

Caractérisation et modélisation de l'accumulation dans la viande de porc d'un contaminant émergent : l'hexabromocyclododécane

Eric ROYER (1), Bertrand MEDA (2), Ronan CARIOU (3), Andrea GARCÍA DE SALAZAR (1), Stéphanie GUERIN (2), Nicolas THENE (1), Elizabeth BAEZA (2), Catherine JONDREVILLE (4)

(1) Ifip-institut du porc, 31500 Toulouse, France

(2) URA, INRA, 37380, Nouzilly, France

(3) LABERCA, ONIRIS, INRA, USC 2013, 44307 Nantes, France

(4) AFPA, INRA, Université de Lorraine, 54500 Vandœuvre-lès-Nancy, France

eric.royer@ifip.asso.fr

Avec la collaboration technique des personnels du moulin expérimental de l'INRA PEAT à Nouzilly et du LABERCA à Nantes, de M. Sachello (Stagiaire El Purpan), ainsi que de B. Thomas et l'équipe Ifip-GIE de la station de Villefranche-de-Rouergue

Caractérisation et modélisation de l'accumulation dans la viande de porc d'un contaminant émergent : l'hexabromocyclododécane

L'hexabromocyclododécane (HBCD) est un retardateur de flamme bromé incorporé dans des matériaux tels que les polystyrènes. Sa présence dans certains échantillons de denrées alimentaires d'origine animale pourrait contribuer à une exposition humaine à ce perturbateur endocrinien. Un total de 56 porcs mâles castrés (LWxLd) × Piétrain (27,7 kg) ont reçu individuellement des aliments témoin ou contenant 32 ou 297 µg d'α-HBCD par kg pendant l'engraissement ou uniquement la période de croissance. Des abattages séquentiels de trois porcs par groupe en exposition ou élimination ont été effectués après 19, 49, 70, 91, et 112 j afin de prélever le foie et des échantillons de gras dorsal et de muscle semi-membraneux. Les performances ne sont pas affectées par l'exposition. Avec l'aliment contenant 297 µg/kg d'α-HBCD, la concentration dans le muscle augmente rapidement pour atteindre 116 ng d'α-HBCD /g de lipides après 49 j. Elle est de 31 ng/g après 63 j d'élimination, en partie en raison de l'accroissement du poids corporel. Les concentrations dans le foie sont inférieures alors que celles dans le tissu adipeux sont supérieures à celles du muscle. Un modèle de type PBPK, combinant des approches de physiologie mécanistique et de pharmacocinétique basée sur la circulation sanguine, a été paramétré parallèlement avec le logiciel Vensim®. Les compartiments représentés : foie, muscles du jambon et de la longe, tissu adipeux sous-cutané, tous irrigués par le plasma, permettent d'étudier le transfert du contaminant vers les tissus. Les prédictions du modèle sont validées par les données expérimentales et permettront la simulation de scénarios d'exposition des animaux. Il est conclu que l'accumulation d'HBCD dans les tissus porcins apparaît possible, justifiant une surveillance des sources d'exposition.

Characterization and modeling of residues of an emergent contaminant in pig meat: hexabromocyclododecane

Hexabromocyclododecane (HBCD) is a brominated flame retardant used into materials such as polystyrenes. Its presence in some animal origin food samples may contribute to human exposure to this endocrine disruptor. A total of 56 barrows (LWxLd) × Piétrain (27.7 kg) were individually given, for total fattening or only growing period, feeds containing 32 or 297 µg α-HBCD per kg or controls. Serial slaughtering of 3 pigs per exposed or decontaminated group was performed at days 19, 49, 70, 91, and 112 to get the liver and backfat and semimembranosus muscle samples. Performance was not affected by α-HBCD exposure. With the 297 µg/kg diet, α-HBCD concentration in the muscle quickly increased up to 116 ng/g lipid at day 49. It declined down to 31 ng/g after 63 d of depuration, partly because of the body weight gain. HBCD concentration was higher in the adipose tissue than in the muscle and was lower in the liver. A Physiologically Based Pharmacokinetic (PBPK) modelling combining mechanistic-physiological and pharmacokinetic approaches was undertaken using the Vensim® software. The model represented different compartments: liver, ham and loin muscles, subcutaneous adipose tissue, all irrigated by plasma, and was calibrated to determine the contaminant transfer to the tissues. Model predictions were validated by experimental data. This generic model may be used to simulate animal exposure scenarios. It is concluded that HBCD accumulation in pig tissues is possible, justifying a monitoring of exposure sources.

INTRODUCTION

Comme d'autres retardateurs de flamme bromés (RFB) tels que PBDE, PBB ou TBBPA, utilisés pour ignifuger les textiles et les matériaux isolants ou électriques, l'hexabromocyclododécane (HBCD) est un perturbateur endocrinien (Van der Ven *et al.*, 2006). Les RFB se caractérisent par des propriétés physico-chimiques qui les rendent lipophiles et bioaccumulables à l'égal d'autres polluants organiques persistants (dioxines). L'HBCD technique est un mélange principalement formé de trois diastéréoisomères (α -, β - et γ -HBCD). Or, plusieurs matériaux à base de polystyrène et contenant jusqu'à 3,8 % d'HBCD, principalement sous la forme α , ont été identifiés dans les bâtiments d'élevage comme sources possibles d'exposition des animaux par voie orale ou respiratoire (Cariou *et al.*, 2014). Bien que sa concentration ne soit pas réglementée, l'HBCD est fréquemment détecté dans les produits animaux (viandes, œufs, lait) à des doses généralement inférieures à 1 ng/g de lipides et sans risque pour la santé humaine (EFSA, 2011), mais les plans de surveillance relèvent une variabilité importante. Aussi, les denrées alimentaires d'origine animale apparaissent comme une source majeure de l'exposition des consommateurs selon l'EFSA (2011).

La présente étude s'intègre au projet BrAviPorc (2013-2016) dont l'objectif est de mieux comprendre les modalités de contamination par HBCD des produits issus des élevages de porcs et de volailles. Une étude d'exposition alimentaire puis une modélisation de l'accumulation de l'isomère α -HBCD, ont été conduites chez le porc.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. Aliments, animaux et dispositif expérimental

Des cristaux contenant 99,3% d' α -HBCD ont été synthétisés par chauffage (172°C, 6 h) et précipitation à partir d'HBCD technique par le LABERCA (Nantes), permettant la préparation d'une huile végétale contaminée contenant 50 μ g d' α -HBCD /g. Ce mélange initial a été dilué et incorporé à du blé broyé (UE INRA PEAT, Nouzilly) afin d'obtenir deux suppléments granulés contenant 50 (S1) ou 500 (S2) μ g d' α -HBCD /kg et représentant 10% de la ration à distribuer. Un aliment charcutier unique témoin et un complémentaire 90% ont été préparés à l'atelier Ifip de Villefranche-de-Rouergue afin que les deux rations finales reconstituées apportent 9,5 MJ d'énergie nette/kg et 0,90 g de lysine digestible/MJ EN.

L'essai à la station de Villefranche-de-Rouergue a comparé, pendant la phase de croissance (j1 à j49), un niveau témoin (T) à deux niveaux de contamination ciblés (N1 à 5 et N2 à 50 μ g d' α -HBCD/kg d'aliment), choisis afin d'atteindre quelques centaines de ng/g de lipides dans les produits animaux. Pendant la phase de finition (j50 à j113), les porcs auxquels un aliment contaminé était distribué en phase de croissance, ont continué à recevoir cet aliment ou bien, pour la moitié d'entre eux, ont reçu l'aliment témoin (N1-T et N2-T).

Cinquante-six porcs mâles castrés (LW x Ld) x Piétrain de 70 j d'âge et 27,7 kg de poids vif (PV) moyen ont été mis en lots sur la base du traitement préalable en post-sevrage et du PV, et logés dans quatre salles identiques, ayant chacune deux cases de 8 porcs avec des réfectoires individuels et une aire d'exercice commune. Afin d'éviter les contaminations par voie aérienne entre traitements, ceux-ci ont été regroupés par salle. Les quantités à distribuer de suppléments S1 et S2 ont été pesées

Tableau 1 – Effectifs par traitement et jour d'abattage

Jour d'abattage	T	N1	N1-T	N2	N2-T
j1	2				
j20		3		3	
j50	3	3		3	
j71		3	3	3	3
j92		3	3	3	3
j113	3	3	3	3	3
Total	8	15	9	15	9

T : Témoin ; N1 et N2 : niveaux 1 et 2 de contamination ; T : témoin

et stockées en barquettes puis mélangées au complémentaire en farine humidifiée en un seul repas quotidien, identique pour tous les porcs et progressant selon l'appétit moyen. Deux porcs témoins ont été abattus à j1 puis des abattages sériés de trois porcs par traitement ont été effectués à j20, 50, 71, 92 et 113. Les effectifs par traitement et abattage figurent au Tableau 1.

1.2. Mesures, prélèvements et analyses

Tous les porcs ont été mis à jeun et pesés individuellement la veille de chaque abattage. Le foie a été prélevé, pesé, et un échantillon préparé à partir des lobes latéral gauche et médial droit. Des échantillons de gras dorsal et de muscle semi-membraneux ont été prélevés. Tous les échantillons ont été conservés à -20°C jusqu'à l'analyse.

La méthode utilisée pour la quantification d'HBCD dans les aliments et les produits animaux est accréditée selon la norme ISO 17025 (LABERCA/HBCD-tm.1.03). Des solutions de référence d'HBCD natif et d'isomères marqués au 13 C ont été utilisées (Laboratoires Wellington). Les échantillons ont été lyophilisés (aliment, muscle, foie), puis extraits par Extraction Liquide sous Pression à chaud (PLE) (matrices lyophilisées et tissu adipeux), purifiés sur colonnes de silice acidifiée, puis par partition entre hexane et soude 1 N. La séparation/détection des isomères d'HBCD repose sur la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS, 6410, Agilent). La quantification est basée sur le principe de dilution isotopique.

1.3. Calculs et analyses statistiques

Le logiciel SAS (9.4, SAS Inst., Cary, NC) a été utilisé pour les analyses statistiques, le test de Tukey étant utilisé pour les comparaisons de moyennes. Les performances zootechniques ont été analysées par une analyse de variance (proc GLM) en utilisant l'animal comme unité expérimentale et en prenant en compte les effets fixes de l'alimentation (A), de la durée totale d'exposition ou d'élimination (J) avec le PV initial en covariable.

Chez les porcs témoins, les teneurs en α -HBCD inférieures à la limite de quantification (LOQ : 0,040 μ g/kg d'aliment, 0,100 ng/g de lipides du muscle ou du gras dorsal, 0,080 ng/g de lipides du foie) ont été remplacées par la LOQ/2 afin d'éviter des données manquantes. Les concentrations d' α -HBCD dans les tissus ont été analysées à l'aide d'un modèle mixte (Proc Mixed) incluant les effets A, J et du tissu, et les interactions A x J ainsi que A x J x Tissu, avec l'animal comme sujet des mesures répétées pour tenir compte de la corrélation entre les tissus prélevés sur un même porc.

Puis, afin de faciliter la comparaison entre les deux niveaux de concentration d' α -HBCD dans les aliments, la concentration d' α -HBCD dans les tissus a été divisée par la concentration dans l'aliment. Ces données, à l'exclusion des porcs témoins, ont été analysées en utilisant un modèle mixte, incluant l'effet fixe de la combinaison A x J, celui du tissu et l'interaction entre ces deux

variables, avec l'animal comme sujet des mesures répétées. Les moyennes ajustées pour les niveaux de concentration d' α -HBCD dans l'aliment sont comparées deux à deux aux mêmes durées d'exposition (19, 49, 70, 91 ou 112 j). Elles ont ensuite été soumises à une régression non linéaire (Proc NLIN) afin d'estimer les caractéristiques d'élimination de l' α -HBCD dans les différents tissus.

Les paramètres k et AR ont été ajustés simultanément au moyen d'un modèle cinétique de premier ordre de la forme suivante : $C_{t_1,t_2} = AR * (e^{-kt_2} - e^{-k(t_1+t_2)})$ (OCDE, 2012) avec C_{t_1,t_2} , la concentration d' α -HBCD dans le tissu (ng/g lipides) rapportée à celle dans l'aliment (ng/g 88% de matière sèche), après une période d'exposition de t_1 jours ($0 \leq t_1 \leq 112$) suivie d'une période d'élimination de t_2 jours (pour $t_1 \leq 49$, $t_2 = 0$; pour $t_1 > 49$, $1 \leq t_2 \leq 63$) et k la constante d'élimination globale (j^{-1}). Le ratio d'accumulation AR est une estimation de la concentration d'HBCD dans la matrice rapportée à sa concentration dans l'aliment à l'équilibre. Afin d'estimer les rôles respectifs de la dilution par la croissance et de l'élimination de la molécule par le métabolisme dans l'évolution de la concentration d' α -HBCD dans les tissus au cours du temps, la constante cinétique de croissance (k_g , j^{-1}) a été estimée à partir des quantités de lipides présents dans chaque tissu (lip, g) selon une régression linéaire (Proc REG) de la forme suivante : $\ln(\text{lip}) = a + k_g \times t_2$ où t_2 est la durée d'élimination (j). Puis, la constante cinétique d'élimination (k_d , j^{-1}) a été obtenue par soustraction de la constante cinétique de croissance k_g à la constante cinétique d'élimination globale k . Les demi-vies d'élimination globale et d'élimination ont été calculées respectivement comme $\ln(2)/k$ et $\ln(2)/k_d$.

1.4. Démarche de modélisation

Un modèle générique pharmacocinétique basé sur la physiologie (PBPK) simulant l'accumulation d'HBCD dans les tissus a été développé à l'aide du logiciel Vensim® DSS 5.11A (Ventana Systems, Harvard, MA). L'intérêt d'un tel modèle est la prise en compte de l'influence de la croissance sur le transfert d'HBCD (MacLachlan, 2010). Il repose sur deux sous-modèles (Figure 1). Le sous-modèle physiologique représente différents compartiments (poids total et poids de lipides) : plasma, foie, deux muscles ayant des teneurs différentes en lipides (longe et jambon), un tissu adipeux de réserve (gras dorsal) et un compartiment représentant le reste de l'animal. Dans le sous-modèle ADME (absorption, distribution, métabolisme, excrétion), l'HBCD est absorbé dans le tube digestif, avant d'être distribué dans l'organisme par le plasma en tenant compte des différences d'irrigation sanguine entre les tissus.

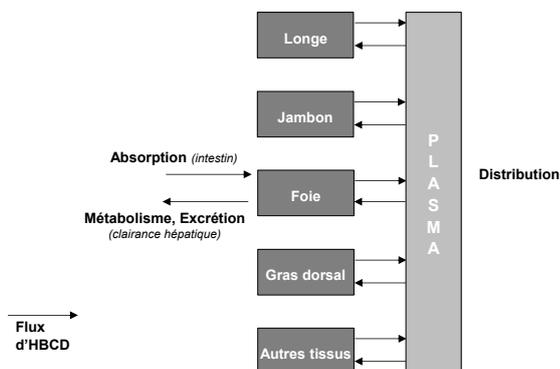


Figure 1 – Représentation du modèle PBPK

L'HBCD étant un composé lipophile et apolaire, il a une grande affinité pour les lipides neutres, soit la somme des triglycérides,

des cholestérols et de 30% des phospholipides, selon Haddad *et al.* (2000). Le coefficient de partition (K_p), qui représente l'affinité relative de l'HBCD pour le plasma et les tissus est donc estimé comme le rapport de concentrations de lipides neutres dans un tissu et dans le plasma. Dans le foie, une fraction de l'HBCD est éliminée par métabolisation (clairance hépatique). Le modèle est paramétré pour tenir compte des vitesses de croissance et de dépôt de lipides différentes entre tissus (allométries) selon l'espèce, la génétique et le sexe. Le modèle a été validé à l'aide des données expérimentales de la phase d'exposition à l'HBCD.

1.4.1. Paramétrage du modèle

Une base de données a été construite afin de collecter les données de la littérature notamment les paramètres anatomiques et physiologiques nécessaires pour décrire la masse des organes, les flux sanguins, etc. La croissance de l'animal est décrite à partir de la fonction classique de Gompertz décrivant le gain de poids vif de l'animal sur la base duquel est calculé le gain de poids des compartiments puis le dépôt de lipides dans ces compartiments. Les allométries de gain de poids des compartiments ont été établies à partir de jeux de données renseignant le poids des tissus et organes en fonction du poids de l'animal. De même, le dépôt de lipides totaux et neutres dans les tissus a été rapporté au poids de l'animal. Le flux d'HBCD ingéré est soumis à un coefficient d'absorption fixé à 90% (Szabo *et al.*, 2011) puis atteint le foie à travers la veine porte, lequel amorce les échanges avec le plasma. Les rapports de concentration de lipides neutres entre les tissus et le plasma (K_p) et l'irrigation des tissus régissent le niveau et la cinétique de distribution de l'HBCD. Le processus d'élimination est estimé classiquement par la clairance hépatique. Du fait des doses relativement faibles de contaminant et en accord avec la concentration proportionnelle dans les tissus avec celle dans l'aliment dans l'expérimentation, les occurrences d'une induction enzymatique ou d'une saturation de clairance n'ont pas été retenues dans le modèle.

1.4.2. Calibration et validation du modèle

Après le paramétrage du modèle, une première tentative de validation, infructueuse, a été réalisée. Une analyse de sensibilité ayant, au préalable, montré la sensibilité du modèle aux variations de plusieurs paramètres physiologiques et zootechniques, différents paramètres (coefficients d'irrigation, proportion de lipides neutres dans les lipides totaux, clairance hépatique) ont été calibrés.

Tableau 2 – Plage attribuée et valeur initiale, puis calculée par l'ajustement de plusieurs paramètres du modèle PBPK à l'aide des données expérimentales du traitement N2.

Paramètre	Plage attribuée	Valeur initiale	Valeur calculée
Coefficients d'irrigation, l/kg/h			
Foie	13,2 à 27	20,1	27,0
Muscle de la longe	3 à 16,4	16,4	5,12
Muscle du jambon	2,2 à 9,2	6,8	2,20
Gras dorsal	9,5 à 13,2	11,4	13,2
Débit cardiaque	4,4 à 9,6	9,0	8,79
Proportion de lipides neutres dans les lipides totaux, kg/kg			
Foie	0,3 à 0,45	0,4	0,30
Muscle de la longe	0,5 à 1	0,66	0,90
Muscle du jambon	0,5 à 1	0,67	0,80
Plasma	0,69 à 0,82	0,7	0,82
Gras dorsal	0,8 à 1	0,7	1,00
Reste	0,5 à 1	0,5	0,48
Taux de clairance	0 à 1	0,2	0,52

Pour cela, le module d'optimisation de Vensim a été utilisé, avec pour objectif l'ajustement des sorties du modèles (teneur en HBCD des tissus/g lipides) sur les teneurs mesurées expérimentalement pour les porcs N2. Les nouvelles valeurs des paramètres ajustés sont présentées au Tableau 2. Les valeurs ainsi fixées pour les coefficients d'irrigation et les proportions de lipides neutres permettent la meilleure correspondance avec le jeu de données N2 (Figure 3).

Afin de valider le modèle, les conditions expérimentales relatives aux traitements N1, N1-T et N2-T ont été reproduites *in silico* (teneur en HBCD de l'aliment, performances zootechniques...) et les teneurs mesurées et simulées en HBCD/g lipides des tissus ont été comparées par régression linéaire avec la fonction lm de R 3.2.4 (www.r-project.org).

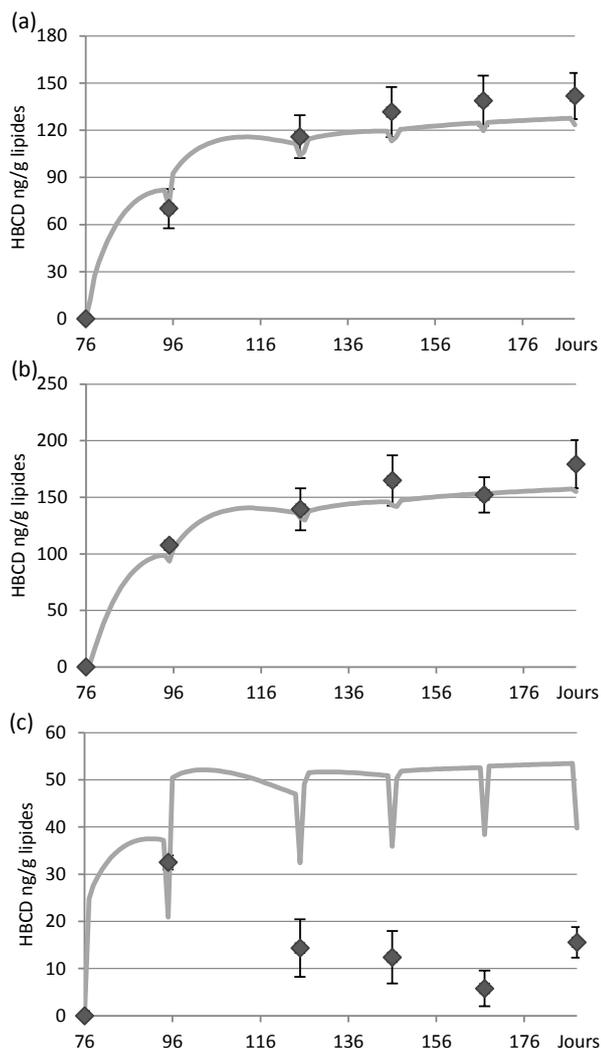


Figure 3 – Concentrations expérimentales (◆) et simulées (—) d'α-HBCD dans le muscle du jambon (a), le gras dorsal (b) et le foie (c) des porcs N2 recevant 30 µg d'α-HBCD/kg d'aliment pendant tout l'engraissement.

2. RESULTATS

2.1. Performances zootechniques

En début d'essai, l'ingestion d'aliment et le gain de poids ont été assez faibles (GMQ moyen : 658 g/j en croissance, 934 g/j en finition), probablement en raison de l'alimentation individuelle

en un seul repas. Les performances et l'état sanitaire n'ont pas été influencés par les aliments distribués (données non présentées).

2.2. Concentrations d'α-HBCD dans les aliments

Conformément aux attentes, les aliments témoin et complémentaire ne contenaient pas d'HBCD (<0,040 µg/kg brut). Les concentrations d'α-HBCD dans les suppléments N1 et N2 étaient respectivement de 31,9 et 297 µg/kg à 88% de matière sèche (soit 34 et 318 µg/kg brut) pour des valeurs cibles de 50 et 500 µg/kg. Ces différences de 32 et 37% par rapport aux valeurs attendues peuvent être considérées comme acceptables. Le rapport de concentrations entre les niveaux 1 et 2 correspond à l'objectif d'un facteur de 10.

2.3. Concentration d'α-HBCD dans les tissus

De l'α-HBCD a été mesuré dans tous les tissus analysés à l'exception, pour les porcs témoins, de tous les foies et des muscles et tissus gras prélevés à j1. La concentration d'α-HBCD a augmenté pendant la phase de contamination puis diminué progressivement pendant la phase d'élimination ($A \times J$, $P < 0,001$) (Tableau 3). Avec les deux aliments N1 et N2, les lipides du gras dorsal étaient plus concentrés en α-HBCD que ceux du muscle semi-membraneux du jambon, alors que le foie était moins contaminé ($A \times J \times \text{Tissu}$, $P < 0,001$). La teneur dans le foie a atteint son pic de concentration dès 19 j d'exposition chez les porcs recevant l'aliment N2.

L'analyse des contrastes entre les deux niveaux d'exposition indique que la concentration d'α-HBCD est proportionnelle à celle de l'aliment quels que soient le tissu et la durée d'exposition ($P > 0,1$), à l'exception des concentrations obtenues dans le foie à j91 qui, rapportées à celles de l'aliment, sont plus élevées avec l'aliment N1 par rapport à N2 (0,88 vs 0,19 ; $P = 0,01$). Aussi, les deux niveaux de contamination ont été regroupés pour l'estimation des paramètres cinétiques. Un modèle cinétique d'ordre 1 a pu être ajusté aux données d'élimination, sauf pour le foie (Tableau 4). La constante d'élimination globale k atteint respectivement 0,0253 et 0,0214 j^{-1} pour le muscle du jambon et le gras dorsal. La demi-vie d'élimination globale est estimée à 27 et 32 j, respectivement.

Tableau 4 – Estimation des paramètres cinétiques de décontamination des tissus porcins¹

Tissu	Muscle du jambon	Gras dorsal	Foie
$k_g \times 10^{-3} (j^{-1})$	15,0	17,2	6,37
R^2	0,58	0,88	0,58
ETR	0,3	0,15	0,13
$k \times 10^{-3} (j^{-1})$	25,3	21,4	nc
AR	5,31	6,55	
R^2	0,51	0,81	
$t_{1/2}$ globale (j)	27	32	
$k_d \times 10^{-3} (j^{-1})$	10,3	4,2	
$t_{1/2}$ d'élimination (j)	67	165	

¹ Les estimations de la constante cinétique de dépôt de lipides (k_g) et de la constante cinétique d'élimination globale (k) ont été obtenues comme décrit dans la partie calculs et analyses statistiques (§ 1.3). R^2 et ETR sont le coefficient de détermination et l'écart type résiduel des régressions. La constante cinétique d'élimination (k_d) est calculée comme $k - k_g$. Les demi-vies d'élimination globale et d'élimination sont calculées respectivement comme $\ln(2)/k$ et $\ln(2)/k_d$. nc : conditions de l'analyse de régression non réunies.

Tableau 3 – Concentration de α -HBCD dans les tissus (ng/g lipides) des porcs exposés aux aliments N1 et N2 ¹

Traitement		Durée (j)	Muscle du jambon		Gras dorsal		Foie	
Témoin		1	0,0 ^a		0,0 ^a		0,0 ^a	
		49	0,1 ^a		0,2 ^a		0,0 ^a	
		112	0,1 ^a		0,3 ^a		0,0 ^a	
Exposition	N1	19	8,7 ^a		9,8 ^a		1,7 ^a	
		49	13,6 ^a		13,1 ^a		2,2 ^a	
		70	14,7 ^a		15,0 ^a		2,0 ^a	
	N2	91	13,0 ^a		16,4 ^a		2,8 ^a	
		112	13,0 ^a		14,1 ^a		1,7 ^a	
		19	70,2 ^c	B	107,7 ^{de}	A	32,5 ^e	C
Elimination	N1-T	49	115,9 ^d	A	139,5 ^{def}	A	14,4 ^{bc}	B
		70	131,6 ^d	B	164,8 ^f	A	12,4 ^{bcd}	C
		91	138,7 ^d	A	152,2 ^{ef}	A	5,8 ^{ab}	B
	N2-T	112	141,8 ^d	B	179,2 ^f	A	15,6 ^c	C
		70	9,5 ^a		12,4 ^a		1,0 ^a	
		91	4,8 ^a		7,1 ^a		0,7 ^a	
N2-T	112	3,8 ^a		5,2 ^a		0,3 ^a		
	70	80,9 ^c	A	96,1 ^{cd}	A	4,5 ^{ad}	B	
	91	52,6 ^{bc}	A	72,3 ^{bc}	A	7,4 ^{ac}	B	
		112	31,0 ^{ab}	A	45,1 ^{ab}	A	6,4 ^{ac}	B

*P-value*²: A ***, J ***, Tissu ***, A×J***, A×J×tissu*** ; ETR : 7,3

¹ Les valeurs correspondent aux moyennes ajustées (n=3), sauf pour le témoin à j1 (n=2). ² Analyse de variance (modèle mixte) incluant les effets de l'alimentation (A), de la durée d'exposition puis d'élimination (J), du tissu, et les interactions A×J ainsi que A×J×Tissu, avec l'animal comme sujet des mesures répétées. NS (non significatif) : P > 0,10, *** P < 0,001. ETR: écart-type résiduel. A l'intérieur d'une ligne, les tissus d'une même combinaison A×J non suivis de la même lettre (A, B, C) différent (P < 0,05). A l'intérieur d'une colonne, les valeurs non indexées de la même lettre (a, b, c, d, e) différent (P < 0,05).

Toutefois, en séparant la dilution due à la croissance de l'animal et au dépôt associé de lipides, ces demi-vies sont doublée et quintuplée pour atteindre respectivement 67 j dans le semi-membraneux et 165 j dans le gras dorsal.

2.4. Validation du modèle

La validité du modèle a été évaluée en comparant les valeurs prédites aux concentrations d' α -HBCD dans les tissus des trois autres jeux de données de l'essai correspondant aux traitements N1, N1-T et N2-T. Les concentrations d' α -HBCD simulées et observées dans le muscle du jambon, le gras dorsal et le foie sont comparées par régression linéaire. Les résultats (Tableau 5, Figure 4) indiquent une bonne correspondance.

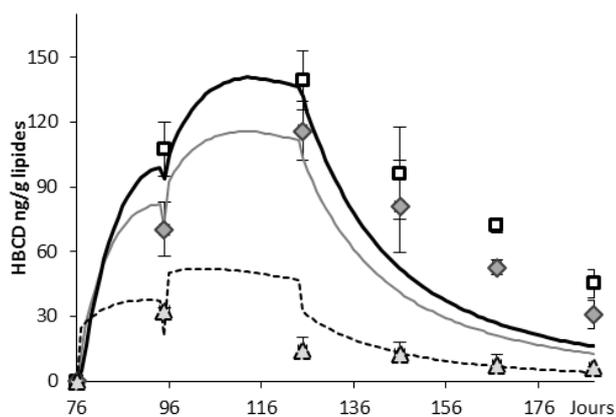


Figure 4 – Concentrations expérimentales (◇) et simulées (—) d' α -HBCD dans le gras dorsal (□, —), le muscle du jambon (◇, —), et le foie (△, ---) des porcs N2-T recevant 30 μ g d' α -HBCD/kg d'aliment en croissance puis l'aliment témoin en finition.

Pour le traitement N1 correspondant à une exposition pendant la période totale au niveau N1, les concentrations d'HBCD

prédites par le modèle sont sous-estimées de 2% dans le muscle du jambon et de 10% dans le gras dorsal. Par contre, le modèle sous-estime d'environ 23% la concentration d'HBCD dans le muscle du jambon et le gras dorsal des porcs des traitements N2-T (Figure 4) et N1-T en période d'élimination, probablement en raison d'une clairance hépatique trop élevée. Les teneurs prédites dans le foie ne permettent pas d'établir statistiquement une relation linéaire avec le groupe N2D, et correspondent à des valeurs surestimées de 90% pour le traitement N1 et de 47% pour le traitement N1-T.

3. DISCUSSION

L'hexabromocyclododécane est inscrit depuis mai 2013 sur la liste des polluants organiques persistants (POP) de la convention de Stockholm, conduisant à l'arrêt progressif de sa production et de son utilisation, en particulier pour ignifuger les polystyrènes. Cette étude confirme que l' α -HBCD est un composé persistant et significativement transféré aux produits issus d'animaux exposés, avec des ratios d'accumulation de respectivement 6,6 et 5,3 dans le gras dorsal et le muscle du jambon. Ces valeurs sont comparables à celles mesurées chez les volailles (poule pondeuse et poulet en croissance) avec des ratios d'accumulation estimés à environ 10 dans le gras abdominal, 6 dans le muscle de la cuisse et 2 dans le filet (Dominguez-Romero *et al.*, 2016). Chez le saumon, ce ratio atteint 2,7 dans le filet (Berntssen *et al.*, 2011). Comme chez le poulet, la croissance et le dépôt de lipides associé contribuent pour plus de la moitié à la limitation de la concentration d'HBCD dans les tissus. Toutefois la disparition de la molécule par métabolisme semble être plus rapide chez le poulet que chez le porc avec des demi-vies d'élimination estimées à 24 j dans le filet et 47 j dans le gras abdominal. Ces différences peuvent être liées à un métabolisme hépatique différents entre espèces (Abdallah *et al.*, 2014). En considérant que les polystyrènes utilisés pour l'isolation des bâtiments soient la source de

Tableau 5 – Equations des régressions linéaires entre les concentrations mesurées et simulées d'HBCD dans le foie, le muscle du jambon et le gras dorsal des traitements N1, N1-T et N2-T.

Variable prédite	b ₀			b ₁		R ²	ETR	
	Val	(e.t.)	P	(e.t.)	P			
N1								
Muscle du jambon	0			0,98	(0,05)	***	0,99	1,47
Foie	0			1,90	(0,17)	***	0,95	0,75
Gras dorsal	0			1,10	(0,03)	***	1,00	0,78
N1-T								
Muscle du jambon	0			0,76	(0,08)	**	0,93	1,65
Foie	0			1,47	(0,09)	***	0,98	0,28
Gras dorsal	0			0,78	(0,15)	***	0,82	3,26
N2-T								
Muscle du jambon	0			0,77	(0,10)	***	0,90	21,5
Foie	4,24	(6,46)	NS	0,71	(0,41)	NS	0,29	9,40
Gras dorsal	0			0,76	(0,10)	***	0,90	27,4

¹ Equation de régression linéaire $Y = b_0 + C * b_1$ obtenue avec la fonction $\text{lm}(Y, \text{variable prédite à expliquer} \sim C, \text{variable mesurée explicative})$. L'intercept, lorsqu'il est non significatif, est supprimé de l'équation, la fonction devenant $\text{lm}(\text{variable à expliquer} \sim \text{variable explicative}-1)$. Val. : valeur, e.t. : écart-type. NS (non significatif) : $P > 0,10$, **: $P < 0,01$, ***: $P < 0,001$. ETR: écart-type résiduel.

contamination des porcs (Cariou et al., 2014), il suffirait de l'ingestion d'1 mg de polystyrène contenant 3% d' α -HBCD par kg d'aliment pour aboutir à une teneur de 140 ng/g lipides dans le muscle du jambon. Cette étude est l'une des toutes premières où la modélisation pharmacocinétique basée sur la physiologie (PBPK) permet de simuler chez le porc les concentrations plasmatiques et tissulaires attendues suite à l'exposition à un polluant organique persistant. Pour cela, la croissance et le dépôt des lipides ainsi que les phases d'absorption, distribution, métabolisme et excrétion (ADME) sont décrites de façon mécaniste. Il n'est pas possible d'avoir toutes les informations pour l'animal étudié et il est largement fait appel aux données de la bibliographie pour établir *a priori* les paramètres.

Parallèlement à ce travail chez le porc, une même démarche est entreprise pour le poulet à partir du recueil des données physicochimiques, *in vitro* et *in vivo* spécifiques à cette espèce. La modélisation générique PBPK permet d'intégrer de la même manière ces données pour la prédiction de la rétention d'HBCD chez les espèces en croissance. A terme, ce modèle pourrait être utilisé pour d'autres molécules lipophiles et apolaires (PCB, dioxines).

CONCLUSION

L'étude d'exposition réalisée chez le porc avec deux niveaux de concentration en α -HBCD dans l'aliment montre que la contamination des tissus est proportionnelle à la quantité ingérée, et que l'élimination n'est pas totale après plus de 60 jours. Le modèle générique PBPK présenté dans cette étude simule correctement la toxico-cinétique d'un retardateur de flamme bromé chez le porc. Il pourra être utilisé pour évaluer le risque de contamination par HBCD de différents tissus de porcs. De futures simulations permettront de comparer différentes situations d'élevage ou d'exposition.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient tout particulièrement Angélique Travel (ITAVI) et Jérôme Henri (ANSES- Laboratoire du médicament vétérinaire) pour leurs contributions. Cette étude a bénéficié du soutien financier du CASDAR dans le cadre du projet BrAviPorc (projet n°1256).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdallah M.A.E., Uchea C., Chipman J. K., Harrad S., 2014. Enantioselective biotransformation of hexabromocyclododecane by in vitro rat and trout hepatic sub-cellular fractions. Environ. Sci. Technol., 48, 2732-2740.
- Berntssen M.H.G., Valdernes S., Rosenlund G., Torstensen B.E., Zeilmaker M.J., Van Eijkeren J.C.H., 2011. Toxicokinetics and carry-over model of α -hexabromocyclododecane (HBCD) from feed to consumption-sized Atlantic salmon (*Salmo salar*). Food Addit. Contam., 28, 1274-1286.
- Cariou R., Vénisseau A., Amand G., Marchand P., Marcon M., Huneau A., Le Bouquin S., Dervilly-Pinel G., Travel A., Le Bizec B., 2014. Identification of hexabromocyclododecane in building material. Organohalogen Compounds, 76, 1521-1524.
- Dominguez-Romero E., Cariou R., Omer E., Marchand P., Dervilly-Pinel G., Le Bizec B., Travel A., Jondreville C., 2016. Tissue distribution and transfer to eggs of ingested α -Hexabromocyclododecane (α -HBCDD) in laying hens (*Gallus domesticus*). J. Agric. Food Chem. 64, 2112-2119.
- EFSA Panel on contaminants in the food chain, 2011. Scientific Opinion on Hexabromocyclododecanes in Food. EFSA Journal 9(7), 2296. 118 pp.
- Haddad S., Poulin P., Krishnan K., 2000. Relative lipid content as the sole mechanistic determinant of the adipose tissue: blood partition coefficients of highly lipophilic organic chemical. Chemosphere, 40, 839-843.
- MacLachlan D.J., 2010. Physiologically based pharmacokinetic (PBPK) model for residues of lipophilic pesticides in poultry. Food Addit. Contam., 27: 3, 302-314.
- OCDE, 2012. Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, n° 305: Bioaccumulation chez le poisson : exposition via le milieu aquatique et via la voie alimentaire. pp 78. www.oecd-ilibrary.org.
- Szabo D.T., Diliberto J.J., Hakk H., Huwe J.K., Birnbaum L.S., 2011. Toxicokinetics of the flame retardant hexabromocyclododecane alpha: effect of dose, timing, route, repeated exposure, and metabolism. Toxicol. Sci., 121, 234-244.
- Van der Ven L., Verhoef A., Van de Kuil T., Slob W., Leonards P.E.G., Visser T.J., Hamers T., Herlin M., Håkansson H., Olausson H., Piersma A.H., Vos J.G., 2006. A 28-day oral dose toxicity study enhanced to detect endocrine effects of hexabromocyclododecane in Wistar rats. Toxicol. Sci., 94, 281-292.