL ⁻¹)	16 \pm 2 ^c	4	374 \pm 12 ^b	3	987 \pm 138 ^a	5	< 0.01
β (day ⁻¹)	0.028 \pm 0.003	5	0.030 \pm 0.002	5	0.029 \pm 0.002	5	0.95
B (ng mL ⁻¹)	20 \pm 2 ^c	5	158 \pm 19 ^b	5	535 \pm 20 ^a	4	< 0.01
$AUC_{0 \rightarrow \infty}$ (ng day mL ⁻¹)	724 \pm 34 ^c	4	5813 \pm 513 ^b	4	18047 \pm 1334 ^a	4	< 0.01
$t_{1/2\alpha}$ dist (hour)	1.20 \pm 0.04 ^a	4	0.27 \pm 0.06 ^b	3	0.42 \pm 0.02 ^b	5	0.02
$t_{1/2\beta}$ elim (day)	24.1 \pm 1.5	5	23.6 \pm 2.0	5	23.9 \pm 1.3	5	0.94
Cl (mL day ⁻¹ kg ⁻¹ BW)	64.1 \pm 6.4	4	44.2 \pm 8.7	3	56.2 \pm 3.8	5	0.19
K_{21} (day ⁻¹ kg ⁻¹ BW)	0.17 \pm 0.04	4	0.40 \pm 0.16	3	0.24 \pm 0.01	5	0.12
K_{12} (day ⁻¹ kg ⁻¹ BW)	0.20 \pm 0.10 ^b	2	0.75 \pm 0.20 ^a	3	0.40 \pm 0.05 ^{ba}	5	0.03
$K_{10} \times 10^{-2}$ (day ⁻¹ kg ⁻¹ BW)	0.14 \pm 0.02	4	0.19 \pm 0.04	3	0.10 \pm 0.02	5	0.17
V_{ss} (L kg ⁻¹ BW)	2.2 \pm 0.3	4	1.4 \pm 0.2	3	1.7 \pm 0.2	5	0.08

279 α : distribution slope, A: intercept of the distribution phase, β : elimination slope, B: intercept of the
 280 elimination phase, $AUC_{0 \rightarrow \infty}$: area under the curve from time zero to infinity, $t_{1/2\alpha}$: distribution half-life,
 281 $t_{1/2\beta}$: elimination half-life, Cl: Clearance, K_{10} is the first order elimination speed; K_{12} and K_{21} the first
 282 order exchange constant between the two compartments, V_{ss} : distribution volume at the equilibrium,
 283 *Values within a line not followed by a common letter (a-c) significantly differ ($P \leq 0.05$).
 284

285 3. Discussion

286
 287 - Toxicokinetics parameters are linear in a realistic and wide exposure range of CLD
 288
 289 The CLD elimination is linear between CLD doses of 0.04 and 1 mg kg⁻¹ BW in serum. This is the first
 290 time that the CLD linearity was checked in animals. In this work, a lower dose of 0.04 mg kg⁻¹ BW was
 291 chosen in order to be in accordance with a realistic exposure range of CLD in FWI. In fact, based on
 292 surveys and monitoring programs lead in FWI (*Personal communication*), it was possible to collect and
 293 analyze serum of bovine with concentrations between 0.2 and 65.9 ng mL⁻¹ (n=93). Because there was
 294 no information about the bovine contamination and because this CLD range of concentrations is in the
 295 range of the CLD concentrations obtain with the lowest dose of our study, it was possible to prove the
 296 accordance of our study with the field contamination.

297 The CLD elimination is linear in a wide range of exposure. This result highlights that there is no
298 saturation mechanism in ewes with CLD doses between 0.04 and 1 mg kg⁻¹ BW. Since CLDOH and its
299 conjugated metabolites were found in liver, urine and feces of ewes, CLD metabolism occurs (Saint-
300 Hilaire et al. 2018a, 2018b) and the enzyme involved is an *aldo ketoreductase* named *chlordecone*
301 *reductase* as described in humans, gerbils and pigs (Fariss et al. 1980; Houston et al. 1981; Soine et al.
302 1983; Molowa et al., 1986a, 1986b). No effect of CLD amount of exposure on blood elimination could
303 be the result of the non-saturation site of the chlordecone reductase in the dose range tested.

304 Based on this result, it will be now possible to apply the same half-life for CLD doses between 0.04 and
305 1 mg kg⁻¹ BW for the determination of the decontamination period for ruminants. This result is important
306 and allow to simplify the future recommendations in term of ruminants depuration strategy in FWI.

307

308 - CLD half-lives in ruminants have the same magnitude order and appear compatible with
309 depuration strategies

310

311 The elimination half-life ($t_{1/2\beta}$) found in ewes is comparable with the half-lives determined previously
312 in goats (20 days, Fournier et al. 2017) in growing juvenile goats (15 days, Lastel et al. 2016) and in
313 bovine (40 days, Mahieu et al. 2015). Ruminants appear to eliminate CLD in a similar order of
314 magnitude and especially small ruminants (goats and ewes). In fact, although goats and ewes have
315 similar body weight and digestive physiology (Helferich et al. 1987), goats are well-known to have an
316 higher metabolization capacity. Toxicokinetic parameters for CLD in goats and ewes are given in Table
317 2. The data for goats were extracted from Fournier et al. (2017) after oral and intravenous administration
318 of 1 mg CLD kg⁻¹ BW. The elimination half-life (mean \pm SE) was 23.9 \pm 0.9 days in ewes and 20.1 \pm
319 1.7 days in goats which is slightly higher, certainly due to a significantly lower clearance in ewes than
320 in goats. The significant lower clearance in goats could be explained by a higher chlordecone reductase
321 activity in goats than in ewes.

322

323

324 **Table 2:** Comparison of toxicokinetic parameters for CLD (mean \pm SE) after CLD administration to
 325 adult goats and ewes.

Parameters	Goats (n = 12)	Ewes (n=15)
β (day ⁻¹)	0.037 \pm 0.003 ^{a*}	0.030 \pm 0.001 ^b
$t_{1/2\beta}$ elim (day)	20.1 \pm 1.7 ^b	23.9 \pm 0.9 ^a
$V_{z\beta}$ (L kg ⁻¹ BW)	1.8 \pm 0.2 ^a	1.7 \pm 0.1 ^a
Cl (mL day ⁻¹ kg ⁻¹ BW)	65 \pm 7 ^a	49 \pm 3 ^{b**}

326 *Values within a line not followed by the same letter (a, b) significantly differ ($P \leq 0.05$); **with n = 12 ewes: this parameter
 327 could not be estimated for 3 ewes

328
 329 The elimination half-lives ($t_{1/2\beta}$) found in ruminants are around 20 and 40 days. This range of elimination
 330 half-life is compatible with the actual rearing strategies in FWI (around 1 year for small ruminants and
 331 more than 2 years for bovine). In comparison with other POPs, as PolyChlorinated Biphenyls (PCBs),
 332 the CLD half-life is relatively short in animals. In fact, the estimated half-lives of Chiral PCBs in
 333 different mammalian species range from 0.13 to 7.9 years (Kania-Korwel and Hans-Joachim Lehmler,
 334 2016). Thanks to the excretion capacity of ruminants, it would be possible to propose a depuration
 335 strategy in FWI.

336
 337

338 **4. Conclusion**

339
 340 A serum half-life of approximately 24 days was found and the CLD elimination in serum between 0.04
 341 and 0.1 mg CLD kg⁻¹ BW was not dose dependent in ewes. Because CLD elimination is linear, it is now
 342 possible to use the same half-life for different level of realistic CLD exposure included between 0.04
 343 and 0.1 mg kg⁻¹ BW. Ruminants CLD half-lives are between 20 and 40 days. These rather short half-
 344 lives are compatible with usual rearing duration of ruminants in FWI. Overall, this study provides
 345 valuable data to establish decontamination strategies for ruminants.

346

347 **Aknowledgements**

348
 349 The experimentation was funded by the CLD National Plan III, research program INSSICCA PITE and
 350 the MENESR (Ministère de l'Education National, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche,
 351 France). The authors thank Claire Collas, Matthieu Delannoy, Frédéric Desor, Hervé Toussaint, Stefan

352 Jurjanz, Marion Hugué, Claire Soligot, Julie Peiffer, Damien Banas and Christine Grandclaude (UR
353 AFPA) for their contribution. We want to thank warmly Pamela Hartmeyer (UR AFPA) for her support
354 during the experiment and Catherine Adam (CART) for the analysis.

355

356 **Conflict of interest**

357

358 The authors have no conflicts of interest.

359

360

361 **References**

362

363

364 Agreste- Statistique Agricole Annuelle (2017) Mémento de la statistique agricole - Guadeloupe.

365 n°125:1–28

366 Cabidoche Y-M, Achard R, Cattan P, et al (2009) Long-term pollution by chlordecone of tropical

367 volcanic soils in the French West Indies: a simple leaching model accounts for current residue.

368 Environ Pollut 157:1697–705.

369 Dallaire R, Muckle G, Rouget F, et al (2012) Cognitive, visual, and motor development of 7-month-old

370 Guadeloupean infants exposed to chlordecone. Environ Res 118:79–85.

371 Dubuisson C, Héraud F, Leblanc J-C, et al (2007) Impact of subsistence production on the management

372 options to reduce the food exposure of the Martinican population to Chlordecone. Regul Toxicol

373 Pharmacol 49:5–16.

374 Fariss MW, Blanke R V., Saady JJ, Guzelian PS (1980) Demonstration of major metabolic pathways

375 for chlordecone (kepone) in humans. Drug Metab Dispos 8:434–438

376 Fournier A, Feidt C, Lastel ML, et al (2017) Toxicokinetics of chlordecone in goats: Implications for

377 risk management in French West Indies. Chemosphere 171:564–570.

378 Helferich WG, Silva MH, Flueck WT, et al (1987) Xenobiotic biotransformation in livers and lungs of

379 adult black-tailed deer: Comparison with domestic goat and sheep. Comp Biochem Physiol Part

380 C, Comp 88:145–149.

381 Houston TE, Mutter LC, Blanke R V., Guzelian PS (1981) Chlordecone alcohol formation in the

382 mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*): A model for human metabolism of chlordecone
383 (kepone). *Toxicol Sci* 1:293–298.

384 Jurjanz S, Collas C, Lastel ML, et al (2017) Evaluation of soil intake by growing Creole young bulls in
385 common grazing systems in humid tropical conditions. *Animal* 11:1363–1371.

386 Jurjanz S, Feidt C, Pérez-Prieto L., et al (2012) Soil intake of lactating dairy cows in intensive strip
387 grazing systems. *Animal* 6:1350–1359

388 Jurjanz S, Jondreville C, Mahieu M, et al (2014) Relative bioavailability of soil-bound chlordecone in
389 growing lambs. *Environ Geochem Health* 36:911–917.

390 Kania-Korwel I, Hans-Joachim Lehmler (2016) Toxicokinetics of chiral Polychlorinated Biphenyls
391 across different species - A review. *Environ Sci Pollut Res Int* 23:2058–2080

392 Kannari (2017) Rapport ANSES - Exposition des consommateurs des Antilles au chlordécone,
393 résultats de l'étude Kannari

394 Khemiri R, Côté J, Fetoui H, Bouchard M (2017) Documenting the kinetic time course of lambda-
395 cyhalothrin metabolites in orally exposed volunteers for the interpretation of biomonitoring data.
396 *Toxicol Lett* 276:115–121.

397 Lastel ML, Lerch S, Fournier A, et al (2016) Chlordecone disappearance in tissues of growing goats
398 after a one month decontamination period—effect of body fatness on chlordecone retention.
399 *Environ Sci Pollut Res* 23:3176–3183.

400 Le Déaut and Procaccia (2009) Report on the Impact of the Use of Chlordecone and Pesticides in the
401 West Indies : Assessment and Future Prospects (Rapports sur les impacts de l'utilisation de la
402 chlordécone et des pesticides aux Antilles : bilan et perspectives d'évolution) OPECST. 223

403 Mahieu M, Fournier A, Lastel ML, et al (2015) Chlordecone and animal breeding individual variability
404 of the excretion capacity of ruminants and consequences on the contamination. Actes du 44ème
405 congrès du groupe français des pesticides, 26-19 mai 2014. Martinique, France. pp 156–163

406 Molowa, Shayne AG, Guzelian PS (1986a) Purification and characterization of chlordecone reductase
407 from human liver. *J Biol Chem* 261:12624–12627

408 Molowa, Wrighton SA, Blanke R V, Guzelian PS (1986b) Characterization of a unique aldo-keto
409 reductase responsible for the reduction of chlordecone in the liver of the gerbil and man. *J Toxicol*

410 Environ Health 17:375–184

411 Multigner L, Ndong JR, Giusti A, et al (2010) Chlordecone exposure and risk of prostate cancer. *J Clin*
412 *Oncol* 28:3457–3462.

413 R Core team (2017) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for
414 Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>. *R A Lang. Environ. Stat.*
415 *Comput. R Found. Stat. Comput.* , Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL [http://www.R-](http://www.R-project.org/)
416 [project.org/](http://www.R-project.org/). 55

417 Ratain MJ, Plunkett WK (2003) Principles of pharmacokinetics

418 Renwick A. (2008) Principles and Methods of Toxicology, Raven Pres

419 Rochette R, Andrieux P, Bonnal V, Cattan P (2017) Contamination des bassins versants de la
420 Guadeloupe continentale par la chlordécone - Actualisation des connaissances et cartographie des
421 zones à risque de contamination. Projet ChlEau Terre

422 Saint-Hilaire M, Bertin T, Inthavong C, et al (2018a) Validation of analytical methods for chlordecone
423 and its metabolites in the urine and feces of ewes. *J Chromatogr B* 1093–1094:66–76.

424 Saint-Hilaire M, Inthavong C, Bertin T, et al (2018b) Development and validation of an HPLC-MS/MS
425 method with QuEChERS extraction using isotopic dilution to simultaneously analyze chlordecone
426 and chlordecol in animal livers. *Food Chem* 252:147–153.

427 Schaaf LJ, Dobbs BR, Edwards IR, Perrier DG (1987) Nonlinear pharmacokinetic characteristics of 5-
428 fluorouracil (5-FU) in colorectal cancer patients. *Eur J Clin Pharmacol* 32:411–418.

429 Soine PJ, Blanke R V., Schwartz CC (1983) Chlordecone metabolism in the pig. *Toxicol Lett* 17:35–
430 41.

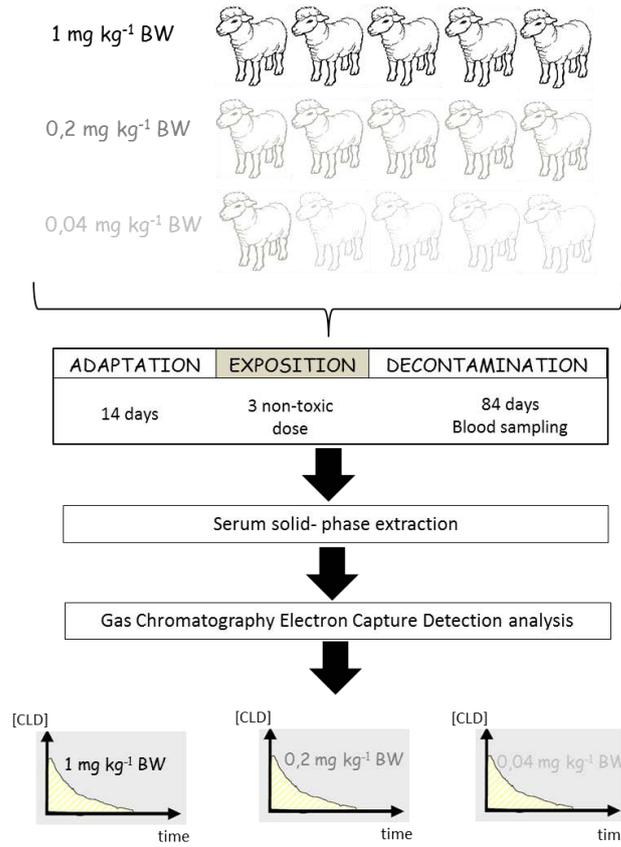
431 Tornero-Velez R, Davis J, Scollon EJ, et al (2012) A pharmacokinetic model of cis- and trans-
432 permethrin disposition in rats and humans with aggregate exposure application. *Toxicol Sci*
433 130:33–47.

434 Toutain PL, Bousquet-Melou A (2004) Volumes of distribution. *J Vet Pharmacol Ther* 27:441–453

435 UNEP (2006) Rapport du Comité d'étude des polluants Organiques persistants sur les Travaux de sa
436 deuxième réunion

437

438



439

440

Graphical Abstract: Experimental design of the CLD toxicokinetic study in ewes

2. Voies et formes d'élimination de la chlordécone et du chlordécol

i. Elimination sanguine après administration i.v de CLD ou de CLDOH

(i-1). Cinétiques d'élimination sanguines

Cette partie présente les formes retrouvées de la CLD et du CLDOH après i.v de CLD ou de CLDOH à $1 \text{ mg kg}^{-1} \text{ PV}$. Les figures 34 et 35 présentent les résultats obtenus.

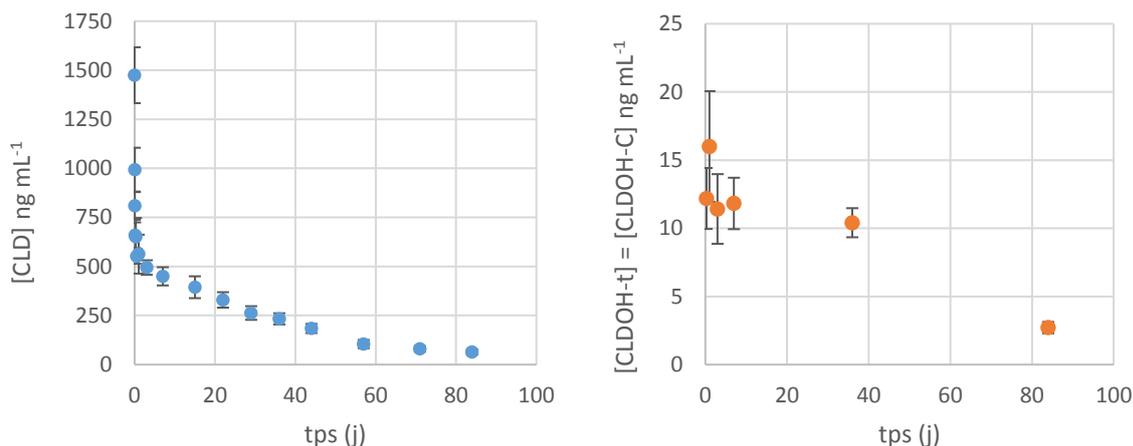


Figure 34 : Concentrations de CLD et de CLDOH-C retrouvées dans le sérum des brebis en fonction du temps de prélèvement (n=5) après i.v de CLD à $1 \text{ mg kg}^{-1} \text{ PV}$. Chaque point représente la moyenne (n=5) \pm l'écart-type de la moyenne.

Après administration i.v de CLD, le seul métabolite quantifié dans le sang est le chlordécol-conjugué (CLDOH-C). Pour rappel, la valeur de concentration de CLDOH-C provient de la différence entre la concentration de chlordécol total (CLDOH-t) après déconjugaison enzymatique et la valeur de la concentration de chlordécol libre de l'échantillon. Ici, le CLDOH n'a jamais été quantifié dans le sérum par conséquent $[\text{CLDOH-t}] = [\text{CLDOH-C}]$. Les concentrations retrouvées de CLDOH-C sont environ 100 fois plus faibles que les concentrations sanguines de CLD. De plus, il est possible d'observer que l'évolution des concentrations sériques du CLDOH-C en fonction du temps semble constante sur une période d'au moins 36 jours (contrairement à la nette diminution des concentrations de CLD observées). En effet les concentrations moyennes de CLDOH-C retrouvées dans le sérum des brebis se situent entre 10 et 16 ng mL^{-1} de CLD du temps $t = 8 \text{ h}$ au temps $t = 36$ jours après administration i.v de CLD.

Après administration i.v de CLDOH, du chlordécol sous forme libre et sous forme conjugué ont été quantifiés. A l'aide de la figure 35, il est possible de montrer que le CLDOH-C se forme quasi instantanément après administration de CLDOH chez la brebis. En effet, 30 min après d'administration du CLDOH, la concentration moyenne de CLDOH retrouvée est de $1593 \pm 236 \text{ ng mL}^{-1}$ et celle de CLDOH-t (CLDOH-C + CLDOH) est de $2390 \pm 76 \text{ ng mL}^{-1}$. Une heure après administration de CLDOH

aux brebis, la concentration moyenne de CLDOH chute fortement à $348 \pm 118 \text{ ng mL}^{-1}$ parallèlement à l'observation d'un pic de chlordécol conjugué : une concentration moyenne de CLDOH-t de $2100 \pm 195 \text{ ng mL}^{-1}$ a été obtenue.

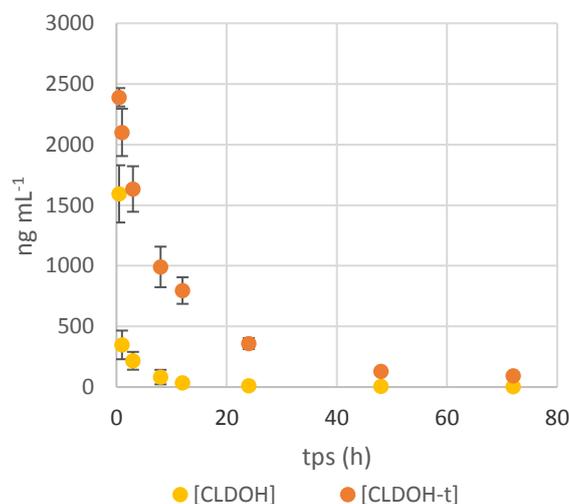


Figure 35 : Concentrations de CLDOH et de CLDOH-t retrouvées dans le sérum des brebis en fonction du temps de prélèvement (n=3) après i.v de CLDOH à 1 mg kg^{-1} PV
Chaque point représente la moyenne (n=3) \pm l'écart-type de la moyenne

A l'aide des cinétiques sanguines d'élimination du CLDOH, il est possible de conclure que l'équilibre de la réaction de métabolisation du CLDOH est fortement déplacé vers la formation du CLDOH-C. Les données d'élimination après administration i.v de CLD et i.v de CLDOH sont cohérentes entre elles étant donné que seule la forme conjuguée du CLDOH est quantifiée dans le sang des brebis. De plus, après administration i.v de CLDOH, de la CLD a été quantifiée à l'état de traces c'est-à-dire à des concentrations proches de la LQ. Cela démontre que chez la brebis la réversibilité de la réaction de réduction de la CLD en CLDOH serait très minoritaire par rapport aux réactions de conjugaison. La figure 36 ci-dessous résume l'équilibre de la réaction de métabolisation de la CLD obtenue à l'aide de ces travaux chez la brebis.



Figure 36 : Equilibre de la réaction de métabolisation de la CLD à l'issu des travaux

(i-2). Comparaison des paramètres toxicocinétiques de la CLD et du CLDOH

A l'aide de la cinétique d'élimination du chlordécol libre, il a été possible de déterminer les paramètres toxicocinétiques de cette molécule chez la brebis. Le traitement des données a été effectué à l'aide d'un modèle monocompartimental. L'objectif de cette partie est de comparer les paramètres toxicocinétiques

retrouvés de la CLD et du CLDOH. Le tableau 20 résume les paramètres d'élimination obtenus. Etant donné qu'il n'a pas été possible de déterminer les paramètres de distribution du CLDOH, ce tableau permet uniquement de comparer les paramètres d'élimination.

Paramètres toxicocinétiques	CLD	n	CLDOH	n
$K_{10} \times 10^{-2} (j^{-1})$	$0,10 \pm 0,02^b$	5	$13,7 \pm 2,4^a$	3
$AUC_{0 \rightarrow \infty} (ng mL^{-1}) j$	18047 ± 1334^a	4	$31,8 \pm 0,1^b$	2
$t_{1/2\beta \text{ elim}} (j)$	$23,9 \pm 1,3^a$	5	$0,07 \pm 0,01^b$	3
$Cl (L j^{-1}) kg^{-1} PV$	$0,056 \pm 0,004^b$	5	$31,4 \pm 0,07^a$	2
$V^* (L)/ kg^{-1} PV$	$1,7 \pm 0,2^a$	4	$2,2 \pm 0,5^a$	3

Tableau 20 : Paramètres toxicocinétiques de la CLD et du CLDOH (moyenne \pm écart-type de la moyenne)
 Les valeurs sur la même ligne qui ne portent pas la même lettre (a-b) sont significativement différentes (p-value < 0,05)
 V^* (Volume de distribution) représente la valeur du V_{ss} pour la CLD et V_c pour le CLDOH

Le temps de demi-vie obtenu pour le chlordécol est de $0,07 \pm 0,01$ jours soit environ 2h. Ce temps de demi-vie est 340 fois plus faible que celui de la CLD. Le temps d'élimination court du CLDOH (par rapport à celui de la CLD) est cohérent avec sa valeur de clairance très élevée par comparaison à celle de la CLD et serait potentiellement expliqué par la formation de son métabolite conjugué.

ii. Elimination urinaire et fécale après i.v de CLD ou CLDOH

(ii-1). Résultats après administration i.v de CLD

Cette partie présente les formes retrouvées de la CLD et du CLDOH après administration i.v de CLD ou de CLDOH à $1 \text{ mg kg}^{-1} PV$.

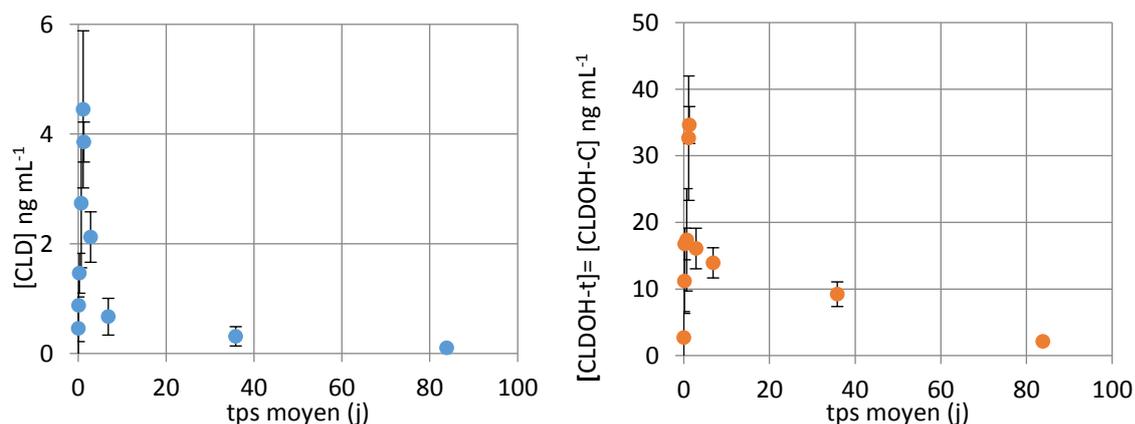


Figure 37 : Concentrations de CLD et de CLDOH-t retrouvées dans les urines des brebis en fonction du temps moyen de l'intervalle de prélèvement (n=5) après administration i.v de CLD à $1 \text{ mg kg}^{-1} PV$
 (Chaque point représente la moyenne (n=5) \pm l'écart-type de la moyenne)

La figure 37 présente les formes retrouvées dans les urines après administration i.v de CLD en fonction du temps moyen de chacun des intervalles de prélèvement. Dans la matrice urinaire, tout comme dans le sang, du CLD et du CLDOH-C ont été retrouvés. Un pic d'apparition de la CLD et du CLDOH-C est observable à $t = 27h$ après administration de CLD par voie i.v. Des concentrations de CLD de 4.5 ± 1.3

ng mL⁻¹ (n=5, moyenne ± écart-type de la moyenne) et de CLDOH-C de 32.6 ± 7.7 ng mL⁻¹ (n = 5, moyenne ± écart-type de la moyenne) ont été retrouvées dans les urines. Les données d'élimination urinaire de la CLD permettent de conclure que la CLD s'élimine majoritairement sous forme de CLDOH-C. Un ratio moyen des concentrations CLDOH-C/CLD de 16 ± 2 (n = 10, moyenne ± écart-type de la moyenne) a été retrouvé. De plus, à l'aide des comparaisons entre les concentrations de CLD sanguines et urinaires, il est possible de conclure que les urines sont presque 300 fois moins concentrées en CLD que les serums (comparaison au pic d'apparition des molécules). A contrario, les concentrations sériques et urinaires de CLDOH-C sont du même ordre de grandeur.

La figure 38 présente les formes retrouvées dans les fèces après administration i.v de CLD en fonction du temps moyen de chacun des intervalles de prélèvement. Dans les fèces, de la CLD et du CLDOH ont été retrouvées. Un pic d'apparition de la CLD et du CLDOH est observable au cours de l'intervalle de prélèvement 24-48h après administration de CLD par voie i.v. Des concentrations moyennes de CLD de 1075 ± 74 ng g⁻¹ MS (n=5, moyenne ± écart-type de la moyenne) et de CLDOH de 545 ± 25 ng g⁻¹ MS (n = 5, moyenne ± écart-type de la moyenne) ont été retrouvées dans les fèces.

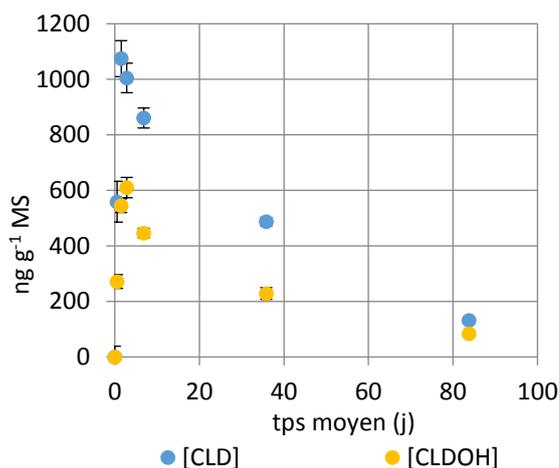


Figure 38: Concentrations de CLD et de CLDOH retrouvées dans les fèces des brebis en fonction du temps moyen de l'intervalle de prélèvement (n=5) après administration i.v de CLD à 1 mg kg⁻¹ PV (Chaque point représente la moyenne (n=5) ± l'écart-type de la moyenne)

(ii-2). Résultats après administration i.v de CLDOH

Cette partie présente les formes d'élimination retrouvées du CLDOH chez la brebis dans les urines et les fèces. Du CLDOH et du CLDOH-C ont été quantifiés dans les urines analysées aux intervalles de temps 24-45 et 58-72h. Entre les intervalles de temps 24-45h et 58-72h, des concentrations moyennes respectivement de CLDOH-t de 134 ± 14 ng mL⁻¹ et de 84 ± 13 ng mL⁻¹ ont été retrouvées. Dans les fèces, du CLDOH uniquement sous sa forme libre a été quantifié. La figure 39 résume l'évolution des concentrations moyennes de CLDOH dans les fèces en fonction du temps moyen de l'intervalle de prélèvement. Une concentration moyenne maximale de 17167 ± 1186 ng g⁻¹ MS de CLDOH a été retrouvée lors du prélèvement 4-24h après i.v de CLDOH.

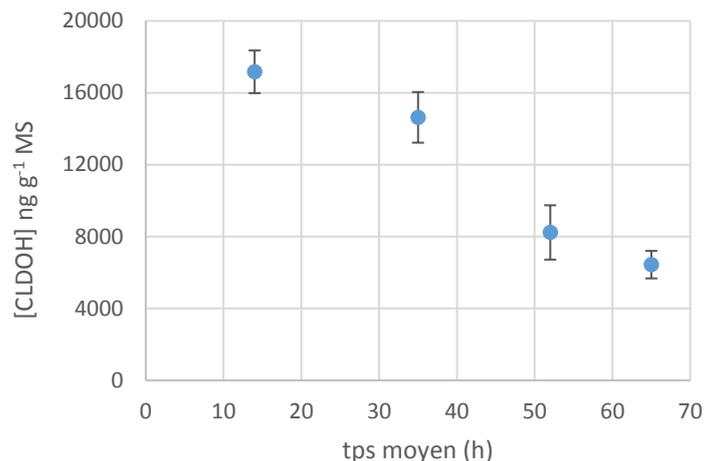


Figure 39 : Concentrations de CLD et de CLDOH retrouvées dans les fèces des brebis en fonction du temps moyen de l'intervalle de prélèvement (n=3) après administration i.v de CLDOH à 1 mg kg⁻¹ PV (n=3, moyenne ± écart-type moyen)

La figure 40 récapitule les voies et les formes retrouvées de la CLD et du CLDOH chez la brebis après i.v de CLD ou CLDOH.

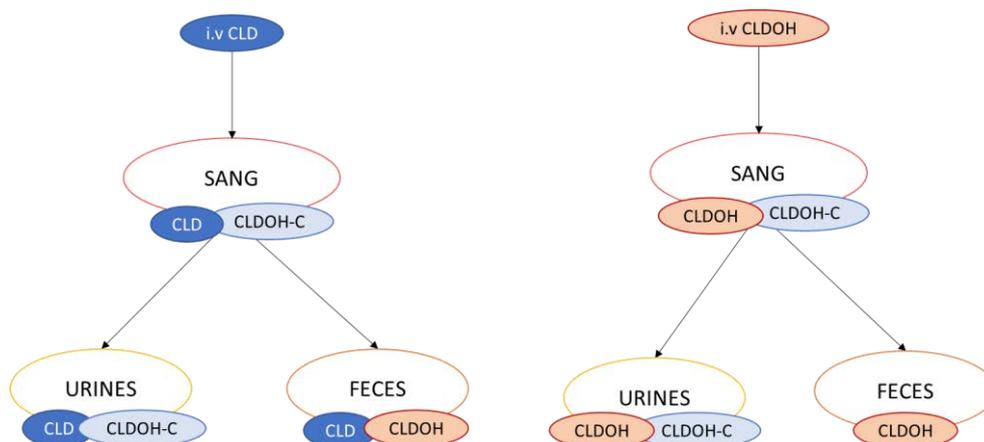


Figure 40 : Bilan des voies et formes d'élimination de la chlordécone et du chlordécol chez la brebis

3. Corrélation entre les concentrations sériques, urinaires et fécales

Afin de déterminer s'il existe des relations de proportionnalité entre les concentrations sériques (compartiment de référence où a été administré la molécule) et les matrices d'excrétion (urines et fèces) différentes corrélations ont été réalisées. La mise en évidence de corrélation entre les compartiments biologiques permet à partir d'un prélèvement d'une des deux matrices, la prédiction de la concentration de la matrice corrélée.

(i-1). Corrélation entre les concentrations sériques et les concentrations fécales

La figure 41 présente les corrélations obtenues par brebis entre les concentrations sériques et les concentrations fécales de CLD. La figure 42 présente les corrélations obtenues entre les concentrations fécales de CLD et de CLDOH. Pour ces corrélations, les quantités de fèces sont exprimées en unités de Matière Sèche (MS) afin d'éliminer les variations dues aux différences de taux d'humidité des fèces d'un prélèvement et d'une brebis à l'autre.

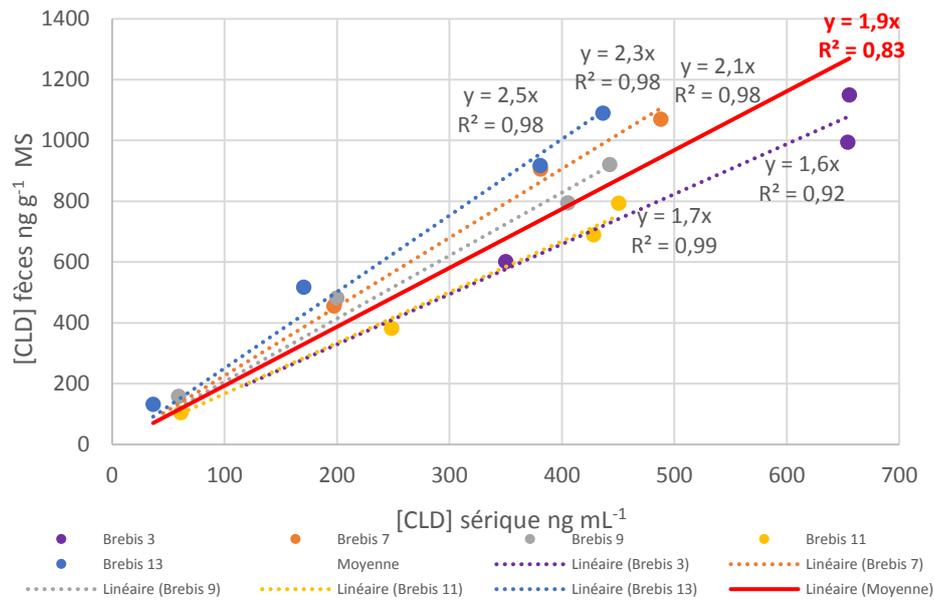


Figure 41 : Corrélation entre les concentrations sériques de CLD et les concentrations fécales de CLD chez la brebis

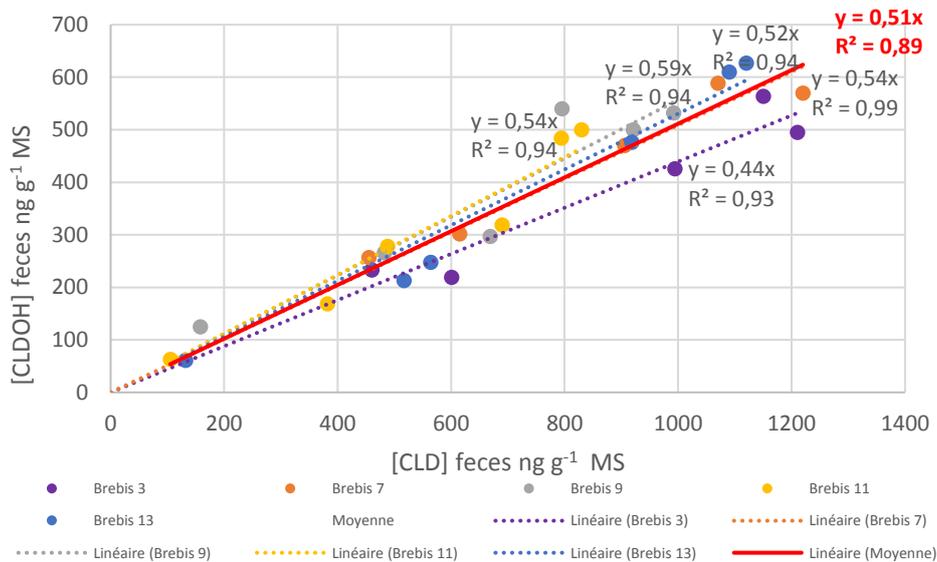


Figure 42 : Corrélation entre les concentrations fécales de CLD et de CLDOH chez la brebis

La figure 41 met en évidence une corrélation linéaire entre les concentrations sériques et fécales de CLD pour chacune des 5 brebis. Afin d'avoir une valeur de moyenne entre les concentrations fécales et sériques, une corrélation moyenne a été tracée en prenant en compte l'ensemble des points des 5 brebis (n = 18). La relation moyenne obtenue entre les concentrations est du type $[\text{CLD}]_{\text{fécale}} / [\text{CLD}]_{\text{sérum}} = 1,9$.

De même, une corrélation linéaire entre les concentrations fécales de CLD et de CLDOH a été mise en évidence (Figure 42). Une corrélation moyenne (en prenant en compte l'ensemble des points des 5 brebis, n = 18) correspondant à un ratio $[\text{CLDOH}]_{\text{fécale}} / [\text{CLD}]_{\text{fécale}} = 0,51$ a été obtenue.

(i-2). Corrélation entre les concentrations sériques et les concentrations urinaires

Ces travaux n'ont pas permis d'établir de corrélations entre les concentrations sériques et urinaires.

A l'issue de la partie 1, il est possible de conclure que :

- (1) Le temps d'élimination de la CLD chez la brebis est d'environ 24 jours dans le sang et il n'y a pas d'effet de la dose sur l'élimination de la molécule (pour des doses entre 0,04 et 1 mg kg⁻¹ PV). Ce temps de décontamination est compatible avec les pratiques d'élevage des ruminants aux Antilles Françaises.
- (2) La CLD s'élimine chez la brebis principalement via les fèces sous la forme de CLD et de CLDOH. Le CLDOH par comparaison à la CLD a un temps de demi-vie faible et est fortement métabolisé en CLDOH-conjugué.
- (3) Des corrélations entre les concentrations sériques et fécales de CLD ont été déterminées ouvrant sur la possibilité d'estimer le niveau de contamination de l'animal à partir d'un prélèvement fécal.
- (4) Des corrélations entre les concentrations de CLD et de CLDOH dans le sérum ont été déterminées. Cela permet de montrer que le métabolisme est constant tout au long de la cinétique d'élimination de l'animal.

PARTIE 2: Distribution tissulaire de la chlordécone et de ses métabolites après administration de chlordécone ou de chlordécol

Les protocoles 1 et 2 ont permis d'obtenir des données de distribution de la CLD et du CLDOH. Les résultats de distribution tissulaire de la CLD dans le foie, le tissu gras et le muscle, 72h après i.v de CLD sont présentés sur de la figure 43.

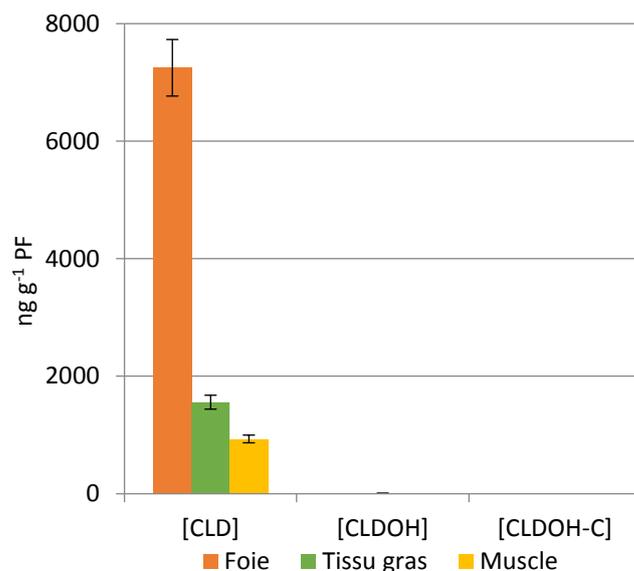


Figure 43: Distribution de la chlordécone dans les organes des brebis, 72h après i.v de CLD (n=3, les barres d'erreurs indiquent l'écart-type de la moyenne ; CLD : chlordécone, CLDOH : chlordécol, CLDOH-C : chlordécol-conjugué) Les conjugués n'ont pas été recherchés dans le tissu gras

Comme indiqué dans la synthèse bibliographique, le foie est l'organe qui contient les concentrations de CLD les plus importantes. Le ratio moyen entre les concentrations de CLD dans le foie et celles dans le muscle est de $7,9 \pm 1,1$ (n=3 ; moyenne \pm écart-type de la moyenne) et entre celles dans le foie et celles dans le tissu gras est de $4,7 \pm 0,4$ (n=3 ; moyenne \pm écart-type de la moyenne). Chez le bovin, le foie est en moyenne 8 ± 4 fois plus concentré que la hampe et 4 ± 1 fois plus concentré en CLD que le tissu adipeux péri-rénal (Lastel, 2016). Les ratios obtenus entre les différents organes dans ces travaux sont donc proches de ceux qui avaient été obtenus chez les bovins élevés dans des zones antillaises. De plus, chez le bovin les tissu-adipeux péri-rénaux sont 2 ± 1 fois plus concentrés en polluant que la hampe (Lastel, 2016). Dans ces travaux, un ratio moyen entre les concentrations de CLD dans le tissu gras et celle dans la hampe de 1.7 ± 0.2 (n=3 ; moyenne \pm écart-type de la moyenne) est retrouvé.

Concernant les métabolites de la CLD dans les organes, il a été possible de quantifier du CLDOH dans le foie et le tissu gras des brebis. Du CLDOH a été quantifié dans un foie de brebis et détecté dans les deux autres foies. Le ratio de concentrations CLD/CLDOH (exprimé en ng g⁻¹ PF) obtenu est de 1368/1. Des ratios dans le foie du même ordre de grandeur avaient été retrouvés dans le chapitre 1. Dans les tissus gras prélevés, du CLDOH a été systématiquement quantifié. Le ratio moyen de concentrations

CLD/CLDOH (exprimé en ng g^{-1} PF) est de 297 ± 46 ($n=3$; moyenne \pm écart-type de la moyenne). Cependant, quelque soit la matrice, les concentrations de métabolites par comparaison à celles de la CLD sont nettement inférieures voire proches de la limite de quantification.

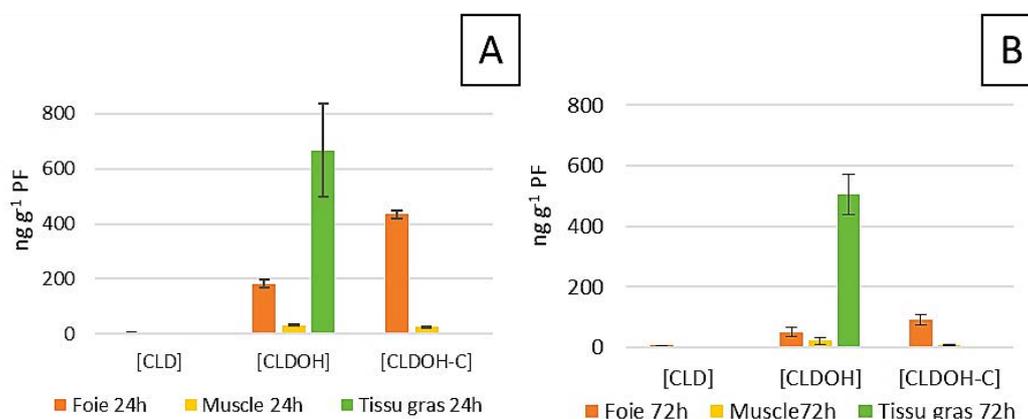


Figure 44 : Distribution du CLDOH et de ses métabolites 24h (A) et 72h (B) après i.v de CLDOH ($n=3$ sauf pour le tissu gras J3 où $n=2$, les barres d'erreurs indiquent l'écart-type de la moyenne ; CLD : chlordécone, CLDOH : chlordécol, CLDOH-C : chlordécol-conjugué). Les conjugués n'ont pas été recherchés dans le tissu gras

La figure 44 présente les données de distribution du CLDOH dans le foie, les muscles et le tissu gras après i.v de CLDOH. Il est possible d'observer que tout comme dans le sang, les concentrations de CLD présentes dans le foie des brebis sont de l'ordre de la limite de quantification à 24 et 72h après i.v de CLDOH. Ces données confirment la très faible réversibilité de la réaction de réduction du CLDOH chez la brebis. Le CLDOH sous sa forme libre se répartit dans le foie, les muscles et le tissu gras des brebis. Le tissu gras est l'organe qui concentre le plus le CLDOH. En effet, le ratio moyen entre les concentrations de CLDOH dans le tissu gras et celles du foie 24h après i.v de CLDOH est de $3,8 \pm 1,2$ et le ratio moyen entre les concentrations de CLDOH dans le tissu gras et celles dans le muscle est de 22 ± 5 ($n=3$, moyenne \pm écart-type de la moyenne). 72h après administration de CLDOH, le ratio moyen entre les concentrations de CLDOH dans le tissu gras et celles du foie est de 17 ± 3 et le ratio moyen entre les concentrations de CLDOH dans le tissu gras et celles du muscle est de 91 ± 38 ($n=3$, moyenne \pm écart-type de la moyenne). La comparaison des ratios de concentrations tissu gras/foie et tissu gras/muscle entre 24h et 72h après administration de CLDOH montre qu'il y a un stockage du CLDOH dans le tissu gras au cours du temps. A l'aide de ces données il est possible de conclure que le CLDOH a un comportement dit centrifuge par comparaison à la CLD. Le CLDOH-C a été retrouvé dans le foie et le muscle. Il n'a pas été possible d'appliquer le protocole de déconjugaison dans le tissu gras des brebis en raison du caractère hydrophobe de la matrice qui ne se mélangerait pas avec le tampon et l'enzyme de déconjugaison. Dans le foie, 24 et 72h après administration de CLDOH, les ratios moyens de concentrations de CLDOH-C/CLDOH retrouvés sont respectivement de $2,4 \pm 0,2$ et de $1,9 \pm 0,2$ ($n=3$, moyenne \pm écart-type de la moyenne). Dans le muscle, 24 et 72h après administration de CLDOH, les ratios moyens CLDOH-C/CLDOH retrouvés sont respectivement de $0,8 \pm 0,1$ et de $0,4 \pm 0,1$ ($n=3$,

moyenne \pm écart-type de la moyenne). Le ratio dans le foie permet de montrer que les concentrations de CLDOH-C entre 24h et 72h sont relativement constantes par rapport au ratio dans le muscle.

La partie 2 permet de conclure que chez la brebis :

- (1) La distribution tissulaire de la CLD après i.v de CLD est la même que celle retrouvée dans la bibliographie. La CLD se distribue principalement dans le foie puis dans le tissu gras et enfin dans le muscle.
- (2) Après i.v de CLD, il n'y a pas de stockage important des métabolites de la CLD dans les tissus périphériques cependant, le ratio CLD/CLDOH retrouvé est plus faible dans le tissu gras que dans le foie alertant sur une différence de comportement entre la CLD et le CLDOH.
- (3) Après i.v de CLDOH, le CLDOH se stocke plus facilement dans le tissu gras que dans le foie indiquant que le CLDOH a un comportement plus lipophile que celui de la CLD. Cette conclusion est cohérente avec les données du protocole i.v de CLD.

PARTIE 3: Approche quantitative des formes d'excrétion de la chlordécone et du chlordécol

1. Etude du transfert de la chlordécone et du chlordécol de la bile vers les fèces

Afin d'étudier les transferts de la chlordécone et de ses métabolites depuis le foie vers les fèces des prélèvements de bile et des contenus intestinaux ont été effectués (Protocole 2). La figure 45 présente les concentrations de CLD et des métabolites retrouvés dans la bile après i.v de CLD ou de CLDOH.

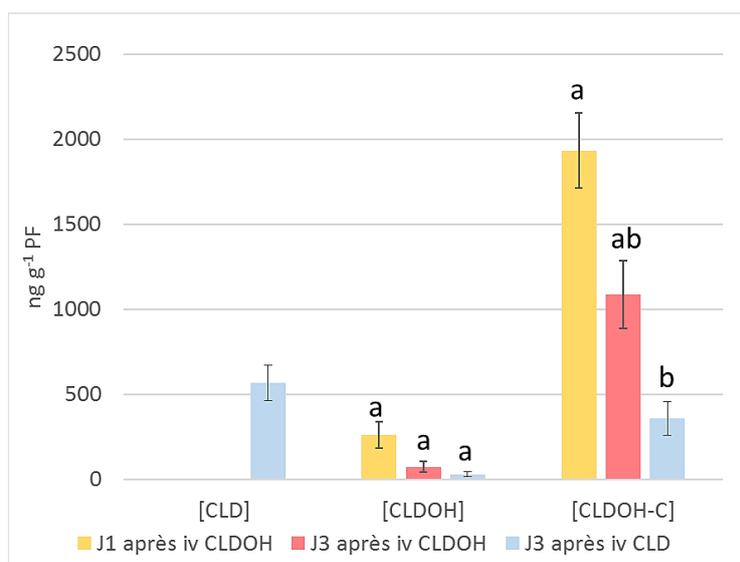


Figure 45: Concentrations de CLD, CLDOH et CLDOH-C dans la bile après i.v de CLD ou i.v de CLDOH (n=3, les barres d'erreurs indiquent l'écart-type autour de la moyenne)
Les valeurs par concentration de molécule qui ne portent pas la même lettre (a-b) sont significativement différentes (p-value < 0,05) pour une molécule et un traitement donné
(CLD : chlordécone, CLDOH : chlordécol, CLDOH-C : chlordécol-conjugué)

Dans la bile, de la CLD, du CLDOH et du CLDOH-C ont été quantifiés après i.v de CLD et uniquement du CLDOH et du CLDOH-C après i.v de CLDOH. Ces données confirment la non réversibilité de la réaction de réduction de la CLD en CLDOH chez la brebis. Comme indiqué dans la littérature, la bile est une matrice qui contient de fortes concentrations de métabolites de la CLD sous forme de CLDOH et de CLDOH-C. Après i.v de CLD, des ratios de concentrations dans la bile CLDOH-C/CLD de 0,5/1, 0,6/1 et 0,7/1 ont été retrouvés. Après i.v de CLDOH, des ratios de concentrations CLDOH-C/CLDOH de 9/1, 13/1 et 68/1. A l'aide de ces résultats, il est possible de conclure que les métabolites conjugués de la CLD produits au niveau du foie sont transférés dans la bile des brebis comme retrouvé chez le porc, l'Homme et la gerbille (Fariss *et al.*, 1980; Houston *et al.*, 1981; Soine *et al.*, 1983). De plus, cela confirme que l'équilibre de métabolisation du CLDOH est déplacé vers la formation du CLDOH-C. La figure 46 présente les proportions retrouvées de CLD et de métabolites dans la bile, le contenu du colon et les fèces après administration i.v de CLD.

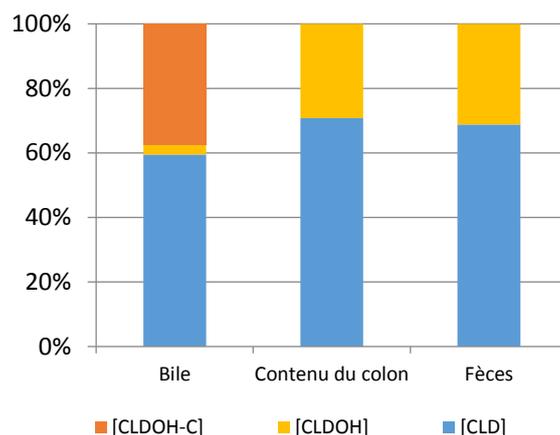


Figure 46 : Proportion de CLD et de métabolites dans la bile, le contenu du colon et les fèces après i.v de CLD

(CLD : chlordécone, CLDOH : chlordécol, CLDOH-C : chlordécol-conjugué ; concentrations normalisées à 100 %)

Etant donné les faibles concentrations de CLDOH retrouvées dans la bile et l'absence de CLDOH dans le sang, il est possible de conclure que le CLDOH sous forme libre arrivant dans les fèces proviendrait principalement de la déconjugaison intestinale du CLDOH-C. En effet, l'unique source d'acheminement du CLDOH vers les fèces est le CLDOH-C provenant de la bile qui subit une étape de déconjugaison intestinale. Cette hypothèse est confirmée sur la figure 46 où un changement de forme entre la bile et le contenu du colon peut être observé. De plus, il est possible de conclure que la déconjugaison intestinale s'est effectuée avant le passage des molécules dans le colon. Afin de préciser comment s'effectue le transfert intestinal du chlordécol, la figure 47 présente la répartition du CLDOH et de ses métabolites après i.v de CLDOH au début et à la fin du contenu du jéjunum.

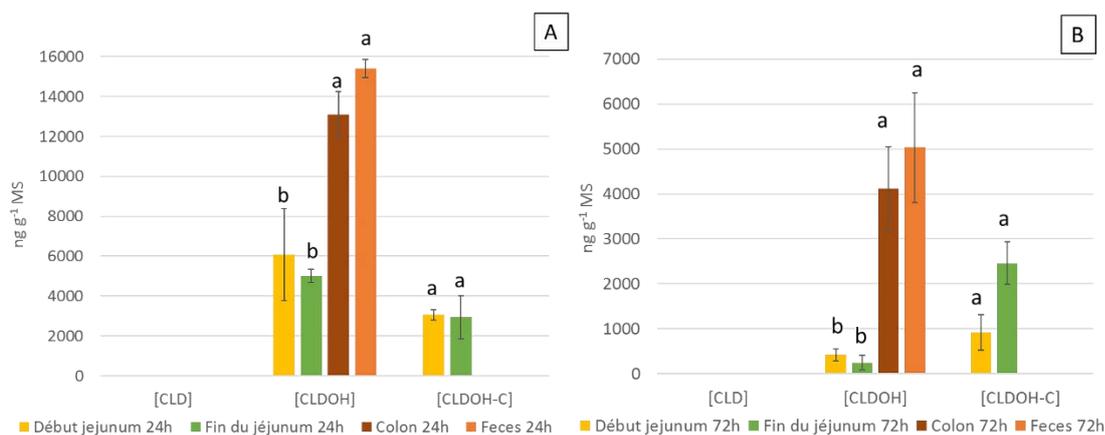


Figure 47 : Comparaison du transfert intestinal du CLDOH et de ses métabolites 24h (A) et 72h (B) après i.v de CLDOH

Les valeurs par concentration de molécule qui ne portent pas la même lettre (a-b) sont significativement différentes (p-value < 0,05) pour une molécule et un traitement donné

(CLD : chlordécone, CLDOH : chlordécol, CLDOH-C : chlordécol-conjugué)

De façon générale, cette figure 47 illustre les formes retrouvées du CLDOH et de ses métabolites dans l'intestin retrouvées 24h et 72h après i.v de CLDOH (concentrations exprimées en ng g⁻¹ MS). Du CLDOH et du CLDOH-C sont retrouvés au début et à la fin du jéjunum. Aucune différence significative

n'a été retrouvée entre les concentrations de molécules obtenues au début et la fin de l'intestin. Ces résultats permettent de conclure que la répartition des molécules le long de l'intestin resterait a priori la même. Après i.v de CLDOH, du CLDOH uniquement sous forme libre a été quantifié dans le contenu du colon et des fèces. Cette étude permet d'indiquer que la déconjugaison intestinale du CLDOH-C s'effectue entre la fin de l'intestin et le colon chez la brebis. La comparaison des concentrations de CLDOH et de CLDOH-C entre 24h et 72h dans les contenus intestinaux et les fèces permet d'observer une nette diminution des concentrations de CLDOH ($p < 0,05$) alors que celles de CLDOH-C entre les deux temps de prélèvement reste constante ($p > 0,05$). Une des hypothèses à cette différence observée serait que la diminution des concentrations de CLDOH serait due à l'élimination de la molécule via les fèces.

2. Détermination des pourcentages excrétés de chlordécone et chlordécol

Cette partie présente les pourcentages de la dose administrée de CLD ou de CLDOH retrouvés dans les fèces à l'aide des clairances sériques et fécales. Il n'a pas été possible de déterminer les clairances urinaires à cause de difficulté de traitement des prélèvements de masses urinaires. Cependant, seulement 3% du total de la quantité de molécules (CLD + métabolites) excrétées dans les fèces semblent être retrouvés dans les urines (comparaison des quantités obtenus au pic d'apparition des molécules dans les fèces et les urines). Ce résultat est cohérent avec les données de la synthèse bibliographique, c'est pourquoi dans la suite de ce travail, la voie urinaire est considérée comme nettement minoritaire devant la voie fécale.

(i-1). Pourcentage de la dose de CLD administrée éliminée via les fèces après i.v de CLD

Les clairances fécales de CLD obtenues par brebis sont présentées sur la figure 48.

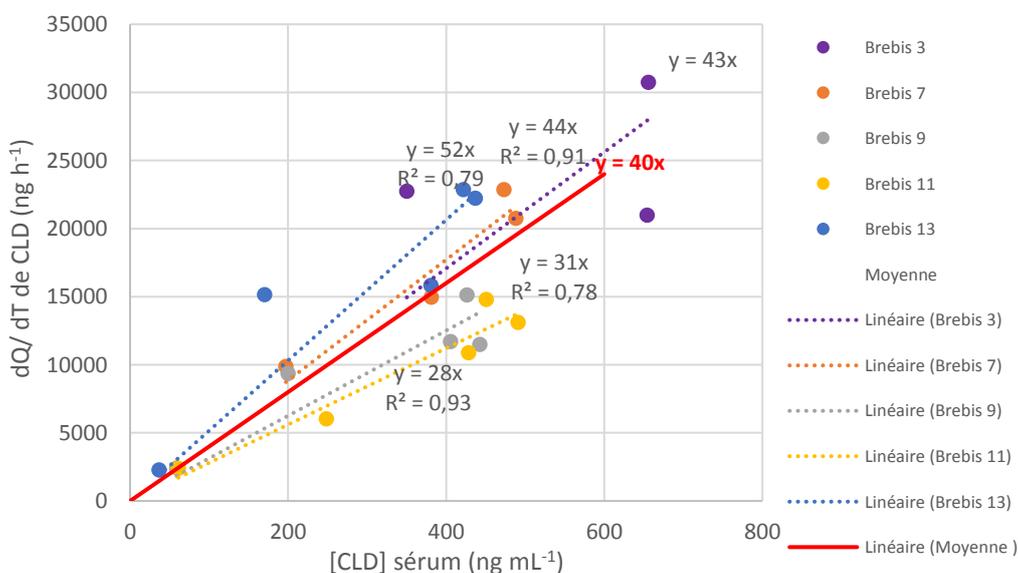


Figure 48 : Clairances fécales de la CLD chez la brebis après i.v de CLD

Les clairances fécales pour chacune des brebis sont déterminées à l'aide de la pente de chacune des courbes et les calculs de pourcentages de CLD éliminés dans les fèces par rapport à la dose administrée sont résumés dans le tableau 2.

Le CLDOH éliminé dans les fèces (après i.v de CLD) provient exclusivement du CLDOH-C. La figure 49 présente l'évolution du taux d'excrétion du CLDOH-t dans les fèces (après administration i.v de CLD) en fonction de la concentration en CLDOH-t dans le sérum c'est-à-dire la concentration de CLDOH-C quantifiée dans le sérum après administration i.v de CLD.

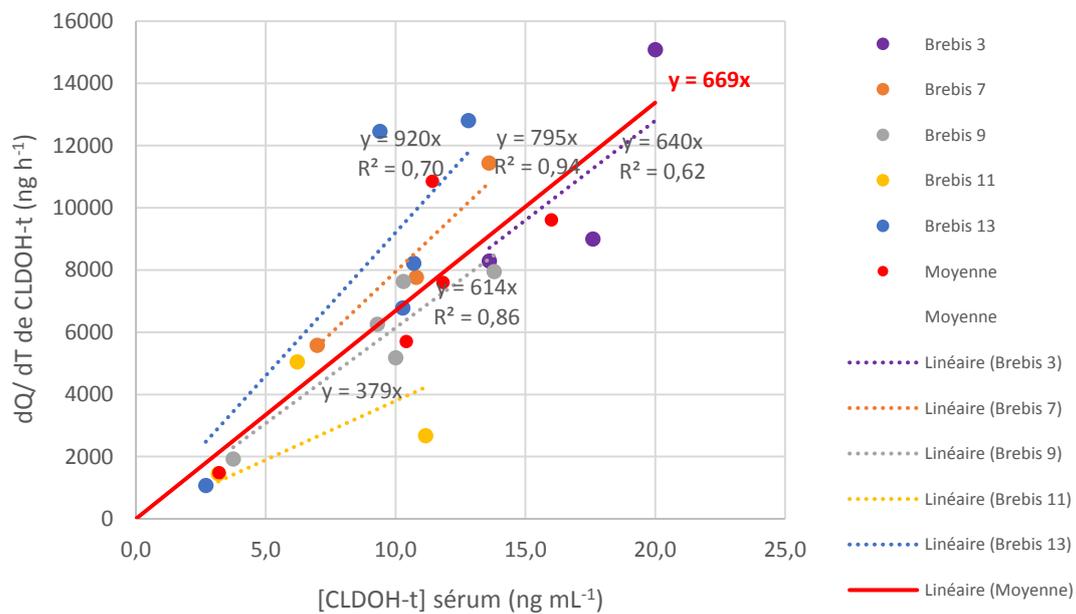


Figure 49 : Clairances fécales du CLDOH-t chez la brebis après i.v de CLD

Le tableau 21 résume les pourcentages excrétés de la dose de CLD administrée sous forme de CLD et de CLDOH.

Tableau 21 : Détermination des pourcentages de CLD excrétés via les fèces après i.v de CLD

	Moyenne	Ecart-type de la moyenne
Clairance fécale de la CLD mL h⁻¹ kg⁻¹ PV (n=5)	0,6	0,1
Clairance sérique de la CLD mL h⁻¹ kg⁻¹ PV (n = 5)	2,1	0,3
Clairance fécale du CLDOH mL h⁻¹ kg⁻¹ PV (n = 5)	11	1,6
Clairance sérique moyenne du CLDOH-t mL h⁻¹ kg⁻¹ PV (n = 3)	44	9
% de la dose excrété de CLD via les fèces sous forme de CLD	31	5
% de la dose excrété de CLD via les fèces sous forme de CLDOH	17	3
% total de la dose excrété sous forme de CLD + CLDOH	48	5

Le tableau 21 indique qu'en moyenne 31 ± 5 % de la dose administrée de CLD sont excrétés sous la forme de CLD et 17 ± 3 % sont excrétés sous la forme de CLDOH. Dans la partie 1, une corrélation entre les concentrations de CLD et de CLDOH de 2 avait été déterminée. Par conséquent un ratio de 2 entre les pourcentages excrétés sous forme de CLD et les pourcentages sous forme de CLDOH était attendu. Un ratio moyen de $2,2 \pm 0,6$ a été obtenu entre le % de la dose de CLD éliminé sous forme de CLD et le % de la dose éliminé sous forme de CLDOH. Par conséquent, les données d'élimination obtenues dans le tableau 2 sont cohérentes avec le ratio attendu. A l'aide de ces résultats, il est possible de conclure que l'élimination de la CLD n'est pas majoritairement pilotée par le métabolisme mais que celui-ci expliquerait 1/6 de l'élimination de la molécule. Chez le rat (qui ne métabolise pas la CLD) au bout de 84 jours, 65.5 % de la dose administrée avaient été éliminés via les fèces (Egle *et al.*, 1978). Cette valeur avait été obtenue à l'aide d'un comptage au ¹⁴C de la CLD et permet de rendre compte du pourcentage réel attendu de molécules excrétées dans les fèces. Au total à l'aide de ces travaux, 48 ± 5 % de la dose de CLD administrée a été éliminée via les fèces. Cette valeur est plus faible mais est tout de même cohérente avec les données obtenues chez le rat.

(i-2). Pourcentage de la dose de CLDOH administrée éliminée via les fèces après i.v de CLDOH

Les clairances fécales du CLDOH obtenues après i.v de CLDOH par brebis sont présentées à l'aide de la figure 50. Malgré le nombre réduit de points à disposition pour ajuster les clairances, ces dernières semblent suivre une relation de type Michaelis-Menten.

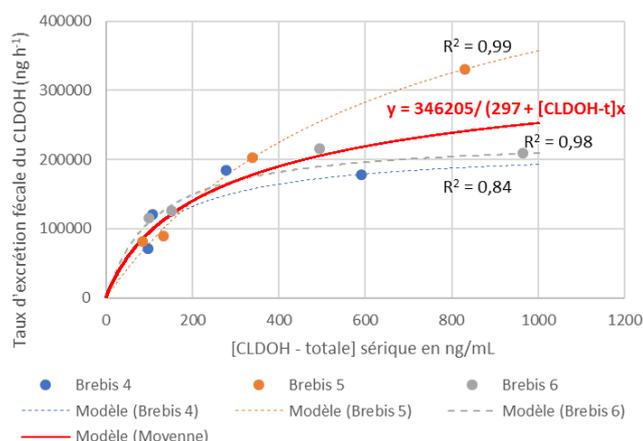


Figure 50 : Clairances fécales du CLDOH après i.v de CLDOH

A l'aide de chaque courbe, il a été possible de déterminer les K_M et V_{max} . Le ratio V_{max}/K_M permet ensuite d'obtenir les valeurs de clairances fécales. Comme indiqué précédemment, le CLDOH éliminé provient essentiellement du CLDOH-t présent dans le sérum. Le K_M , V_{max} , la clairance fécale, la clairance sérique et le pourcentage excrété moyen du CLDOH dans les fèces par rapport à la dose administrée sont rapportés dans le tableau 22 ci-dessous :

Tableau 22 : Détermination des pourcentages de CLDOH excrétés via les fèces après i.v de CLDOH (n=3)

	Moyenne	Ecart-type de la moyenne
K_M (ng mL ⁻¹)	297	176
V_{max} (ng h ⁻¹)	346205	12157
Clairance fécale du CLDOH (mL h ⁻¹) kg ⁻¹ PV	21	5
Clairance sérique moyenne du CLDOH-t (mL h ⁻¹) kg ⁻¹ PV	44	9
% de la dose excrété de CLDOH via les fèces	51	18

A l'aide du tableau 22, il est possible de conclure que le pourcentage moyen total de CLDOH excrété via les fèces par rapport à la dose administrée de CLDOH est de 51 ± 18 %. Ce pourcentage a été déterminé à l'aide de la clairance sérique moyenne du CLDOH-t obtenue pour les 3 brebis.

3. Proposition d'un premier modèle compartimental chez la brebis

Un modèle compartimental a été construit pour décrire simultanément le devenir de la CLD, du CLDOH et du CLDOH-C chez la brebis (Figure 51). Ce modèle est une simplification de la réalité visant à indiquer ce que deviennent les molécules dans l'organisme animal. Il s'appuie sur les travaux toxicocinétiques (voies, formes et quantités des molécules se distribuant et s'éliminant dans l'organisme) réalisés dans cette thèse. Un compartiment est un ensemble homogène de molécules sur le plan cinétique (Toutain and Bousquet-Melou, 2007b). Entre les compartiments, il y a des échanges ou transferts qui sont qualifiés de réversibles ou irréversibles. Ces échanges sont symbolisés par K_{ij} (microconstantes du modèle) des constantes de transfert du compartiment i vers j exprimées en inverse du temps et des réactions d'ordre 1.

K_{12} , K_{21} , K_{89} , K_{98} , K_{56} , K_{65} sont les constantes de transfert entre le sérum (compartiment 1, 5, 8 et 13) et les tissus périphériques (2, 6, 9 et 15) pour la CLD, le CLDOH et le CLDOH-C et un métabolite non connu.

K_{31} , K_{13} , K_{35} , K_{53} , K_{38} , K_{83} , K_{313} et K_{133} représentent les constantes de transfert entre le foie (compartiment 3) et le sérum (1,5,8 et 13).

K_{14} , K_{57} , K_{810} et K_{1315} représentent les constantes d'élimination de la CLD, du CLDOH, du CLDOH-C et d'un autre métabolite depuis le sérum vers les urines (4, 7, 10 et 15).

K_{311} , K_{312} et K_{316} sont les constantes d'élimination de la CLD, du CLDOH et d'un autre métabolite depuis le foie vers les fèces (11, 12 et 16).

Le modèle est décrit par un système d'équations différentielles qui permet de modéliser les variations des quantités de molécules en fonction du temps dans chaque compartiment. A chaque instant t , la quantité $X(t)$ de molécules dans un compartiment donné est la différence entre la quantité entrante et sortante. Cette variation est étudiée à l'aide de la dérivée de cette fonction (Toutain and Bousquet-Melou, 2007b). Les équations du modèle sont rapportées sur la figure 52.

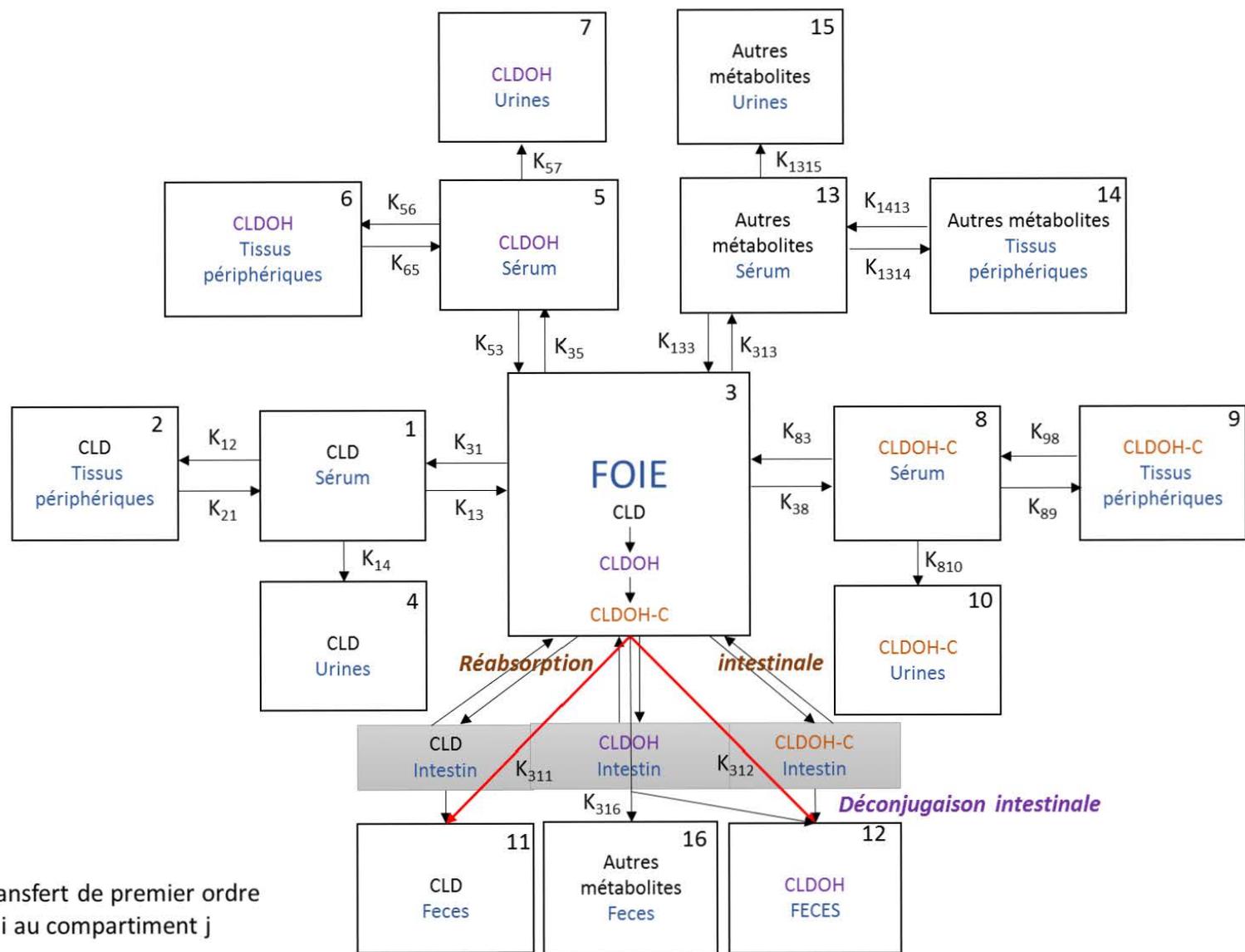


Figure 51 : Approche compartimentale de l'élimination de la chlordécone chez la brebis

$$\begin{aligned}
 C_{CLD} &= \frac{X_1}{V_1} \\
 C_{CLDOH} &= \frac{X_5}{V_5} \\
 C_{CLDOH-c} &= \frac{X_8}{V_8} \\
 C_{\text{Autres métabolites}} &= \frac{X_{13}}{V_{13}} \\
 \frac{dX_1}{dT} &= K_{21}X_2 + K_{31}X_3 - (K_{12} + K_{13} + K_{14})X_1 \\
 \frac{dX_2}{dT} &= K_{12}X_1 - K_{21}X_2 \\
 \frac{dX_3}{dT} &= K_{13}X_1 + K_{53}X_5 + K_{133}X_{13} + K_{83}X_8 - (K_{31} + K_{35} + K_{313} + K_{38} + K_{311} + K_{312})X_3 \\
 \frac{dX_4}{dT} &= K_{14}X_1 \\
 \frac{dX_5}{dT} &= K_{65}X_6 + K_{35}X_3 - (K_{56} + K_{53} + K_{57})X_5 \\
 \frac{dX_6}{dT} &= K_{56}X_5 - K_{65}X_6 \\
 \frac{dX_7}{dT} &= K_{57}X_5 \\
 \frac{dX_8}{dT} &= K_{38}X_3 + K_{98}X_9 - (K_{83} + K_{810} + K_{89})X_8 \\
 \frac{dX_9}{dT} &= K_{89}X_8 - k_{98}X_9 \\
 \frac{dX_{10}}{dT} &= K_{810}X_8 \\
 \frac{dX_{11}}{dT} &= K_{311}X_3 \\
 \frac{dX_{12}}{dT} &= K_{312}X_3 \\
 \frac{dX_{13}}{dT} &= K_{313}X_3 + K_{1413}X_{14} - (K_{133} + K_{1315} + K_{1314})X_{13} \\
 \frac{dX_{14}}{dT} &= K_{1314}X_{13} - K_{1413}X_{14} \\
 \frac{dX_{15}}{dT} &= K_{1315}X_{13} \\
 \frac{dX_{16}}{dT} &= K_{316}X_3
 \end{aligned}$$

Figure 52 : Equations mathématiques du modèle compartimental de la chlordécone chez la brebis

Cette étude a permis d'obtenir de nouveaux résultats concernant l'élimination de la CLD.

La chlordécone et le chlordécol s'éliminent dans le sang sous forme de CLD et de CLDOH-C chez la brebis. La forme majoritaire d'élimination de la CLD dans le sang est la CLD. Le temps de demi-vie d'élimination de la CLD est de 24 jours et son élimination ne dépend pas de la dose administrée (dans l'intervalle 0.04 à 1 mg kg⁻¹ PV des doses testées). Le temps de demi-vie du chlordécol est d'environ 2h. La chlordécone a une distribution centripète (stockage dans le foie) par comparaison à celle du chlordécol qui est centrifuge (stockage dans le tissu gras). La CLD s'élimine faiblement dans l'urine sous forme de CLD et CLDOH-C. La voie majoritaire d'élimination de la CLD et du CLDOH est la voie fécale et la CLD s'élimine sous forme de CLD et de CLDOH alors que le CLDOH s'élimine uniquement sous forme de CLDOH. Le CLDOH éliminé dans les fèces provient de la déconjugaison intestinale du CLDOH-C. Le CLDOH est un métabolite intermédiaire peu quantifié dans l'organisme de l'animal après ingestion de CLD hormis dans le tissu gras où la molécule se stockerait plus facilement. Environ 50 % de la dose totale administrée de CLD est éliminée via les fèces. L'élimination de la CLD est expliquée par 1/3 de son élimination sous sa forme parent et à 1/6 de son élimination sous forme CLDOH (un ratio de concentration CLD/CLDOH de 2/1 a été retrouvé tout au long de la cinétique de décontamination animale).

Les fèces seraient un bon indicateur de la contamination de l'animal étant donné qu'une corrélation significative a été déterminée entre les concentrations de CLD dans le sérum et celles dans les fèces.

A l'aide de ces résultats il a été possible de compléter le schéma d'élimination de la CLD (Figure 53) et de proposer un premier modèle compartimental de l'élimination de la chlordécone chez la brebis (Figure 51). Ces travaux de thèse seront discutés dans la partie discussion générale qui suit.

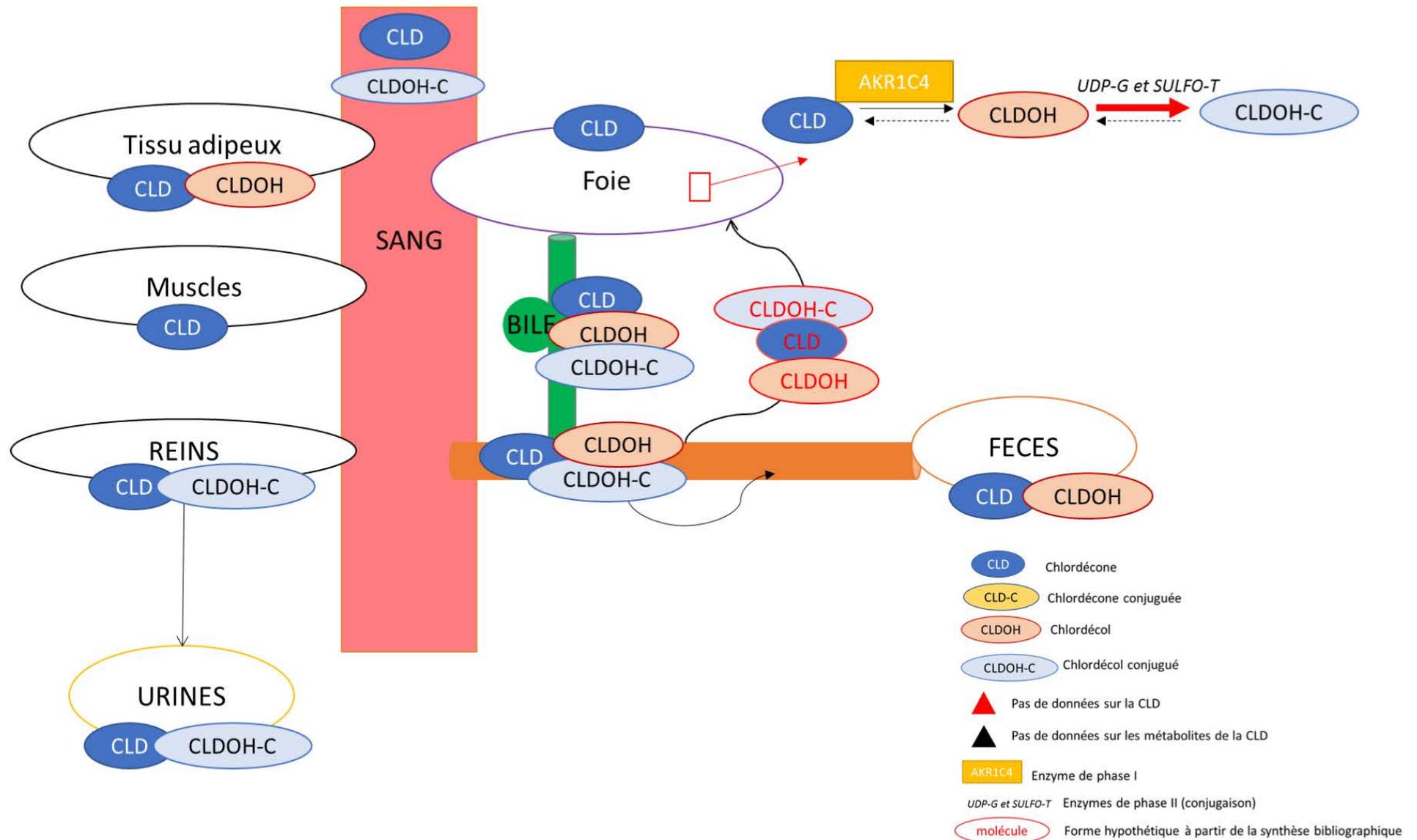
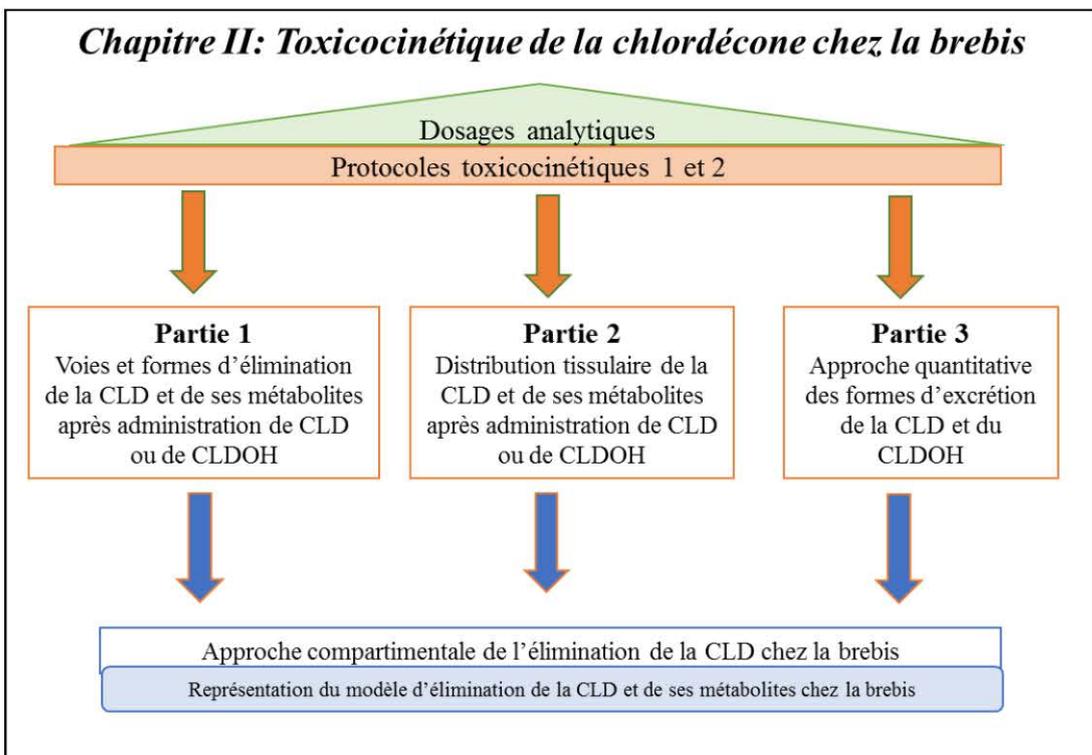
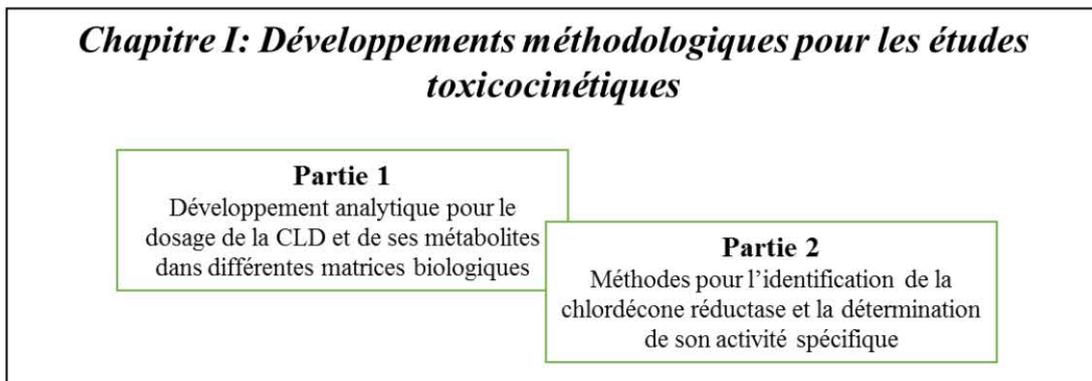
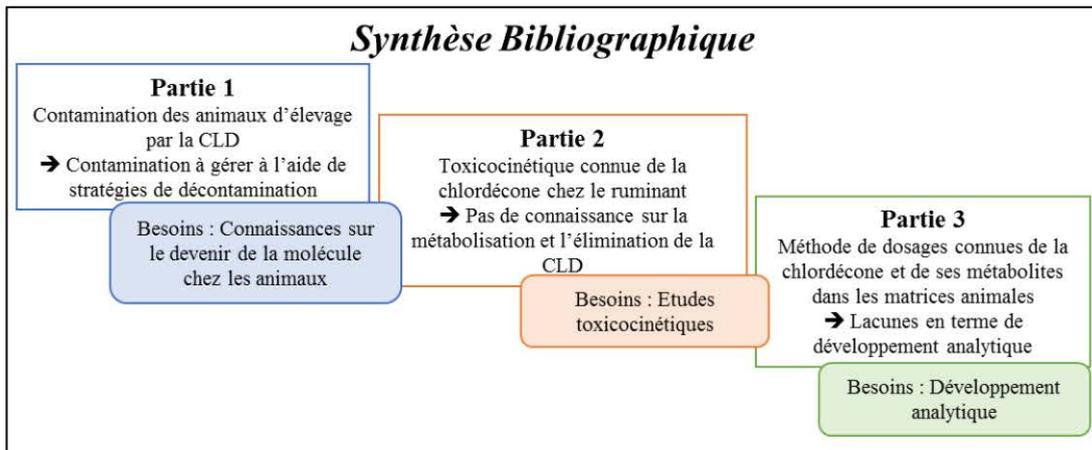


Figure 53 : Schéma global d'élimination de la chlordécone chez la brebis

5

Discussion Générale et Perspectives

Introduction Générale
Comment s'élimine la chlordécone (CLD) chez la brebis ?



Discussion générale et Perspectives

Conclusion générale

La discussion générale a pour objectif de replacer l'ensemble des résultats présentés dans le contexte général de la thèse. Cette thèse s'inscrit dans le cadre du programme ANR INSSICCA qui vise à proposer des stratégies innovantes pour sécuriser les systèmes de production animale en zones contaminées. L'objectif de ce programme est de réduire l'exposition de la population à la chlordécone à travers la maîtrise de la contamination animale. Par conséquent, l'application possible de ces travaux sur le terrain sera évoquée.

La partie discussion générale sera scindée en trois parties : une première axée autour de la toxicocinétique de la chlordécone, une deuxième autour du développement analytique de méthodes de dosage de la chlordécone et de ses métabolites et une troisième présentant les perspectives de nos travaux.

PARTIE 1: Une étude toxicocinétique support pour la gestion de la contamination animale aux Antilles

1. De nouvelles connaissances sur le devenir de la CLD

C'est la première fois que la métabolisation de la CLD a été démontrée chez un animal d'élevage. Cette nouvelle connaissance permet d'apporter des informations supplémentaires sur les mécanismes d'élimination de la CLD chez la brebis.

i. Le métabolisme, une voie d'explication des modalités de vitesse d'élimination de la chlordécone

(i-1). Linéarité de l'élimination de la CLD

Nos travaux ont montré qu'il n'y avait pas d'effet de la dose administrée de CLD (entre 0,04 et 1 mg kg⁻¹ PV de CLD) sur l'élimination de la chlordécone. En d'autres termes, aucun phénomène de saturation n'a été observé. Etant donné que nos travaux ont montré que la CLD était partiellement métabolisée en CLDOH par la chlordécone réductase, il est possible de conclure que le mécanisme permettant d'obtenir une linéarité de l'élimination de la CLD serait une non saturation des sites enzymatiques de la chlordécone réductase : l'organisme est capable de prendre en charge de fortes concentrations de CLD. Ce résultat est important pour la gestion de la contamination animale car il permet de conclure que même à une dose élevée (par comparaison à une dose de terrain), les paramètres d'élimination de la molécule resteront identiques.

(i-2). Temps de demi-vie et activités enzymatiques spécifiques

Nos travaux ont permis la détermination d'un temps de demi-vie moyen (n=15) de la CLD de 24 ± 1 jours (moyenne ± écart-type de la moyenne). Cependant des temps de demi-vies individuels entre les animaux d'une valeur minimale de 21 et d'une valeur maximale de 30 jours ont été obtenus. Par conséquent, des variations inter-individuelles sont visibles. Des variations inter-individuelles avaient été également observées à l'échelle enzymatique dans des foies de travailleurs exposés à la CLD (Molowa et al., 1986a). Une des hypothèses évoquées par Molowa et al. (1986a) concernant l'élimination de la CLD serait que les variabilités de concentration de chlordécone réductase dans le foie pourraient expliquer les variabilités obtenues des temps de demi-vie d'élimination sanguine de la molécule. Dans nos travaux, la détermination de l'activité chlordécone réductase n'a pas pu être effectuée dans les foies des 15 brebis du protocole toxicocinétique. Cependant, pour appuyer cette hypothèse, le dosage de l'activité chlordécone reductase a été effectué dans 3 foies de brebis non préalablement exposés à la chlordécone. Des

activités spécifiques de 5, 7 et 11 pmol CLDOH⁻¹ min⁻¹ mg⁻¹ de protéines ont été retrouvées dans les trois foies de brebis. Ces valeurs ont été obtenues à l'aide de la méthode de dosage du CLDOH dans les foies des animaux pour laquelle une incertitude de 10 % avait été obtenue à l'issue de l'étape de validation du CLDOH. Il n'est pas possible de directement utiliser cette valeur d'incertitude de la méthode pour comparer les activités enzymatiques retrouvées étant donné que l'incertitude due à l'extraction des protéines cytosoliques n'a pas été évaluée. Cependant la comparaison d'activités spécifiques de 5 et 11 pmol CLDOH⁻¹ min⁻¹ mg⁻¹ de protéines suggère une hypothèse de variabilité individuelle. Il sera intéressant par la suite d'établir un lien direct entre la mesure de l'activité spécifique et le temps de demi-vie sérique de la CLD. De plus, il serait aussi intéressant de comparer les activités spécifiques obtenues d'animaux exposés versus des animaux non exposés afin de vérifier l'hypothèse d'induction enzymatique indiquée par [Molowa *et al.* \(1986\)](#).

Hormis des variabilités de temps de demi-vie inter-individuelles, des temps de demi-vie d'élimination de la CLD différents entre les espèces sont connus. Le temps de demi-vie de la CLD chez l'ovin est d'environ 24 jours, chez le caprin d'environ 20 jours et chez le bovin de 43 jours. De plus, des travaux en cours au laboratoire UR AFPA montrent que le temps de demi-vie chez le porc est d'environ 50 jours. Ces comparaisons montrent que d'une espèce à l'autre des différences ou ressemblances en termes d'élimination sont visibles. Comme pour les variabilités inter-individuelles, les variabilités inter-espèces entre les temps de demi-vie obtenus pourraient être en partie expliquées par des variabilités de concentrations de chlordécone réductase dans l'animal. L'identification de l'AKR1C4 a été effectuée dans les foies de brebis, de chevreau, de perche, de canard et de porc. Ce premier dosage semi-quantitatif a permis de montrer que pour une même quantité de protéines totales déposées, l'intensité des bandes sur le Western-Blot entre la brebis et le chevreau sont très proches c'est-à-dire qu'ils auraient des quantités d'enzymes similaires dans leurs foies. A contrario, chez le porc, le canard et la perche des bandes moins intenses sont obtenues (par comparaison à la brebis) indiquant qu'ils possèdent des quantités d'enzymes plus faibles dans leurs foies. De plus, la détermination de l'activité spécifique chlordécone réductase a été effectuée dans les foies de brebis et porc. Des activités spécifiques de 5, 7 et 11 pmol CLDOH⁻¹ min⁻¹ mg⁻¹ de protéines ont été retrouvées dans 3 foies de brebis alors qu'une activité spécifique plus faible de 2 pmol CLDOH⁻¹ min⁻¹ mg⁻¹ de protéines a été retrouvée dans un foie de porc. La mesure d'une activité spécifique qui semblerait être plus forte chez la brebis est donc cohérente avec la présence de quantité plus importante d'enzyme. La brebis et le chevreau ont donc des quantités proches d'enzymes dans leurs foies et les temps de demi-vie obtenus entre les espèces sont proches : 24 et 21 jours. Les quantités plus importantes d'enzyme chez la brebis par rapport au porc sont cohérentes avec son temps de demi-vie d'élimination sanguin plus faible indiquant une vitesse d'élimination de la CLD plus rapide chez la brebis cohérente avec sa mesure d'activité spécifique spécifique. Par conséquent, les variations du métabolisme de la CLD entre les individus et entre les espèces permettraient en partie d'expliquer la vitesse d'élimination de la molécule c'est-à-dire son temps de demi-vie. Ces travaux sont à confirmer à l'aide d'un plus grand nombre d'échantillons et de différentes espèces.

ii. Le métabolisme hépatique permet d'expliquer en partie les formes distribuées et éliminées de la chlordécone

Après administration i.v de CLD, la distribution de la CLD chez l'ovine est similaire à celle connue dans la littérature : le foie est l'organe de concentration de la CLD. La quantification de fortes concentrations de CLD dans le foie des animaux indique sa capacité à fixer la CLD. La métabolisation dans le foie s'effectue donc à partir de la fraction libre de CLD. Dans le foie, le chlordécol a été mesuré à des ratios de CLD/CLDOH de concentration de 1368/1 à 4000/1, donc à très faibles concentrations et il n'y a pas eu de quantification possible de métabolites conjugués. Après i.v du CLDOH, son temps de demi-vie d'élimination est très court par comparaison à celui de la CLD (d'environ 2h contre 24 j) car il est rapidement métabolisé en CLDOH-C. Cela expliquerait pourquoi de faibles concentrations de CLDOH sont quantifiées dans le foie. La non quantification de CLDOH-C serait tout d'abord expliquée par une limite de quantification de la méthode trop élevée pour quantifier des traces de CLDOH-C dans le foie car du CLDOH-C a pu être quantifié dans le sang. Cependant, l'obtention de faibles concentrations de CLDOH-C serait due à une excrétion biliaire importante des métabolites conjugués étant donné que des concentrations importantes de conjugués ont été retrouvées dans la bile. Dans la littérature, des concentrations importantes de conjugués avaient aussi été retrouvées dans la bile de gerbille, d'Homme et de porc (Fariss *et al.*, 1980; Houston *et al.*, 1981; Soine *et al.*, 1983). Au cours de ces travaux, il n'a jamais été possible de quantifier de métabolites conjugués de la chlordécone (CLD-C) dans les matrices biologiques analysées. Par conséquent, nos résultats invalident les structures de métabolites conjugués de la CLD (CLD-C) proposées par Fariss *et al.* (1980). Le métabolisme intestinal des brebis permet de comprendre pourquoi du CLDOH sous forme libre est quantifié dans les fèces des animaux alors que ce métabolite intermédiaire n'est quasiment jamais dans l'organisme animal. En effet, nos travaux indiquent que des enzymes de déconjugaison seraient présentes entre la fin du jéjunum et le colon et déconjugueraient le CLDOH-C en CLDOH. Un ratio constant de concentrations entre la CLD et le CLDOH a été retrouvé et ce ratio de 2/1 était proche de celui retrouvé de 2,4/1 chez la gerbille (Houston *et al.*, 1981). Les métabolismes hépatiques et intestinaux permettent donc de comprendre les formes de distribution et d'élimination retrouvées de la CLD. Il sera intéressant de déterminer à l'aide du calcul de clairance hépatique (somme de la clairance métabolique et de la clairance biliaire) où se positionne le foie en tant qu'organe épurateur de la CLD et du CLDOH. En effet, nos travaux indiquent un comportement différent du foie vis-à-vis de la CLD et du CLDOH et cette différence sera notamment visible lors de calculs de clairance métaboliques et biliaires.

iii. ... mais le métabolisme ne pilote quantitativement pas l'élimination de la chlordécone

Environ 1/3 de la dose administrée de CLD s'éliminerait sous forme de CLD et 1/6 s'éliminerait sous forme de CLDOH. Nos travaux permettent pour la première fois de déterminer les quantités éliminées de CLD et de CLDOH par un animal d'élevage. Ce bilan quantitatif permet de conclure que le métabolisme connu joue un rôle dans l'élimination de la CLD mais ne piloterait quantitativement pas son élimination. En plus de montrer que l'élimination de la CLD était majoritairement faite sous sa forme parent, ces données quantitatives permettent de faire un bilan des quantités éliminées par rapport à la dose administrée. Ces travaux ont mis en évidence que 48 ± 5 % de la dose de CLD administrée aux brebis ont été éliminés via les fèces. Or la période de décontamination des animaux a été de 84 jours. Le temps de demi-vie de la brebis est de 24 jours par conséquent, la période de décontamination a permis d'éliminer 90 % de la dose administrée de l'organisme animal. En termes de bilan quantitatif, 30-40 % de la dose administrée n'a pas été retrouvée. La première hypothèse qui expliquerait ce delta de 30 à 40% serait une incertitude sur le bilan quantitatif effectué de la CLD. En effet, le calcul des pourcentages excrétés de CLD et de CLDOH se base sur le rapport de la clairance sérique et de la clairance fécale des molécules. Or, la clairance fécale dépend principalement des concentrations de molécules obtenues et des quantités de fèces prélevées. Par conséquent, des pertes éventuelles de fèces lors des prélèvements pourraient expliquer une sous-estimation du pourcentage de la quantité totale éliminée via les fèces. Cependant, dans la littérature, 65,5 % de la CLD administrée a été retrouvée dans les fèces des rats par quantification au C14 (Egle *et al.*, 1978). Par conséquent, dans nos travaux, il serait éventuellement possible d'avoir une sous-estimation du pourcentage total excrété cependant, cette incertitude n'atteindrait pas les 30 à 40 % manquants du bilan d'élimination. Une deuxième hypothèse serait donc qu'il y aurait une voie de stockage et/ou de métabolisation et/ou d'élimination de la CLD qui serait inconnue. Il est possible que la CLD, un ou plusieurs de ses métabolites se métabolisent en une autre molécule actuellement non recherchée dans nos échantillons et que cette molécule (1) se stocke dans l'organisme ou (2) s'élimine via les urines ou les fèces.

2. Application à court terme des nouvelles connaissances chez la brebis

i. Réduction de l'exposition du consommateur à la chlordécone et de ses métabolites

(i-1). Stratégies de décontamination animale

Les protocoles toxicocinétiques ont montré que les demi-vies de la CLD dans l'organisme des ruminants sont relativement courtes (entre 20 et 40 jours selon les espèces) et permettent d'envisager des périodes de décontamination des animaux sur des pas de temps compatibles avec les pratiques d'élevage. L'objectif du programme est de construire des abaques et des équations par espèce pour déterminer les temps de décontamination nécessaires en fonction de la concentration sanguine initiale (contamination) et de la valeur finale visée (animal apte à être consommé par la population). La valeur visée a en effet été déterminée à partir de la LMR dans les tissus et de la relation de corrélation existant entre les

concentrations de CLD dans les différents tissus. La construction des abaques et des équations repose donc sur les temps de demi-vies déterminés à l'aide des protocoles toxicocinétiques à disposition. Or, en raison de l'hétérogénéité des concentrations de CLD dans le sol, différentes doses de CLD peuvent être ingérées par l'animal. Nos travaux ont démontré la linéarité de l'élimination sanguine de la CLD entre 0,04 et 1 mg/kg PV. Par conséquent, quelque soit la dose ingérée par l'animal le même temps de demi-vie sera utilisé pour la détermination des temps de décontamination de l'animal. Ce résultat est primordial et permettra de construire des abaques simplifiés sans prise en compte de la dose ingérée de CLD par l'animal. Le suivi de la décontamination animale pourrait s'effectuer à l'aide de matrices autres que le sang permettant d'estimer le niveau d'exposition de l'animal telles que les fèces, les urines, les poils, le lait ou encore les œufs. A l'aide de ces travaux, une corrélation significative a été démontrée entre les concentrations de CLD sériques et fécales. Par conséquent, un prélèvement fécal (technique moins invasive qu'un prélèvement sanguin) permettrait de renseigner sur les niveaux de contamination de l'animal. Il sera intéressant de confirmer les corrélations entre les concentrations sériques et fécales et de confirmer ce calcul prédictif de décontamination sur le terrain pour valider cette démarche comme outil de gestion.

(i-2). Est-il possible de retrouver du chlordécol dans les DAOA ?

Nos résultats ont montré qu'après administration d'une dose i.v unique de CLD de 1 mg kg⁻¹ PV de CLD, de très faibles concentrations de CLDOH sont quantifiées dans le foie des brebis. Le chlordécol a été quantifié dans le tissu gras et des ratios de concentrations CLD/CLDOH de 300/1 contre des ratios de 1368/1 à 4000/1 dans le foie ont été retrouvés. Le chlordécol a donc un comportement plus lipophile que celui de la CLD et ce résultat est en accord avec les données obtenues après i.v de CLDOH. Dans la bibliographie, des travaux avaient montré qu'après administration (par voie intrapéritonéale) de CLDOH chez la gerbille et le rat, de la CLD avait été en majorité quantifiée dans les foies (ratio de concentration CLD/CLDOH entre 6/1 et 15/1). Dans nos travaux, la réversibilité de la réaction métabolique n'a pas été la réaction majoritairement obtenue chez la brebis. Par conséquent, une des hypothèses est que la brebis ne posséderait pas l'enzyme (non caractérisée) capable d'effectuer la réaction d'oxydation du CLDOH en CLD ou posséderait de très faibles quantités de cette enzyme dans son foie. Ce résultat est important pour la compréhension de la distribution et de l'élimination de la molécule chez les animaux d'élevage. Actuellement, la LMR appliquée pour la CLD prendrait à priori en compte la toxicité du CLDOH (<http://questions.assemblee-nationale.fr/q14/14-9191QE.htm>). Chez des bovins naturellement contaminés par la CLD et ayant des concentrations dans leurs foies de CLD 2 à 8 fois la LMR en vigueur, il n'a pas été possible de quantifier de CLDOH (limite de quantification trop élevée pour le CLDOH). Ce métabolite serait aussi toxique que la CLD selon les études de [Desaiyah and Koch, \(1975\)](#), [Soileau and Moreland, \(1983\)](#) et [Moreland and Soileau, \(1988\)](#). Cependant, il n'est pas possible d'exclure totalement un apport de toxicité par le chlordécol produit par les animaux étant donné que peu

d'études sur la toxicité de ce métabolite sont connues. De plus, nos travaux ont été effectués sur le devenir du CLDOH dans des conditions de doses saturantes et à l'aide d'une dose unique de CLDOH. Il serait important de vérifier lors des plans de surveillance de la CLD dans les DAOA s'il y a présence de CLDOH.

ii. Rejet de la chlordécone dans l'environnement...mais aussi du chlordécol, son métabolite qu'il faudra surveiller

Ces travaux de thèse montrent que la brebis excrète 1/3 de la dose ingérée sous forme de CLD et 1/6 de sous forme de CLDOH via les fèces. Le ratio de concentration dans les fèces entre les concentrations de CLD et de CLDOH est de 2/1. Ces données pourront servir à estimer les quantités de CLD et de chlordécol rejetées dans l'environnement en se basant par exemple sur des quantités approximativement ingérées par l'animal (en fonction de la teneur des sols). Dans le récent rapport sur la contamination des bassins versants de la Guadeloupe continentale par la CLD, 86,5 % des pesticides retrouvés dans les bassins de la Guadeloupe (Basse-Terre) étaient la CLD, la 5b-hydrochlordécone et le chlordécol (Rochette *et al.*, 2017). Sur 62 bassins, la CLD a été retrouvée dans 40 bassins, la 5b-hydrochlordécone a été retrouvée dans 24 bassins et le chlordécol dans 12 bassins. Etant donné que le chlordécol est un métabolite retrouvé jusqu'à présent uniquement chez l'animal, nos travaux permettent d'apporter des informations supplémentaires sur l'origine du chlordécol qui est retrouvé dans l'eau. Par conséquent du CLDOH en plus de la CLD est rejeté dans l'environnement. Or actuellement, peu d'études de toxicité ont été effectuées concernant ce métabolite. Une des applications directes de ce résultat serait le suivi du devenir du CLDOH dans l'environnement. A-t-il la même persistance dans les sols que la CLD ? Est-il possible qu'il soit biodégradé par les bactéries du sol ? Comment s'accumulerait-il dans les produits végétaux ? Chez l'animal, nos travaux ont permis de répondre aux questions sur le devenir du CLDOH. Le CLDOH a un temps de demi-vie court de 2h environ par rapport à la CLD et se stocke plus facilement dans le tissu gras que dans le foie et le muscle et 1/3 de la dose ingérée de CLDOH est éliminé sous forme de CLDOH dans les fèces.

PARTIE 2: Un développement analytique propice à des projets portant sur la chlordécone

1. Une nouvelle méthode d'extraction sensible de la chlordécone et du chlordécol

i. Une méthode d'analyse fiable et sensible de dosage de la chlordécone et du chlordécol

Des manquements et des lacunes concernant les méthodes de dosage du CLDOH avaient été présentés. En effet, le dosage du CLDOH s'effectue soit par GC-MS, GC-ECD (Fariss *et al.*, 1980) ou à l'aide de l'unique méthode existante par LC-MS/MS de dosage simultané de la CLD et du CLDOH (He *et al.*, 2015). Cette dernière a été développée pour le dosage de la CLD et du CLDOH dans l'eau et le sol et une limite de quantification assez élevée de 30 ng mL⁻¹ avait été obtenue pour le CLDOH. De plus, les auteurs n'utilisaient pas la quantification à l'aide d'étalons internes isotopiques. Or, ce mode permet de garantir une confiance élevée dans les résultats obtenus à l'issue de l'extraction des molécules mais aussi d'obtenir une méthode de dosage plus spécifique.

La nouvelle méthode de dosage simultané de la CLD et du CLDOH que nous avons mis en place dans ces travaux permet d'atteindre des limites de quantification à l'état de traces pour le CLDOH. Par exemple, dans les urines, les limites de quantification obtenues pour la CLD et le CLDOH sont respectivement de 0,1 ng mL⁻¹ et de 1,3 ng mL⁻¹ (soit un gain de sensibilité d'un facteur 20 environ par rapport à la méthode de He *et al.* (2015)). L'obtention de limites de quantification aussi faibles pour le CLDOH est en partie due à une extension du domaine de linéarité. Le domaine de linéarité dans les travaux de He *et al.* (2015) s'étend de 30 à 200 ng mL⁻¹ alors que dans ces travaux il s'étend de 1 à 100 ng mL⁻¹. En effet, nous avons pu mettre en place une méthode de dosage plus sensible pour le CLDOH grâce au choix d'une transition MRM plus spécifique (490,7 → 35 contrairement au suivi de la transition 490,7 → 490,7 par He *et al.* (2015)). De plus, l'utilisation des étalons internes isotopiques ¹³C-CLD et ¹³C-CLDOH permet d'améliorer la précision autour du domaine de linéarité, d'avoir une confirmation de l'ion suivi et de corriger les pertes éventuelles lors des extractions. Par conséquent, les deux grands apports de la méthode de dosage simultané de la CLD et du CLDOH mise en place dans nos travaux par rapport à la bibliographie sont : le suivi d'une transition MRM plus spécifique pour le CLDOH et l'utilisation de l'étalon interne isotopique ¹³C-CLDOH.

ii. Une même méthodologie d'extraction pour différentes matrices biologiques animales

La synthèse bibliographique a également permis de mettre en évidence différentes stratégies d'extraction de la CLD et du CLDOH dans les matrices biologiques animales. L'unique méthode d'extraction

de la CLD et du CLDOH dans toutes les matrices biologiques était la méthode de Fariss *et al.* (1980). Les récents développement de méthodes d'extraction n'avaient porté que sur la CLD. Dans le foie et le tissu gras la technique d'extraction était de type solide/liquide et dans le sérum l'extraction se faisait à l'aide de la technique par SPE. Dans ces travaux, la première difficulté était d'obtenir (1) une méthode d'extraction permettant d'extraire simultanément la CLD et le CLDOH en fournissant des taux de récupération satisfaisants des molécules, la deuxième était (2) d'établir une méthode qui puisse facilement s'adapter à différentes matrices biologiques et la dernière que (3) ces méthodes soient simples d'exécution et les moins coûteuses possibles. Par conséquent, l'apport majeur démontré dans nos résultats est que la technique d'extraction QuEChERS permet d'extraire simultanément la CLD et le CLDOH dans un grand nombre de matrices biologiques animales d'intérêts c'est-à-dire le sérum, le foie, la bile, le tissu gras, les fèces et les urines. Cette technique d'extraction est simple et donc facilement adaptable à différentes matrices. Ce résultat est très important pour la problématique de dosage de la CLD et de ses métabolites dans les différentes matrices car les méthodes actuelles de dosage de la CLD sont longues et par conséquent coûteuses.

iii. Le dosage des métabolites conjugués de la chlordécone et du chlordécol

Dans nos travaux, les métabolites conjugués de la CLD et du chlordécol n'ont pas été directement quantifiés. Ainsi, un traitement enzymatique est employé tout comme dans la littérature pour hydrolyser les fonctions conjuguées (sulfaté + glucuronné) à l'aide d'enzymes de déconjugaison. Le traitement enzymatique effectué permet d'obtenir la concentration totale de métabolites conjugués sans distinction du sulfaté et du glucuronné. Par conséquent deux limites sont visibles dans nos travaux : (1) le rendement de déconjugaison enzymatique n'a pas été vérifié et (2) il n'est pas possible de faire la distinction entre les métabolites sulfatés et glucuronnés. Or, dans les résultats des protocoles toxicocinétiques, du chlordécol conjugué a été quantifié. Afin d'assurer nos résultats, nous avons optimisé le protocole de déconjugaison afin de libérer les quantités maximales de métabolites conjugués. Cette optimisation est un apport intéressant car nous ne disposons pas de données d'optimisation des protocoles de déconjugaison datant des années 1980. Cependant, il n'est pas possible de conclure définitivement sur une déconjugaison totale des conjugués. Par conséquent, afin d'apporter des réponses aux deux limites énoncées précédemment, du chlordécol sulfaté a été synthétisé à partir des urines de brebis du protocole toxicocinétique 1. La synthèse du chlordécol sulfaté a été possible grâce à une collaboration entre le CEA-Génoscope d'Evry et l'UR AFPA. A l'issue de l'optimisation de la détection du chlordécol sulfaté par LC-MS/MS, il a été possible d'obtenir une méthode permettant le dosage simultané de la CLD, du chlordécol et du chlordécol-sulfaté (CLDOH-S) (Figure 54). A l'aide de cette méthode, un échantillon d'urine issu du protocole 2 et prélevé à l'intervalle de temps 24-45h a été réanalysé avant et après déconjugaison enzymatique à l'aide de la méthode LC-MS/MS permettant le suivi du CLDOH-S (Figures 55 et 56).

Le gradient d'élution utilisé n'est pas optimal mais permet de visualiser les molécules recherchées. Sur la figure 55 présentant le résultat des urines avant déconjugaison, du CLDOH-S et du CLDOH sont élués respectivement à 2,01 et 5,38 min. Ce premier résultat montre que la méthode QuEChERS développée et validée dans les urines pour le dosage de la CLD et du CLDOH permet aussi d'extraire le CLDOH-S. Le taux de récupération en étalonnage externe obtenu du CLDOH-S est tout de même faible : de l'ordre de 20 %. En étalonnage externe, une concentration de $1,14 \text{ ng mL}^{-1}$ de CLDOH-S a été retrouvée dans les urines. Cependant, étant donné que la détermination de la concentration de CLDOH-S n'a pas pu être corrigée par un étalon interne ; cette valeur est donc sous-estimée et il n'a donc pas été possible de conclure sur la forme (glucuroné ou sulfaté) majoritairement présente dans les urines des brebis. Une des perspectives de nos travaux sera d'améliorer la quantification du chlordécol sulfaté afin de conclure sur la forme majoritairement excrétée par la brebis. Sur la figure 56 présentant les résultats des urines après déconjugaison, du CLDOH-S et du CLDOH sont élués respectivement à 2,27 min. et 5,38 min. Sur la transition MRM 1 du CLDOH-S, une impureté est visible à proximité du pic d'élution du CLDOH-S. Cependant, le temps de rétention du CLDOH-S à 2,27 min est confirmé à l'aide de sa deuxième transition MRM. Lorsque l'on compare l'aire du pic de CLDOH-S avant déconjugaison (Figure 55) et l'aire du pic du CLDOH-S après déconjugaison (Figure 56), le pic après déconjugaison ne représenterait plus que 10 % du pic de CLDOH-S avant déconjugaison. Cela laisserait supposer que le protocole utilisé pour la déconjugaison du sulfaté serait efficace. Cependant, il sera important de confirmer ces résultats à l'aide d'un plus grand nombre d'échantillon et si possible l'utilisation d'un étalon interne pour le CLDOH-S. De plus, il serait intéressant de synthétiser du chlordécol-glucuroné pour déterminer la forme majoritaire de conjugaison du chlordécol qui est excrétée par la brebis.

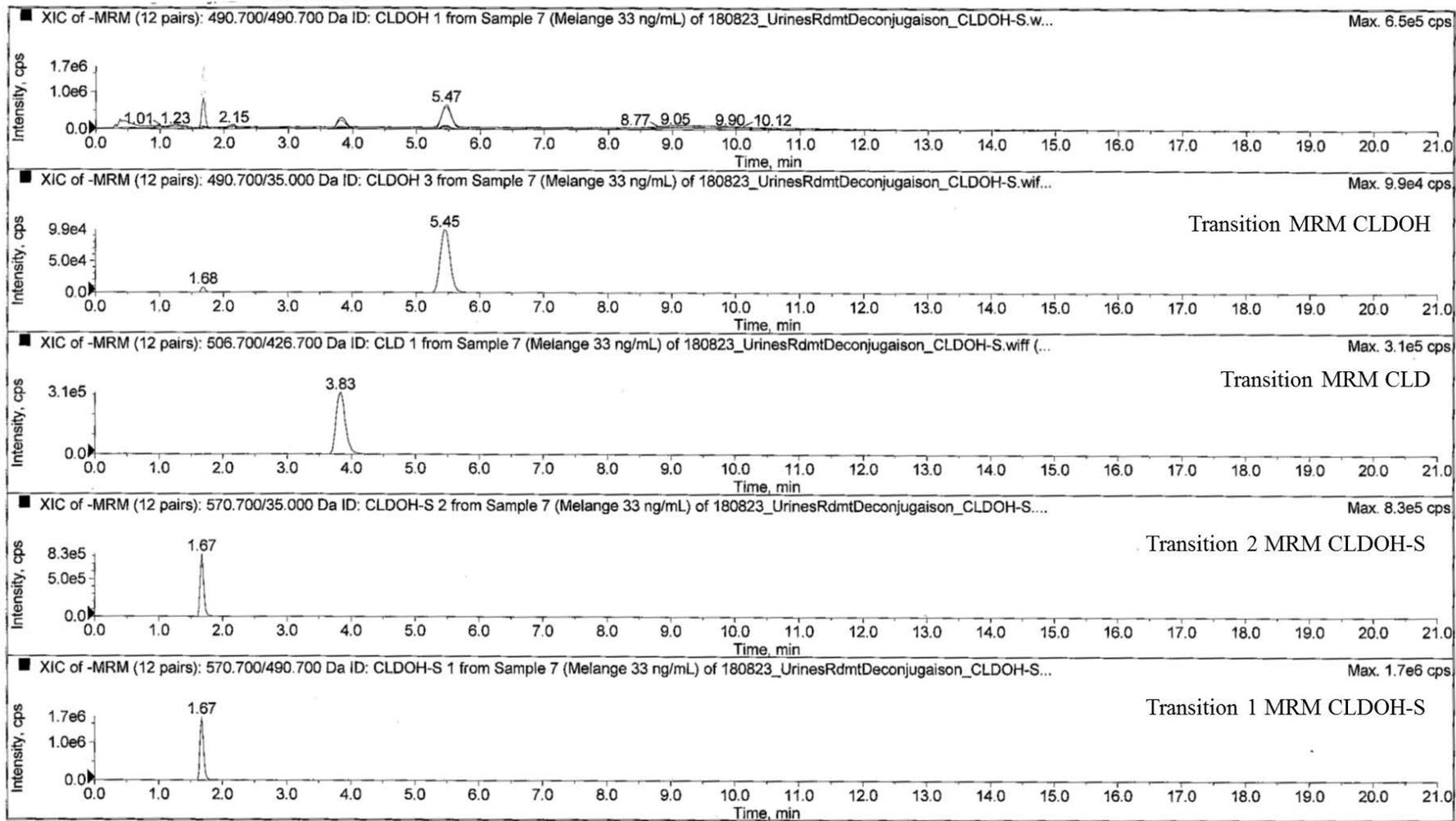


Figure 54 : Chromatogramme d'un mélange CLD, CLDOH et CLDOH-S obtenu par LC-MS/MS

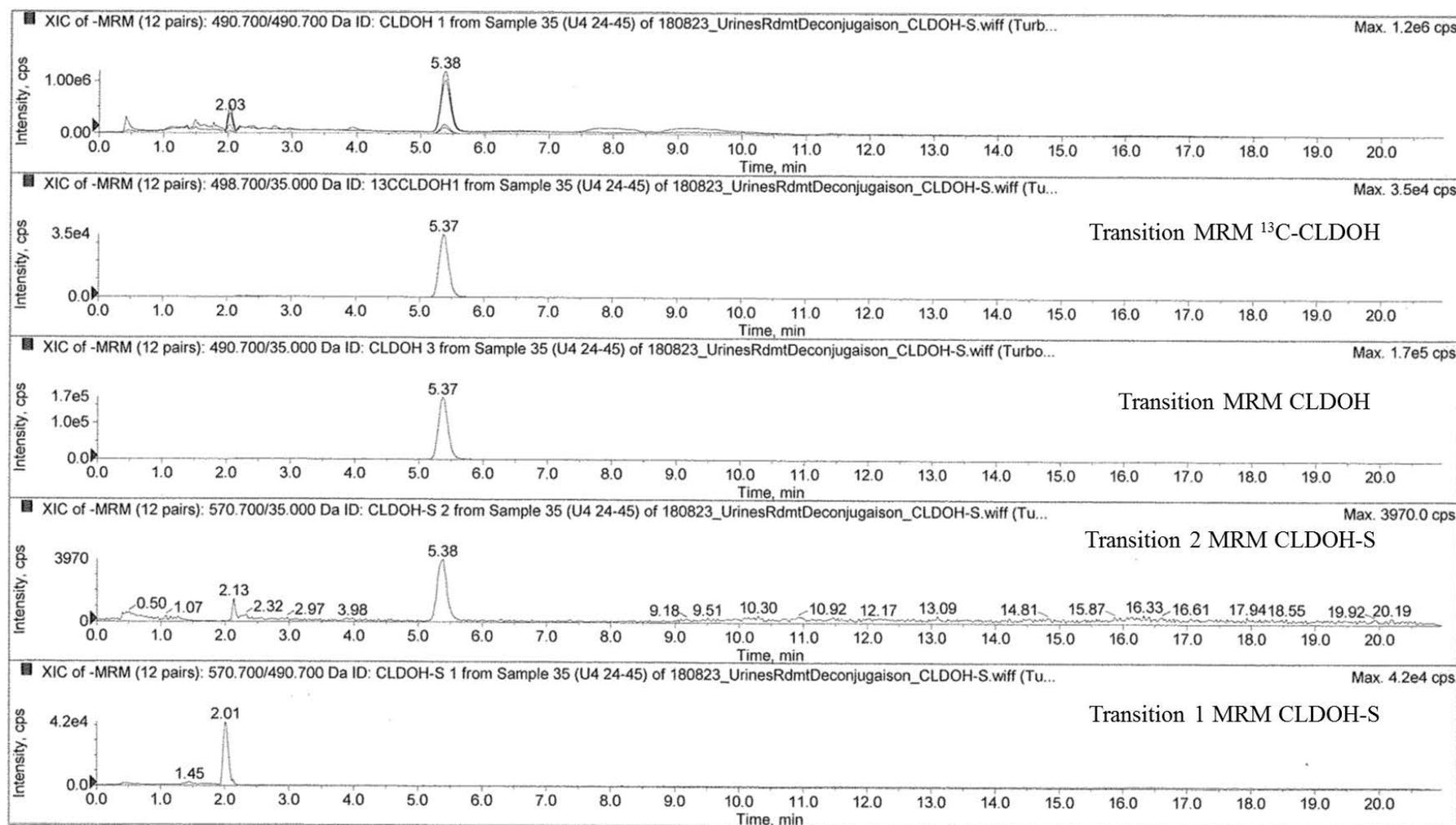


Figure 55 : Chromatogramme d'une urine de brebis au temps de prélèvement 24-45h après i.v de CLDOH et avant déconjugaison enzymatique obtenu par LC-MS/MS

*

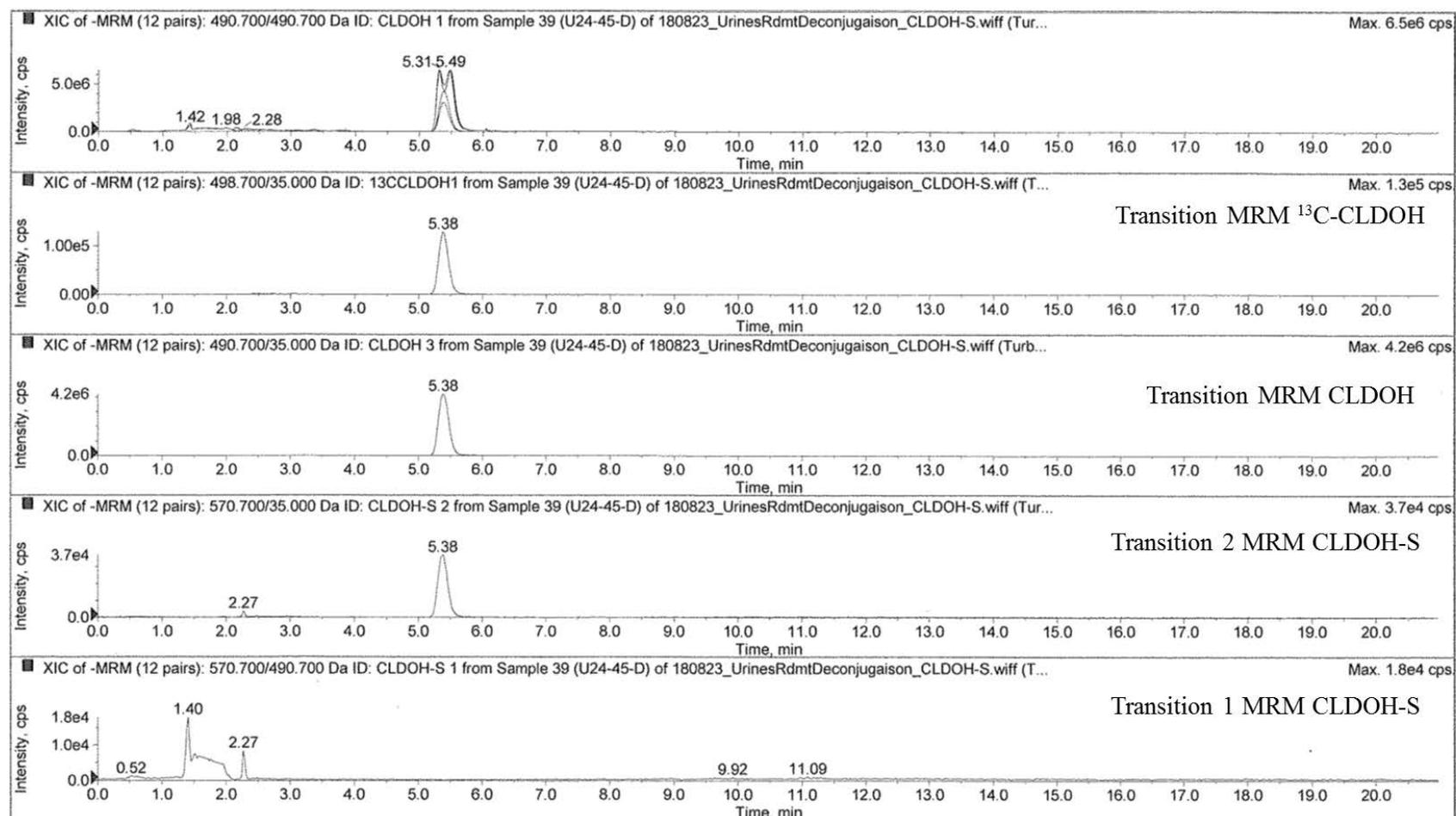


Figure 56 : Chromatogramme d'une urine de brebis au temps de prélèvement 24-45h après i.v de CLDOH et après déconjugaison enzymatique obtenu par LC-MS/MS

2. Application à court terme

i. Une méthodologie rapide et moins coûteuse d'extraction de la chlordécone

Une des limites actuelles dans le dosage de la CLD est la lourdeur des méthodes d'extraction qui par conséquent pèse sur les coûts d'analyse (http://www.assembleenationale.fr/13/rap-off/i1778.asp#P998_119464). Une application directe de ce travail de développement analytique sera son utilisation pour un dosage plus rapide de la CLD dans les matrices d'intérêts. Ces méthodes pourront être utiles à des projets de recherches autour de la CLD mais aussi des plans de surveillance de la CLD dans les DAOA. Hormis l'analyse dans les matrices biologiques animales, la méthodologie QuEChERS est une technique pouvant aussi s'adapter à différentes matrices (végétales ou animales par exemple) pour le suivi de la CLD et de ses métabolites.

ii. Des améliorations autour du dosage des métabolites de la CLD pour un meilleur suivi de la contamination animale

Dans ces travaux de thèse, les méthodes développées et validées dans le foie et les fèces pourront être directement utilisées pour un suivi de la CLD et de ses métabolites. Cependant, certaines méthodes pour être directement appliquées nécessitent d'être améliorées ou validées.

- Validation des méthodes de dosage simultané de la CLD et du CLDOH dans le tissu gras et le sérum

Le CLDOH se stockerait plus facilement dans le tissu gras que dans les autres tissus (foie et muscle par exemple). C'est un polluant qui a un comportement plus lipophile que celui de la CLD. Bien que dans nos travaux, une dose de CLDOH élevée ait été administrée aux animaux, le suivi de ce métabolite semblerait être tout même nécessaire (en raison des faibles connaissances sur sa toxicité) et informative (suivi des métabolites de la CLD). Dans nos travaux, une méthode QuEChERS a été développée pour le dosage de la CLD et du CLDOH dans le tissu gras et le sérum. Afin de disposer de données d'imprégnation des animaux ou encore de l'Homme, une application de ces travaux serait la validation des méthodes de dosage de la CLD et du CLDOH dans le tissu gras et dans le sérum.

- Vers une méthode de dosage directe du chlordécol glucuroné et du sulfaté ?

Une amélioration de nos travaux serait la mise au point d'une méthode de dosage de la CLD, du CLDOH, du CLDOH-S du CLDOH-G. Cela permettrait (1) de pouvoir distinguer le chlordécol sulfaté du chlordécol glucuroné et (2) de vérifier le rendement de déconjugaison des métabolites conjugués. Ces travaux pourront être effectués en améliorant la méthode d'analyse simultanée présentée dans la partie 1.iii précédente. A l'aide de cette méthode il serait possible d'affiner les données obtenues à l'aide des deux protocoles toxicocinétiques. En effet, nos résultats ont montré qu'après i.v de CLD, la forme

majoritairement éliminée dans les urines est le CLDOH-C (protocole 1). De plus, après i.v de CLDOH, la forme majoritairement retrouvée dans le sérum et les urines est aussi le CLDOH-C. Par conséquent, afin d'affiner les bilans quantitatifs d'élimination de la CLD, il sera important d'effectuer des travaux de mise au point de méthode de dosage du chlordécol sulfaté et du chlordécol glucuroné.

1. A la recherche des métabolites manquants de la CLD

Ces travaux ont mis en évidence que 48 ± 5 % de la dose de CLD administrée aux brebis a été éliminée via les fèces. Par conséquent, 30 à 40 % de la CLD serait éliminé sous une forme inconnue. La première hypothèse qui expliquerait ce delta de 30 à 40 % serait une incertitude sur le bilan quantitatif effectuée de la CLD. Cependant, cette incertitude n'atteindrait pas les 30 à 40 % manquants du bilan d'élimination. Une deuxième hypothèse serait qu'il y aurait une voie de stockage, de métabolisation et/ou d'élimination qui serait inconnue de la CLD. Dans l'hypothèse où une voie de la CLD serait manquante, son élucidation pourrait s'effectuer à l'aide de deux approches : une ciblée et une non-ciblée. La méthodologie QuEChERS permet de couvrir un large spectre de polarité de molécules. Par conséquent, il serait tout d'abord intéressant de développer une méthode d'extraction permettant d'extraire sélectivement la CLD et tous ses métabolites connus (de type animaux le CLDOH, CLDOH-S, CLDOH-G ou de type bactériens tels que le la 5b-hydrochlordécone ou encore les métabolites dont la structure a été caractérisée par exemple comme dans les travaux de [Chaussonnerie et al. \(2016\)](#)). Ces méthodes permettraient de vérifier que la ou les voies d'élimination manquantes de la CLD ne seraient pas via des métabolites connus dans la littérature. Une deuxième approche dite non-ciblée pourrait aussi être effectuée. En effet, une des perspectives importantes de ces travaux est la recherche de métabolites inconnus de la CLD par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse haute résolution (LC-HR/MS-MS) dans les matrices animales. Afin de déterminer le bilan d'élimination de la CLD, il aurait aussi été possible de procéder par comptage au ^{14}C après administration de ^{14}C -CLD comme effectué par [Egle et al. \(1978\)](#) chez le rat (qui ne métabolise la CLD). Au bout de 84 jours, 65.5 % de la dose administrée avaient été éliminés via les fèces. Il est possible d'observer qu'à l'aide de ce bilan, la totalité de la dose admnistrée n'avait pas été retrouvée.

PARTIE 3: Vers la réalisation d'un modèle compartimental de la chlordé- cone chez la brebis

Les travaux analytiques permettent de disposer des nouvelles méthodes de dosage de la CLD et de ses métabolites. A l'aide de ces méthodes, des études toxicocinétiques ont permis de déterminer ce que devient la CLD dans l'organisme animal et en particulier de combler les manquements sur la métabolisation de la molécule.

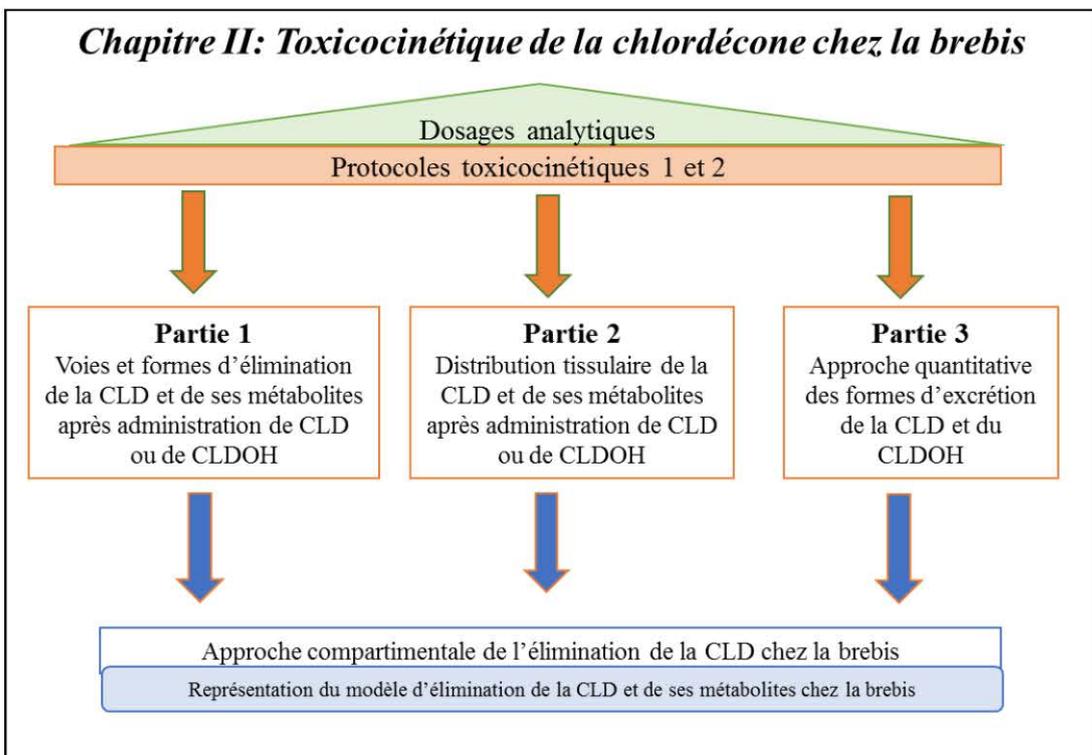
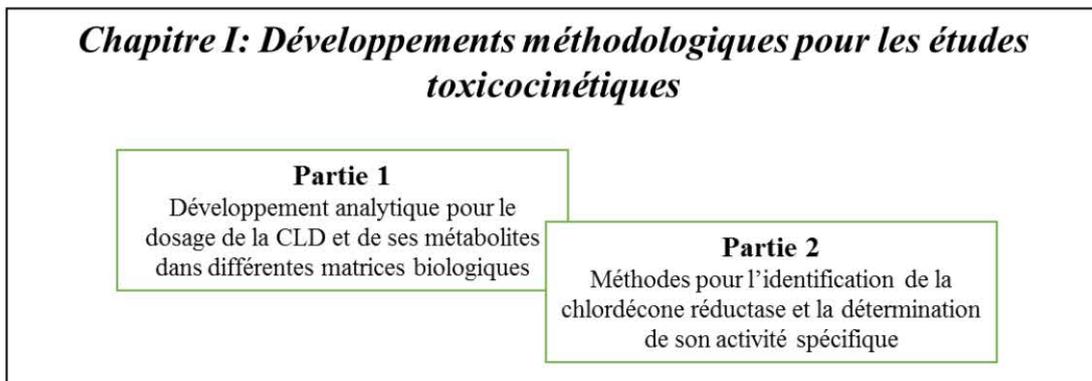
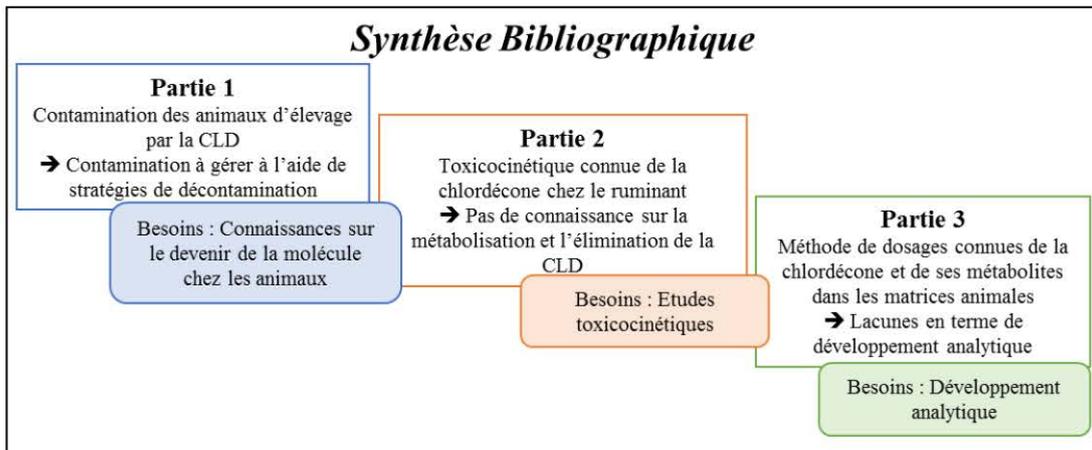
Un premier modèle compartimental de la CLD a été présenté à la fin du deuxième chapitre. Ce modèle sera utile pour la maîtrise de la contamination animale aux Antilles Françaises. Les objectifs de ce modèle sont (1) de faire un bilan des connaissances acquises concernant l'élimination de la CLD et en particulier de visualiser et hiérarchiser les données manquantes (2) d'intégrer des paramètres liés à l'exposition, à la physiologie de l'animal et aux mécanismes ADME de la molécule afin d'obtenir des prédictions des concentrations tissulaires chez la brebis (3) de conseiller sur les pratiques d'élevage à risques et par conséquent de préconiser des moyens pour réduire l'exposition de l'animal.

A la suite de cette étape de construction du modèle, une expérimentation complémentaire permettant d'obtenir des concentrations tissulaires de CLD en dynamique dans le temps devra être menée (en période de contamination et de décontamination). Puis, il sera nécessaire de résoudre les systèmes d'équations différentielles associées afin de déterminer chacune des constantes de transfert entre compartiment. Le modèle devra ensuite être validé grâce à des données de terrain.

6

Conclusion Générale

Introduction Générale
Comment s'élimine la chlordécone (CLD) chez la brebis ?



Discussion générale et Perspectives

Conclusion générale

En conclusion, les travaux réalisés dans cette thèse ont permis d'étudier le devenir de la chlordécone (CLD) chez la brebis. Deux apports ont été possibles à l'aide de nos travaux. De nouvelles méthodes de dosage de la CLD et du CLDOH ont été mises en place et validées dans le foie, les fèces et les urines. Ces méthodes pourront servir à (1) une sécurisation des DAOA via l'analyse de routine de la CLD (et si nécessaire du CLDOH) par des méthodes plus rapides et donc moins coûteuses et (2) aux projets de recherche autour de la CLD (toxicocinétique, rejet dans l'environnement, voie(s) supplémentaire(s) d'élimination de la molécule..).

L'étude toxicocinétique de la CLD chez la brebis a mis en évidence que l'animal métabolise la molécule au niveau hépatique. Ce métabolisme permet d'expliquer les formes distribuées et éliminées de la CLD dans les urines et les fèces mais il ne pilote pas l'élimination de la molécule mère qui est majoritairement effectuée sous sa forme parent CLD. Le CLDOH est un métabolite intermédiaire qui n'est quasiment jamais quantifié dans l'organisme animal hormis dans les fèces où il est éliminé après déconjugaison du CLDOH-C. En effet, le métabolisme du CLDOH est fortement déplacé vers la formation du CLDOH-C. Cette métabolisation importante explique que dans le sang, uniquement du CLDOH-C soit quantifié. Cependant, les concentrations de CLDOH-C quantifiées dans le sang sont minoritaires devant celles obtenues de CLD. Par conséquent, étant donné que dans le sang et les fèces, des concentrations de CLD plus importantes sont obtenues que celles de ses métabolites, baser nos stratégies de déconjugaison sur les temps de demi-vies d'élimination sanguins obtenus de la CLD chez les ruminants permettrait le mieux de rendre compte de la contamination animale. Cependant, il sera important que des études futures soient effectuées sur la comparaison de la toxicité entre la CLD et le CLDOH. Nos travaux ont de plus montré que les fèces pourraient servir pour du biomonitoring étant donné que des corrélations entre les concentrations sanguines et fécales ont été obtenues. Par conséquent, il serait pertinent de conforter ces corrélations à l'aide d'un nombre plus important d'animaux et d'espèces animales d'élevage différentes (porcin, bovin, caprin, ovin par exemple). De plus, le modèle compartimental proposé permet d'intégrer les données d'élimination obtenues dans ces travaux et servira d'outil d'aide à la gestion de la contamination animale aux Antilles Françaises.

7

Annexe

Annexe : Récapitulatif des études d'exposition de l'homme à la chlordécone effectuées de 2003 à 2016

Etude	Période	Lieu d'étude	Objectifs
ESCAL (Etude sur la Santé et les Comportements AL imentaires)	2003-2004	Martinique	<ul style="list-style-type: none"> • Concevoir les enquêtes RESO (RESidus Organochlorés) • Calculer les niveaux d'exposition de la population à la CLD
CALBAS (Comportements AL imentaires dans le sud de la BAS se-Terre)	2004-2005	Guadeloupe	<ul style="list-style-type: none"> • Définir les Limites Maximales de Résidus dans les aliments • Caractériser les populations à risque d'exposition élevée
RESO (RESidus Or-ganochlorés)	2005-2007	Guadeloupe et Martinique	<ul style="list-style-type: none"> • Récolte de données de contamination des aliments dans les circuits de distribution antillais (légumes, fruits, viandes, poissons, œufs, produits laitiers, produits de la mer) • Recommander des limitations de consommation et interdictions de pêche
HIBISCUS	2003-2004	Guadeloupe	<ul style="list-style-type: none"> • Déterminer les niveaux de CLD et l'imprégnation mère-enfant • Obtenir des informations expliquant cette imprégnation
KARUPROSTATE	2004-2007	Guadeloupe	<ul style="list-style-type: none"> • Analyser les relations entre l'exposition à la chlordécone et le risque de survenue du cancer de la prostate
TI MOUN	2006-2008	Guadeloupe	<ul style="list-style-type: none"> • Caractériser l'impact de l'alimentation maternelle sur déroulement de la grossesse et le développement de l'enfant
Jafa (Jardins Familiaux)	2008-2010 (Martinique) 2011-2013 (Guadeloupe)	Guadeloupe et Martinique	<ul style="list-style-type: none"> • Estimer le niveau d'exposition des populations situées en zone d'exposition potentielle • Réduire l'exposition à la CLD des populations aux habitudes de consommation et d'approvisionnement provenant des jardins familiaux
KANNARI	2011- 2016	Martinique et Guadeloupe	<ul style="list-style-type: none"> • Evaluer l'exposition de la population à la CLD par voie alimentaire • Evaluer les risques liés à l'exposition • Décrire les populations les plus sensibles ou plus à risque à la CLD • Evaluer la pertinence des mesures de gestion du risque adoptées (2007) et si nécessaire les actualiser

8

Références Bibliographiques

- Adams, R.H., Morales-Garcia, F., 2008. Residual concentration of hydrocarbons in soil in the tropics. I: Considerations for public health and livestock protection. *Interciencia* 33, 476–482.
- Adir, J., Caplan, Y.H., Thompson, B.C., 1978. Kepone serum half-life in humans. *Life Sci.* 22, 699–702.
- Alexandre, G., Arquet, R., Fleury, J., Boval, M., Mahieu, M., Mandonnet, N., 2012. Systèmes d'élevage caprins en zone tropicale : analyse des fonctions et des performances. *Prod. Anim.* 25, 305–315.
- Amiard, J.C., 2011. Les risques chimiques environnementaux: méthodes d'évaluation et impacts sur les organismes.
- Anastassiades, M., Lehotay, S.J., Stajnbaher, D., Schenck, F., 2003. Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile. *J. AOAC Int.* 86, 412–431.
- Anderson, B., de Peyster, A., Gad, S., Hakkinen, P.J., Kamrin, M., Locey, B., 2005. Anderson et al. *Encycl. Toxicol. Elsevier Sci.*
- Arrêté du 11 janvier 2007 relatif aux limites et références de qualité des eaux brutes et des eaux destinées à la consommation humaine mentionnées aux articles R. 1321-2, R. 1321-3, R. 1321-7 et R. 1321-38 du code de la santé publique. NOR: SANP0720201A
- Bachur, N.R., 1976. Cytoplasmic aldo-keto reductases: a class of drug metabolizing enzymes. *Science* (80-). 193, 595–597.
- Baldi, I., Cordier, S., Coumoul, X., Elbaz, A., Gamet-Payrastre, L., Le Bailly, P., ..., Van Maele-Fabry, G., 2013. Pesticides: effets sur la santé. Institut national de la santé et de la recherche médicale.
- Bichon, E., Guiffard, I., Vénisseau, A., Marchand, P., Antignac, J.P., Le Bizec, B., 2015. Ultra-trace quantification method for chlordecone in human fluids and tissues. *J. Chromatogr. A* 1408, 169–177.
- Blanke, R. V., Fariss, M.W., Griffith, F.D., Guzelian, P.S., 1977. Analysis of chlordecone in biological specimens. *J. Anal. Toxicol.* 1, 57–62.
- Bonan, H., Prime, J.-L., 2001. Rapport sur la présence de pesticides dans les eaux de consommation humaine en Guadeloupe. Ministère l'aménagement du Territ. l'environnement pp.86.
- Bordet, F., Thieffine, A., Mallet, J., Heraud, F., Bateau, A., Inthavong, D., 2007. In-house validation for analytical methods and quality control for risk evaluation of chlordecone in food. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 87, 985–998.
- Boucher, O., Simard, M.N., Muckle, G., Rouget, F., Kadhel, P., Bataille, H., Chajès, V., Dallaire, R., Monfort, C., Thomé, J.P., Multigner, L., Cordier, S., 2013. Exposure to an organochlorine pesticide

- (chlordecone) and development of 18-month-old infants. *Neurotoxicology* 35, 162–168.
- Bouveret, C., 2012. Biodisponibilité relative du chlordécone de l'andosol et du nitisol chez les animaux d'élevage monogastriques.
- Bouveret, C., Rychen, G., Lerch, S., Jondreville, C., Feidt, C., 2013. Relative bioavailability of tropical volcanic soil-bound chlordecone in piglets. *J. Agric. Food Chem.* 61, 9269–9274. hBoval, M., Coppry, O., Naves, M., Alexandre, G., 2012. L'élevage traditionnel, une source et un support pour l'innovation agro-écologique: la pratique du piquet aux Antilles. *Cour. l'environnement l'INRA* n°62 87–98.
- Boylan, J.J., Cohn, W.J., Egle, J.L., Blanke, R. V, Guzelian, P.S., 1979. Excretion of chlordecone by the gastrointestinal tract: Evidence for a nonbiliary mechanism. *Clin. Pharmacol. Ther.* 25, 579–585.
- Bristeau, S., 2012. Validation d'une méthode d'analyse de la chlordécone pour l'application au suivi des procédés de dépollution des sols Antillais.
- Burnette, S., 1982. "Western blotting": electrophoresis of protein from sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem* 112, 195–203.
- Cabidoche, Y.-M., Achard, R., Cattan, P., Clermont-Dauphin, C., Massat, F., Sansoulet, J., 2009. Long-term pollution by chlordecone of tropical volcanic soils in the French West Indies: a simple leaching model accounts for current residue. *Environ. Pollut.* 157, 1697–705.
- Chaussonnerie, S., Saaidi, P.L., Ugarte, E., Barbance, A., Fossey, A., Barbe, V., Gyapay, G., Brüls, T., Chevallier, M., Couturat, L., Fouteau, S., Muselet, D., Pateau, E., Cohen, G.N., Fonknechten, N., Weissenbach, J., Le Paslier, D., 2016. Microbial degradation of a recalcitrant pesticide: Chlordecone. *Front. Microbiol.* 7.
- Chung, S.W.C., Chen, B.L.S., 2011. Determination of organochlorine pesticide residues in fatty foods: A critical review on the analytical methods and their testing capabilities. *J. Chromatogr. A* 1218, 5555–5567.
- Clostre, F., Letourmy, P., Thuriès, L., Lesueur-Jannoyer M, 2014a. Effect of home food processing on chlordecone (organochlorine) content in vegetables. *Scien* 490, 1044–1050.
- Clostre, F., Letourmy, P., Turpin, B., Carles, C., Lesueur-Jannoyer, M., 2014b. Soil type and growing conditions influence uptake and translocation of organochlorine (chlordecone) by cucurbitaceae species. *Water. Air. Soil Pollut.* 225.
- Coat, S., Monti, D., Legendre, P., Bouchon, C., Massat, F., Lepoint, G., 2011. Organochlorine pollution in tropical rivers (Guadeloupe): Role of ecological factors in food web bioaccumulation. *Environ.*

- Pollut. 159, 1692–1701.
- Cohn, W.J., Boylan, J.J., Blanke, R. V, Fariss, M.W., Howell, J.R., Guzelian, P.S., 1978. Treatment of chlordecone (Kepone) toxicity with cholestyramine. Results of a controlled clinical trial. *N. Engl. J. Med.* 298, 243–8.
- Comité d'étude des polluants organiques persistants, 2006.
- Cravedi, J.P., Zalko, D., Savouret, J.F., Menuet, A., Jégou, B., 2007. Le concept de perturbation endocrinienne et la santé humaine. *Medecine/Sciences* 23, 198–204.
- Dallaire, R., Muckle, G., Rouget, F., Kadhel, P., Bataille, H., Guldner, L., Seurin, S., Chajès, V., Monfort, C., Boucher, O., Pierre Thomé, J., Jacobson, S.W., Multigner, L., Cordier, S., 2012. Cognitive, visual, and motor development of 7-month-old Guadeloupean infants exposed to chlordecone. *Environ. Res.* 118, 79–85.
- Desaiah, D., Koch, R.B., 1975. Inhibition of ATPases activity in channel catfish brain by Kepone and its reduction product. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 13, 153–158.
- Desprats, J.-F., Pierre-Léande, C., Ovarbury, T., 2016. Suivi et mise à jour 2016 du SIG sur la contamination des sols de Martinique par la chlordécone. Rapport final BRGM RP- 66297 - FR.
- Eckburg, P.B., Bik, E.M., Bernstein, C.N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S.R., Nelson, K.E., Relman, D.A., 2005. Microbiology: Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* (80-). 308, 1635–1638.
- Egle, J.L., Fernandez, S.B., Guzelian, P.S., Borzelleca, J.F., 1978. Distribution and excretion of chlordecone (kepone) in the rat. *Drug Metab. Dispos.* 6.
- Eroschenko, V.P., Hackmann, N.L., 1981. Continuous ingestion of different chlordecone (kepone) concentrations and changes in quail reproduction. *J. Toxicol. Environ. Health* 8, 659–665.
- Eroschenko, V.P., Place, A.T., 1977. Prolonged effects of Kepone on strength and thickness of eggshells from Japanese quail fed different calcium level diets. *Environ. Pollut.* 255–264.
- Eroschenko, V.P., Wilson, W.O., 1974. Photoperiods and Age as Factors Modifying the Effects of Kepone in Japanese Quail. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 29, 329–339.
- Evaluation de l'exposition alimentaire au chlordécone des enfants guadeloupéens, 2011.
- Exposition des consommateurs des Antilles au chlordécone, résultats de l'étude Kannari, 2017.
- Fariss, M.W., Blanke, R. V., Saady, J.J., Guzelian, P.S., 1980. Demonstration of major metabolic pathways for chlordecone (kepone) in humans. *Drug Metab. Dispos.* 8, 434–438.
- Fournier, A., Feidt, C., Lastel, M.L., Archimede, H., Thome, J.P., Mahieu, M., Rychen, G., 2017. Toxicokinetics of chlordecone in goats: Implications for risk management in French West Indies.

Chemosphere 171, 564–570.

- Fries, G., Marrow, G., Snow, P., 1982. Soil ingestion by swine as a route of contaminant exposure. *Environ. Toxicol. Chem.* 1, 201–204.
- Galan, F., Julien, L., Duflot, B., 2008. Panorama des filières animales et typologie des systèmes d'exploitation avec élevage de guadeloupe. Program. Réseaux Références" POSEI Fr. 1–63.
- Galan, F., Reuillon, J.-L., Letellier, O., Bleubar, S., Marie, F., 2009. Caractérisation des systèmes d'élevage bovin des départements d'outre-mer (DOM). Premiers résultats issus des réseaux de références. Characterisation of cattle breeding systems in the French Overseas Departments (FOD). First results from the benc, Journées 3R.
- Gaumand, C., de Verdelon, X., Gravaud, A., Vernerey, M., 2005. Évaluation des actions menées en rapport avec la présence de chlordécone et autres pesticides organochlorés en Guadeloupe et en Martinique.
- Gill, S.R., Pop, M., DeBoy, R.T., Eckburg, P.B., Turnbaugh, P.J., Samuel, B.S., ..., Nelson, K.E., 2006. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science* (80-). 312, 1355–1359.
- Godard, E., 2007. Chlordécone 1999-2007 – Découverte et gestion d'une pollution agricole sans précédent. Groupe Régional des phytosanitaires (GREPHY), Fort-de-France, Martinique (France) Séance plénière du 22 octobre. 32p.
- González-Curbeloa, M.Á., Lehotaya, S.J., Hernández-Borgesb, J., Rodríguez-Delgadoba, M.Á., 2014. Use of ammonium formate in QuEChERS for high-throughput analysis of pesticides in food by fast, low-pressure gas chromatography and liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1358, 75–84.
- Gressler, V., Franzen, A.R.L., de Lima, G.J.M.M., Tavernari, F.C., Dalla Costa, O.A., Feddern, V., 2016. Development of a readily applied method to quantify ractopamine residue in meat and bone meal by QuEChERS-LC-MS/MS. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 1015–1016, 192–200.
- Guzelian, P.S., 1982. Chlordecone poisoning: A case study in approaches for detoxification of humans exposed to environmental chemicals. *Drug Metab. Rev.* 13, 663–679.
- He, D., Xia, B., Liu, J., Ding, L., Zhou, Y., 2015. Determination of Kepone and Its Metabolite in Water and Soil by High-Performance Liquid Chromatography–Mass Spectrometry. *Anal. Lett.* 48, 1–8.
- Houston, T.E., Mutter, L.C., Blanke, R. V., Guzelian, P.S., 1981. Chlordecone alcohol formation in the mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*): A model for human metabolism of chlordecone (kepone). *Toxicol. Sci.* 1, 293–298. <https://doi.org/10.1093/toxsci/1.3.293-d>
- IEDOM, 2015. Rapport annuel 2014 - IEDOM Guadeloupe.

- IPCS, 1984. Environmental health criteria 43: Chlordecone, international programme on chemical safety World Health Organization.
- Jannoyer, M.L., Cattan, P., Woignier, T., Clostre, F., 2016. Crisis management of chronic pollution: contaminated soil and human health., CRC Press. ed.
- Jensen, E.C., 2012. The basics of Western blotting. *Anat. Rec.* 295, 369–71.
- Jondreville, C., Bouveret, C., Lesueur-Jannoyer, M., Rychen, G., Feidt, C., 2012. Relative bioavailability of tropical volcanic soil-bound chlordecone in laying hens (*Gallus domesticus*). *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20, 292–299.
- Jondreville, C., Fournier, A., Mahieu, M., Feidt, C., Archimède, H., Rychen, G., 2014a. Kinetic study of chlordecone orally given to laying hens (*Gallus domesticus*). *Chemosphere* 114, 275–281.
- Jondreville, C., Lavigne, A., Jurjanz, S., Dalibard, C., Liabeuf, J.-M., Clostre, F., Lesueur-Jannoyer, M., 2014b. Contamination of free-range ducks by chlordecone in Martinique (French West Indies): a field study. *Sci. Total Environ.* 493, 336–41.
- Jondreville, C., Travel, A., Besnard, J., Feidt, C., 2011. Intake of herbage and soil by free-range laying hens offered a complete diet compared to a whole-wheat diet. 9^{ème} Journées La Rech. Avic. Tours, Fr. 29-30 Mars, 2011.
- Jurjanz, S., Collas, C., Lastel, M.L., Godard, X., Archimède, H., Rychen, G., Mahieu, M., Feidt, C., 2017. Evaluation of soil intake by growing Creole young bulls in common grazing systems in humid tropical conditions. *Animal* 11, 1363–1371.
- Jurjanz, S., Feidt, C., Pérez-Prieto, L., Ribeiri Filho, H.M., Rychen, G., Delagarde, R., 2012. Soil intake of lactating dairy cows in intensive strip grazing systems. *Animal* 6, 1350–1359.
- Jurjanz, S., Jondreville, C., Mahieu, M., Fournier, A., Archimède, H., Rychen, G., Feidt, C., 2014. Relative bioavailability of soil-bound chlordecone in growing lambs. *Environ. Geochem. Health* 36, 911–917.
- Kermarrec, A., 1980. Niveau actuel de la contamination des chaînes biologiques en Guadeloupe : pesticides et métaux lourds 155.
- Lamant, M., 2006. Caractérisation d'une nouvelle apolipoprotéine humaine, l'APO O. Université Paul Sabatier-Toulouse III.
- Laprévôte, O., 2001. Spectrométrie de masse organique et bio-organique [WWW Document]. Lab. spectrométrie masse, Inst. Chim. des Subst. Nat. UPR CNRS2301, Gif-sur-Yvette.
- Lastel, M.L., 2016. Chlordécone et filières animales antillaises - De la distribution tissulaire aux stratégies de décontamination chez les ruminants.

-
- Lastel, M.L., Lerch, S., Fournier, A., Jurjanz, S., Mahieu, M., Archimède, H., Feidt, C., Rychen, G., 2016. Chlordecone disappearance in tissues of growing goats after a one month decontamination period—effect of body fatness on chlordecone retention. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 3176–3183.
- Le Déaut and Procaccia, 2009. Report on the Impact of the Use of Chlordecone and Pesticides in the West Indies : Assessment and Future Prospects (Rapports sur les impacts de l'utilisation de la chlordécone et des pesticides aux Antilles : bilan et perspectives d'évolution) OPECST.
- Levillain, J., Cattan, P., Voltz, M., Cabidoche, Y., 2012. Agriculture , Ecosystems and Environment Analysis of environmental and farming factors of soil contamination by a persistent organic pollutant , chlordecone , in a banana production area of French West Indies 159, 123–132.
- Mahieu, M., Fournier, A., Lastel, M.L., Feidt, C., Rychen, G., Archimède, H., 2015. Chlordecone and animal breeding individual variability of the excretion capacity of ruminants and consequences on the contamination, in: Actes Du 44ème Congrès Du Groupe Français Des Pesticides, 26-19 Mai 2014. Martinique, France. pp. 156–163.
- Marquet, P. (2005)., 2005. Théorie et instrumentation des techniques de LC-MS et LC-MS/MS applicables à la toxicologie., in: *Annales de Toxicologie Analytique.* p. Vol. 17, No. 1, pp. 5–12.
- Mayland, H., Shewmaker, G., & Bull, R., 1977. Soil ingestion by cattle grazing crested wheatgrass. *J. Range Manag.* 30, 264–265.
- McQueen, C., 2017. *Comprehensive toxicology - Third Edition*, Elsevier.
- Molowa, Shayne, A.G., Guzelian, P.S., 1986a. Purification and characterization of chlordecone reductase from human liver. *J. Biol. Chem.* 261, 12624–12627.
- Molowa, Wrighton, S.A., Blanke, R. V, Guzelian, P.S., 1986b. Characterization of a unique aldo-keto reductase responsible for the reduction of chlordecone in the liver of the gerbil and man. *J. Toxicol. Environ. Health* 17, 375–184.
- Moreland, D.E., Soileau, S.D., 1988. Effets of chlordecone and chlordecone alcohol on isolated ovine erythrocytes. *J. Toxicol. Environ. Health* 24, 237–249.
- Moriwaki, H., Hasegawa, A., 2004. Detection of chlordecone by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18, 1243–1244.
- Multigner, L., Ndong, J.R., Giusti, A., Romana, M., Delacroix-Maillard, H., Cordier, S., Jégou, B., Thome, J.P., Blanchet, P., 2010. Chlordecone exposure and risk of prostate cancer. *J. Clin. Oncol.* 28, 3457–3462.
- Naber, E.C., Ware, G.W., 1964. Effect of kepone and mirex on reproductive performance in the laying hen. *Poult. Sci.* 44, 875–880.
- Naves, M., 2003. *Caractérisation et gestion d'une population bovine locale de la zone tropicale: le bovin*

- créole de Guadeloupe 283.
- Naves, M., Buxadera Menendez, A., Alexandre, G., Mandonnet, N., 2001. Etude comparative sur la méthodologie d'estimation des poids à fges types avant sevrage appliquée aux caprins créoles producteurs de viande. *Rev. Elev. trop.* 54, 81–97.
- Ochiai, H., 1982. Electric transfer of peptides from acrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications of "Western blotting"(author's transl). *Seikagaku.* 54, 107–109.
- Oppermann, U.C.T., Maser, E., 2000. Molecular and structural aspects of xenobiotic carbonyl metabolizing enzymes. Role of reductases and dehydrogenases in xenobiotic phase I reactions. *Toxicology* 144, 71–81.
- Penning, T.M., Burczynski, M., Jez, J., Hung, C., Lin, H., Ma, H., Moore, M., Palackal, N., Ratnam, K., 2000. Human 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase isoforms (AKR1C1–AKR1C4) of the aldo-keto reductase superfamily: functional plasticity and tissue distribution reveals roles in the inactivation and formation of male and female sex hormones. *Biochem. J.* 351, no Pf, 67.
- Picot, A., Rabache, M., 2005. Fiche Toxic Ecotoxic Chimique. Assoc. Toxicol.
- R Core team, 2017. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>. R A Lang. Environ. Stat. Comput. R Found. Stat. Comput. , Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.
- Rižner, T.L., Penning, T.M., 2014. Role of aldo-keto reductase family 1 (AKR1) enzymes in human steroid metabolism. *Steroids* 79, 49–63.
- Rochette, R., Andrieux, P., Bonnal, V., Cattan, P., 2017. Contamination des bassins versants de la Guadeloupe continentale par la chlordécone - Actualisation des connaissances et cartographie des zones à risque de contamination. Projet. ChlEau Terre.
- Roméo, M., Giambérini, L., 2008. Historique. Les biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques, Lavoisier, ed. Paris.
- Rouessac, F., Rouessac, A., 2000. Analyse chimique: Méthodes et techniques instrumentales modernes, Dunod. ed. Paris.
- SANTE/EU, 2015. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed. SANTE/11945/2015. Leg. Depos. 11945, 1–42.
- Shelby, M.D., Newbold, R.R., Tully, D.B., Chae, K., Davis, V.L., 1996. Assessing environmental chemicals for estrogenicity using a combination of in vitro and in vivo assays. *Environ. Health Perspect.* 104, 1296–1300.
- SigmaAldrich, 2009. <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Datasheet/7>

- Skalsky, H.L., Fariss, M.W., Blanke, R. V., Guzelian, P.S., 1979. the Role of Plasma Proteins in the Transport and Distribution of Chlordecone (Kepone®) and Other Polyhalogenated Hydrocarbons. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 320, 231–237.
- Smith, J.-C., Arant, F.-S., 1987. Residues of kepone in milk from cows receiving treated feed. *J. Econ. Entomol.* 60, 925–927.
- Snegaroff, J., 1977. Les résidus d’insecticides organochlorés dans les sols et les rivières de la région bananière de Guadeloupe.
- Soileau, S.D., Moreland, D.E., 1983. Effects of chlordecone and its alteration products on isolated rat liver mitochondria. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 67, 89–99.
- Soine, P.J., Blanke, R. V., Guzelian, P., Schwartz, C.C., 1982. Preferential binding of chlordecone to the protein and high density lipoprotein fractions of plasma from humans and other species. *J. Toxicol. Environ. Health* 9, 107–118.
- Soine, P.J., Blanke, R. V., Schwartz, C.C., 1984. Isolation of chlordecone binding proteins from pig liver cytosol. *J. Toxicol. Environ. Health* 14, 305–317.
- Soine, P.J., Blanke, R. V., Schwartz, C.C., 1983. Chlordecone metabolism in the pig. *Toxicol. Lett.* 17, 35–41.
- Stafford, C., Reichel, W., Swineford, D., Prouty, R., Gay, M., 1978. Gas-Liquid chromatographic determination of kepone in field-collected avian tissues and eggs. *J. AOAC* 61, 8–14.
- Thornton, I., Abrahams, P., 1983. Soil ingestion—a major pathway of heavy metals into livestock grazing contaminated land. *Sci. Total Environ.* 28, 287–294.
- Toutain, P.L., Bousquet-Melou, A., 2007a. Le modèle monocompartimental : Administration unique par voie IV et sous la forme d ’ un bolus du principe actif Analyse des données plasmatiques du principe actif. Cours de pharmacocinétique-ENV Toulouse.
- Toutain, P.L., Bousquet-Melou, A., 2007b. Les modèles compartimentaux. Cours de pharmacocinétique-ENV Toulouse.
- V03-110, A.N., 2010. Analyse des produits agricoles et alimentaires- Protocole de caractérisation en vue de la validation d’analyse quantitative par construction du profil d’exactitude.
- Vassaux, D., Rehel, M., Lagadic, L., 2013. First evidence of the presence of chlordecone-reductase in the freshwater shrimp *Macrobrachium rosenbergii* and the oyster *Crassostrea gigas*. Implications for water quality and food safety assessment in tropical regions., in: Personnel Communication, 6th SETAC Africa Conference, Lusaka, Zambia.

- Viau, C., Tardif, R., 2003. Viau et al, in: Toxicologie, Environnement et Santé Publique-Fondements et Pratiques. pp. 119–143.
- Waegeneers, N., De Steur, H., De Temmerman, L., Van Steenwinkel, S., Gellynck, X., Viaene, J., 2009. Transfer of soil contaminants to home-produced eggs and preventive measures to reduce contamination. *Sci. Total Environ.* 407, 4438–4446.
- Yamashita, M., Fenn, J.B., 1984. Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme. *J. Phys. Chem.* 88, 4451–4459.
- Yogendrarajah, P., Van Poucke, C., De Meulenaer, B., De Saeger, S., 2013. Development and validation of a QuEChERS based liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the determination of multiple mycotoxins in spices. *J. Chromatogr. A* 1297, 1–11.

Toxicocinétique de la chlordécone chez la brebis

Aux Antilles Françaises, les animaux d'élevage sont susceptibles d'être exposés à la chlordécone (CLD), Polluant Organique Persistant (POP) présent dans leur environnement. Afin de sécuriser les Denrées Alimentaires d'Origine Animale (DAOA) destinées à la consommation humaine, nos travaux ont porté sur l'étude du devenir de la CLD chez la brebis. Les objectifs de ces travaux étaient de comprendre comment s'effectue l'élimination de la molécule depuis l'organisme animal c'est-à-dire de déterminer par quelle(s) voie(s), sous quelle(s) forme(s), en combien de temps, en quelle quantité et par quels mécanismes s'élimine la CLD. Pour cette étude, deux volets ont été considérés : un volet analytique et un volet toxicocinétique. En effet, les méthodes de dosage connues des métabolites de la CLD ne permettaient pas d'obtenir la sensibilité et la fiabilité attendues pour nos travaux. Ainsi, un développement analytique de méthodes de dosage de la CLD et de ses métabolites dans les matrices d'intérêt a été mené. Ces travaux analytiques se sont appuyés sur une méthodologie d'extraction de type Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe (QuEChERS), une analyse par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) et l'utilisation d'étalons internes isotopiques. Ce développement permet de disposer de méthodes de dosage sensibles, rapides et fiables de la CLD et de ses métabolites dans différentes matrices animales. A l'issue de l'étape de développement analytique, les méthodes dans le foie, les fèces et les urines ont été validées à l'aide de profils d'exactitude établis selon la norme V03-110 et le guide SANTE de référence pour les pesticides. Pour exemple, dans la matrice foie, des limites de quantification de $1,36 \mu\text{g kg}^{-1}$ PF et de $2,50 \mu\text{g kg}^{-1}$ PF respectivement de chlordécone et de chlordécol (métabolite de la CLD) ont été retrouvées. Le deuxième volet de cette thèse s'est appuyé sur deux protocoles toxicocinétiques réalisés chez la brebis. A l'aide de ces expérimentations, il a été possible de combler une partie des lacunes sur la toxicocinétique de la CLD chez la brebis. Nos travaux ont démontré que la CLD est partiellement métabolisée en chlordécol (CLDOH) par la chlordécone réductase dans le foie des brebis. Par la suite, la CLD et le CLDOH peuvent être métabolisés à l'aide d'UDP-glucuronosyl-transferases et de sulfo-transferases en métabolites conjugués de la CLD et du CLDOH (CLD-C et CLDOH-C). Le CLDOH est un métabolite intermédiaire qui n'est quasiment jamais quantifié dans l'organisme animal hormis dans le tissu gras. L'élimination de la CLD se fait majoritairement via les fèces : 1/3 de la molécule parent CLD est éliminé sous forme de CLD et 1/6 est éliminé sous forme de CLDOH. La voie urinaire est une voie mineure d'élimination de la CLD. A l'aide de ces travaux, un modèle compartimental a été proposé. Sur la base de ce modèle, des travaux de modélisation seront possibles et permettront la proposition et la mise en place de stratégies de décontamination des ovins aux Antilles Françaises.

Mot Clés : CLD, méthode analytique, toxicocinétique, métabolites, brebis

Toxicokinetics of chlordecone in ewes

In the French West Indies (FWI), farming animals can be exposed to CLD, a persistent organic pollutant (POP) bound to soil in contaminated areas. In order to produce safe animal products, this thesis was focused on the CLD's fate in ewes. The aims were to determine by which way(s), in which form(s), in how much time, in which quantities and by which mechanisms, CLD would be eliminated from the animal body. In this thesis, two complementary approaches were followed. First it was necessary to improve the analytical methods especially for the metabolites in order to obtain more sensitive and reliable methods than the actual ones. In the analytical approach, methods for CLD and its metabolites were developed in various animal matrices suitable for the toxicokinetic studies. The extraction method was based on the Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe (QuEChERS) methodology and the analysis was performed with a liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Isotopic Standards were also used. Thanks to this work, sensitive, quick and reliable methods were obtained in animal matrices. The set-up methods in liver, feces and urine were validated with accuracy profiles according to the French Standard NF V03-110 and European Union guidelines. Limits of quantifications of $1.36 \mu\text{g kg}^{-1}$ and $2.50 \mu\text{g kg}^{-1}$ of fresh liver were respectively found for chlordecone and chlordecol (the CLD's metabolite). Secondly, and thanks to the analytical development, *in vivo* toxicokinetic studies were performed to determine the fate of CLD in ewes. The second approach of this thesis was based on two toxicokinetic protocols realized in ewes. The results revealed that CLD is partially metabolized in chlordecol (CLDOH) by the chlordecone reductase in ewe's liver. Then, CLD and CLDOH can be conjugated by UDP-glucuronosyl-transferases and sulfo-transferases in conjugated metabolites (CLD-C and CLDOH-C). It appeared that CLDOH is only an intermediate metabolite which is almost never quantified in the organism except in fat tissue. The major route of CLD elimination is in feces: 1/3 of the molecule is eliminated in its CLD's form and 1/6 in its CLDOH's form. The urinary way of CLD elimination is minor. Based on the obtained results, a compartmental model was proposed. It will allow to propose and to establish ovine decontamination strategies in the FWI.

Keywords: CLD, analytical method, toxicokinetics, metabolites, ewe