

ACCUMULATION DANS LES TISSUS ET TRANSFERT DANS L'ŒUF DES PARAFFINES CHLOREES APRES INGESTION PAR LA POULE PONDEUSE

Mézière Marie¹, Marchand Philippe¹, Hutinet Sébastien¹, Larvor Frédéric¹,
Baéza Elisabeth², Le Bizec Bruno¹, Dervilly Gaud¹, Cariou Ronan¹

¹LABERCA, Oniris, INRAE, 44307 Nantes, France

²INRAE, Université de Tours, BOA, 37380 Nouzilly, France

laberca@oniris-nantes.fr

RÉSUMÉ

Les paraffines chlorées (CP) sont des mélanges complexes de dizaines des groupes de formule $C_xH_{2x+2-y}Cl_y$, comportant chacun des milliers d'isomères. Leur production, actuellement estimée à plus de 2 millions de tonnes par an, répond à des usages variés en tant que retardateurs de flamme, additifs plastiques et lubrifiants. Elles sont en partie libérées dans l'environnement au cours de leur cycle de vie. Les CP à chaînes courtes (C_{10} - C_{13}) ont récemment été classées comme polluants organiques persistants dans le cadre de la convention de Stockholm.

La présente étude visait à étudier l'influence de la longueur de la chaîne et du taux de chloration des CP sur leur biodisponibilité et leur distribution dans les tissus de la poule pondeuse, animal modèle et d'intérêt agronomique. Cinq formulations de CP ont été incorporées dans l'aliment pour atteindre les niveaux hauts environnementaux. Soixante-neuf poules ont été élevées en cages individuelles pendant 13 semaines. Les œufs ont été collectés quotidiennement et des excréta toutes les deux semaines. Des sacrifices sériés ont permis de collecter muscle, tissu adipeux, foie, sérum, et reste de la carcasse.

Une augmentation du poids des œufs statistiquement moins prononcée pour le groupe exposé après 42 jours suggère un impact négatif sur les performances de ponte. Une cinétique de transfert dans les œufs a été observée pour 4 des 5 formulations, avec un état d'équilibre atteint au bout de 14 jours et un taux maximal observé pour le groupe $C_{30}H_{53}Cl_9$. A l'état d'équilibre, les CP ont été retrouvées dans tous les tissus à diverses concentrations, ce qui indique un potentiel d'accumulation. La dépuration cumulée par les excréta et les œufs à l'équilibre n'expliquait qu'une proportion minoritaire des quantités ingérées, suggérant la possibilité d'une biotransformation.

ABSTRACT

Accumulation in tissues and transfer to eggs of laying hens of chlorinated paraffins after dietary exposure

Chlorinated paraffins (CPs) are complex mixtures of polychlorinated *n*-alkane chains of chemical formula $C_xH_{2x+2-y}Cl_y$, produced at more than 2 million tons a year. They are used as plasticizers, flame retardants or lubricants. CPs are partly and unintentionally released in the environment and are transferred along the food chains. Short-chain CPs (C_{10} - C_{13}) have been listed to the Stockholm Convention in 2017.

The present work aimed at investigating the influence of the chain length and the chlorine number of CPs on their bioavailability and their distribution in tissues of the laying hen, a model organism of agronomic interest. Feed was fortified at environmentally relevant levels with five technical mixtures. Hens ($n = 69$) were raised in individual cages during 13 weeks. The eggs were collected daily and excreta every two weeks. Successive slaughters allowed collecting muscle, adipose tissue, liver, serum, and the rest of the carcass.

A slower increase of the egg weight in the exposed group after 42 days suggested a negative influence on the laying performance. Four of the five mixtures showed a transfer kinetics in eggs, the steady state being reached after 14 days. The highest transfer rate was observed for the $C_{30}H_{53}Cl_9$ homologue group. At the steady state, CPs were observed in all tissues at various levels, showing a bioaccumulation potential. At the steady state as well, the cumulative depuration through excreta and eggs explained only a minor proportion of the intake, suggesting the occurrence of biotransformation.

INTRODUCTION

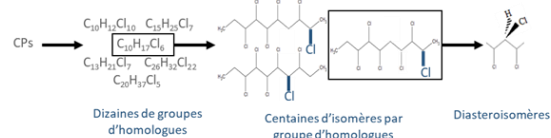
Les paraffines chlorées (CP), de formule chimique $C_xH_{2x+2-y}Cl_y$, sont des mélanges complexes de centaines de groupes d'homologues ayant une longueur de chaîne carbonée linéaire et un nombre de chlore variables, comprenant eux-mêmes des centaines d'isomères (Ali, 2010) (Figure 1). Elles sont typiquement subdivisées en trois groupes en fonction de la longueur de leur chaîne : les chaînes courtes (C_{10} - C_{13} , SCCP), les chaînes moyennes (C_{14} - C_{17} , MCCP), et les chaînes longues ($C_{\geq 18}$, LCCP). Ces substances sont synthétisées à partir de chaînes de *n*-alcanes issues de l'industrie pétrolière. Grâce à une large gamme de propriétés chimiques, leur utilisation comme retardateurs de flamme, additifs plastiques et lubrifiants a fortement augmenté depuis les années 1980 (Glüge *et al.*, 2016), récemment estimées à plus de 1 million de tonnes par an (EFSA, 2020).

Une fraction de ces volumes est libérée dans l'environnement lors de la production, de l'utilisation ou de la destruction des produits les contenant. Or, les propriétés physico-chimiques des CP se rapprochent de celles de contaminants halogénés tels que les polychlorobiphényles (PCB), dont le danger est reconnu et bien décrit (Muir, 2010). Dans ce contexte, évaluer le risque associé à ces contaminants en lien avec l'exposition humaine est une nécessité pressante.

Du point de vue de la caractérisation du danger, il est urgent de déployer des efforts dans la caractérisation des dangers pour non seulement confirmer la toxicité des SCCP (déjà classées comme cancérogènes), mais surtout étudier celle des MCCP et des LCCP.

Du point de vue de l'évaluation de l'exposition, de plus en plus de données de contamination des SCCP dans l'environnement sont rapportées (<0.001 - 517 ng/m³ dans l'air, 4 - 121 ng/g ou 2 - 669 ng/g de matière sèche dans le sol ou les sédiments, respectivement) (Wei *et al.*, 2016 ; Glüge *et al.*, 2018), établissant leur persistance et leur capacité de transport sur de longues distances. Les CP étant fortement hydrophobes et lipophiles, elles sont accumulées préférentiellement dans les compartiments environnementaux hydrophobes tels que le sol et les sédiments, mais leur bioamplification dans les écosystèmes marins a également été rapportée (Vorkamp *et al.*, 2019). Elles sont en effet accumulées dans les fractions lipidiques du biote. En parallèle, les données sur les MCCP restent limitées et les données sur les LCCP sont quasi inexistantes. Dans les denrées alimentaires, une vingtaine d'études font l'état de la contamination des SCCP (de quelques ng à plusieurs milliers de ng par g de matière fraîche (Iino *et al.*, 2005 ; Chen *et al.*, 2018 ; Gao *et al.*, 2019 ; Krätschmer *et al.*, 2019 ; Li *et al.*, 2020),

Figure 1. Complexité de la structure des CP.



dont seulement quatre présentent l'état de la contamination en Europe, et aucune en France. De même que pour l'environnement, les données de contamination de l'alimentation par des MCCP et des LCCP sont presque inexistantes.

Ces données d'évaluation du risque ont conduit à la récente classification des SCCP en tant que POP dans le cadre de la Convention de Stockholm (UNEP, 2017). Toutefois, le manque criant de données toxicologiques et d'exposition précédemment mis en lumière limite l'évaluation du risque associé à l'exposition aux SCCP, MCCP et LCCP.

Parmi les denrées alimentaires, il apparaît important d'évaluer la contamination potentielle des œufs, et surtout la relation entre l'ingestion de CP et la dépuration *via* la ponte chez la poule. En effet, il est bien connu que les volailles sont exposées aux POP *via* l'ingestion d'aliments contaminés ou *via* la consommation de sols dans lesquels les POP s'accumulent (Jondreville *et al.*, 2014 ; Polder *et al.*, 2016). De fait, des niveaux de CP dans les aliments pour volaille ont déjà été rapportés (Dong *et al.*, 2019 ; Sun *et al.*, 2020) et les œufs de poule d'une zone polluée chinoise contenaient des quantités extrêmement élevées de SCCP et de MCCP (plusieurs dizaines de milliers de ng/g de poids frais) (Zeng *et al.*, 2018).

Le présent travail visait à obtenir des informations sur le comportement des CP le long de la chaîne alimentaire et des éléments sur leur toxicocinétique. Pour aborder cette problématique, une expérimentation animale a été élaborée et mise en œuvre après accord du comité d'éthique, en collaboration avec le pôle d'expérimentation avicole de Tours (PEAT, INRAE, Nouzilly). Cette expérimentation visait à étudier l'influence de la longueur de la chaîne et du taux de chlore des CP sur leur biodisponibilité et distribution dans les tissus d'un animal modèle, la poule pondeuse, après exposition alimentaire. Cet animal a été sélectionné à la fois parce qu'il s'agit d'un oiseau terrestre dont les mécanismes de digestion/absorption sont relativement similaires à ceux de l'homme, et en raison de son intérêt agronomique.

Le travail présenté a fait l'objet de deux articles dans une revue internationale à comité de lecture (Mézière *et al.*, 2021a, 2021b).

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Substances de référence

Afin de couvrir l'ensemble de la gamme de CP, cinq mélanges techniques ont été fournis soit par AccuStandard Inc. (New Haven, CT, USA), dont Chlorowax™ 500C (SCCPs, faible taux de chlore, SCCPs low %Cl), Paroil™ 179–HV (SCCP, fort taux de chlore, SCCP high %Cl), Unichlor™ 40–90 (LCCP, faible taux de chlore, LCCP low %Cl) et CPW–100 (LCCP, fort taux de chlore, LCCP high %Cl), soit par des collègues de l'EMPA (Suisse) : (I-42, MCCP, faible taux de chlore). Les profils en groupes d'homologues (groupes d'isomères) sont présentés en Figure 2. Le ^{13}C - γ -Hexabromocyclo-dodécane (HBCDD) et le d_{18} - β -HBCDD ont été procurés par Wellington Laboratories Inc. (Ontario, Canada) et ont été utilisés comme étalons interne (IS) et externe (RS), respectivement.

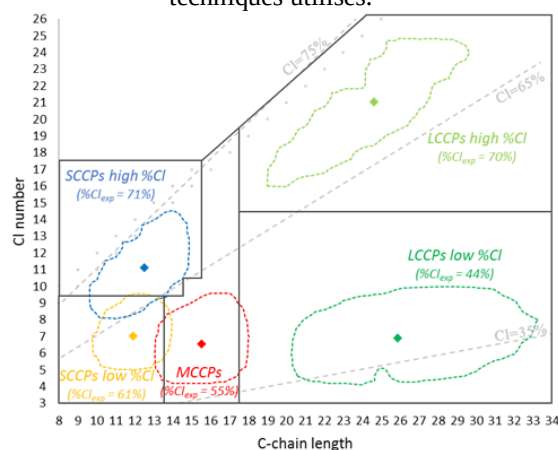
1.2. Design expérimental

L'aliment a été préparé à partir de maïs, blé, soja, et tous les nutriments nécessaires aux poules pondeuses. Deux lots d'aliment ont été préparés en ajoutant 1,8 % d'huile de colza témoin ou enrichie en CP. La concentration cible en CP de l'aliment fortifié était de 200 ng/g pour chacun des cinq mélanges techniques. Chaque lot a été granulé (diamètre 5 mm).

L'expérimentation (agrément APAFIS#17145-2018101712299769v2) a été menée dans une installation appropriée de l'unité expérimentale PEAT. Quatre-vingts poules pondeuses (Isa Brown) ont été logées dans des cages individuelles et élevées dans des conditions conventionnelles de température et d'éclairage, avec aliment témoin distribuée *ad libitum* pendant la période d'acclimatation (1 mois). A J0, 11 poules ont été exclues pour limiter la variabilité individuelle après pesée. Les poules restantes (1663 ± 105 g, $n=69$) ont été réparties en 2 groupes recevant soit l'aliment témoin ($n=21$), soit l'aliment fortifié ($n=48$), pendant un maximum de 91 jours (13 semaines). Les refus ont été enregistrés chaque semaine. Les poules ont ingéré 107 ± 13 g d'aliments par jour tout au long de l'expérimentation, ce qui correspond à une exposition de 5×21 μg de CP par jour.

Les aliments distribués en début, milieu et fin d'expérimentation ont été échantillonnés. Les œufs ont été collectés et pesés quotidiennement. La totalité des CP étant attendue dans le jaune (lipophilicité), les jaunes ont été poolés par jour pour les poules témoins ou exposées, à l'exception du jour 90 où ils ont été conservés individuellement pour évaluer la variabilité inter-individuelle. Les poules ont été pesées et sacrifiées de manière sériée, après un jeûne de 12 h, par électroanesthésie bitemporale suivie d'une section de l'artère carotide. Le sang a été prélevé et le sérum séparé après coagulation. Les poules ont ensuite été plumées. Puis, le foie, la graisse abdominale, les muscles de la jambe gauche (cuisse et pilon) et le reste de la carcasse ont été collectés et pesés. De plus, les

Figure 2. Profils expérimentaux des 5 mélanges techniques utilisés.



excrétas (fèces + urine) produits au cours des 14 derniers jours des individus abattus au jour 91 ont été collectés et poolés. Tous les échantillons ont été conservés à -20 °C jusqu'à l'analyse.

Les jaunes de poule de 5 et 17 jours (groupe témoin et exposé, resp.) ont été sélectionnés pour l'étude de la cinétique de transfert dans l'œuf. Les foies, les muscles, le sérum, le tissu adipeux et les carcasses à J77 (exposés) et J91 (témoins et exposés), ainsi que les excréta, ont été sélectionnés pour le bilan de matière à l'état d'équilibre.

1.3. Préparation de l'échantillon

Le foie, le muscle et la carcasse ont préalablement été homogénéisés et lyophilisés. Les excréta ont été séchés à 60 °C pendant 2 jours puis homogénéisés. L'aliment, le maïs, le blé et le soja ont homogénéisés. Les CP ont été co-extraites avec les lipides par extraction liquide sous pression (PLE, SpeedExtractor E-914/E-916, Büchi, France) avec un mélange toluène/acétone (7:3, v/v). La matière grasse du tissu adipeux a été directement prélevée. Après précipitation des protéines avec de l'oxalate de dipotassium, le sérum a été extrait par partage liquide-liquide (méthanol, éther diéthylique). Les lipides extraits ont été déterminés de manière gravimétrique, sauf pour le sérum, pour lequel les classes lipidiques (triglycérides, cholestérol estérifié et libre, phospholipides) ont été déterminées avec des kits enzymatiques (Biolabo, Maizy, France) (Marchand *et al.*, 2010).

L'étalon interne (^{13}C - γ -HBCDD, 5 ng) a été ajouté avant purification à travers une colonne remplie de 10 g de gel de silice neutre et de 20 g de gel de silice acide (44 % H_2SO_4). L'élution a été réalisée avec 60 mL d'un mélange dichlorométhane/hexane (1:1, v/v). Les extraits ont été reconstitués dans 1 mL d'hexane et chargés sur une colonne de 6 g de Florisil désactivé avec 3 % d'eau. L'élution a été réalisée avec 20 mL de dichlorométhane. Les extraits ont été reconstitués dans 25 μL d'acétonitrile contenant l'étalon externe (d_{18} - β -HBCDD, 0,2 ng/ μL).

1.4. Acquisition et traitement des données

L'acquisition et le traitement des données ont été effectués comme décrit par Mézière *et al.* (2020) avec un couplage chromatographie liquide – spectrométrie de masse à haute résolution (HRMS) équipé d'une source d'ionisation électrospray (Q-Exactive, Thermo Fischer Scientific, San José, CA, USA). Brièvement, la séparation chromatographique a été réalisée sur une colonne analytique Hypersil Gold (100 mm x 2,1 mm, 1,9 µm) (Thermo Fischer Scientific). La phase mobile était constituée de 70 % à 100 % d'ACN dans de l'eau. Un mélange de dichlorométhane/acétonitrile (1:1, v/v) a été ajouté après la colonne pour améliorer la formation des adduits chlorés ciblés. Les données ont été acquises dans le mode négatif sur la plage m/z [300–1500], à une résolution de 140 000 FWHM à m/z 200. Les signaux des adduits $[M+Cl]^-$ ont été intégrés dans l'environnement R (C_8 - C_{36} , Cl_4 - Cl_{30} , ± 5 ppm).

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Aliment

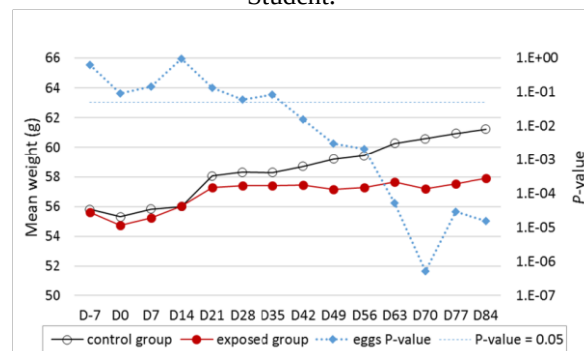
Des traces de LCCP et SCCP à fort taux de Cl, ainsi que de MCCP ont été observées dans l'aliment témoin (120, 25 et 57 ng/g, respectivement). Un tel phénomène avait déjà été rapporté par l'étude de Dong *et al.* (2019) qui ont mesuré des niveaux de SCCP et MCCP de 140 à 2000 ng/g dans les aliments d'origine animale et végétale, les aliments végétaux étant les moins contaminés. L'analyse des matières premières constitutives de l'aliment a révélé que les profils de contamination des SCCP et MCCP dans le blé, le maïs et surtout le soja correspondaient à celui de l'aliment témoin. La mesure des niveaux de fortification (différence entre aliment fortifié et témoin) correspondait à la valeur cible de 200 ng/g pour toutes les catégories de CP. L'exposition quotidienne réelle était donc de 24, 24, 25, 21 et 32 µg/jour de SCCP faible %Cl, SCCP fort %Cl, MCCP, LCCP faible %Cl et LCCP fort %Cl, respectivement.

2.2. Performances de ponte

Le poids corporel des poules à l'abattage (1645 ± 139 g) et le nombre d'œufs produits quotidiennement ($0,96 \pm 0,05$) sont restés stables dans le temps. Le poids moyen des œufs a légèrement augmenté de $55,3 \pm 2,8$ et $54,8 \pm 3,6$ g (J1) à $61,2 \pm 1,5$ et $57,9 \pm 4,6$ g (J91) pour le groupe témoin et le groupe exposé, respectivement (Figure 3). L'augmentation du poids des œufs était statistiquement moins prononcée pour les poules exposées par rapport aux poules témoins après J42 ($P < 0,05$). Une telle observation peut indiquer que l'exposition aux CP induit un effet physiologique sur le poids des œufs.

Aucun changement significatif n'a été observé entre les groupes témoin et exposé concernant la

Figure 3. Evolution de la masse moyenne des œufs au cours du temps, avec la valeur P du test de Student.



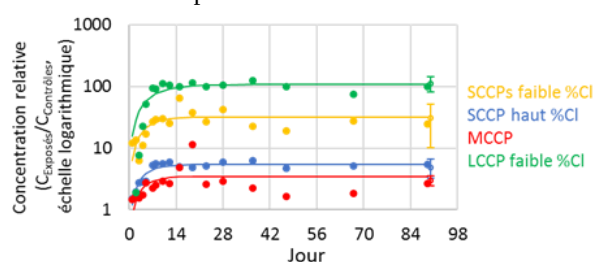
proportion de jaune ou la teneur en lipides dans le jaune. La diminution du poids des œufs ne semble donc pas être liée à la teneur en jaune, suggérant que les CP affectent le processus de ponte de manière plus globale. Si une telle observation se confirmait, l'exposition des poules pondeuses aux CP aurait un fort impact sur les performances agronomiques.

2.3. Cinétiques dans l'œuf

Une cinétique de premier ordre a été observée pour 4 des 5 mélanges techniques, avec un état d'équilibre atteint au bout de 14 jours (Figure 4). Pour les LCCP fort %Cl, seules de faibles traces des groupes d'homologues de plus faible masse ont été détectées. Parmi les quatre mélanges techniques transférés, une augmentation du taux de transfert à l'équilibre des groupes d'homologues en fonction de la longueur de la chaîne, la teneur en chlore et le coefficient de partage octanol-eau (K_{oe}) a été observée, jusqu'à atteindre un optimum pour $C_{30}Cl_9$. En conséquence, les taux de transfert des mélanges techniques ont augmenté avec la longueur de chaîne (SCCP < MCCP < LCCP) et le nombre de chlore. La mise en évidence d'un fort potentiel de transfert pour les LCCP faible %Cl était intéressante car ces longueurs de chaînes sont peu étudiées, et aucune donnée n'est reportée sur leur transfert après exposition alimentaire chez les oiseaux.

Finalement, le transfert des CP semble donc gouverné par deux phénomènes opposés, d'une part le K_{oe} comme facteur favorable, et d'autre part le

Figure 4. Données expérimentales (points) ou modélisées (lignes) représentant la cinétique de transfert des CP aux œufs de poule pondeuse après exposition alimentaire.



poids moléculaire dont la limite de 1000 Da est communément évoquée pour le passage de la barrière gastro-intestinale (EFSA, 2008).

2.4. Accumulation dans les tissus

La distribution et l'accumulation des CP dans l'ensemble des tissus et fluides collectés ont été étudiées à J91 après vérification que l'état d'équilibre était bien atteint depuis au moins J77.

Les SCCP et les MCCP ont été retrouvées à des niveaux équivalents dans tous les tissus, ce qui indique une diffusion passive dans les tissus selon leur taux de lipides respectifs et un potentiel d'accumulation (Figure 5).

Les LCCP à bas taux de chlore ont été retrouvées dans toutes les matrices, avec des niveaux relativement plus importants dans le foie, le sérum et les œufs. Elles apparaissent donc aptes à circuler et être distribuées dans les différents compartiments. Il convient ainsi de poursuivre les études toxicologiques sur ces composés afin d'évaluer le risque lié à l'exposition à des chaînes plus longues. Cependant, puisqu'elles ont été retrouvées à des teneurs plus élevées dans les excréta et œufs, une accumulation relativement faible peut être attendue.

Les LCCP à haut taux de chlore, ont été retrouvées dans le foie et les excréta principalement, même si des traces des homologues de plus faible masse ont également été détectées dans le sérum et la carcasse, suggérant une distribution de ces homologues dans le corps de la poule. La forte présence dans le foie suggère leur capacité à être absorbées, mais elles seraient ensuite soit retenues dans le foie, soit excrétées *via* la bile dans les intestins, soit biotransformées.

De plus, un bilan massique à l'équilibre a révélé que la dépuration cumulée par les excréta et les œufs n'expliquait qu'une proportion minoritaire des quantités ingérées (Figure 6). L'hypothèse la plus plausible est la biotransformation, comme le suggèrent le peu d'études traitant de ce sujet dans la littérature. Une évaluation plus approfondie du métabolisme des CP sera nécessaire pour compléter les résultats de la présente expérience.

Figure 5. Concentrations pour chaque catégorie de CP dans les matrices (ng/g de lipides) et excréta (ng/g de matière sèche) de la poule pondeuse à l'équilibre (centiles 0, 25, 50, 75 et 100).

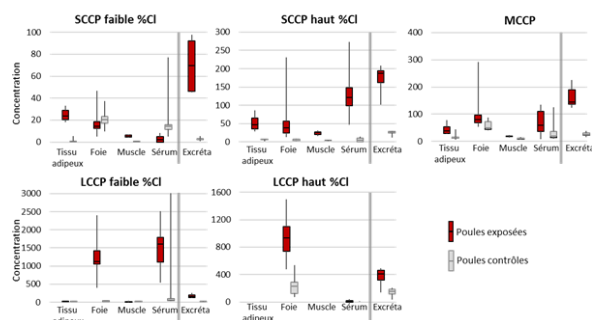
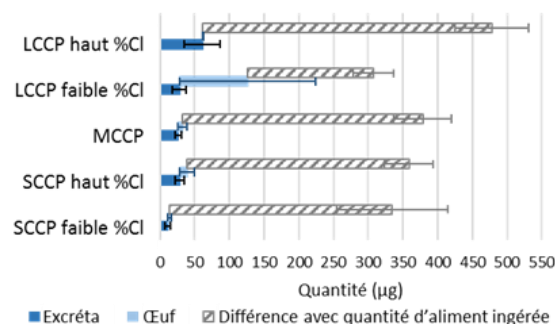


Figure 6. Bilan de matière de chaque catégorie de CP à l'équilibre entre les excréments et les œufs relatifs à la quantité d'aliments ingérée, estimé sur 14 jours à l'équilibre.



CONCLUSION

Cette expérimentation a prouvé la biodisponibilité de l'ensemble des CP, quels que soient la longueur de chaîne ou le taux de chloration impliqués. Cependant, une forte différence de comportement après absorption a été mise en évidence. En effet, les LCCP à fort taux de chlore sont majoritairement retenues dans le foie, tandis que les LCCP à bas taux de chlore sont distribuées par le sang mais sont principalement excrétées dans les œufs ou retenues dans le foie, et que les SCCP et MCCP sont distribuées dans les tissus de la poule de façon homogène. Ces nouvelles connaissances invitent à poursuivre les recherches utiles à l'évaluation de l'exposition du consommateur par voie alimentaire.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ali, 2010. Springer. [DOI](#).
 Chen et al., 2018. Environ. Sci. Technol., [DOI](#).
 Dong et al., 2019. Sci. Total Environ., [DOI](#).
 EFSA, 2008. EFSA Journal, [DOI](#).
 EFSA, 2020. EFSA Journal, [DOI](#).
 Gao et al., 2019. Environ. Int., [DOI](#).
 Glüge et al., 2016. Sci. Total Environ., [DOI](#).
 Glüge et al., 2018. Environ. Sci. Technol., [DOI](#).
 Iino et al., 2005. Environ. Sci. Technol., [DOI](#).
 Jondreville et al., 2014. Chemosphere, [DOI](#).
 Krätschmer et al., 2019. Chemosphere, [DOI](#).
 Li et al., 2020. Chemosphere, [DOI](#).
 Marchand et al., 2010. Chemosphere, [DOI](#).
 Mézière et al., 2020. J. Chromatogr. A, [DOI](#).
 Mézière et al., 2021a. Food Chem., [DOI](#).
 Mézière et al., 2021b. Food Chem., [DOI](#).
 Muir et al., 2000. Springer. [DOI](#).
 Polder et al., 2016. Sci. Total Environ., [DOI](#).
 Sun et al., 2020. J. Hazard. Mat., [DOI](#).
 UNEP, 2017. UNEP/POPS/COP.8/SC.8/11. [Lien](#).
 Vorkamp et al., 2019. Emerg. Contam., [DOI](#).
 Wei et al., 2016. Environ. Int., [DOI](#).
 Zeng et al., 2018. Environ. Int., [DOI](#).