

# Transfert des hydrocarbures aromatiques polycycliques chez le ruminant laitier – Approche méthodologique et résultats préliminaires

C. FEIDT, N. GROVA, C. CREPINEAU, S. LUTZ, G. RYCHEN

Laboratoire Sciences Animales, INRA-INPL-UHP, 2 av. de la Forêt de Haye, 54505 Vandoeuvre

**RESUME** – Les analyses effectuées montrent une contamination significativement supérieure de l’herbe en Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) dans des zones exposées à un important trafic autoroutier. L’utilisation de trois HAP marqués au  $^{14}\text{C}$  (phénanthrène, pyrène et benzo[a]pyrène) a démontré un passage par voie alimentaire jusqu’au lait, soit des molécules parents, soit de leurs métabolites. L’essai réalisé avec des vaches en conditions de production standard, a permis d’estimer des coefficients de transfert de la ration hivernale au lait pour différents HAP. Dans ces deux expériences, le transfert semble décroître lorsque la lipophilicité des molécules augmente. Ces coefficients de transfert montrent un risque de transfert de HAP vers le lait lorsque les animaux sont au pâturage sur des parcelles exposées comme celles retenues dans notre étude.

## Polycyclic aromatic hydrocarbons transfer in lactating ruminant – Methodological approach and preliminary results

C. FEIDT, N. GROVA, C. CREPINEAU, S. LUTZ, G. RYCHEN

Laboratoire Sciences Animales, INRA-INPL-UHP, 2 av. de la Forêt de Haye, 54505 Vandoeuvre

**SUMMARY** – Grass contamination due to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH) was significantly higher in the vicinity of a motorway than in control pastures. The use of three  $^{14}\text{C}$  radiolabelled PAHs (phenanthrene, pyrene, benzo[a]pyrene) showed a transfer from feedstuffs to milk, either of the original molecule or of its metabolites. An experiment carried out with lactating cows allowed us to estimate transfer efficiency expressed as transfer coefficients. The analyses carried out showed a grass contamination significantly higher with Polycyclic Aromatic Hydrocarbon in areas exposed to a significant motorway traffic. In these two experiments, the transfer seems to decrease when the lipophilicity of the molecules increases. These coefficients of transfer show a risk of PAHs transfer towards milk when the animals are on pastures exposed like those retained in our study.

## INTRODUCTION

Des crises sanitaires récentes ont mis en évidence la capacité du ruminant laitier, lorsqu'il est exposé (Merchekour et Bignon, 2002), à excréter des polluants organiques dans le lait. Une étude prospective entreprise par notre laboratoire (Grova *et al.*, 2002) ainsi que divers articles (Dennis *et al.*, 1991 ; Lawrence et Weber, 1984) ont montré la présence d'Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) dans le lait. Certaines de ces molécules lipophiles ont un potentiel carcinogène ou mutagène reconnu (WHO, 1998). Une méthodologie a été mise en place afin d'évaluer le risque de transfert des HAP de l'aliment au lait chez le ruminant. Elle vise dans un premier temps à estimer les niveaux d'exposition des ruminants. Dans un deuxième temps, le transfert 'aliment-lait' a été caractérisé grâce à des HAP marqués aux isotopes. Enfin, des coefficients de transfert ont été déterminés chez des vaches laitières en conditions de production. L'objectif global est, à terme, de prédire la concentration de HAP dans le lait en fonction de la contamination des matrices environnementales au sein de l'agrosystème considéré.

## 1. MATERIEL ET METHODES

### 1.1. EVALUATION DE L'EXPOSITION

Les prélèvements d'herbe ont été effectués le long d'un gradient de distance perpendiculaire à une autoroute (trafic > 70000 véhicules/jour). Trois intervalles de distance ont été retenus depuis le bord de la voie routière : 0-10 m, 10-50 m et 50-150 m. Pour chaque point du gradient, 3 répétitions sont effectuées en prélevant des échantillons d'herbe sur 3 cercles de 6m de diamètre déterminés aléatoirement (n = 3). 3 prélèvements ont été réalisés sur une pâture témoin éloignée de toute source de contamination identifiée. Les 16 HAP de la liste US-EPA ont été recherchés par CPG-SM (Grova *et al.*, 2000). Une analyse de variance et un test de Newman-Keuls ont été réalisés sous STAT-ITCF.

### 1.2. TRANSFERT VERS LE LAIT

6 chèvres Alpine chamoisée en lactation ont été utilisées. Par lot de deux, elles ont reçu  $2,6.10^6$  Bq d'un HAP marqué au  $^{14}C$  (phénanthrène, pyrène ou benzo[a]pyrène) par voie orale. Chaque molécule a été distribuée à deux chèvres différentes (n = 2). Le suivi de la radioactivité a été effectué pendant 5 jours dans le lait par comptage en scintillation liquide. Le volume de chaque traite a été multiplié par la concentration de radioactivité (Bq/ml) pour obtenir une quantité de radioactivité excrétée, ce qui a permis d'établir un bilan d'excrétion sur 5 jours.

### 1.3. COEFFICIENTS DE TRANSFERT

Cinq vaches Prim'Holstein (ENSAIA, Champenoux, France) de performances zootechniques (production laitière, âge, poids vif, 3<sup>ème</sup> lactation) similaires ont été utilisées. A partir du vêlage, les animaux sont nourris individuellement en ration complète (71% ensilage de maïs ; 13,7% ensilage d'herbe ; 7,6% de blé ; 4,8% de tourteaux de soja ; 2,2% de maïs grain et 0,16% de  $CaCO_3$ ). L'ingéré quotidien a été mesuré par pesée des refus et un suivi journalier de la production laitière a été réalisé pour chaque individu. 500ml de lait (mélange de 2 traites consécutives) prélevés en salle de traite et 200g d'un mélange de la ration prélevée quotidiennement les 3 jours précédant les prélèvements de lait ont été analysés par extraction de la matière grasse puis par CPG-MS (Grova *et al.*, 2000). La contamination de l'eau et de l'air a été contrôlée. Les résultats ont été traités sous STAT-ITCF par analyse de variance et comparaison de moyenne selon la méthode des contrastes de Bonferroni.

## 2. RÉSULTATS

### 2.1. EVALUATION DE L'EXPOSITION LIÉE AU TRAFIC AUTOROUTIER

Les concentrations en HAP totaux présents dans l'herbe ne varient pas avec la distance. 81 % de la contamination totale est due à des composés à 4 et 5 cycles aromatiques. Les valeurs retrouvées entre 0 et 150 m sont significativement supérieures (tab. 1) à celle observée pour l'herbe témoin. Le pâturage des animaux en bordure d'un axe autoroutier majeur peut donc conduire à une exposition 8 fois supérieure à celle observée dans une pâture témoin. Si la somme n'évolue pas avec la distance, les HAP les plus lourds sont surtout présents à moins de 10 m de la chaussée.

**Tableau 1**  
Comparaison des contaminations en HAP totaux (ng/g MS) de l'herbe en fonction de la distance à l'axe autoroutier (les lignes comportant une lettre différente diffèrent significativement :  $p < 0,05$  ;  $n=3$ )

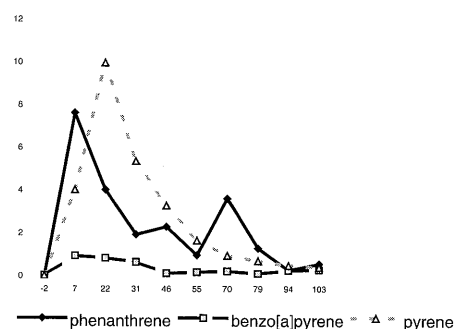
Site	Herbe	
	m*	et*
0-10 m	981 a	94
10-50 m	836 a	65
50-150 m	950 a	164
Témoin	119 b	23

m = moyenne, et = écart-type.

### 2.2. MISE EN ÉVIDENCE D'UN TRANSFERT VERS LE LAIT PAR VOIE ORALE

La radioactivité liée aux molécules introduites a été détectée dans le lait rapidement après l'ingestion (fig. 1). Le niveau atteint avec le benzo[a]pyrène reste proche du bruit de fond alors que les pics sont clairement visibles pour le phénanthrène et le pyrène. La concentration de radioactivité multipliée par le volume de traite permet d'estimer la part de la radioactivité ingérée que l'on retrouve dans le lait. Elle est proche de 0,2% pour le benzo[a]pyrène et s'élève à 1,5 et 1,9% pour le phénanthrène et le pyrène respectivement. Le transfert par voie alimentaire est donc avéré. Le taux de transfert semble être inférieur pour le benzo[a]pyrène par rapport aux deux autres HAP testés.

**Figure 1**  
Cinétique d'apparition de la radioactivité dans le lait



### 2.3. ESTIMATION DE COEFFICIENTS DE TRANSFERT ALIMENT-LAIT

Les résultats obtenus pour l'air ambiant et l'eau de boisson permettent de négliger l'apport en HAP de ces 2 matrices par rapport à celui dû à la ration. Seuls 6 HAP sur les 16 recherchés ont été quantifiés dans la ration et dans le lait. Les coefficients de transfert (CT) calculés pour ces 6 HAP varient de 30% pour le naphthalène à 0,8 % pour le chrysène. L'effet molécule est hautement significatif ( $p < 0,0001$ , ETR = 2,69). La méthode des contrastes permet d'isoler de manière signifi-

**Tableau 2**  
Coefficients de transfert (%) de la ration au lait suivant la molécule (n = 5)

Naphtalène		Fluorène		Phénanthrène		Fluoranthène		Pyrène		Chrysène		Effet molécule	
m	et	m	et	m	et	m	et	m	et	m	et	p	ETR
32,0	5,8	7,3	1,4	7,2	1,8	4,2	1,1	4,7	1,4	0,8	1,2	<0,0001	2,69

cative ( $p < 0,05$ ) 4 groupes de molécules : le naphtalène (CT  $\approx$  30 %), le fluorène et le phénanthrène (CT  $\approx$  7 %), le fluoranthène et le pyrène (CT  $\approx$  4,5 %) et le chrysène (CT  $\approx$  0,8 %). La capacité d'une molécule ingérée à être excrétée dans le lait semble décroître lorsque son caractère lipophile augmente.

### 3. DISCUSSION

Les ruminants laitiers au pâturage dans des zones exposées peuvent ingérer des quantités de HAP significativement supérieures à celles ingérées dans une zone témoin éloignée de toute source de contamination identifiée.

L'expérimentation conduite avec des HAP marqués a permis de démontrer le passage de l'aliment vers le lait. Le coefficient de transfert obtenu lors de cet apport unique en conditions contrôlées était de l'ordre de 1 à 2% pour le phénanthrène et le pyrène. Sur notre exploitation laitière expérimentale, les coefficients de transfert obtenus pour ces molécules étaient de 7,2 et 4,7% respectivement. Cette différence peut s'expliquer par un apport continu chez les vaches en conditions réelles de production contrairement à la dose unique reçue par les chèvres. Une différence de comportement des HAP a été observée dans les deux cas. Un HAP lourd à 5 cycles aromatiques comme le benzo[a]pyrène n'a pas été excrété vers le lait lors de l'essai chèvre, il n'a pas non plus été retrouvé dans le lait de vache. En conditions de production, les coefficients de transfert varient de 1 à 30 %, avec une tendance à la décroissance du transfert avec l'augmentation de la taille des molécules. Bien qu'appartenant à une même famille, ces molécules ont des pro-

priétés physicochimiques et une capacité à être biotransformées qui varient fortement. Ces variations pourraient être à l'origine des différences de comportement observées dans le transfert de l'aliment au lait chez le ruminant.

### CONCLUSION

Le ruminant peut donc excréter dans le lait les HAP qu'il ingère. Ce transfert dépend des molécules. Les plus lourdes qui sont aussi celles réputées les plus toxiques semblent être excrétées avec un rendement moindre. Des approches plus fines (culture cellulaire, suivi des métabolites) sont en cours pour expliquer ce mécanisme de transfert différentiel.

*Nous remercions l'ADEME pour sa participation au projet.*

**Dennis, M.J., Massey, R.C., Cripps, G., Venn, I., Howarth, N., Lee, G., 1991.** Food Addit. Contamin., 8, 517-530.

**Grova, N., Laurent, C., Feidt, C., Rychen, G., Laurent F., Lichtfouse, E., 2002.** Eur. J. Mass Spectr., 6, 457-460.

**Grova, N., Feidt, C., Crépineau, C., Laurent, C., Lafargue, P.E., Rychen, G., 2002.** J. Agric. Food Chem., 50, 4640-4642.

**Lawrence, J.F., Weber, D.F., 1984.** J. Agric. Food Chem., 32, 794-797.

**Merchekour, F., Bignon, E., 2002.** Réussir Lait Élevage, 150, 26-42.

**WHO (World Health Organization), 1998** (Editor). In Selected Non-heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. Genève, Suisse. EHC 202, 325-624.