

Approche toxicocinétique de la bioaccumulation des composés perfluoroalkyles chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*)

Alice Vidal

► **To cite this version:**

Alice Vidal. Approche toxicocinétique de la bioaccumulation des composés perfluoroalkyles chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*). Biodiversité et Ecologie. Université de Lyon, 2019. Français. NNT : 2019LYSE1070 . tel-02299353

HAL Id: tel-02299353

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-02299353>

Submitted on 27 Sep 2019

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.



N°d'ordre NNT : 2019LYSE1070

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON
opérée au sein de l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N° 341
Evolution Ecosystèmes Microbiologie Modélisation

Spécialité de doctorat : Ecotoxicologie

Discipline : Écologie des communautés, fonctionnement des écosystèmes, écotoxicologie

Soutenue publiquement le 03/06/2019, par :
Alice Vidal

Approche toxicocinétique de la bioaccumulation des composés perfluoroalkyles chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*)

Devant le jury composé de :

CRAVEDI, Jean-Pierre
HOUDE, Magali
CHARLES, Sandrine
LOIZEAU, Véronique
GARRIC, Jeanne
BABUT, Marc
BEAUDOUIN, Rémy

Directeur de recherche, INRA
Chercheuse, Environnement Canada
Professeure des universités, Lyon 1
Chercheuse, Ifremer
Directrice de recherche, Irstea
Chercheur (ICPEF), Irstea
Chargé de recherche, INERIS

Président & rapporteur
Rapporteuse
Examinatrice
Examinatrice
Directrice de thèse
Co-directeur de thèse
Invité

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Président du Conseil Académique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire

Vice-président de la Commission Recherche

Directrice Générale des Services

M. le Professeur Frédéric FLEURY

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Didier REVEL

M. le Professeur Philippe CHEVALIER

M. Fabrice VALLÉE

Mme Dominique MARCHAND

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud –

Charles Mérieux

Faculté d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Département de formation et Centre de Recherche en

Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur G. RODE

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Directeur : Mme la Professeure C.

VINCIGUERRA

Directeur : M. X. PERROT

Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Département Biologie

Département Chimie Biochimie

Département GEP

Département Informatique

Département Mathématiques

Département Mécanique

Département Physique

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Polytech Lyon

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. F. DE MARCHI

Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD

Directeur : Mme C. FELIX

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Directeur : M. le Professeur J-C PLENET

Directeur : M. Y. VANPOULLE

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Directeur : M. le Professeur E. PERRIN

Directeur : M. G. PIGNAULT

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Directeur : M. N. LEBOISNE

Résumé

Les substances poly- et per-fluorées (PFAS), exclusivement d'origine anthropique, sont de nos jours largement utilisées dans diverses applications industrielles et domestiques. La synthèse des PFAS engendre leurs rejets dans l'environnement, où ces composés se retrouvent aussi bien dans l'atmosphère que dans les milieux terrestres et aquatiques. Les études de distribution environnementale, relativement récentes, ont montré la bioaccumulation de certains PFAS chez les vertébrés aquatiques. La toxicocinétique (TK) des PFAS est particulière en raison de leurs propriétés physico-chimiques. Même si les études de TK de ces composés sont de plus en plus nombreuses, quelques verrous mécanistiques restent encore à lever chez les vertébrés aquatiques, notamment concernant les processus d'absorption, de distribution et d'élimination. Dans l'optique d'améliorer ces connaissances, un modèle toxicocinétique à base physiologique (PBTK) a été développé pour décrire le devenir de trois PFAS appartenant à la famille des perfluoroalkyles : le perfluorooctane sulfonate (PFOS), le perfluorohexane sulfonate (PFHxS) et l'acide perfluorononanoïque (PFNA). Ce modèle PBTK s'appuie sur les paramètres physiologiques de la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) et a permis de tester plusieurs hypothèses mécanistiques de la bioaccumulation des PFAS, utile à l'évaluation du risque engendré par l'exposition à ces substances. La croissance et la température de l'eau, facteurs clés dans la TK des poïkilothermes, ont également été intégrées dans le modèle. Les trois expériences d'exposition aux PFOS, PFHxS et PFNA par voie alimentaire à différentes températures (7°C, 11°C et 19°C) réalisées au cours de cette thèse ont permis (i) de mesurer les concentrations dans les organes d'intérêt et (ii) de calibrer et évaluer les prédictions du modèle.

Mots clés : Truite arc-en-ciel – Substances perfluoroalkyles – Modèle physiologique – Description mécanistique

Abstract

Poly- and per-fluorinated substances (PFAS), exclusively derived from anthropogenic activity, are nowadays widely used for industrial and domestic purposes. During their synthesis, PFAS are released in the atmosphere as well as in aquatic and terrestrial compartments. Environmental distribution studies are relatively recent and have shown the bioaccumulation of some PFAS in aquatic vertebrates. Physico-chemical properties of PFAS lead to a specific toxicokinetic (TK) profile. Although TK studies on these compounds are becoming more and more abundant, some mechanistic challenges still need to be solved for aquatic vertebrates, particularly for absorption, distribution and elimination processes. In order to improve this knowledge, a physiologically based toxicokinetic (PBTK) model has been developed to describe the fate of three PFAS belonging to the perfluoroalkyl family: perfluorooctane sulfonate (PFOS), perfluorohexane sulfonate (PFHxS) and perfluoronanoic acid (PFNA). This PBTK model was parametrized with rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) physiological parameters. Next, it was used to test several mechanistic hypotheses about PFAS bioaccumulation, useful for improving the risk assessment of these chemicals. Fish growth and water temperature are key factors in the TK for poikilotherms. So, they have been integrated in the model. Three experiments of dietary exposure to PFOS, PFHxS and PFNA at different temperatures (7°C, 11°C and 19°C) have been performed. They allowed (i) to measure concentrations in organs of interest and (ii) to calibrate and evaluate the model predictions.

Key words: Rainbow trout – Perfluoroalkyl substances – Physiological model – Mechanistic description



FX Photo, 2019

Remerciements

En premier lieu, un immense merci à Jeanne Garric et à Marc Babut, ma directrice et mon co-directeur de thèse, qui m'ont donné la possibilité de vivre les péripéties du doctorat. Vous m'avez tous les deux guidée, à votre manière, dans ce travail de recherche. Jeanne, ton regard d'expert m'a apporté une aide précieuse tout au long de la thèse et ton franc-parler m'a permis de dépasser mes moments de doute. Marc, ton organisation méticuleuse et ta façon de me faire prendre conscience que cette thèse était la mienne, en me répétant régulièrement « c'est TA thèse », m'ont fait développer une bonne autonomie et renforcer ma rigueur professionnelle.

Un merci sans limite à Rémy Beaudouin pour son implication dans cette aventure. Et quelle aventure, la modélisation ! Rémy, ta patience, ta pédagogie, ton sens de l'humour et ta bonne humeur, m'ont presque fait apprécier les moments de galère, endurés lors du développement du modèle. Ce n'était pas chose facile, quand on pense que je ne connaissais même pas la différence entre un écart-type et une erreur type ! Maintenant, grâce à toi, j'ai pris goût à écrire des équations différentielles, à pâtisser des cheesecakes à la banane et j'ai enrichi mon répertoire des chansons pourries de vieux dessins animés (euh... de chansons extra de ta génération, pardon).

Je remercie Eric Rochard, ainsi que les personnes de l'équipe technique des plateformes expérimentales de St-Seurin sur l'Isle et de l'INRA de Thonon-les-bains, et notamment Laurent Espinat, Charline Gesset, Patrick Chèvre, Louis Jacob et Fabien Polese, qui ont chéri mes truites durant les expériences. Un merci particulier à Laurent pour avoir supporté mes cris d'horreur du début au moment de tuer les truites (surtout les truites Pokémon) et pour m'avoir transmis ton savoir sur de nombreux sujets liés à la nature. Je tiens également à remercier Charline qui m'a apporté bien plus qu'une aide professionnelle. Je garde en tête un souvenir fort de nos moments de complicité, de discussions interminables, de nos histoires de tout et de rien, sans oublier les dissections guidées au rythme des chansons de Céline Dion.

Un grand merci à Emmanuelle Vuillet pour m'avoir autorisée à passer des mois entiers auprès du Xévo de l'ISA et également à Florent Lafay et à Gaëlle Danièle pour avoir consacré du temps au développement des méthodes d'analyse malgré l'odeur nauséabonde de poisson qui envahissait le laboratoire. Merci aussi à Barbara Giroud et Maéva Fieu pour leur aide.

Je remercie les membres de l'équipe ECOTOX d'Irstea Lyon-Villeurbanne, que j'ai croisés dans les couloirs pendant 3 ans, pour leurs diverses personnalités créant un mélange explosif. Parmi eux, Lucile Perrier, qui a su, grâce à sa joie de vivre, tourner mes craintes de débutante dans la recherche à la rigolade, merci.

Qu'aurait été ma vie de doctorante sans mes acolytes thésards, dont certains désormais docteurs et d'autres plus fraîchement arrivés (courage à vous). Paul et Duarte, merci de ne pas trop m'avoir écoeurée du doctorant lors de votre départ. Aude (Aud-dog pour les intimes), mon alter égo du bayésien, tu es la seule à pouvoir me soutenir dans mes questionnements insensés à propos de *l'a priori*

et de *l'a posteriori*. Pauline (ou Paupau la rigolo), ma partenaire de footings, nécessaires à notre bien être moral. Plus qu'avec « training », footing rimait plutôt avec potins, histoires en tout genre, confessions, secrets, colères, rires... En plus de nos courses hebdomadaires, je n'oublierai jamais le goût délicieux des pains briochés de ta boulangerie. J'ai découvert une très belle personne en partageant ce bureau avec toi. Natacha le chat et Max, vous êtes arrivés trop tard ! Vous étiez où il y a trois ans, tabarnouche ?! J'aurais vraiment aimé vivre davantage de moments en compagnie de votre dynamisme, de votre bonne humeur et votre punch (à ne pas confondre avec celui aromatisé à la mangue de Natacha).

En parlant de doctorants, je ne peux pas faire l'impasse sur ceux de l'équipe METO de l'INERIS. J'ai découvert de supers personnes en allant faire un ch'ti tour dans le ch'nord ! Puis, on apprend à se connaître assez vite à passer 2h par jour dans les transports en commun (quand la SNCF ne fait pas des siennes...) ! Audrey, Ségo, Vivi, Paul et Marc, merci d'avoir rendu mon séjour picard si amusant et si agréable, et d'avoir animé certaines de mes soirées parisiennes (mais ça, faut pas trop le dire parait-il). Courage aux téméraires. Merci également à Céline Brochot de m'avoir accueillie dans son équipe et à Frédéric Bois pour les nombreux conseils, toujours donnés avec un grand sourire.

Les plus courageux dans toute cette histoire sont sûrement Machieu, FX Ploto, Marie Lardon et Carotte qui ont été là dans les meilleurs moments comme dans les pires, pendant ces trois ans. Mes chers colocs et amis néyens, ma famille d'adoption lyonnaise, vous avez été des repères essentiels. Je vous remercie de m'avoir apporté autant de soutien, d'aide, de réconfort et de courage durant ces trois ans. Po(r)por, bravo pour avoir supporté mes *@dgihfzohforkjhfl* quotidiens de fin de thèse avec un calme légendaire, et merci de reprendre le flambeau de la coloc du bonheur. Cléa, Mathilde, Mylène, Camille, Perrine et Sophie merci d'avoir égayé ma vie lyonnaise.

Malgré la distance, un grand merci à Fanny, Clara, Laura, Elo, Gladys, Agathe, Diane, Pierre, Valou, Camille, Jeanne, Justine, Cécilia, Alexis C., Alexis P., Gaël, Anne, Mallo, Cha, Marie, Valé, Perrine, Betty et Angie, pour votre amitié et votre présence. C'est promis, cette fois, les études, c'est terminé !

Un remerciement tout particulier à Jane... C'est une belle preuve d'amour que tu me fais en restant à mes côtés jusqu'au bout. Tu as été présent dans tous les moments de difficultés (sans trop avoir le choix) mais tu n'as jamais baissé les bras. Coriace le type ! Ta force a vaincu mes craintes et ta patience l'a emporté sur mes angoisses. Il est maintenant temps de nous lancer dans nos futurs projets (à deux) !

Enfin, je souhaite remercier ma famille (Maman, Papa, Elsa et Mima), sans qui je n'aurais jamais vu le bout de cette aventure. Même loin, votre soutien, votre amour et vos encouragements ont été le moteur de ma persévérance. Papa, maman, je suis d'accord, j'ai « bien buché », mais il n'empêche que sans vous deux, jamais je n'aurais pu écrire ce paragraphe.

Table des matières

Remerciements	i
Table des matières	iv
Liste des abréviations	x
Liste des figures et des tableaux	xii
Valorisations scientifiques des travaux de thèse	xviii
Introduction	1
Chapitre 1. Synthèse bibliographique	7
1 Les composés organiques fluorés : généralités	8
1.1 Brève histoire des PFAS	8
1.2 Nomenclature, classification et synthèse	11
1.2.1 Nomenclature et classification.....	11
1.2.2 Synthèse des PFAS	13
1.3 Propriétés physico-chimiques et applications.....	14
1.4 Ecotoxicologie des PFAS.....	15
1.4.1 Sources de PFAS et estimation de leurs émissions	15
1.4.2 Devenir environnemental	15
2 Toxicocinétique des PFAS chez le poisson	17
2.1 Toxicocinétique chez le poisson.....	17
2.2 Absorption des PFAS.....	19
2.3 Distribution des PFAS.....	21
2.4 Métabolisation.....	22
2.5 Elimination.....	22
2.6 Influence des facteurs environnementaux sur la toxicocinétique	25
2.7 Effets des PFAS chez le poisson	26
2.8 Données toxicocinétiques des PFAS chez le poisson	27
3 Modélisation de la cinétique des PFAS chez le poisson	28
3.1 Différents niveaux de complexité : du modèle un compartiment au modèle toxicocinétique à base physiologique (PBTK).....	28
3.2 Les modèles PBTK	29
3.2.1 Fonctions et avantages des modèles PBTK	29
3.2.2 Construction des modèles PBTK	30
3.2.2.1 Structure conceptuelle des modèles PBTK - Sélection des compartiments	30

3.2.2.2	Ecriture mathématique des modèles PBTK	32
3.2.2.3	Estimation statistique des paramètres – Approche bayésienne	33
3.2.2.4	Méthodes de simulation.....	35
3.2.2.5	Evaluation des modèles PBTK.....	36
3.3	Modèles mécanistiques publiés pour les PFAS	36
3.3.1	Modèles développés à partir de données mammifères	36
3.3.2	Modèles développés à partir de données poissons.....	37
3.3.3	Limites des modèles mécanistiques développés pour les PFAS chez le poisson.....	40
Objectifs	44
Chapitre 2. Méthodologie	48
1	Modèle d'étude : la truite arc-en-ciel (<i>Oncorhynchus mykiss</i>).....	48
1.1	Morphologie	49
1.2	Répartition géographique	49
1.3	Alimentation et cycle de vie.....	50
2	Plan expérimental	51
2.1	Stratégie expérimentale générale.....	51
2.2	Expérience eau à 11°C – Plateforme expérimentale INRA.....	52
2.3	Expériences eau à 7°C et à 19°C – Plateforme expérimentale Irstea.....	55
2.4	Récapitulatif du design expérimental	57
3	Contamination de la nourriture	58
3.1	Description de l'aliment utilisé	58
3.2	Choix des PFAS d'intérêt	58
3.3	Mise au point du protocole de contamination de la nourriture	59
3.3.1	Choix des concentrations de contamination.....	59
3.3.2	Mélange des solutions aux granulés	59
3.3.3	Enrobage des granulés contaminés	60
3.3.4	Résultats des tests préliminaires de contamination	61
3.4	Protocole de contamination de la nourriture des lots expérimentaux	62
3.4.1	Contamination du lot de l'expérience 11°C	62
3.4.2	Contamination du lot des expériences 7°C et 19°C	63
4	Analyses chimiques des PFAS	64
4.1	Quantification par UHPLC-MS/MS	64
4.1.1	Chromatographie liquide à Ultra Haute Performance (UHPLC)	65
4.1.2	Spectrométrie de masse	66
4.1.3	Conditions UHPLC-MS/MS utilisées	67
4.1.4	Optimisation de la méthode d'analyse	68
4.2	Préparation des échantillons pour les dosages chimiques - Protocoles	69

4.2.1	Protocole d'extraction pour l'eau	69
4.2.2	Protocole d'extraction pour les fèces et la nourriture	70
4.2.3	Protocoles d'extraction pour les matrices biologiques	71
4.2.3.1	Sang.....	71
4.2.3.2	Muscle, foie, viscères, reins et cerveau	71
4.2.4	Stratégie analytique	72
 Chapitre 3. Elucider la toxicocinétique du PFOS via un modèle PBTK développé chez la truite arc-en-ciel		
.....		76
1	Collecte des données expérimentales relatives au PFOS, nécessaires à la calibration et l'évaluation du modèle PBTK.....	76
1.1.	Données d'exposition	76
1.2.	Données physiologiques	77
1.3.	Concentrations en PFOS mesurées dans les divers organes	78
2	Description de la toxicocinétique du PFOS chez la truite arc-en-ciel grâce à la modélisation PBTK	79
 Chapitre 4. Comparaison de la toxicocinétique du PFHxS et du PFNA avec celle du PFOS chez la truite arc-en-ciel		
.....		111
1	Introduction.....	112
2	Méthodologie	112
2.1.	Répartition du PFOS, PFHxS et PFNA dans les organes d'intérêt	112
2.2.	Modèle à un compartiment : calcul des cinétiques d'absorption et d'élimination.....	113
2.3.	Modèle PBTK : comparaison des paramètres a posteriori	113
3	Résultats	114
3.1.	Collecte des données expérimentales relatives au PFHxS et au PFNA.....	114
3.2.	Répartition du PFHxS et du PFNA dans les organes d'intérêt	117
3.3.	Résultats des cinétiques d'absorption et d'élimination du modèle un compartiment	118
3.4.	Résultats du modèle PBTK	119
3.4.1.	Résultats de la calibration du modèle PBTK.....	119
3.4.2.	Concentrations prédites dans les organes	120
3.4.3.	Absorption et élimination des substances	122
4	Discussion, conclusion et perspectives	123
 Chapitre 5. Influence de la température sur la toxicocinétique des substances perfluoroalkyles chez la truite arc-en-ciel		
.....		130

Chapitre 6. Effet de la température sur la TK du PFOS chez la truite arc-en-ciel : exploration via un modèle PBTK	153
1 Introduction.....	154
2 Matériels et méthodes	155
2.1. Application directe du modèle aux résultats des expérimentations à 7°C, 11°C et 15°C.	155
2.2. Ajustement de la croissance des individus selon les expériences (température et quantité de nourriture distribuée)	155
2.3. Différentes hypothèses sur les processus ADME	156
2.3.1. Description de l’hypothèse 1 : débit cardiaque	156
2.3.2. Description de l’hypothèse 2 : coefficient de partage	157
2.3.3. Description de l’hypothèse 3 : constante de vitesse d’absorption et clairances	157
2.3.4. Description de l’hypothèse 5 : flux sanguins.....	158
2.4. Calibration du modèle PBTK	160
2.5. Simulations du modèle PBTK	160
2.6. Comparaison des hypothèses	161
3 Résultats	162
3.1. Application directe du modèle aux expérimentations à 7°C, 11°C et 19°C.....	162
3.2. Ajustement de la croissance des individus selon les expériences.....	163
3.3. Comparaison de l’ajustement de la TK selon les hypothèses	164
3.3.1. Résultats de la calibration bayésienne.....	164
3.3.2. Analyse des RMSE	165
3.4. Prédications du modèle PBTK (hypothèse 5).....	167
3.4.1. Prédications du débit cardiaque et des flux sanguins.....	167
3.4.2. Concentrations en PFOS prédites dans les différents organes analysés	168
3.4.3. Prédications des processus de cinétique du PFOS.....	169
4 Discussion, limites et perspectives du modèle PBTK	170
 Discussion générale et perspectives	 180
1 Objectifs de thèse.....	180
2 Synthèse des principaux résultats expérimentaux.....	180
3 Discussion de la modélisation de la TK des PFAS	181
3.1. Stratégie de développement du modèle PBTK	184
3.2. Performances du modèle PBTK développé pour les substances perfluoroalkyles.....	185
3.2.1. Intégration dans le modèle des processus clés de la TK des composés chimiques chez le poisson.....	185
3.2.2. Description des processus d’absorption, de distribution et d’élimination des substances perfluoroalkyles chez la truite arc-en-ciel.	186

3.2.3.	Généricité de l'application du modèle PBTK aux substances perfluoroalkyles	187
3.3.	Faiblesses du modèle PBTK développé pour les substances perfluoroalkyles : disponibilité limitée des données	188
4	Perspectives d'amélioration de la description de la TK des substances perfluoroalkyles	190
4.1	Considération de processus mécanistiques supplémentaires	190
4.2	Extrapolations possibles pour le modèle PBTK	192
Conclusion générale		197
Références bibliographiques		199
Annexes.....		218

Liste des abréviations

ADME	Absorption, distribution, métabolisme et excrétion
ANCOVA	Analyse de covariance
BIC	<i>Bayesian information criterion</i>
C-F	Liaison Carbone – Fluor
DEB	<i>Dynamic Energy Budget</i>
DIC	<i>Deviance information criterion</i>
ECF	Fluoruration électrochimique
EDTA	ÉthylèneDiamineTétraAcétique
EPA	<i>Environmental Protection Agency</i> – Agence de protection de l'environnement
ESI	<i>Electrospray ionization</i>
FABP	<i>Fatty Acid Binding Protein</i>
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i> - Organisation pour l'alimentation et l'agriculture
FFESSM	Fédération Française d'Études et de Sports Sous-Marins
FTCA	Acrylate fluorotélomère
FTOH	Alcool fluorotélomère
GIT	Tractus gastro-intestinal
HAP	Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques
HF	Fluorure d'hydrogène
HSI	Indice hépatosomatique
IC	Intervalle de crédibilité
IPCC	<i>Intergovernmental Panel on Climate Change</i>
K _{ow}	Coefficient octanol-eau
LOD	Limite de détection
LOQ	Limite de quantification
MCMC	<i>Monte Carlo Markov Chain</i>
MRM	<i>Multiple Reaction Monitoring</i>
MS	Spectrométrie de masse
OAT	Transporteur d'anion organique
OECD	<i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i> – Organisation de coopération et de développement économiques
PBTK	<i>Physiologically Based Toxicokinetic</i> - Toxicocinétique à base physiologique
PCB	PolyChloroBiphényles
PE	PolyEthylène

PFAS	Substances poly-et perfluorées
PFBS	Perfluorobutane sulfonate
PFCA	Acides perfluoroalkyles carboxyliques
PFDA	Acide perfluorodécanoïque
PFDoDA	Acide perfluorododécanoïque
PFHpA	Acide perfluoroheptanoïque
PFHxA	Acide perfluorohexanoïque
PFHxS	Perfluorohexane sulfonate
PFNA	Acide perfluorononanoïque
PFOA	Acide perfluorooctanoïque
PFOS	Perfluorooctane sulfonate
PFPA	Acide perfluoropentanoïque
PFSA	Acides perfluoroalkyles sulfoniques
PFTA	Acide perfluorotétradécanoïque
PFUnDA	Acide perfluoroundécanoïque
POP	Polluant Organique Persistant
PP	PolyPropylène
PSA	<i>Primary Secondary Amine</i>
PTFE	Polytétrafluoroéthylène
RE	<i>Relative Error</i>
RMSE	<i>Root Mean Squared Error</i>
SD	Ecart-type
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i> – Extraction en phase solide
STEP	Station d'épuration des eaux usées
TK	Toxicocinétique
UHPLC	Chromatographie liquide à Ultra Haute Performance
WHO	<i>World Health Organization</i> - Organisation mondiale de la santé

Liste des figures et des tableaux

Chapitre 1

Figures

- Figure 1.** Structures chimiques du PTFE (A), du PFOA (B) et du PFOS (C). **p.6**
- Figure 2.** Histoire des PFAS : évènements clés de 1938 à 2018 (adapté de Lindstrom *et al.* 2011). **p.8**
- Figure 3.** Exemples de substances alternatives fluorées. A. ADONA – B. GenX – C. F-53B – D. PFHxS – E. PFBS. **p.9**
- Figure 4.** Substances poly-(A) et per-fluorées (B). **p.9**
- Figure 5.** Classification des différents PFAS (à partir de Buck *et al.* 2011).
- Figure 6.** Structure moléculaire des PFAS appartenant aux PFSA (A), de formule générale $C_nF_{2n+1}SO_3H$ et aux PFCA (B), de formule générale $C_nF_{2n+1}COOH$. **p.10**
- Figure 7.** Parties hydrophile et hydrophobe d'une substance perfluorée, ici le PFOA. **p.11**
- Figure 8.** Circulation des PFAS dans l'environnement (d'après Hrádková *et al.* 2010). **p.12**
- Figure 9.** Relations entre toxicocinétique et effets (toxicodynamie) d'une molécule chimique chez un organisme. **p.15**
- Figure 10.** Schéma conceptuel des connexions entre organes jouant un rôle clé dans les processus ADME chez le poisson (d'après Kleinow *et al.* 2008). **p.16**
- Figure 11.** Respiration par les ouïes des poissons et anatomie des branchies. **p.18**
- Figure 12.** Distribution d'un composé chimique dans les reins, en relation avec les autres tissus et le sang, d'après Miller, 1987. **p.22**
- Figure 13.** Chambre respiratoire à trois compartiments (A, B et C), d'après McKim et Goeden (1982). **p.26**
- Figure 14.** Etapes de construction et de développement d'un modèle PBTK (d'après la thèse de Marie-Emilie Willemin, 2014). **p.28**
- Figure 15.** Structure conceptuelle du modèle PBTK à 5 compartiments, représentant la physiologie de la truite arc-en-ciel (Nichols *et al.* 1990). **p.29**
- Figure 16.** Représentation de la distribution du composé dans un organe à perfusion limitée (A) et un organe à diffusion limitée (B). **p.31**
- Figure 17.** Calibration bayésienne d'un modèle PBTK (Thèse de Marie-Emilie Willemin, 2014). **p.33**
- Figure 18.** Schéma conceptuel du modèle de Ng et Hungerbühler (2013). **p.36**
- Figure 19.** Modèle de Mittal et Ng (2018) avec un compartiment fèces. **p.38**

Chapitre 2

Figures

- Figure 1.** Méthodologie générale de la thèse. **p.43**
- Figure 2.** Truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*). **p.43**
- Figure 3.** Gammes de températures optimales, tolérées et létales pour la truite arc-en-ciel adulte, juvénile et aux stades larvaires. **p.45**
- Figure 4.** Cycle de vie d'*O. mykiss* de l'oeuf au stade adulte. **p.46**
- Figure 5.** Bassins expérimentaux (contaminé et témoin) de la station expérimentale de l'INRA, Thonon-les-Bains. **p.48**
- Figure 6.** Etapes de prélèvements. **p.49**

Figure 7. A. Bassins expérimentaux de la plateforme d'Irstea de St-Seurin-sur-l'Isle avec les bassins témoin et contaminé en blanc et le bac tampon en noir. B. Arrivée d'eau des bassins témoin et contaminé. *p.51*

Figure 8. Récapitulatif du design expérimental des trois expériences d'exposition aux PFAS menées au cours de cette thèse. *p.52*

Figure 9. PFAS sélectionnés pour cette thèse. *p.54*

Figure 10. Protocole expérimental du test préliminaire de contamination de la nourriture. *p.56*

Figure 11. Protocole de contamination de la nourriture – 25 kg de granulés versés dans la bétonnière pour le mélange avec la solution de contamination, suivis de la phase de séchage sous hotte. *p.59*

Figure 12. Schéma du principe d'une chaîne de chromatographie liquide. *p.61*

Figure 13. Schéma du fonctionnement d'un spectromètre de masse en tandem. *p.61*

Figure 14. Schéma du gradient appliqué lors des analyses UHPLC. *p.63*

Tableaux

Tableau 1. Volumes de solution mère à prélever pour obtenir les quantités de PFAS à mélanger avec les 25 g d'aliments pour réaliser les différentes concentrations test. *p.55*

Tableau 2. Résultats des concentrations de PFOS et de PFHxS dans les granulés avant et après immersion dans l'eau (ng g^{-1}) et dans l'eau récupérée (ng mL^{-1}). *p.57*

Tableau 3. Paramètres d'identification du PFOS, du PFHxS et du PFNA (temps de rétention, transition de quantification et de confirmation et rapport des aires des transitions). *p.62*

Tableau 4. Rendement d'extraction (%), LOD et LOQ (ng g^{-1} ou ng mL^{-1}) du PFOS, PFHxS et PFNA, dans les différentes matrices. *p.64*

Chapitre 3

Figures (partie 1)

Figure 1. Masse des individus témoins (traits en pointillés) et contaminés (traits continus) des trois expériences : 7°C (bleu), 11°C (vert) et 19°C (rouge). *p.72*

Figures (partie 2)

Figure 1. Schematic description of the PBTK model developed for rainbow trout. Uptake (food and branchial uptake) and excretion (feces, urine, bile and branchial excretion) sites are represented in orange and green, respectively. *p.77*

Figure 2. Predicted body weight and length of fish. In all graphs, black lines are the model predictions, black crosses are the arithmetic mean, grey crosses are the observed data ($n=5$). These simulations were made from a sample based on every 10th iteration of the last 1000 of each of three chains. *p.86*

Figure 3. Predicted concentrations in the organs analyzed. In all graphs, black lines are the model predictions, black crosses are the geometric mean, grey crosses are the observed data ($n=5$) and the grey area is the 95% credibility interval of the model predictions, computed from the posterior distribution. These simulations were made from a sample based on every 10th iteration of the last 1000 of each of three chains. *p.87*

Figure 4. (A) Percentage of absorbed PFOS in organisms over time (Q_{abs}), calculated as $Q_{\text{abs}} = 1 - Q_{\text{excret}_{\text{feces}}} - Q_{\text{excret}_{\text{bile}}}$. (B) Contribution of each elimination pathway calculated as the ratio of PFOS quantity eliminated by urine, gills, bile or feces relative to the PFOS dose administrated (%). (C) Predicted concentrations in analyzed feces where the black line is the model predictions, black crosses are the geometric means, grey crosses are observed data and

the grey area is the 95% credibility interval of the model predictions. (D) PFOS quantity in gut lumen 2, corresponding to the PFOS quantity excreted by the bile. (E) PFOS quantity in gut lumen 1, corresponding to PFOS fraction provided by food that has entered the organism. (F) PFOS quantity in gut lumen 1 during the first 5 days. **p.88**

Figure 5. (A) Quantity of PFOS excreted by bile according to the reabsorbed fraction tested in model 1 compared to that simulated by model 0. Solid lines represent the mean simulated quantities and the grey area the 95% credibility interval of the model predictions. (B) Colored crosses represent concentrations in organs (model 0) and dotted lines represent 1.5-fold and twofold factors. (C) Colored crosses represent concentrations in organs (model 1 with 100% PFOS reabsorbed) and dotted lines represent 1.5-fold and twofold factors. **p.89**

Figure 6. (A) Comparison of predictions of PFOS concentrations in organs and feces from models 0 and 2. Solid black lines are the geometric mean predictions of model 2 and the grey areas are the 95% interval of model 0 predictions. (B) Quantity of PFOS administered from food (solid black line) and water (dotted line) over time. (C) Contribution of each elimination pathway calculated as the ratio of PFOS quantity eliminated by urine, gills, bile or feces relative to the PFOS administrated dose (%). **p.91**

Tableaux (partie 1)

Tableau 1. Concentrations en PFOS dans l'aliment contaminé (ng g^{-1}) et dans l'eau (ng mL^{-1}) des trois expériences (moyennes des doubles injections des échantillons \pm écart-type). **p.71**

Tableau 2. Concentrations en PFOS (moyenne géométrique \pm écart-type) dans les organes et les fèces des individus des trois expériences, exprimées en ng g^{-1} de poids frais. **p.73**

Tableaux (partie 2)

Table 1. Glossary of parameter symbols, definitions and units used in the PBTK model. **p.79**

Table 2. Symbols, prior distribution or value, source, estimation of mean, standard deviation (SD) and 95% credibility intervals (95% CI) for all parameters used in model 0. **p.85**

Table 3. Calculated RE in each organ and in feces for model 0 and the four hypotheses tested in model 1; 25%, 50%, 75% and 100% correspond to the PFOS fraction reabsorbed in organisms by the enterohepatic cycle. **p.90**

Table 4. Calculated RE in each organ and feces for models 0 and 2. **p.92**

Chapitre 4

Figures

Figure 1. Représentation du risque statistique (α et β). La courbe noire correspond à la distribution *a priori* et la courbe bleue à la distribution *a posteriori*. La ligne verticale rouge est le seuil de décision. L'aire colorée en bleu correspond dans notre cas à un chevauchement de 20%. **p.107**

Figure 2. Répartition (%) du PFOS (rose), du PFHxS (bleu) et du PFNA (gris) dans les tissus analysés (sang, foie, muscle, viscères, cerveau et reins). **p.111**

Figure 3. Concentrations en PFOS, en PFHxS et en PFNA dans le sang (ng mL^{-1}) pour les expériences 7°C et 19°C. **p.111**

Figure 4. Graphiques des concentrations prédites en fonction des concentrations mesurées expérimentalement le PFOS (gauche), le PFHxS (milieu) et le PFNA (droite). **p.112**

Figure 5. Prédications des concentrations en PFHxS dans les organes (sang, foie, muscle, cerveau, reins et viscères). **p.114**

Figure 6. Prédications des concentrations en PFNA dans les organes (sang, foie, muscle, cerveau, reins et viscères). **p.114**

Figure 7. (A) Pourcentage de PFHXS absorbé dans l'organisme au cours du temps (Q_{abs}), calculé comme $Q_{abs} = 1 - Q_{excretfèces} - Q_{excretbile}$ - (B) Contribution de chaque voie d'élimination calculée comme le rapport entre la quantité de PFHXS éliminée par l'urine, par les branchies, par la bile ou par les fèces et la dose administrée de PFHXS (%) - (C) Concentrations prédites dans des fèces (ligne noire). Les croix noires représentent les moyennes géométriques des données expérimentales, les croix grises sont les données observées et la zone grise est l'intervalle de crédibilité à 95 % des prédictions du modèle - (D) Quantité de PFHXS dans la lumière intestinale 2, correspondant à la quantité de PFHXS excrétée par la bile. **p.115**

Figure 8. (A) Pourcentage de PFNA absorbé dans l'organisme au cours du temps (Q_{abs}), calculé comme $Q_{abs} = 1 - Q_{excretfèces} - Q_{excretbile}$ - (B) Contribution de chaque voie d'élimination calculée comme le rapport entre la quantité de PFNA éliminée par l'urine, par les branchies, par la bile ou par les fèces et la dose administrée de PFNA (%) - (C) Concentrations prédites dans des fèces (ligne noire). Les croix noires représentent les moyennes géométriques des données expérimentales, les croix grises sont les données observées et la zone grise est l'intervalle de crédibilité à 95 % des prédictions du modèle - (D) Quantité de PFNA dans la lumière intestinale 2, correspondant à la quantité de PFNA excrétée par la bile. **p.116**

Tableaux

Tableau 1. Concentrations en PFHxS et en PFNA dans l'aliment contaminé ($ng\ g^{-1}$) et dans l'eau ($ng\ mL^{-1}$) des trois expériences (moyennes des doubles injections des échantillons \pm écart-type). **p.108**

Tableau 2. Concentrations en PFHxS (moyenne géométrique ($n=5$) \pm écart-type) dans les organes et les fèces des individus des trois expériences, exprimées en $ng\ g^{-1}$ de poids frais. **p.109**

Tableau 3. Concentrations en PFNA (moyenne géométrique ($n=5$) \pm écart-type) dans les organes et les fèces des individus des trois expériences, exprimées en $ng\ g^{-1}$ de poids frais. **p.110**

Tableau 4. Constantes d'absorption (K_a) et d'élimination (K_e), calculées simultanément à partir des concentrations mesurées dans le sang, pour les expériences $7^\circ C$ et $19^\circ C$. **p.112**

Tableau 5. Symboles, distribution *a priori*, estimation de la moyenne \pm écart-type et intervalles de crédibilité à 95 % (IC 95 %) pour les paramètres calibrés dans les modèles *PFHxS* et *PFNA*, en comparaison avec les distributions *a posteriori* trouvées pour le *PFOS*. **p.113**

Chapitre 5

Figures

Figure 1. Mean concentrations ($n=5$) of PFOS (A) and PFHxS (B) in the organs studied ($ng\ g^{-1}$ wet weight) at $7^\circ C$, $11^\circ C$ and $19^\circ C$. **p.132**

Figure 2. Boxplots of the organ: blood ratios of PFOS (A) and PFHxS (B) for our three experiments and that of Goeritz *et al.* (2013). White boxes correspond to $7^\circ C$, light grey boxes to $11^\circ C$, dark grey boxes to $14^\circ C$ - $16^\circ C$ (Goeritz *et al.* 2013) and black boxes to $19^\circ C$. **p.133**

Figure 3. Proportional distributions of PFOS (A) and PFHxS (B) in liver (white), muscle (pale grey), blood (dark grey) brain (black) and kidney (hatched) at the end of the exposure period (42 days) and at $7^\circ C$ and $19^\circ C$. The percentages represent ranges for 5 fish. **p.134**

Tableaux

- Table 1.** Exposed fish growth rate (GR) at 7°C, 11°C and 19°C (GR ± standard deviation), initial mass and final mass (mean of fish mass (g) ± standard deviation ($n=5$)). **p.131**
- Table 2.** Mean PFOS and PFHxS concentrations in blood, liver, muscle, brain and kidney of exposed rainbow trout ($n=5$) at $d=28$. Concentrations were adjusted for fish growth ($1 + b \times \text{time}$) and are expressed in ng g^{-1} wet weight for liver, muscle, brain and kidney and expressed in ng mL^{-1} for blood. **p.131**
- Table 3.** Elimination rate constants ± standard deviation, R^2 and estimated mean tissue-specific half-life times of PFOS and PFHxS at 7°C, 11°C and 19°C. **p.135**

Chapitre 6

Figures

- Figure 1.** Répartition des flux sanguins, calculés à partir des données des trois expériences réalisées par Barron *et al.* (1987), à 6°C, 12°C et 18°C. Les pourcentages ont été obtenus à partir des fractions calculées pour chaque organe. **p.151**
- Figure 2.** Prédiction du modèle de la masse et de la taille des poissons aux trois températures (7°C, 11°C et 15°C, lignes bleues, vertes et jaunes, respectivement), sans appliquer de correction par la température aux processus physiologiques. **p.154**
- Figure 3.** Prédiction du modèle des concentrations en PFOS dans quelques organes aux trois températures (7°C, 11°C et 15°C, lignes bleues, vertes et jaunes, respectivement), sans appliquer de correction par la température aux processus physiologiques. **p.155**
- Figure 4.** Prédiction du modèle de la taille (colonne de gauche) et de la masse (colonne de droite) des individus aux quatre températures (7°C, 11°C, 15°C et 19°C, lignes bleues, vertes, jaunes et rouges, respectivement). **p.156**
- Figure 5.** Graphique représentant les ratios des sommes des RMSE de chaque température et de la somme des RMSE du modèle de référence (bleu, vert et jaune) pour chaque hypothèse testée, et le ratio du total des RMSE de chaque température et de la somme des RMSE du modèle de référence (noir), pour chaque hypothèse testée. **p.158**
- Figure 6.** Graphique représentant les ratios des RMSE de chaque organe à chaque hypothèse testée et des RMSE de chaque organe du modèle de référence, à chaque température. **p.158**
- Figure 7.** Débit cardiaque corrigé par la loi d'Arrhenius et flux relatifs de sang arrivant aux organes ayant été corrigés par la température (foie, muscle, reins et viscères). **p.159**
- Figure 8.** Prédiction du modèle des concentrations en PFOS dans quelques organes aux quatre températures (7°C, 11°C, 15°C et 19°C, lignes bleues, vertes, jaunes et rouges respectivement). **p.161**
- Figure 9.** A. Absorption du PFOS (%) en fonction de la température. B. Quantité de PFOS excrétée par les fèces en fonction de la température. C. Quantité de PFOS excrétée par l'urine en fonction de la température. D. Quantité de PFOS dans la lumière intestinale 2, soit la quantité de PFOS dans la bile en fonction de la température. E. Quantité de PFOS dans la lumière de l'intestin en fonction de la température, durant la totalité de l'expérience et sur les cinq premiers jours. F. Concentrations en PFOS prédites dans les fèces (lignes), comparées aux données observées (croix). **p.162**

Tableaux

- Tableau 1.** Symboles, définitions (unités), références, distributions *a priori* & *a posteriori* : estimation de la moyenne ± écart type et intervalles de crédibilité 95% (IC95%) pour tous les paramètres utilisés dans le modèle PBTK. **p.157**

Tableau 2. Récapitulatif qualitatif des hypothèses testées pour le modèle PBTK intégrant la température pour chaque température. *p.164*

Discussion générale

Tableau 1. Synthèse des modèles PBTK développés spécifiquement pour les PFAS chez le poisson et comparaison de leurs performances et faiblesses. *p.172*

Valorisations scientifiques des travaux de thèse

Articles

Accepté

Vidal A., Lafay F., Daniele G., Vulliet E., Rochard E., Garric J., Babut M. Does water temperature influence the distribution and elimination of perfluorinated substances in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)?

Soumis

Vidal A., Beaudouin R., Garric J., Babut M. Elucidating the fate of perfluorooctanoate sulfonate using a rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) physiologically-based toxicokinetic model

En rédaction

Vidal A., Beaudouin R., Garric J., Babut M. Temperature effects on perfluorooctanoate sulfonate toxicokinetics in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): exploration via a physiologically-based toxicokinetic model

Communications orales

Vidal A., Beaudouin R., Espinat L., Lafay F., Daniele G., Garric J., Babut M. Développement d'un modèle toxicocinétique à base physiologique (PBTk) chez le poisson applicable aux perfluorés (PFOS, PFHxS et PFNA). *SEFA, Lille, juin 2017*

Vidal A., Beaudouin R., Garric J., Babut M. Développement d'un modèle toxicocinétique à base physiologique décrivant la bioaccumulation par voie alimentaire d'un acide perfluoroalkyl sulfonique chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*). *SEFA, Montpellier, juin 2018*

Posters

Vidal A., Daniele G., Vuillet E., Lasne E., Péry A., Rochard E., Garric J., Babut M. Approche toxicocinétique de l'accumulation des composés organiques fluorés chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*). *SEFA, Lille, juin 2017*

Vidal A., Beaudouin R., Lafay F., Daniele G., Garric J., Babut M. Implementing a physiologically based toxicokinetic (PBTk) model describing the bioaccumulation of three perfluorinated substances in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *SETAC, Bruxelles (Belgique), mai 2017*

Vidal A., Lafay F., Daniele G., Vulliet E., Rochard E., Garric J., Babut M. Does water temperature influence the distribution and the elimination of perfluorinated substances in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)? *SETAC, Rome (Italie), mai 2018*

Vidal A., Beaudouin R., Garric J., Babut M. Development of a Physiologically Based Toxicokinetic (PBTk) model describing the bioaccumulation of a perfluorinated substance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *SETAC, Rome (Italie), mai 2018*

Degli Esposti D., Vidal A., Casadio R., Babut. *In silico* estimate of affinity constants for perfluorinated compounds in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) proteins. *SETAC, Rome (Italie), mai 2018*

Introduction

Introduction

La pollution des écosystèmes d'eau douce et marins est devenue un sujet de préoccupation majeure. La pression anthropique que subissent les milieux aquatiques est directement liée au développement des sociétés modernes. En effet, l'activité industrielle conduit à la fabrication d'une multitude de molécules (phytosanitaires, pharmaceutiques, additifs etc...) synthétisées pour diverses utilisations (agriculture, santé, alimentation etc...) qui se retrouvent ainsi dans l'environnement. Les progrès des techniques analytiques, en termes de sensibilité et de spécificité, ont permis de détecter et d'identifier certaines de ces molécules. Cependant, il existe encore une quantité indéterminée de molécules issues de la chimie ainsi que de métabolites, et l'identification de leur effet sur le vivant est un réel challenge pour l'écotoxicologie. Parmi les polluants détectés dans l'environnement, les substances poly- et per-fluorés (PFAS), d'origine exclusivement anthropique, ont retenu l'intérêt des scientifiques depuis une vingtaine d'années. Il existe une grande diversité de PFAS qui se distinguent par leur structure chimique, regroupée dans de nombreuses familles. Les PFAS sont identifiables par les liaisons que forment les atomes de carbone de leur squelette avec des atomes de fluor. La stabilité de cette liaison procure à ces substances une excellente résistance thermique, chimique et biologique, ce qui constitue un avantage pour une large gamme d'applications tant industrielles que domestiques. Cependant, du fait de leurs propriétés physico-chimiques, certains PFAS sont très stables dans l'environnement conduisant à la présence ubiquiste de certains d'entre eux dans les compartiments atmosphérique, terrestre et aquatique. Par ailleurs, il a été démontré que ces composés se bioaccumulent dans les organismes aquatiques à plusieurs niveaux trophiques (Ahrens *et al.* 2011 ; Houde *et al.* 2011) provoquant ainsi des effets toxiques (Ahrens *et al.* 2014). Depuis ces découvertes, un des composés perfluorés, le perfluorooctane sulfonate (PFOS) a même été classé parmi les polluants organiques persistants (POP). La réglementation concernant sa production a conduit les industries chimiques à se tourner vers de nouvelles générations de substances fluorées. Malgré ces efforts, d'importantes concentrations de PFAS sont encore décelées dans les matrices environnementales et biologiques (Land *et al.* 2018), et les impacts des nouveaux PFAS sur les milieux sont à ce jour peu étudiés. La problématique de la contamination aquatique par les PFAS est donc d'actualité, amenant la communauté scientifique à s'intéresser à la toxicité de ces molécules.

L'étude de la toxicité d'une substance se décompose en deux étapes. La toxicocinétique (TK) détermine le devenir d'une substance dans les différents tissus de l'individu (description spatiale et temporelle) et la toxicodynamie détermine les actions toxiques au niveau des tissus cibles. Les effets dépendent de la dose qui atteint les cellules, non forcément proportionnelle à la dose d'exposition, en

raison des processus d'absorption, de métabolisation, de distribution et d'élimination : processus ADME (Andersen, 1995). Les mécanismes ADME des PFAS diffèrent de ceux des autres substances organiques, tels que les PolyChloroBiphényles (PCB) ou les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP). Tandis que les PCB et HAP s'accumulent préférentiellement dans les graisses, les PFAS présentent une affinité importante pour certaines protéines tissulaires et se retrouvent principalement dans le foie et le sang des individus. Malgré l'augmentation des études scientifiques sur ce sujet, les connaissances sur les déterminants mécanistiques des processus ADME des PFAS demeurent limitées. Le phénomène de bioaccumulation est d'autant plus complexe qu'il est influencé par divers paramètres chimiques et biologiques, tels que la structure moléculaire et les propriétés physico-chimiques des polluants, la croissance des individus, ainsi que par des facteurs abiotiques, comme la concentration en oxygène dissous, le pH, la température.... En effet, les changements de température influencent certains paramètres physiologiques conduisant à des variations dans la cinétique des substances chez les poissons, organismes poïkilothermes. Pour combler les lacunes concernant les mécanismes de transfert et de transformation des composés chimiques au sein d'un organisme, les modèles mathématiques se révèlent être des outils indispensables et performants. Parmi eux, les modèles toxicocinétiques basés sur des considérations anatomiques, physiologiques et biochimiques, appelés modèles PBTK (Physiologically-Based Toxicokinetic models) sont souvent utilisés. Il s'agit de modèles multi-compartiments, représentant de manière plus ou moins fine l'organisme, où les compartiments choisis sont paramétrés spécifiquement pour l'espèce d'intérêt. Ces modèles offrent de multiples fonctionnalités, comme la simulation de la cinétique des polluants à l'échelle du tissu ou de l'organe et la possibilité de tester diverses hypothèses mécanistiques. Prédire le devenir d'une substance chez une espèce choisie se révèle être utile pour l'évaluation des risques, et les modèles PBTK sont ainsi de plus en plus considérés dans le domaine de l'écotoxicologie (Grech *et al.* 2017). Cependant, les modèles applicables aux propriétés uniques des PFAS sont encore peu nombreux, tandis qu'il paraît crucial d'élucider les mécanismes ADME régissant le devenir de ces molécules chez un organisme.

La présente thèse s'inscrit dans le courant des travaux sur l'analyse du devenir de certains PFAS chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*). D'une manière générale, les poissons sont reconnus en tant qu'espèces sentinelles en écologie et en évaluation des risques car leur physiologie peut permettre des extrapolations avec d'autres vertébrés, dont les mammifères (Girard, 1998). Par ailleurs, les poissons jouent un rôle fondamental dans le fonctionnement des réseaux trophiques, se trouvant à des niveaux trophiques inférieurs comme supérieurs (Srikanth *et al.* 2013) et se révèlent être de bons indicateurs de l'état de santé des écosystèmes aquatiques. La truite arc-en-ciel est un modèle d'étude souvent utilisé en écotoxicologie pour les avantages qu'elle offre : disponibilité de nombreux

paramètres physiologiques et anatomiques dans la littérature, intérêt halieutique et économique, facilité d'élevage et de prélèvement des tissus.

Cette thèse s'articule autour de deux axes principaux, complémentaires l'un de l'autre : une partie expérimentale et une partie modélisation. Plus précisément, un modèle PBTK a été développé et calibré avec des données expérimentales obtenues chez la truite arc-en-ciel adulte afin de décrire le devenir dans l'organisme de trois substances perfluoroalkyles : le PFOS, l'acide perfluorononanoïque (PFNA) et le perfluorohexane sulfonate (PFHxS), choisies pour leur pertinence environnementale et leur disponibilité commerciale. Ce modèle PBTK permet d'apporter des informations liées à la cinétique de ces substances et de connaître les contributions des différentes voies d'élimination. Pour une description plus réaliste des conditions environnementales, l'influence de la température a été prise en considération, grâce aux jeux de données acquis durant cette thèse suite aux expositions des organismes aux PFNA, PFOS et PFHxS à différentes températures. Dans la limite de notre connaissance, aucun modèle PBTK applicable aux PFAS ne prend en considération la température comme variable explicative, et les données expérimentales sont inexistantes à ce jour.

Ce manuscrit est composé de six chapitres. Le 1^{er} concerne l'état des connaissances sur la bioaccumulation des PFAS et sa modélisation. Il présente les généralités sur les PFAS, leur profil TK, les modèles multi-compartiments développés pour ces substances ainsi que leurs limites. Cette synthèse bibliographique ouvre sur les objectifs de la thèse. Le 2^{ème} chapitre décrit la méthodologie employée pour y répondre et regroupe toutes les informations concernant la mise en œuvre expérimentale et l'analyse des perfluorés dans les diverses matrices. Le 3^{ème} chapitre vise à décrire le profil TK du PFOS chez la truite arc-en-ciel, via un premier modèle PBTK. Les profils TK des deux autres substances perfluoroalkyles sélectionnées, le PFHxS et le PFNA, sont comparés à celui du PFOS grâce à ce même modèle dans le 4^{ème} chapitre. Puis, nous avons considéré l'effet de la température sur la cinétique de ces mêmes substances et les résultats expérimentaux des expositions menées à différentes températures ont été rapportés dans le 5^{ème} chapitre de ce manuscrit. La température a ensuite été intégrée dans notre modèle PBTK en tant que facteur explicatif de la TK des substances étudiées, la méthodologie et les résultats font l'objet du 6^{ème} chapitre. Enfin, une dernière partie est consacrée à la discussion des principaux résultats de cette thèse (synthèse des résultats expérimentaux, performances et faiblesse du modèle) et présente les perspectives ainsi que la conclusion de ce travail de thèse.

Chapitre 1

Synthèse bibliographique

Chapitre 1. Synthèse bibliographique

1 Les composés organiques fluorés : généralités

1.1 Brève histoire des PFAS

L'atome de fluor a été découvert pour la première fois au début du XIX^{ème} siècle grâce aux travaux d'André Marie Ampère, en France et d'Humphrey Davy, en Angleterre. Dans la classification périodique, le fluor est l'halogène le plus petit, possédant l'électronégativité la plus forte. La liaison carbone-fluor est donc extrêmement solide, avec une énergie d'environ 484 kJ.mol⁻¹ (Smart 1994). Cependant, l'atome de fluor n'avait pu être isolé en raison de son exceptionnelle réactivité avec la vapeur d'eau atmosphérique. C'est Henri Moissan qui parvint à cet exploit pour la première fois, en 1886. Une cinquantaine d'années plus tard, le chimiste Roy Plunkett, travaillant pour la société américaine *Éleuthère Irénée du Pont de Nemours et compagnie*, abrégée "DuPont", synthétisa accidentellement en 1938 le premier composé organique fluoré : le polytétrafluoroéthylène (PTFE). Fabriqué à partir de l'acide perfluorooctanoïque (PFOA), le PTFE fut d'abord utilisé comme matériau d'étanchéité, puis a été commercialisé sous la marque Teflon® en 1949. En 1956, la compagnie chimique 3M dépose la marque Scotchgard®, un antitache, dont le perfluorooctane sulfonate (PFOS) est un ingrédient clé (Betts, 2007).

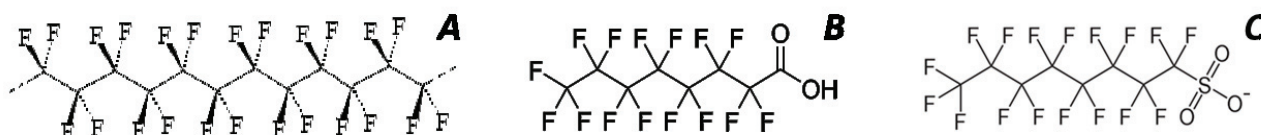
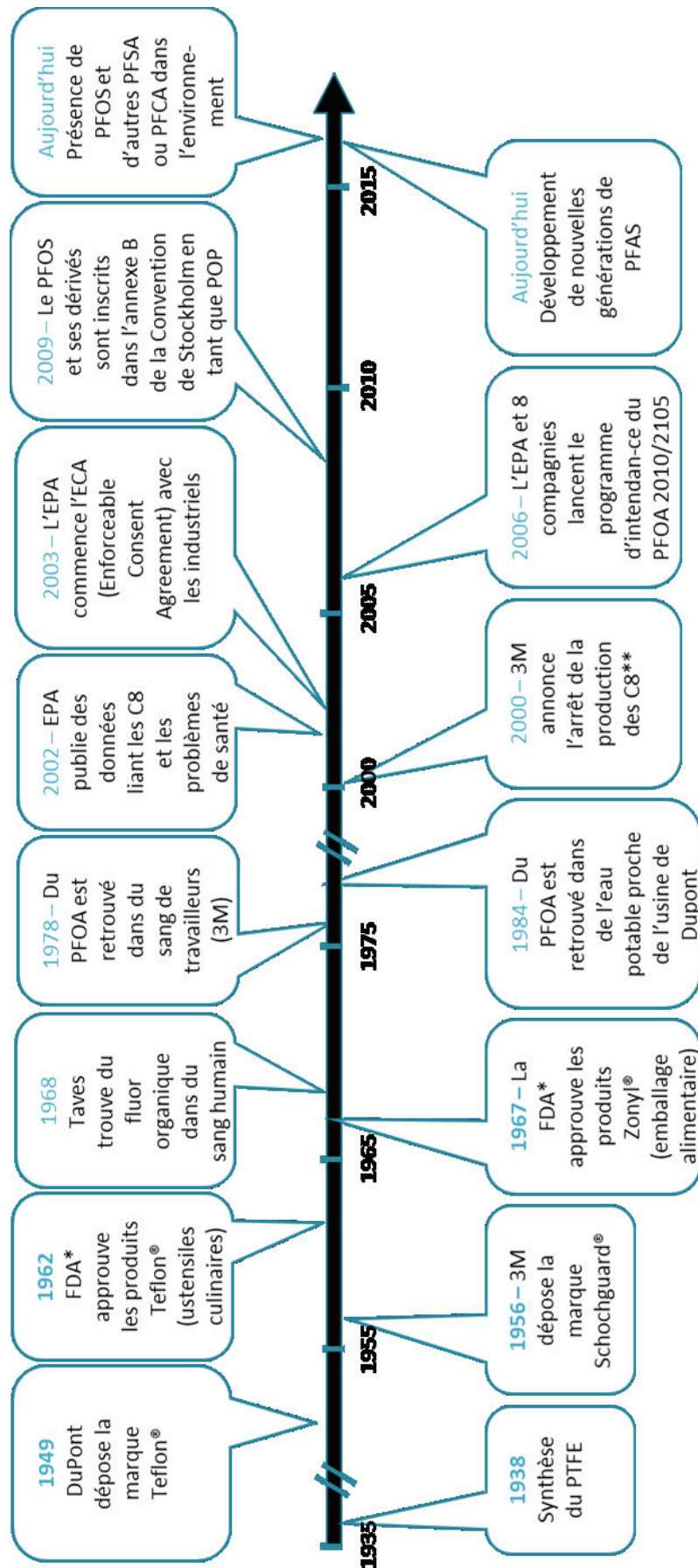


Figure 1. Structures chimiques du PTFE (A), du PFOA (B) et du PFOS (C).

En 1968, les travaux de Taves ont permis d'identifier deux formes de composés fluorés dans le sang humain. L'un était sous forme d'ion inorganique libre tandis que l'autre était sous forme de grosse molécule stable associée à l'albumine sérique, laissant penser à une molécule de fluorocarbone (Taves, 1968). Ce n'est que huit ans plus tard, que des travaux ont identifié qu'il s'agissait du PFOA (Taves *et al.* 1976). En 1978, des analyses de sang des ouvriers de l'usine 3M ont révélé la présence de PFOA (Lindstrom *et al.* 2011) et en 1984, cette molécule a également été trouvée dans une eau de boisson locale, près de l'usine Washington Works (usine Dupont). Il a fallu attendre mai 2000 pour que 3M annonce l'arrêt de la production du PFOS, du PFOA ainsi que de leurs dérivés, sous la pression de l'United States Environmental Protection Agency (US EPA) (3M, 2000). En parallèle, des études environnementales et sanitaires ont démontré que les PFAS étaient largement distribués dans

l'environnement (Giesy et Kannan, 2001) et que la plupart des échantillons de sang humain prélevés dans le monde contenaient des quantités de PFOS de l'ordre du ng mL^{-1} (Kannan *et al.* 2004). Suite à ces découvertes alarmantes, les scientifiques se sont davantage intéressés à la toxicité des PFAS et ont mené des études de plus en plus approfondies sur le sujet. A partir de 2008, l'Union Européenne a interdit la plupart des utilisations du PFOS (Directive Européenne 2006/122/CE, 2008), qui est inscrit dans l'Annexe B de la Convention de Stockholm en tant que POP en mai 2009 et sur la liste des substances prioritaires de la Directive Cadre sur l'Eau (Directive 2013/39/UE). Aujourd'hui, malgré une tendance à la baisse, le PFOS et le PFOA demeurent deux des PFAS les plus fréquemment ciblés et détectés dans l'environnement et dans le biote (Houde *et al.* 2011 ; Lindstrom *et al.* 2011 ; Wang *et al.* 2015 ; Land *et al.* 2018 ; Vedagiri *et al.* 2018). Un récapitulatif des étapes clés de l'histoire des PFAS est proposé Figure 2.



*FDA : Food & Drug Administration

** C8 : PFAS possédant 8 carbones fluorés

Figure 2. Histoire des PFAS : évènements clés de 1938 à 2018 (adapté de Lindstrom *et al.* 2011).

Désormais, depuis les restrictions concernant la synthèse et l'utilisation de certains PFAS, les industries chimiques se tournent vers de nouvelles générations de molécules fluorées, plus rapidement dégradées dans l'environnement et beaucoup moins, voire non bioaccumulables par les organismes (Wang *et al.* 2013 ; Gomis *et al.* 2015). Ces alternatives se traduisent par l'introduction d'un hétéroatome au sein de la chaîne carbonée ou par la réduction du squelette fluoré (Figure 3). Par exemple, la compagnie 3M a transformé la formule du Scotchgard® en remplaçant le PFOS par une molécule plus hydrophile, le perfluorobutane sulfonate (PFBS), comportant seulement quatre carbones fluorés alors que le PFOS en possède huit (3M, 2000). Cependant, les informations toxicologiques concernant ces alternatives fluorées demeurent très limitées et ne permettent pas encore d'avoir du recul sur leurs conséquences environnementales et sanitaires (Land *et al.* 2018).

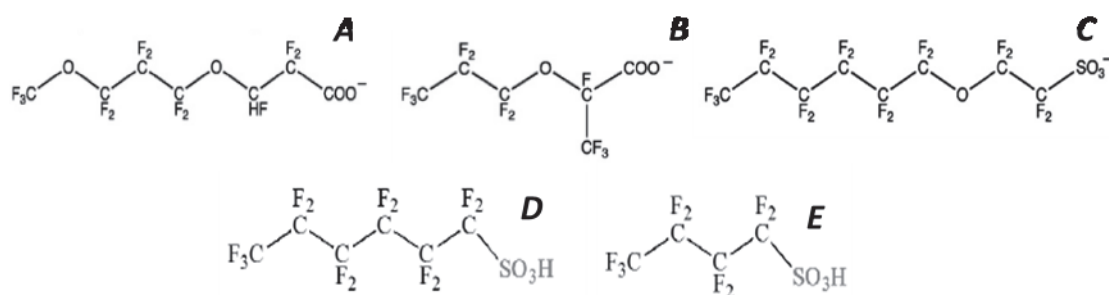


Figure 3. Exemples de substances alternatives fluorées. A. ADONA (n° CAS : 958445-44-8) – B. GenX (n° CAS : 62037-80-3) – C. F-53B (n° CAS : 73606-19-6) – D. Perfluorohexane sulfonate (PFHxS) – E. Perfluorobutane sulfonate (PFBS).

1.2 Nomenclature, classification et synthèse

1.2.1 Nomenclature et classification

Le terme *composé fluoré* est le terme générique et non-spécifique pour décrire des molécules organiques et inorganiques comportant au moins un atome de fluor (Banks *et al.* 1994). Les substances organiques **poly- et per-fluorées** se distinguent par le nombre d'atomes de fluor présents sur leur chaîne carbonée. Les substances **poly**fluoroalkyles ne possèdent que quelques atomes d'hydrogène substitués par des atomes de fluor alors que la totalité des atomes d'hydrogène sont remplacés par des atomes de fluor dans le cas des substances **per**fluoroalkyles (Figure 4).

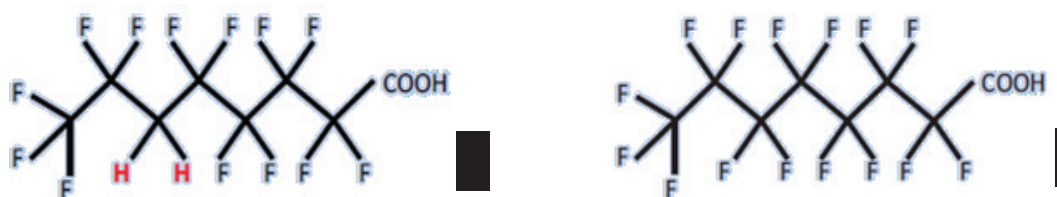


Figure 4. Substances poly-(A) et per-fluorées (B).

Une classification pour les PFAS a été mise en place et deux grandes catégories se distinguent : les composés **non polymères** et **polymères**. Rappelons qu'un polymère est défini comme une substance composée d'une ou de plusieurs unités de monomères. A leur tour, ces deux catégories sont divisées en plusieurs familles. La Figure 5 propose un aperçu des différentes familles de PFAS.

<u>COMPOSES NON POLYMERES</u>	<u>COMPOSES POLYMERES</u>
<p>Substances polyfluorées</p> <p><i>Quelques atomes d'hydrogène de la chaîne carbonée ont été remplacés par des atomes de fluor</i></p> <p>Substances perfluorées</p> <p><i>Tous les atomes d'hydrogène de la chaîne carbonée ont été remplacés par des atomes de fluor</i></p> <p>1. Acides perfluoroalkyles : formule générale $C_nF_{2n+1}COOH$ (PFCA) ou $C_nF_{2n+1}SO_3H$ (PFSA)</p> <p>2. Fluorotélomère. <i>Quelques exemples :</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • n:2 Iodures (n:2 FTI) : $C_nF_{2n+1}CH_2CH_2I$ • n:2 Oléfines (n:2 FTO) : $C_nF_{2n+1}CH=CH_2$ • n:2 Alcools (n:2 FTOH) : $C_nF_{2n+1}CH_2COOH$ <p>3. Dérivés sulfonamido perfluoroalcane. <i>Quelques exemples :</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Perfluoroalcanes sulfonamides : $C_nF_{2n+1}SO_2NH(R')$ • Perfluoroalcanes sulfonamidoéthanol : $C_nF_{2n+1}SO_2N(R')CH_2CH_2OH$ <p>4. Acides poly- et per-fluoroalkyles carboxyliques éther</p> <p>Leurs sels sont utilisés notamment comme matériaux alternatifs dans la fabrication des fluoropolymères.</p>	<p>1. Fluoropolymères</p> <p><i>Atomes de fluor directement liés au squelette carboné</i></p> <p>2. Perfluoropolyéthers</p> <p><i>Atomes de fluor directement liés au squelette composé de carbones et d'oxygènes</i></p> <p>3. Polymères à chaîne latérale fluorée</p> <p><i>Squelette de polymères non-fluorés avec des chaînes latérales fluorées, à la composition variable</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Polymères acrylates et méthacrylates fluorés • Polymères uréthane fluorés • Polymères oxétane fluorés

Figure 5. Classification des différents PFAS (à partir de Buck *et al.* 2011).

Parmi toutes ces familles, nous nous concentrons exclusivement sur l'une d'entre elles dans ce manuscrit : la famille des **acides perfluoroalkyles**. Caractérisée par le groupement C_nF_{2n+1} , cette famille est largement étudiée par la communauté scientifique du fait de sa prédominance dans l'environnement. Les acides perfluoroalkyles se divisent en deux catégories : les **acides perfluoroalkyles sulfoniques (PFSA)** et les **acides perfluoroalkyles carboxyliques (PFCA)** illustrés Figure 6.

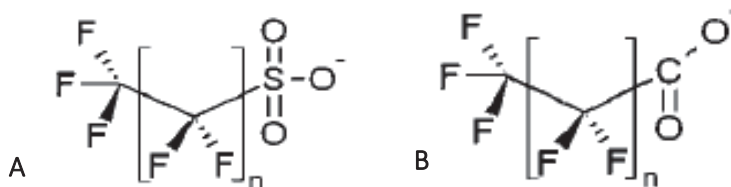


Figure 6. Structure moléculaire des PFAS appartenant aux PFSA (A), de formule générale $C_nF_{2n+1}SO_3H$ et aux PFCA (B), de formule générale $C_nF_{2n+1}COOH$.

Les PFCA et le PFSA sont souvent référencés par rapport à la longueur de leur chaîne (*chaîne courte* ou *chaîne longue*). Pour éviter toute ambiguïté, la définition proposée par l'OCDE (2011) stipule que les composés à *longue chaîne* sont des :

- PFCA avec 8 carbones à minima (soit 7 carbones fluorés au moins)
- PFSA avec 6 carbones à minima (soit 5 carbones fluorés au moins)

Du fait de leur ubiquité et de leur toxicité, trois substances fluorées appartenant à la famille des acides perfluoroalkyles ont été sélectionnées dans le cadre de cette thèse : le perfluorooctane sulfonate (PFOS), le perfluorohexane sulfonate (PFHxS) et l'acide perfluorononanoïque (PFNA).

1.2.2 Synthèse des PFAS

Il existe deux méthodes de synthèse des PFAS : la **fluoration électrochimique** (ECF) et la **télomérisation**. L'ECF est basée sur une réaction entre une chaîne hydrocarbonée et une molécule de fluorure d'hydrogène (HF) anhydre. Le courant électrique appliqué provoque la substitution des atomes d'hydrogène de la chaîne carbonée par des atomes de fluor. L'ECF est un moyen relativement peu onéreux de produire des substances fluorées. Cependant, cette technique forme un mélange complexe d'isomères ramifiés (impuretés) et linéaires, avec des rendements variables en fonction du composé de départ (Lehmler, 2005) et des taux d'impuretés pouvant atteindre 30% (OECD, 2007 ; Buck *et al.* 2011). Néanmoins, l'étude des isomères ramifiés et linéaires permet d'identifier les sources de PFAS puisque le manque de pureté isomérique signe la synthèse de PFAS par ECF (Benskin *et al.* 2010). Progressivement, l'ECF a donc été abandonnée au profit de la télomérisation. Cette méthode se déroule en deux étapes et ne produit que des composés linéaires. La première phase consiste à faire réagir un iodure perfluoroalkyle (de formule générale $C_nF_{2n+1}I$) avec un tétrafluoroéthylène (C_2F_4) pour former un *télomère A* à la chaîne plus longue et de formule $C_nF_{2n+1}(CF_2CF_2)_nI$. Lors de la seconde étape, le télomère

A réagit avec une molécule d'éthylène ($\text{CH}_2=\text{CH}_2$), pour donner le *télomère B* de formule $\text{C}_n\text{F}_{2n+1}(\text{CF}_2\text{CF}_2)_n\text{CH}_2\text{CH}_2\text{I}$. Les télomères A et B sont des molécules intermédiaires réagissant par la suite et donnant naissance à des fluorotélomères.

1.3 Propriétés physico-chimiques et applications

Les liaisons carbone-fluor (C-F) des PFAS leur confèrent des propriétés physico-chimiques uniques, telles qu'une excellente résistance chimique et thermique. En effet, les liaisons C-F sont difficilement rompues par l'action de bases ou d'acides et démontrent une bonne résistance face à la photolyse et à la biodégradation (Giesy *et al.* 2010). En revanche, certains composés fluorés sont moins stables et plus sensibles aux dégradations environnementales que d'autres. Ces substances sont appelées précurseurs et peuvent se transformer en un ou plusieurs produits de dégradation. La persistance dans l'environnement des produits finaux de la dégradation des précurseurs ainsi que celle d'autres PFAS est non seulement due aux liaisons C-F mais également à l'encombrement stérique des molécules. En effet, pour minimiser cet encombrement, la chaîne fluorée change de géométrie en fonction du nombre de carbones. En dessous de neuf carbones fluorés, les PFAS adoptent une configuration en zigzag et à partir de 12 carbones, ils prennent une forme hélicoïdale, unique dans la nature, engendrant une extrême stabilité (ANSES, 2011). Les liaisons C-F constituent la partie hydrophobe des PFAS alors que le groupement fonctionnel en fin de chaîne forme une partie plus hydrophile (Figure 7).

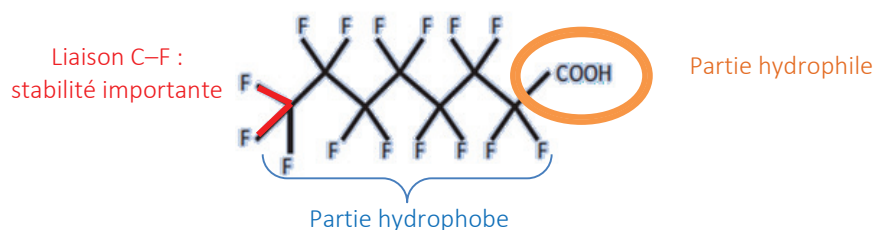


Figure 7. Parties hydrophile et hydrophobe d'une substance perfluorée, ici le PFOA.

Ces propriétés, attrayantes et avantageuses, conduisent à l'utilisation des PFAS dans de nombreuses applications. Les PFAS sont des tensioactifs très performants (Renner, 2006 ; Kissa, 2001). Les propriétés des tensioactifs diffèrent selon le nombre d'atomes de fluor et leur localisation sur la chaîne. Les applications des PFAS sont diverses, s'étendant du domaine industriel au domaine domestique. Ces substances sont utilisées en tant qu'additif dans les fluides hydrauliques pour l'aviation et l'aérospatiale, dans les peintures et les revêtements des produits de construction, en tant que retardateurs de flammes ou encore qu'agent mouillant dans les produits ménagers (vernis de plancher et produits de nettoyage). Les PFAS rentrent aussi dans la composition des mousses anti-incendie et dans la formulation de certains herbicides et de certains régulateurs de croissance (Siegemund *et al.* 2000). La synthèse de

polymères fluorés est également largement répandue (Kissa, 2001). Ceux-ci sont utilisés pour le câblage, la tuyauterie, les joints, les isolateurs (Carlson *et al.* 2000), dans les domaines de l'automobile, de l'aérospatiale, de l'aviation, de l'électronique etc... Ils sont également utilisés dans les films couvrant les capteurs solaires pour les protéger des intempéries (Banks *et al.* 1994), dans les films alimentaires, dans les produits de nettoyage comme les anti-graisse (Siegemund *et al.* 2000), dans les ustensiles de cuisine comme revêtement antiadhésif, dans les matières premières pour les implants dans le corps humain (Carlson *et al.* 2000), dans les revêtements antitaches et les imperméabilisants imprégnés dans certains tissus, cuirs, meubles, tapis... (Carlson *et al.* 2000 ; Paul *et al.* 2009). Les récentes alternatives aux PFAS sont développées pour ces mêmes applications (Wang *et al.* 2013 ; Gomis *et al.* 2015).

1.4 Ecotoxicologie des PFAS

1.4.1 Sources de PFAS et estimation de leurs émissions

Les PFAS sont émis dans l'environnement au cours de leur cycle de vie. Les procédés de fabrication (*cf.* partie 1.2.2) engendrent deux types de sources d'émissions : les sources directes et indirectes (Prevedouros *et al.* 2006 ; Buck *et al.* 2011). Les sources d'émission directe correspondent au cycle de vie des PFAS, depuis leur fabrication jusqu'à leur élimination, incluant également les émissions d'impuretés produites lors de leur synthèse. Les sources d'émission indirecte, sont définies quant à elles, comme les émissions provenant de la transformation des précurseurs dans l'environnement.

Dans cette partie, nous nous intéresserons particulièrement aux émissions et aux sources des PFSA et des PFCA dans l'environnement. Les rejets provenant de la production de fluoropolymères contribuent majoritairement aux émissions de PFCA (Wang *et al.* 2014). L'étude récente de Wang *et al.* (2014) a estimé que les émissions globales des PFCA (C4-C14) s'élevaient entre 2610 et 21400 tonnes de 1951 à 2015 et projetée entre 20 et 6420 tonnes de 2016 à 2030. Pour la famille des PFSA, les émissions directes et indirectes du PFOS ont été estimées à 1228–4930 tonnes et celles de ses précurseurs à 1230–8738, entre 1958 et 2015. La plupart de ces émissions ont eu lieu entre 1958 et 2002. Par la suite, elles ont diminué en raison à la restriction réglementaire sur la production et l'utilisation des précurseurs. Toujours est-il qu'il faudra un certain temps pour observer une diminution des concentrations en PFOS dans l'environnement (Wang *et al.* 2017).

1.4.2 Devenir environnemental

La production et les émissions des PFAS sur l'ensemble de la planète conduisent à leur présence dans l'environnement, dans les compartiments atmosphérique, terrestre et aquatique. Le cycle de vie des PFAS (Figure 8) est propre à chacune des molécules, puisqu'il dépend de la forme sous laquelle elles se trouvent (protonée ou anionique), des conditions environnementales (teneur en carbone organique,

température, salinité, concentration en oxydant atmosphérique, pH) et des propriétés physico-chimiques du PFAS concerné (longueur de la chaîne, groupes fonctionnels et pKa) (Goss, 2007 ; Jeon *et al.* 2010). Quant à leur rémanence, d'une manière générale, les PFAS neutres sont moins persistants dans l'environnement que les PFAS ioniques tels que les PFSA ou les PFCA (souvent produits finaux de dégradation des précurseurs), et ils peuvent se transformer par hydrolyse, photolyse et biodégradation, au cours de leur cycle de vie (Ahrens, 2014 ; Butt *et al.* 2014).

Plusieurs sources de PFAS conduisent à la contamination des compartiments atmosphérique, terrestre et aquatique. Dans l'atmosphère par exemple, certains précurseurs de PFAS, comme le FOSE ($C_8F_{17}SO_2NHCH_2CH_2OH$) ou le FOSA ($C_8F_{17}SO_2NH_2$) ont été quantifiés dans des échantillons d'air prélevés dans une zone urbanisée et une zone rurale (Martin *et al.* 2002) et peuvent se dégrader sous l'action des radicaux libres (Hurley *et al.* 2004). Selon les composés, ces derniers peuvent-être soit directement en phase gazeuse, soit associés à des particules (Martin *et al.* 2002 ; Kim et Kannan 2007). Les PFAS présents dans les sols peuvent provenir des mousses anti-incendie, déversées en grande quantité lors d'exercices divers (Wilhelm *et al.* 2010 ; SSEHRI, 2018 ; AGDD, 2018) ; des rejets d'usine dispersés directement sur le sol ou dans les décharges avec des règles de confinement peu codifiées, surtout avant 1998 (Paul *et al.* 2009 ; Emmett *et al.* 2006) ; ou encore des déchets industriels mélangés à des amendements agricoles (Skutlarek *et al.* 2006). Les PFAS atteignent les milieux aquatiques soit par rejet direct des eaux usées soit par ruissellement. En effet, les PFAS sont mal retenus et peu dégradés dans les STEP (station d'épuration des eaux usées) et les précurseurs s'y décomposent en métabolites ultimes (PFSA et PFCA) (ANSES, 2011). D'une manière générale, les PFAS à chaîne courte sont plus mobiles que leurs homologues à chaîne longue, donc moins retenus dans le sol et atteignent plus rapidement les eaux souterraines (Gellrich *et al.* 2012). La vitesse à laquelle les substances atteignent les cours d'eau, les mers et les océans dépend donc de leur polarité et de leur mobilité dans l'eau et le sol. La concentration des PFAS dans les eaux varie selon l'endroit où les analyses sont réalisées (régions, pays, amont ou aval d'une source de PFAS). Parmi tous les compartiments, l'océan est probablement le plus grand réservoir de PFAS (Cousins *et al.* 2011). 95% des émissions de PFAS sont directement rejetés dans le milieu aquatique, le reste dans l'atmosphère (Ahrens, 2011). De nos jours, certains PFAS sont présents dans les régions éloignées de toute activité anthropique, comme les régions polaires (Giesy and Kannan, 2001 ; Benskin *et al.* 2012). Pour l'océan Arctique, il est estimé que le transport à grande distance de la famille des PFCA est une à deux fois plus important par l'eau que via l'atmosphère (Shoeib *et al.* 2006 ; Wania, 2007).

Parmi les milliers de PFAS existants dans l'environnement, quelques-uns d'entre eux peuvent se bioaccumuler dans les organismes aquatiques et terrestres, à tous niveaux trophiques. Il a été démontré

par ailleurs, que certains PFAS se bioamplifient le long de la chaîne trophique (Phillips *et al.* 2010 ; Giesy et Kannan, 2001 ; Houde *et al.* 2011). C'est le cas du PFOS, par exemple, pour lequel les concentrations les plus fortes se trouvent chez les principaux prédateurs, tels que le pygargue à tête blanche (*Haliaeetus leucocephalus*) et le vison (*Mustela vison*) (Kannan *et al.* 2001 ; Kannan *et al.* 2002).

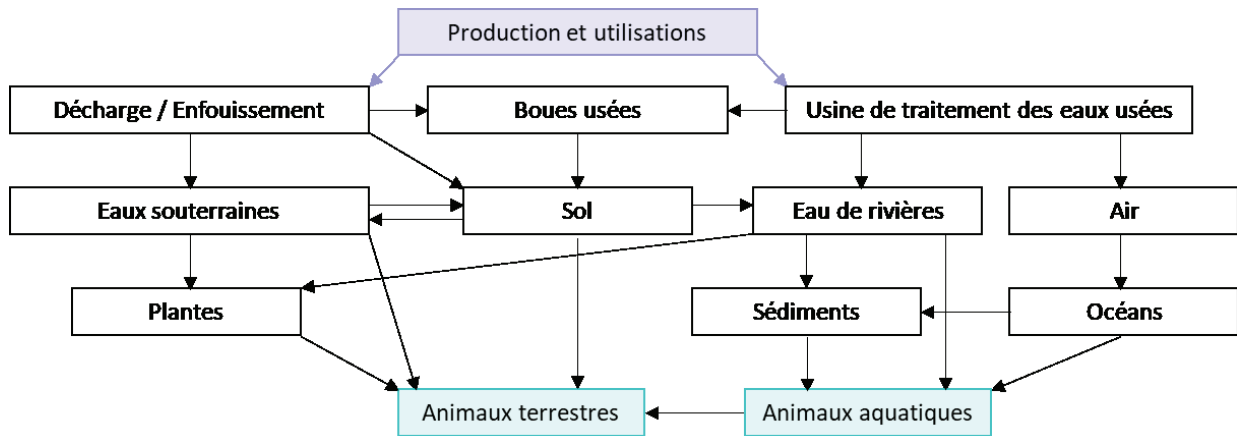


Figure 8. Circulation des PFAS dans l'environnement (d'après Hrádková *et al.* 2010).

2 Toxicocinétique des PFAS chez le poisson

2.1 Toxicocinétique chez le poisson

D'une manière générale, la TK des substances chimiques joue un rôle clé dans leur toxicité et concerne plus précisément le devenir d'un polluant au sein d'un organisme (Krishnan et White, 2013). Les études de TK visent à relier la quantité de produits chimiques dans le milieu extérieur à la quantité présente dans l'organisme (Rivière, 1993) et à préciser sous quelle forme : composé initial ou métabolites. La TK est liée aux processus ADME (Figure 9), modifiant les concentrations effectives des xénobiotiques dans les organes au cours du temps (Kleinow *et al.* 2008). La TK se caractérise par des variables telles que la clairance, la demi-vie, les volumes de distribution, nécessaires pour analyser le comportement d'une substance.

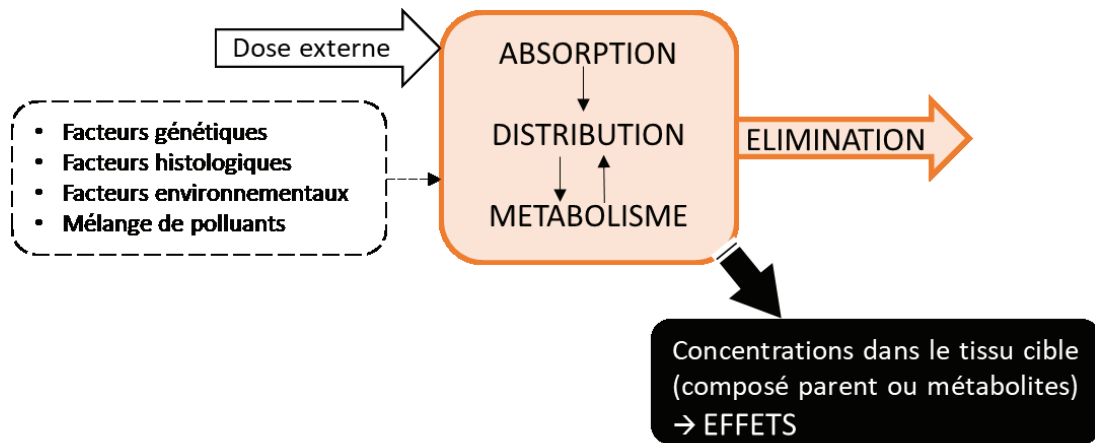


Figure 9. Relations entre toxicocinétique et effets (toxicodynamie) d'une molécule chimique chez un organisme.

Dans de nombreux domaines, dont celui de l'écotoxicologie, le poisson est utilisé en tant qu'organisme modèle pour les divers avantages qu'il présente. Comme chez le mammifère, il existe plusieurs voies d'absorption et d'élimination chez le poisson et les processus ADME sont également régis par les organes et les liens existant entre eux (Figure 10). Les processus ADME chez les poissons d'eau douce sont détaillés dans les parties qui suivent.

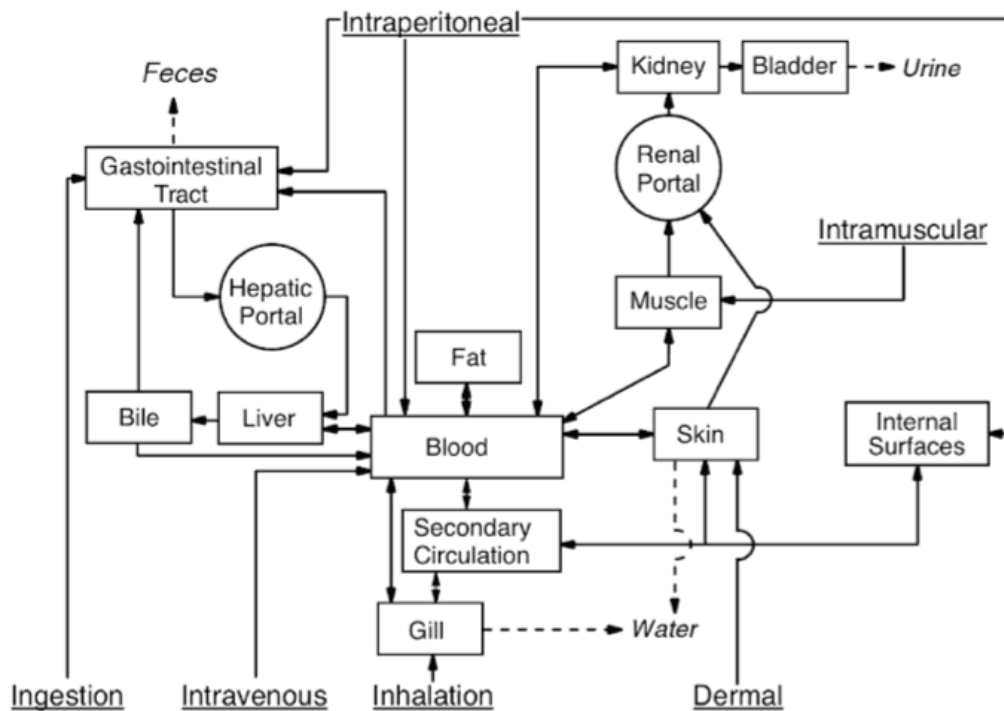


Figure 10. Schéma conceptuel des connexions entre organes jouant un rôle clé dans les processus ADME chez le poisson (d'après Kleinow *et al.* 2008).

En 2003, Martin *et al.* ont publié la première étude de toxicocinétique des PFAS chez le poisson, étudiant un mélange de PFSA et PFCA absorbés soit par voie alimentaire soit par baignade chez la truite arc-en-ciel juvénile (Martin *et al.* 2003 ; Martin *et al.* 2003b). Ce n'est que quelques années

plus tard que d'autres études se sont intéressées à l'exposition des PFAS chez la truite (De Silva *et al.* 2009 ; Lee et Schultz, 2010 ; Butt *et al.*, 2010). Plus récemment, d'autres espèces de poisson dulcicoles ou marines, telles que la carpe, la perche et le fugu ont été exposées à des mélanges de PFAS (Shi *et al.* 2018 ; Gaillard *et al.* 2017 ; Honda *et al.* 2017). Le design expérimental de l'ensemble de ces travaux a permis de fournir des données relatives à l'absorption, à la distribution tissulaire et à l'élimination de certains PFAS, notamment des PFSA et PFCA.

2.2 Absorption des PFAS

L'**absorption** est le processus via lequel une substance chimique pénètre les barrières biologiques pour entrer dans l'organisme avant de passer dans la circulation systémique, que seule une fraction atteindra pour arriver aux divers organes. La fraction absorbée de la molécule dépend de la dose, de la voie d'administration, de la durée d'exposition, des propriétés physico-chimiques propres à chaque molécule et du processus de transport emprunté à travers les membranes cellulaires par la molécule (diffusion passive, transport actif). Les voies d'absorption par les ouïes et le tractus gastro-intestinal (GIT), importantes chez le poisson, sont détaillées ci-dessous.

Les polluants organiques administrés par voie orale transitent par le GIT, dans lequel ils peuvent se lier aux aliments et aux bactéries du contenu luminal, limitant leur biodisponibilité. La biodisponibilité conditionne l'absorption des composés chimiques, *i.e.* la fraction du composé non transformé traversant la lumière intestinale pour atteindre la circulation systémique. D'un point de vue morphologique, le GIT du poisson présente des différences marquées entre les espèces (Kapoor *et al.* 1976 ; Kleinow et James, 2001 ; Smith, 1989). Le GIT de la truite arc-en-ciel se caractérise par un estomac bien distinct et un caecum pylorique développé. Le sang veineux des organes composant le GIT s'accumule dans la veine porte hépatique avant d'entrer dans le foie (Smith et Bell, 1975 ; Thorarensen *et al.* 1991).

Les fonctions primaires des branchies sont d'assurer les échanges gazeux et l'osmorégulation. La ventilation des branchies est réalisée à l'aide d'un système de pompe en deux temps. La première phase consiste en une aspiration générée par l'ouverture des opercules qui permet à l'eau de rentrer par la bouche. La deuxième phase utilise la pression générée par la contraction des muscles de la bouche pour forcer l'eau à pénétrer dans la cavité operculaire par l'arc branchial (Kleinow *et al.* 2008). L'eau arrive donc dans la surface respiratoire (lamelles recouvrant les filaments des arcs branchiaux) où se produit le transfert d'oxygène (Figure 11). Le sang veineux appauvri en oxygène circule à travers les lamelles branchiales, tandis que l'eau riche en oxygène s'écoule entre les lamelles. Le sang et l'eau s'écoulent dans des directions opposées, créant ainsi un système efficace

d'échange gazeux à contre-courant. L'oxygène qui diffuse à travers l'épithélium lamellaire se lie à l'hémoglobine et est transporté par le sang jusqu'aux tissus. La diffusion de l'oxygène dépend du gradient de concentration entre le sang et les cellules individuelles des tissus. De la même manière que pour l'oxygène, les branchies permettent également l'entrée dans l'organisme des polluants organiques présents dans l'eau (Erickson et McKim, 1990). En effet, le système de contre-courant maintient un gradient de diffusion des composés chimiques au niveau de l'épithélium des lamelles branchiales (Erickson et McKim, 1990) et la perfusion sanguine, la perméabilité des membranes et la ventilation respiratoire (flux d'eau traversant les branchies) jouent alors un rôle primordial (Neely, 1979 ; Kleinow *et al.* 2008).

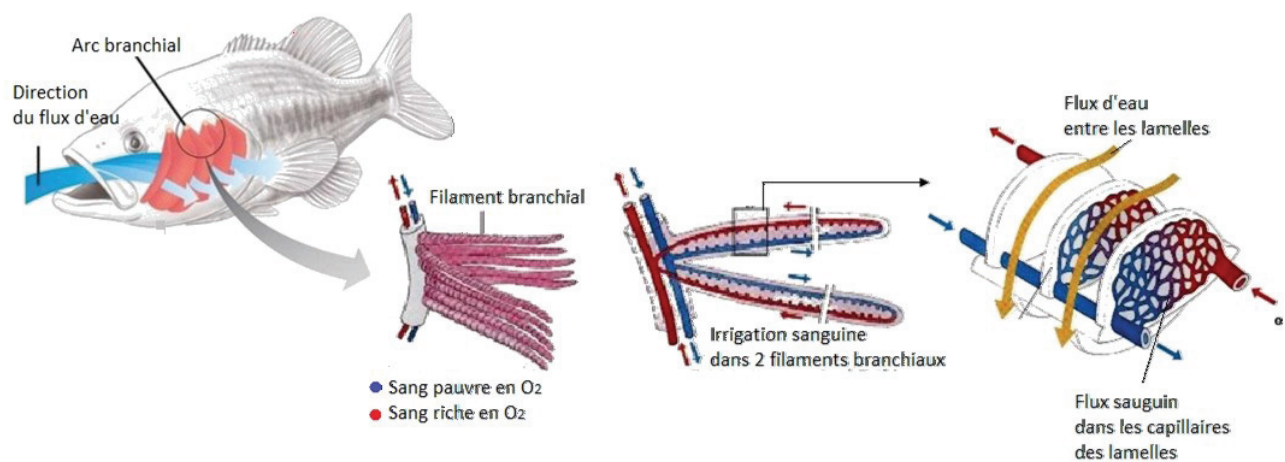


Figure 11. Respiration par les ouïes des poissons et anatomie des branchies. (Schéma original : copyright© 2009 Pearson Education, Inc²)

Les études ayant exposé des poissons à des PFAS, seuls ou en mélange, soit par baignade soit par l'alimentation (Martin *et al.* 2003 ; Martin *et al.* 2003b ; Consoer *et al.* 2016 ; Goeritz *et al.* 2013 ; Butt *et al.* 2010) ont démontré une absorption rapide des composés, quelle que soit la voie par laquelle l'organisme a été exposé et que la vitesse d'absorption dépend de la structure de la molécule (Martin *et al.* 2003b). Chez la truite arc-en-ciel, l'efficacité d'assimilation des PFAS administrés par voie orale est importante et quasi-totale pour le PFOS (Martin *et al.* 2003). Cependant, les expériences d'exposition par baignade ne renseignent pas la voie par laquelle les PFAS sont entrés, les substances pouvant être absorbées via l'eau de boisson, les branchies ou même la peau. En effet, l'absorption cutanée est également une voie d'entrée pour les contaminants chez le poisson. Celle-ci est importante pour les petits poissons ou pour les juvéniles des gros poissons tandis qu'elle est considérée comme mineure chez les gros poissons (McKim *et al.* 1996).

2.3 Distribution des PFAS

La distribution d'une substance se définit comme la répartition de celle-ci dans les différents tissus et organes d'un individu (organes de métabolisation, de stockage et d'excrétion) et s'effectue via la circulation systémique. Cinq facteurs principaux contrôlent la distribution des xénobiotiques par le sang dans les tissus : (1) les caractéristiques physico-chimiques des composés, (2) le gradient de concentration entre le sang et les tissus, (3) la perfusion des organes, (4) l'affinité du contaminant pour le sang et les composants tissulaires, (5) l'activité des protéines spécifiques de transport membranaire (Kleinow *et al.* 2008). D'autres facteurs tels que l'existence de barrières naturelles de l'organisme peuvent influencer la distribution. Par exemple, au niveau du cerveau, la barrière hémato-encéphalique limite la diffusion des produits chimiques (Banks, 2009). Pour de nombreux composés, la distribution se produit par simple diffusion suivant un gradient de concentration. Lorsqu'un composé se diffuse rapidement à travers les membranes biologiques, le débit sanguin des organes et le maintien d'un gradient de concentration sont les principaux déterminants de la distribution. La forme sous laquelle se trouve le composé chimique, libre ou liée, détermine son affinité pour les constituants sanguins et tissulaires. Ces affinités peuvent soit agir comme un obstacle à la distribution car la biodisponibilité est limitée, soit être une aide à l'absorption en créant un gradient de concentration tissu-sang favorable. Les processus de distribution contrôlés par simple diffusion présentent généralement une cinétique de premier ordre tandis que les protéines de transport membranaire présentent souvent une cinétique non linéaire (saturable). Dans le sang, les liaisons entre les composés chimiques et les protéines se font essentiellement avec l'albumine. Cette molécule, fabriquée dans les hépatocytes, est le principal composant du plasma. Les liaisons entre l'albumine et les toxiques sont réversibles, pouvant libérer ces derniers qui traverseront la paroi des vaisseaux et exerceront leurs effets sur les cellules cibles. Certaines espèces, comme la carpe, ne possèdent pas d'albumine (De Smet *et al.* 1998) contrairement à la truite arc-en-ciel (Davidson *et al.* 1989). Compte tenu de certaines différences avec l'albumine des mammifères (comme l'hétérogénéité et l'existence de divers phénotypes), celle de la truite arc-en-ciel est décrite comme "para-albumine" (Perrier *et al.* 1977). Dans les tissus, certains toxiques se lient aux apolipoprotéines (FABP, d'après leur dénomination anglaise, *Fatty Acid Binding Protein*) (Armitage *et al.* 2016). Chez le poisson, la présence de FABP a été démontrée, entre autre, dans le cœur (Steward et Driedzic, 1995 ; Ando *et al.* 1998), dans le muscle (Londrville et Sidel, 1996), dans le foie (Jordal *et al.* 2006) ainsi que dans les intestins (Andre *et al.* 2000 ; Pierce *et al.* 2000). Les FABP appartiennent à une famille de protéines cytosoliques de 14 000 Da et jouent un rôle dans l'absorption, le transport et le métabolisme des acides gras endogènes (Appelkvist et Dallner, 1980).

Chez le poisson comme chez les mammifères (Lindstrom *et al.* 2011), les concentrations en PFSA et les PFCA étudiés sont plus importantes dans le foie et dans le sang contrairement à d'autres polluants organiques tels que les PCB ou les HAP s'accumulant davantage dans les tissus adipeux. Le profil TK particulier est dû à leurs propriétés à la fois hydrophobes et lipophobes et à leur affinité pour l'albumine et les FABP du foie (L-FABP). Cette affinité a été démontré chez les mammifères grâce à des études *in vitro* (Bischel *et al.* 2011 ; Zhang *et al.* 2013). Certains auteurs pensent que ces protéines jouent un rôle dans la bioaccumulation de PFAS chez les vertébrés aquatiques (Ng et Hungerbühler, 2013 ; Zhong *et al.* 2019 ; Martin *et al.* 2003 ; Consoer *et al.* 2016). En effet, les poissons possèdent des protéines identiques ou différentes mais ayant une fonction similaire. Comme mentionné auparavant, des protéines apparentées à l'albumine sont présentes chez les salmonidés, y compris la truite arc-en-ciel (Jones *et al.* 2003 ; Manera *et al.* 2006) et des orthologues aux transporteurs d'anions organiques (OAT) et aux FABP de mammifères ont été identifiés chez un certain nombre d'espèces de poissons (Liu *et al.* 2003 ; Ando *et al.* 1998 ; Londrville *et al.* 1996 ; Torstensen *et al.* 2009 ; Boaru *et al.* 2006 ; Meier-Abt *et al.* 2007 ; Popovic *et al.* 2010 ; Aslamkhan *et al.* 2006 ; Di Pietro *et al.* 1997).

2.4 Métabolisation

La **métabolisation** est le processus de biotransformation d'un xénobiotique le rendant plus hydrophile afin de faciliter son excrétion par le rein ou par la bile. Très brièvement, la biotransformation s'effectue via deux types de réactions fondamentales : les réactions de phase I et de phase II. Les réactions de la phase I sont des réactions de dégradation telles que l'oxydation (action du cytochrome P-450) et la réduction (hydrolyse) alors que celles de la phase II sont des réactions de conjugaison destinées à accroître la solubilité des métabolites. Il arrive que plusieurs métabolites soient formés pour un même xénobiotique pouvant être plus ou moins toxiques que la molécule mère. De nombreux précurseurs peuvent se biotransformer chez le poisson. Par exemple, le PFOA est l'un des métabolites principaux du 8:2 FTOH et du 8:2 FTCA (Butt *et al.* 2014).

2.5 Elimination

L'**élimination** est l'étape ultime du devenir des composés parents et des métabolites au sein d'un organisme. L'excrétion branchiale est surtout importante pour les composés neutres, solubles dans l'eau et de faible poids moléculaire. Celle-ci est bi-directionnelle, et comme pour l'absorption, l'élimination des substances par cette voie est une diffusion passive et un processus non saturable (Kleinow *et al.* 2008).

Les composés chimiques peuvent aussi s'éliminer par l'urine. Les structures de reins des poissons en fonction de l'espèce sont très diverses mais les fonctionnalités de base sont les mêmes pour les téléostéens marins et d'eau douce. Cet organe a deux fonctions principales : maintien du bilan ionique et hydrique et excrétion des composés endogènes et exogènes. L'osmorégulation permet aux poissons vivant en eau salée de produire de petites quantités d'urine relativement concentrée, tandis que les poissons d'eau douce produisent de grandes quantités d'urine diluée pour ne pas évacuer les sels. Le contenu chimique de l'urine reflète le résultat de la filtration glomérulaire, de la sécrétion tubulaire et de la réabsorption (Pritchard et Bend, 1984). En effet, les produits chimiques présents dans le sang sont, dans un premier temps, filtrés au niveau du glomérule et sont transportés ensuite jusque dans l'urine grâce au système tubulaire (succession de tubules). Ils sont alors, soit excrétés définitivement par l'urine, soit réabsorbés dans le sang (Figure 12). Ce processus nécessite l'aide de transporteurs tels que les OAT. Les composés hydrophobes neutres filtrés par les glomérules sont généralement réabsorbés mais la clairance rénale peut cependant constituer une importante voie d'élimination pour de tels composés. D'après Kleinow *et al.* (2008), l'excrétion urinaire est supposée être une voie d'élimination secondaire, excepté pour les contaminants organiques de petite taille moléculaire (500 g mol^{-1}) avec une grande fraction non liée aux protéines plasmatiques (Miller, 1987, Pritchard et Renfro, 1984). En effet, l'efficacité de l'excrétion rénale des composés chimiques est soumise à deux caractéristiques : le poids moléculaire et la liaison aux protéines plasmatiques. Le débit de filtration glomérulaire déterminé pour la truite représente un peu moins de 1% du débit sanguin total dans le rein (McKim *et al.* 1999).

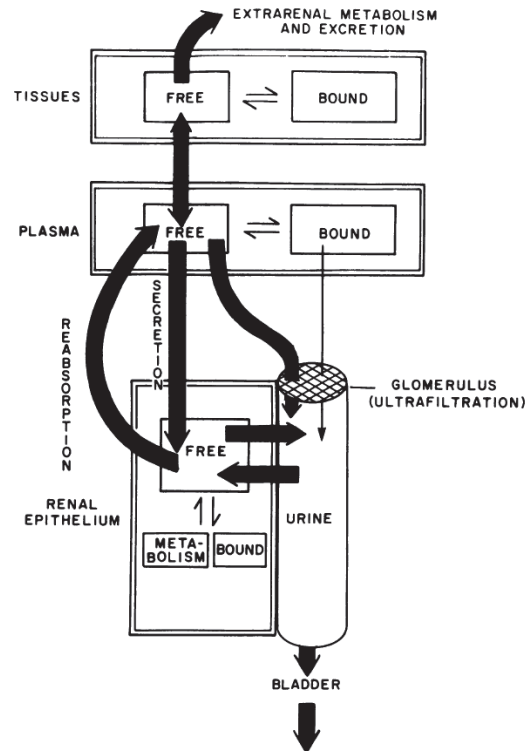


Figure 12. Distribution d'un composé chimique dans les reins, en relation avec les autres tissus et le sang (d'après Miller, 1987).

Plusieurs processus hépatiques et intestinaux contribuent aussi à l'élimination des xénobiotiques chez le poisson. La fraction non absorbée de composé chimique provenant de l'alimentation sera éliminée directement par les fèces, après son passage dans le GIT. La fraction absorbée quant à elle, va être transférée vers le foie. Elle sera ou non biotransformée et les molécules initiales ainsi que les métabolites potentiels pourront être évacués par la bile, produite par le foie. Les déchets biliaries sont alors déversés dans le GIT et le composé chimique pourra soit être évacué par les fèces, soit être réabsorbé. Ce cycle se nomme la circulation entérohépatique (Statham *et al.* 1976). Quelques études indiquent que la circulation entérohépatique peut se produire chez les poissons (James, 1987 ; Fricker *et al.* 1997). Cependant, la réabsorption entérohépatique ainsi que la sécrétion biliaire épisodique rendent difficile l'estimation de la contribution de l'excrétion biliaire par rapport à l'excrétion totale (Kleinow *et al.* 2008).

Les demi-vies d'élimination relativement longues des PFSA et des PFCA (plusieurs jours) sont similaires dans les études d'exposition par voie alimentaire et par voie branchiale (Martin *et al.* 2003 ; Martin *et al.* 2003b). Ceci peut être dû au cycle entéro-hépatique auquel les PFAS pourraient être soumis (Martin *et al.* 2003). Chez les mammifères, la voie d'élimination prédominante dépend de l'espèce étudiée. Une étude d'exposition au PFOS chez le bœuf (Lupton *et al.* 2014) a démontré que la principale voie d'excrétion était les selles (11 ± 1.3 % de la dose administrée) tandis que l'urine constituait une voie minoritaire (0.5 ± 0.07 % de la dose). En revanche, une exposition au PFOS chez

le rat a démontré que la voie urinaire était la voie d'élimination principale chez les rats contaminés au PFOS (Cui *et al.* 2010). Une étude similaire chez le rat a démontré que le PFOA était excrété principalement par l'urine, alors que l'élimination fécale ne représentait qu'un faible pourcentage de la dose, peu importe le sexe (Vanden Heuvel *et al.* 1991). L'élimination urinaire est liée aux interactions des PFAS avec les OAT (Han *et al.* 2008 ; Yang *et al.* 2010). Certains de ces transporteurs semblent favoriser l'excrétion des PFAS par l'urine, tandis que d'autres favorisent leur réabsorption (Han *et al.* 2008). Récemment, deux études se sont intéressées à l'élimination du PFOA et du PFOS chez la truite arc-en-ciel par les branchies et par l'urine (Consoer *et al.* 2014 ; Consoer *et al.* 2016). En raison de la faible quantité des deux substances dans la bile à la fin de la période d'exposition, les auteurs n'ont pas discuté des voies biliaire et fécale. Ils mentionnent cependant que l'élimination biliaire peut être plus importante quand les organismes sont exposés par l'aliment, en raison des débits biliaires plus élevés. Dans le cas du PFOA, approximativement 90% de la substance est éliminée par l'urine, contre 10% par la voie branchiale. Pour le PFOS, seulement 20% de la substance a été éliminée par l'urine et la clairance rénale associée à l'excrétion du PFOS est environ 75 fois inférieure à celle du PFOA. Il a été suggéré que seul le PFOA interagit fortement avec les OAT des reins des truites et que l'élimination du PFOS par l'urine est le résultat de la filtration glomérulaire. L'implication des OAT n'est cependant pas à exclure totalement compte tenu du peu d'expériences menées sur ce sujet. Ces résultats suggèrent que les modèles développés pour prédire la bioaccumulation des PFAS chez le poisson doivent tenir compte des clairances rénales pour chaque composé. Par ailleurs, le mucus présent à la surface de la peau pourrait constituer une voie d'élimination importante pour le PFOS chez des poissons comme le fugu (*Takifugu rubripes*), dont le mucus pourrait même être l'unique voie d'élimination du PFOS (Honda *et al.* 2018).

2.6 Influence des facteurs environnementaux sur la toxicocinétique

Les processus ADME sont dépendants de plusieurs facteurs biotiques ou abiotiques, pouvant influencer les cinétiques d'absorption et d'élimination des xénobiotiques. Nous pouvons citer le taux d'alimentation, la composition de la nourriture ainsi que la température dues globalement aux saisons, accentuées par le changement climatique, ou localement par des déversements industriels, mais également les facteurs intrinsèques propres aux individus comme l'âge, le sexe et le stade de vie (Jimenez *et al.* 1987 ; Paterson *et al.* 2007 ; Lee et Schultz., 2010). Pour les PFAS, il a été démontré que la vitesse d'élimination du PFOA chez le méné tête-de-boule (*Pimephales promelas*) dépend du sexe (Lee et Schultz, 2010) et la bioaccumulation de certains PFSA et PFCA chez la truite arc-en-ciel dépend du stade de vie (Martin *et al.* 2003 ; Goeritz *et al.* 2013). Les propriétés physico-chimiques des substances jouent également un rôle important dans la bioaccumulation des PFAS. Par exemple,

les isomères ramifiés sont éliminés plus vite que les isomères linéaires (Benskin *et al.* 2009). Par ailleurs, les PFAS à longue chaîne, plus hydrophobes et moins mobiles que leurs homologues à courte chaîne, s'accumulent davantage dans les organismes. De la même manière, les PFAS dotés d'un groupement sulfonate s'accumulent plus que les acides carboxyliques analogues (Martin *et al.* 2003 ; Houde *et al.* 2011 ; Wen *et al.* 2017).

2.7 Effets des PFAS chez le poisson

La toxicodynamie concerne les effets que causent des molécules étrangères, seules ou en mélange, pénétrant dans l'organisme, une fois les cellules cibles atteintes et s'intéresse également aux facteurs qui contrôlent la réponse biologique.

Dans le cas des PFAS, des études de toxicodynamie ont été réalisées sur une diversité d'organismes (végétaux, invertébrés et vertébrés). Chez les poissons, les PFAS peuvent provoquer des effets variés et la plupart des études se sont concentrées sur le PFOS. Chez les larves et les embryons de poisson zèbre (*Danio rerio*), il a été démontré que le PFOS entraîne des retards d'éclosion, impacte la croissance embryonnaire, engendre des malformations cardiaques et des effets sur le comportement et sur le développement, notamment sur la courbure de la colonne vertébrale (Li *et al.* 2015 ; Shi *et al.* 2017 ; Wang *et al.* 2011, Huang *et al.* 2010, Shi *et al.* 2008). L'étude de Chen *et al.* (2014) a révélé l'altération de l'organogenèse chez les larves de poisson zèbre exposées au PFOS au début du développement, corrélée à de nombreux changements dans l'expression des gènes. Wei *et al.* (2008) ont analysé un profil d'expression de gènes pour détecter les changements dans les hépatocytes cultivés de *Gobiocypris rarus* suite à une exposition à des PFAS seuls ou en mélange (PFOA, PFNA, PFDA, PFDoDA, PFOS, 8:2FTOH). Les gènes affectés sont ceux intervenant dans le métabolisme et le transport des acides gras, dans le métabolisme des xénobiotiques, dans la réponse immunitaire et dans l'apparition du stress oxydant. Chez le poisson zèbre adulte, le PFOS peut être hépatotoxique à partir d'une certaine concentration (Du *et al.* 2009) et causer des effets perturbateurs du système endocrinien (Du *et al.* 2013 ; Hoff *et al.* 2003). Le PFOS peut également impacter la mobilité des spermatozoïdes du poisson zèbre et diminuer significativement le succès de fécondation (Xia et Niu, 2016). Chez le médaka japonais (*Oryzias latipes*), le PFDoDA cause des dommages à l'ADN (Ayanda *et al.* 2018) et divers changements histologiques ont été repérés dans la glande thyroïde des poissons contaminés au PFOS (Ji *et al.* 2008). Chez le poisson-épée (*Xiphophorus helleri*), une exposition au PFOS a causé des effets oestrogéniques (Han et Fang, 2010). Dans l'ensemble des études de toxicodynamie menées, les PFSA et les PFCA les plus toxiques sont ceux à longue chaîne et ceux dotés d'un groupement sulfonate.

2.8 Données toxicocinétiques des PFAS chez le poisson

De nombreuses études ont porté sur la toxicocinétique et la toxicodynamie des PFAS chez les mammifères mais elles sont beaucoup moins nombreuses pour les vertébrés aquatiques. Les échantillons prélevés *in situ* chez le poisson permettent de recenser les concentrations en PFAS dans divers organes de plusieurs espèces et de construire une base de données solides pour le domaine de l'évaluation des risques. Cependant, ces études ne comblent pas les lacunes existantes sur les mécanismes ADME des PFAS. En effet, la plupart des études *in situ* ne distinguent pas les sources d'exposition aux contaminants (eau, aliment, sédiment...) et ne permettent pas de connaître la contribution de chacune des voies d'élimination. De la même manière, si les études *in vivo* en conditions contrôlées permettent de maîtriser les doses d'exposition, elles ne renseignent pas les voies d'entrée et de sortie empruntées par les contaminants. Lors d'une exposition par l'eau, le composé peut pénétrer dans l'organisme soit par ses branchies, soit par la peau, soit par l'eau de boisson et il est difficile de distinguer par une simple analyse de l'eau, si la substance a été éliminée par les branchies ou par l'urine. Pour discerner les voies d'absorption et d'élimination d'un composé, certains auteurs placent les individus dans une chambre respiratoire (Figure 13). Ce dispositif, développé par McKim et Goeden (1982), est une boîte compartimentée en trois parties séparées par des membranes étanches. Ce système permet de séparer l'eau inspirée par le poisson de celle qu'il expire, de déterminer le volume d'eau passant à travers les branchies dans un intervalle de temps connu, et de récupérer l'urine par une canule mise en place dans le canal urinaire. Pour les PFAS, seules les études de Consoer *et al.* (2014) et Consoer *et al.* (2016), dont les résultats sont exposés dans la partie 2.5, ont utilisé ce système pour connaître les contributions des voies d'élimination du PFOA et du PFOS, respectivement. Néanmoins, outre les soucis éthiques que posent ce système, les fonctions physiologiques peuvent être altérées à cause du stress auquel est soumis l'individu. Les réponses physiologiques et les paramètres associés peuvent donc être biaisés.

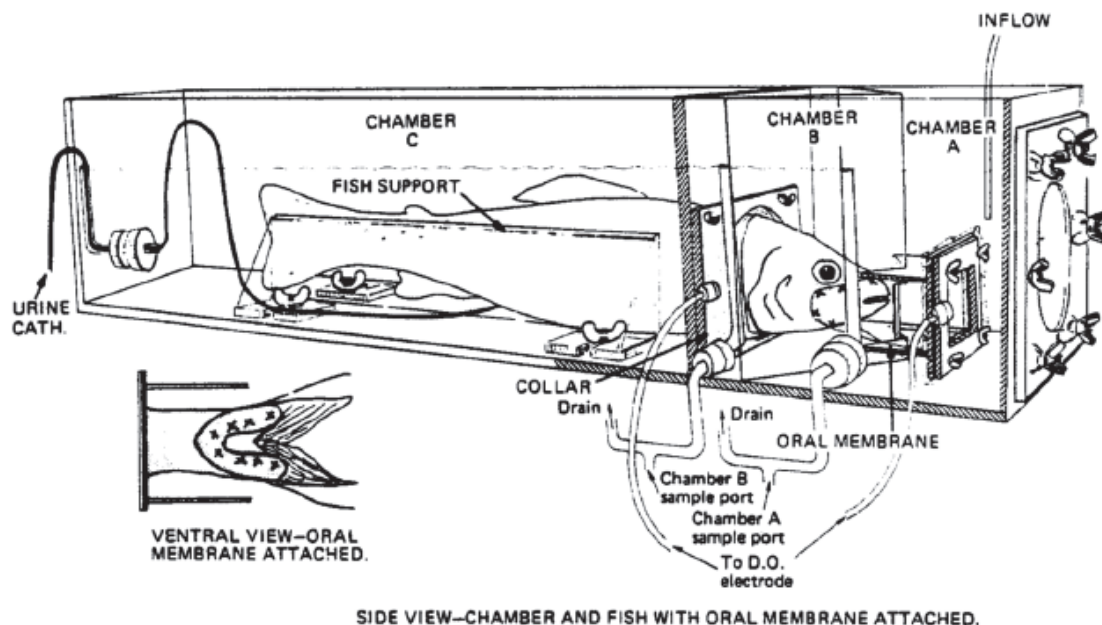


Figure 13. Chambre respiratoire à trois compartiments (A, B et C), d'après McKim et Goeden (1982).

Par ailleurs, certaines études suggèrent que l'affinité des PFAS pour certaines protéines explique la distribution de ces substances dans le sang et le foie et pourraient être responsables en partie de leur élimination lente. Cependant, les études chez le poisson sur ces interactions sont encore rares. En plus du manque de données et d'informations sur la toxicocinétique des PFAS, aucune étude n'a été réalisée à ce jour sur l'influence des facteurs biotiques ou abiotiques. Comme mentionné précédemment, la température de l'eau par exemple ou le taux d'oxygène dissous peuvent influencer les processus ADME des contaminants. Il semble important de considérer ces variables dans les études de cinétique chez le poisson.

3 Modélisation de la cinétique des PFAS chez le poisson

3.1 Différents niveaux de complexité : du modèle un compartiment au modèle toxicocinétique à base physiologique (PBTk)

Le concept de modélisation PBTk n'est pas nouveau. L'utilisation de modèles multi-compartiments intégrant des données biologiques et physiologiques pour la simulation des données pharmacocinétiques a été introduite par Teorell, en 1937. A cette période, leur application était limitée car les outils informatiques ne permettaient pas de traiter la complexité mathématique des équations différentielles régissant les modèles, et les bases de données référençaient encore trop peu de paramètres (Jones and Rowland-Yeo, 2013).

Les modèles décrivant le devenir des substances chimiques chez les poissons ont été dans un premier temps développés pour les composés lipophiles peu solubles (Neely *et al.* 1974 ; Neely,

1979). Ces modèles étaient généralement composés d'un unique compartiment homogène et la cinétique du composé était modélisée par ses constantes de vitesse d'absorption et d'élimination. Bien que leur utilisation soit pertinente pour de nombreux produits chimiques et pour diverses applications, la simplicité de ces modèles ne permettait pas d'expliquer la complexité des processus ADME. Bischoff *et al.* (1970) ont publié un modèle PBTK préliminaire pour le méthotrexate, incluant des processus métaboliques et établissant ainsi la base pour les modèles PBTK actuels. Un second modèle PBTK a vu le jour en 1984 pour évaluer le devenir du styrène chez le rat pour plusieurs voies d'administration (Ramsey et Andersen, 1984).

Les modèles PBTK ont été plus utilisés à partir des années 1980 grâce aux progrès des outils informatiques (Edginton *et al.* 2008). Le nombre de publications impliquant la modélisation PBTK a considérablement augmenté au cours des dernières années, soulignant l'intérêt et l'utilité de cet outil pour la communauté scientifique dans le domaine de l'écotoxicologie pour comprendre le devenir de certaines substances dans les organismes. Le premier modèle PBTK poisson fut développé par Zaharko *et al.*, en 1972, sur la raie (adaptation de modèles sur les rongeurs). Par la suite, d'autres études ont mis au point des modèles PBTK pour différentes espèces de poisson telles que la truite (Nichols *et al.* 1990 ; Lien *et al.* 2001 ; Ng et Hungerbühler, 2013), l'anguille européenne (Brinkman *et al.* 2015), le poisson-zèbre (Péry *et al.* 2014), le gardon (Brinkman, 2015), le méné tête-de-boule (Stadnicka *et al.* 2012 ; Lien et McKim, 1993), le médaka japonais (Lien et McKim, 1993), le poisson-chat (Nichols *et al.* 1993) et l'aiguillat (Bungay *et al.* 1976). Les modèles PBTK chez la truite arc-en-ciel sont plus nombreux que les autres en raison des connaissances physiologiques plus étendues sur cette espèce (Gingerich *et al.* 1990 ; Barron *et al.* 1987 ; Buschnell *et al.* 1998). En effet, la truite arc-en-ciel est devenue une espèce modèle pour beaucoup d'études scientifiques, densifiant la base de données physiologiques, anatomiques et cinétiques. *O. mykiss* est largement utilisée en laboratoire grâce à son élevage bien maîtrisé, et son intérêt halieutique et économique. La taille des individus favorise les études de TK, et en particulier les prélèvements des tissus et des organes. Par ailleurs, son génome a récemment été entièrement séquencé (Berthelot *et al.* 2014).

3.2 Les modèles PBTK

3.2.1 Fonctions et avantages des modèles PBTK

Les modèles PBTK sont construits sur des mécanismes physiologiques réels, propres aux espèces d'intérêt et offrent l'avantage de réduire l'expérimentation animale ainsi que le coût financier des études *in vivo* et *in vitro* réalisées pour obtenir des données cinétiques relatives aux produits chimiques (Mittal *et al.* 2018). Les modèles PBTK permettent d'étudier les processus ADME d'un

produit chimique, d'obtenir les paramètres de cinétique de celui-ci et de simuler des concentrations de polluants (molécules mères et métabolites) à l'échelle de l'organe. Les modèles PBTK peuvent également prendre en compte plusieurs voies d'exposition, estimer la distribution d'un polluant en faisant varier les conditions expérimentales (dose initiale, contamination chronique ou accidentelle) et extrapoler les relations dose-réponse d'une espèce à une autre. Chaque modèle PBTK est unique, certains répondent à une problématique spécifique (Mittal *et al.* 2018 ; Khazaei *et al.* 2018), tandis que d'autres sont développés de manière à prédire le devenir d'un ensemble de substances, et sont dits génériques (Grech *et al.* 2019).

3.2.2 Construction des modèles PBTK

Le développement d'un modèle PBTK suit différentes étapes, illustrées par la Figure 14.

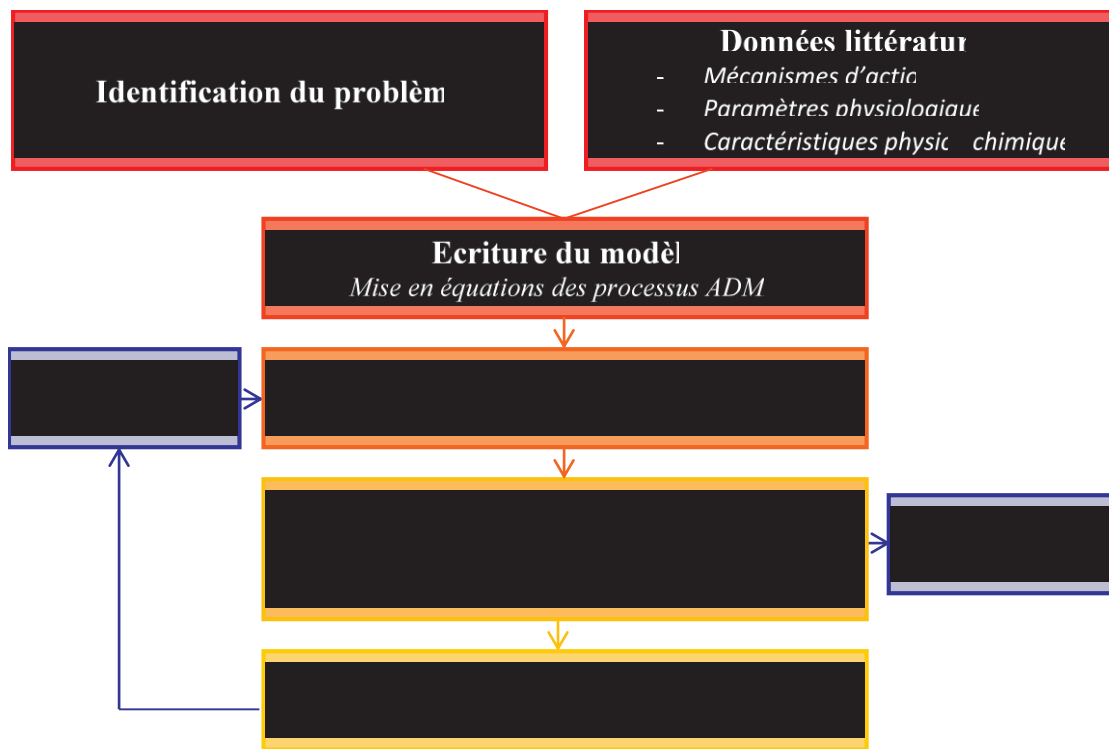


Figure 14. Etapes de construction et de développement d'un modèle PBTK (d'après la thèse de Marie-Emilie Willemin, 2014).

3.2.2.1 Structure conceptuelle des modèles PBTK - Sélection des compartiments

L'étape de définition de la structure du modèle est essentielle. Il n'est pas nécessaire de représenter les organes de manière exhaustive, tout dépend de la question traitée ainsi que des données disponibles dans la littérature (Figure 14). Pour de tels modèles, il n'y a pas de limite dans le choix du nombre de compartiments, ni dans celui de la complexité de leur représentation (Barton *et al.* 2006). C'est d'ailleurs l'une des difficultés à laquelle se heurte le modélisateur : développer suffisamment le modèle pour pouvoir expliquer les processus ADME d'une substance sans tomber

dans une complexité qu'il ne peut pas résoudre par manque de données disponibles. Il doit donc trouver un juste milieu entre simplicité et réalisme (Clewel and Clewel 2008). En plus d'être adapté à l'anatomie d'une espèce, les modèles PBTK sont basés sur les interactions entre tous les tissus, interconnectés par la circulation sanguine (Figure 15). Dans chaque compartiment, les polluants pénètrent par le sang artériel et ressortent par le sang veineux.

Un modèle PBTK doit prendre en compte les organes impliqués dans l'absorption des substances (tractus gastro-intestinal, peau, poumons, branchies...), dans leur distribution (sites d'action en fonction de la molécule d'intérêt), dans leur métabolisation et dans leur élimination (foie, reins...), ainsi que les fluides reliant les différents compartiments (plasma, sang...). Certains organes, non essentiels à la description des mécanismes ADME, peuvent être groupés en un seul compartiment s'ils possèdent le même niveau de perfusion et des coefficients de partage avec le sang similaires (Ramsey et Andersen, 1984). Dans les modèles publiés, ces tissus sont souvent regroupés sous les termes de tissus *rapidement perfusés* (par exemple, les viscères) et de tissus *faiblement perfusés* (par exemple, la peau avec le muscle). Une autre alternative est de regrouper les concentrations résiduelles du contaminant étudié dans un seul et même compartiment, souvent appelé *reste du corps* (Krishnan et Perret, 2009).

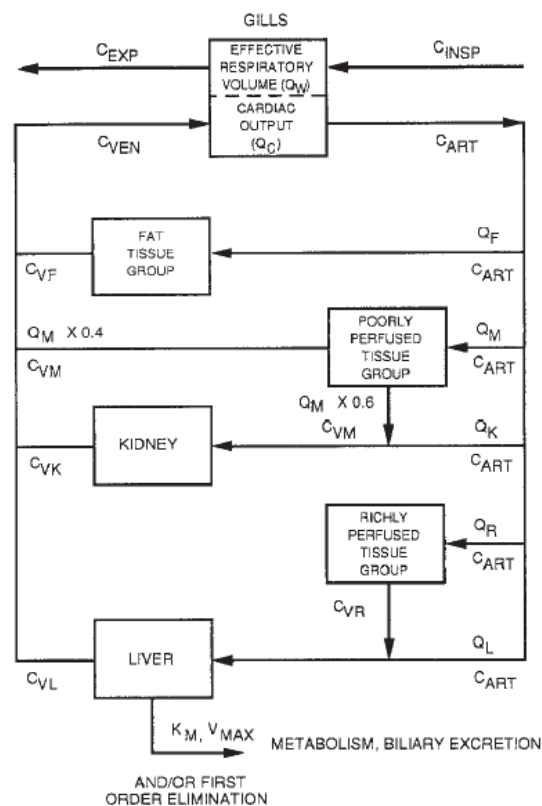


Figure 15. Structure conceptuelle du modèle PBTK à 5 compartiments, représentant la physiologie de la truite arc-en-ciel (Nichols *et al.* 1990).

3.2.2.2 Ecriture mathématique des modèles PBTK

Des équations différentielles, propres à chaque processus ADME, permettent de décrire mathématiquement les transferts des composés. Même si la solution analytique des modèles PBTK est calculable, il est plus simple d'obtenir la solution des équations numériquement, en raison de leur complexité. Les échanges des substances entre les tissus sont réalisés via la circulation sanguine et dépendent de plusieurs variables (débit sanguin, volume des organes, concentration de la substance dans un organe etc...). Il existe plusieurs représentations de ce transfert, selon la nature de la distribution. Si le facteur limitant est la perfusion du tissu, alors l'équation régissant la quantité de la molécule au cours du temps s'écrit :

$$\frac{dQ_i(t)}{dt} = F_i \times (C_{art}(t) - \frac{C_i(t)}{PC_i}) \quad \text{(Equation 1)}$$

Avec $Q_i(t)$ représentant la quantité du polluant dans le compartiment i , F_i le flux artériel arrivant au compartiment i , $C_{art}(t)$ la concentration de la substance dans le sang artériel, $C_i(t)$ la concentration de la substance dans le sang veineux quittant le compartiment et PC_i le coefficient de partage entre le tissu et le sang et t le temps. Dans cette équation, la distribution est supposée être instantanée et uniforme au sein du tissu. Le facteur limitant peut également être la diffusion, qui dépend de la perméabilité de l'organe. Pour modéliser ce cas de figure, le tissu est divisé en deux sous-compartiments (l'espace extracellulaire et l'espace intracellulaire) et la surface d'échange entre les deux est représentée par le coefficient de perméabilité (PA_t), exprimé en volume temps⁻¹ masse du tissu⁻¹ (Figure 16). Les quantités de composés dans l'espace extracellulaire (Q_{sgT}) et le tissu (Q_i) sont respectivement :

$$\frac{dQ_{sgT}(t)}{dt} = F_i \times (C_{art}(t) - C_{sgT}(t)) - PA_t \times (C_{sgT}(t) - \frac{C_i(t)}{PC_i}) \quad \text{(Equation 2)}$$

$$\frac{dQ_i(t)}{dt} = PA_t \times (C_{sgT}(t) - \frac{C_i(t)}{PC_i}) \quad \text{(Equation 3)}$$

Avec C_{sgT} la concentration du composé dans l'espace extracellulaire.

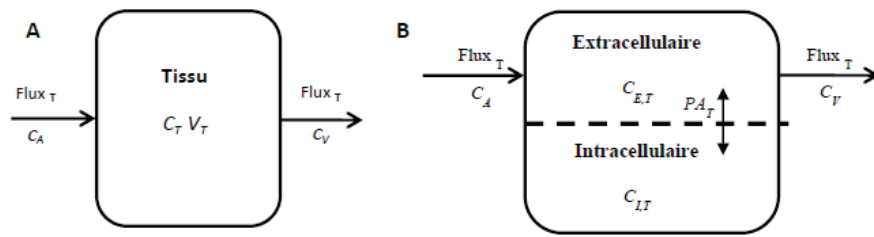


Figure 16. Représentation de la distribution du composé dans un organe à perfusion limitée (A) et un organe à diffusion limitée (B). C désigne les concentrations dans, respectivement, l'artère (C_A), le tissu (C_T), la veine (C_V), l'espace extracellulaire ($C_{E,T}$) et intracellulaire ($C_{I,T}$). V_T correspond au volume tissulaire et PA_T au coefficient de perméabilité entre les deux sous compartiments (Marie-Emilie Willemin, 2014).

3.2.2.3 Estimation statistique des paramètres – Approche bayésienne

L'étape suivante consiste à renseigner les valeurs des paramètres et l'estimation de leur erreur. Les données nécessaires comprennent des paramètres physiologiques dépendant de l'espèce (volumes des tissus, flux sanguins...), de paramètres physico-chimiques liés à la molécule (solubilité, lipophilie, pKa...), des paramètres biochimiques (liaisons aux protéines, coefficients de partage, constante cinétique...) et des paramètres relatifs à l'exposition uniquement nécessaires à la conduite des simulations (durée, dose ...). Certains paramètres sont corrélés entre eux, comme par exemple le débit cardiaque et les flux sanguins de chaque organe. Une paramétrisation rigoureuse est exigée pour ne pas modéliser des mécanismes physiologiques non réalistes (Bernillon et Bois, 2000). Les valeurs de ces paramètres peuvent être le résultat d'expérimentations réalisées pour un cas précis ou disponibles *a priori* dans la littérature scientifique, émergeant d'expériences *in vivo*, *in vitro* ou encore *in silico*. Les données expérimentales sont des mesures de concentrations ou de quantités de polluants analysées dans divers tissus au cours du temps. Lors de ces expériences, il est également possible de récolter des paramètres directement mesurables, comme le sexe, l'âge, la masse corporelle et la longueur du corps des individus, qui sont autant de covariables.

Pour estimer les valeurs d'un paramètre, certains auteurs utilisent une méthode d'estimation visuelle, *i.e.* plusieurs valeurs sont choisies par les modélisateurs pour le ou les paramètre(s) inconnu(s) et la valeur menant à une concordance satisfaisante entre la cinétique observée et les prédictions du modèle est retenue (Tornero-Velez *et al.* 2012). Cette méthode n'est cependant pas robuste et est souvent biaisée par les choix *a priori* des modélisateurs (Brochot, Willemin & Zeman, 2014). En parallèle de cette approche visuelle, l'approche **bayésienne** est une méthode souvent employée (Gelman *et al.* 1996 ; Hack, 2006). L'inférence bayésienne permet d'établir des distributions *a posteriori* pour les valeurs de paramètres d'un modèle, à partir d'informations *a priori* et de données expérimentales. Le théorème de Bayes (Equation 4) permettant de calculer ces distributions, s'écrit de la manière suivante :

$$\mathbf{P}(\Theta|\mathbf{y}) = \frac{\mathbf{P}(\Theta) \mathbf{P}(\mathbf{y}|\Theta)}{\mathbf{P}(\mathbf{y})} \quad \text{(Equation 4)}$$

Avec $\mathbf{P}(\Theta|\mathbf{y})$, la probabilité des paramètres sachant les données, *i.e.* la distribution de probabilité *a posteriori* des paramètres et $\mathbf{P}(\mathbf{y})$ est la distribution *a priori* de \mathbf{y} . La distribution *a posteriori* des paramètres (Equation 5) s'écrit donc proportionnellement au produit de la distribution *a priori* des paramètres $\mathbf{P}(\Theta)$ et de la vraisemblance des données $\mathbf{P}(\mathbf{y}|\Theta)$:

$$\mathbf{P}(\Theta|\mathbf{y}) \propto \mathbf{P}(\Theta) \mathbf{P}(\mathbf{y}|\Theta) \quad \text{(Equation 5)}$$

Donc, la distribution de probabilité peut être définie comme une fonction associant les valeurs prises par une variable considérée comme aléatoire (données observables ou non-observables, regroupées sous la notation Θ) à leur probabilité de réalisation. Les incertitudes sur les valeurs de ces variables se quantifient par les distributions de probabilités *a priori* $\mathbf{P}(\Theta)$, permettant de définir des intervalles de valeurs possibles. Elles sont ensuite mises à jour par de nouvelles données expérimentales (\mathbf{y}) pour donner une distribution de probabilité *a posteriori* ($\mathbf{P}(\Theta|\mathbf{y})$). La forme de la vraisemblance dépend du modèle d'erreur et du modèle déterministe adopté. Dans le cas de cette thèse, le modèle déterministe est un modèle PBTK (Figure 17) et dans le cas d'études de cinétique, le modèle d'erreur est souvent le modèle log-normal, utilisé pour décrire l'erreur analytique de telles mesures.

L'inférence bayésienne présente de nombreux avantages, d'où son utilisation de plus en plus fréquente en écotoxicologie. Un des avantages est l'utilisation de distributions *a priori*, permettant de résumer l'information disponible dans la littérature sur les paramètres utilisés dans le modèle. Lorsqu'on ne possède pas du tout d'information sur les paramètres, on utilise des distributions *a priori* larges, comme par exemple des lois uniformes. Un autre des avantages de la méthode est de fournir des informations sur les corrélations entre paramètres à travers les distributions *a posteriori* jointes et de pouvoir pallier au problème d'estimation simultanée de tous les paramètres.

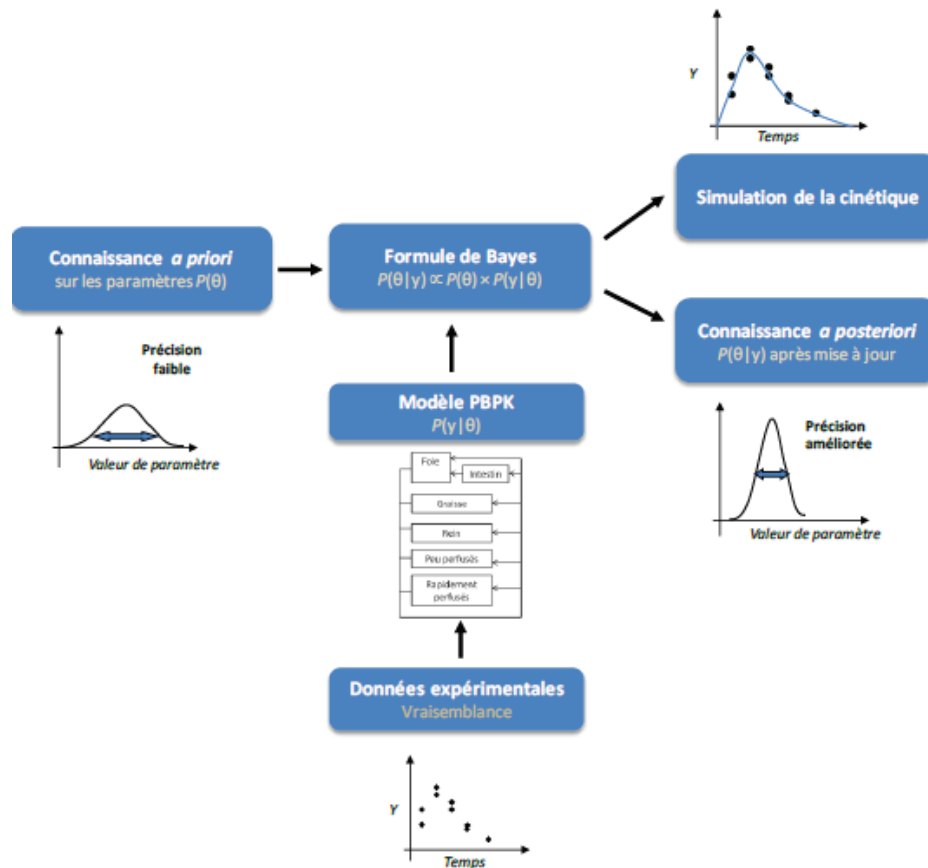


Figure 17. Calibration bayésienne d'un modèle PBTK (Marie-Emilie Willemin, 2014).

3.2.2.4 Méthodes de simulation

Comme mentionné précédemment, il est difficile d'obtenir une solution analytique pour ce genre de modèle, dû à la complexité des distributions *a posteriori* et des équations du modèle PBTK. Dans ce cas, les méthodes de Monte Carlo par chaînes de Markov (MCMC) sont souvent utilisées pour échantillonner des valeurs de paramètres issus de la distribution *a posteriori* sans connaître l'expression analytique de cette dernière (Brochot, Willemin & Zeman, 2014). Plusieurs algorithmes ont été proposés pour construire des chaînes MCMC. Les plus utilisés pour la calibration de modèles PBTK sont l'algorithme de Metropolis-Hastings et l'échantillonnage de Gibbs, pour lequel la connaissance de l'expression analytique des lois de distributions conditionnelles de chaque variable du modèle en fonction des autres variables et des données est requise (Brochot, Willemin & Zeman, 2014). Pour vérifier la convergence vers une même valeur, plusieurs chaînes sont simulées (souvent trois) et analysées par diverses méthodes, comme la méthode de Gelman et Rubin (1992) qui compare la variance intra-chaîne et inter-chaîne.

3.2.2.5 Evaluation des modèles PBTK

L'évaluation est cruciale dans le développement d'un modèle PBTK. Elle vise à apprécier la fiabilité de celui-ci et sa capacité à prédire ou expliquer correctement le comportement des produits chimiques d'intérêt (Chiu *et al.* 2007). En effet, une mauvaise paramétrisation peut induire des biais dans les calculs des processus de TK et donc de la dose interne modélisée. Comme expliqué par (Brochot, Willemin & Zeman, 2014), l'évaluation du modèle peut se faire de différentes manières, en vérifiant :

- 1) la structure du modèle, qui doit être en accord avec les connaissances physiologiques et anatomiques de l'espèce d'intérêt,
- 2) la conservation de la masse et des flux sanguins : respectivement, la somme des volumes de tissus doit être inférieure ou égale au poids corporel et la somme des flux sanguins de chaque tissu doit être égale au débit cardiaque,
- 3) l'ajustement des prédictions aux données expérimentales. La méthode la plus utilisée consiste à superposer les données expérimentales à la courbe de prédiction du modèle et quantifier l'écart entre les points observés et prédits, soit par le calcul de la racine carrée de l'erreur moyenne soit par l'écart relatif à la moyenne,
- 4) les estimations des paramètres en comparant les distributions *a priori* et *a posteriori* pour s'assurer de leur cohérence. En effet, les valeurs des paramètres physiologiques doivent être plausibles. Si les distributions sont considérablement différentes, le modèle (valeurs des paramètres ou équations différentielles) peut être remis en question.

3.3 Modèles mécanistiques publiés pour les PFAS

Les modèles multi-compartiments décrivant le devenir des PFAS dans les organismes ont émergé récemment, depuis la prise de conscience sur leur toxicité dans les années 2000. La grande majorité est développée pour les mammifères, à partir de données sur le rat ou le singe, et les modèles poissons demeurent très peu nombreux, les données étant encore rares.

3.3.1 Modèles développés à partir de données mammifères

Généralement, les modèles PBTK développés à partir des mammifères ont pour objectif de contribuer à l'évaluation des risques pour la santé humaine. La plupart sont construits à partir des données obtenues chez le rat (Loccisano *et al.* 2011 ; Worley et Ficher, 2015 ; Cheng et NG, 2017 ; Kim *et al.* 2017) mais il existe aussi des modèles basés sur la physiologie du singe (Loccisano *et al.* 2012 ; Fabrega *et al.* 2014). Même si leur but est commun, chaque modèle a un objectif particulier.

Par exemple, Kim *et al.* (2017) ont développé leur modèle sur le rat pour connaître l'influence du sexe sur les effets liés à une exposition au PFHxS. Loccisano *et al.* (2011) ont examiné les effets de la gestation et de la lactation sur la toxicocinétique du PFOS et du PFOA chez la ratte afin d'extrapoler le modèle à la femme enceinte. Ce modèle est fondé sur la description de la réabsorption rénale, de la fraction libre des PFAS dans le plasma et de la liaison saturable dans le foie. D'après leurs recherches, la toxicocinétique du PFOS et du PFOA est sensible aux paramètres régissant la réabsorption rénale, suggérant que ce phénomène est en partie responsable de la longue demi-vie de ces composés. Worley et Fisher (2015) ont axé leur travail sur le rôle des transporteurs rénaux dans la toxicocinétique du PFOA chez le rat. L'élimination rénale est significativement différente chez le mâle par rapport à la femelle. Cette différence de demi-vie proviendrait de l'expression des OAT qui n'est pas la même selon le sexe. Cheng et Ng (2017) ont également développé un modèle PBTK chez le rat, en utilisant les perméabilités membranaires comme facteur limitant la distribution du PFOA et en prenant également en compte les liaisons des PFAS avec les FABP et l'albumine.

3.3.2 Modèles développés à partir de données poissons

Le modèle PBTK développé par Nichols *et al.* (1990) est la référence de la plupart des modèles développés sur le poisson (Figure 15). A partir de celui-ci, Ng et Hungerbühler ont conçu, en 2013, le premier modèle multi-compartiments, afin de décrire la bioaccumulation de certains PFSA et PFCA (PFOA, PFDA, PFUnDA, PFDoDA, PFHxS, et PFOS) (Figure 18). Ce modèle, développé pour la truite arc-en-ciel, comporte 10 compartiments, dont les graisses, le muscle, le foie et le rein, sont divisés en deux sous-compartiments : le fluide et le tissu. L'eau est la seule voie d'exposition aux PFAS et l'absorption par les ouïes est régie par trois processus souvent pris en compte dans les modèles de bioaccumulation chez le poisson : la vitesse de ventilation (débit d'eau à travers les branchies), la diffusion (transport du composé à travers la membrane branchiale) et la perfusion (débit sanguin à travers les branchies). Une fois le composé dans le sang, seule la fraction libre se diffuse vers les compartiments tissulaires. Dans ce modèle, les auteurs ont considéré l'association des PFAS avec l'albumine sérique ainsi qu'avec les L-FABP, l'élimination par l'urine, mais également la réabsorption rénale facilitée par les OAT. Toutes les prédictions du modèle ont été évaluées en les comparant avec les données expérimentales des études de Martin *et al.* (2003) d'une part, dans laquelle des truites arc-en-ciel juvéniles ont été exposées à de l'eau contaminée par un mélange de PFSA et PFCA (PFPA, PFHxA, PFHpA, PFOA, PFDA, PFUnDA, PFDoDA, PFTA, PFBS, PFHxS et PFOS) et de Inoue *et al.* (2012) d'autre part, dans laquelle des carpes ont été exposées à de l'eau contaminée à un mélange de PFAS similaire (PFOA, PFUnDA, PFDoDA, PFTA, PFHxA, PFODA, PFOS). Cependant, les auteurs n'ont pas développé leur modèle ni à partir des flux sanguins relatifs aux organes, ni à partir de coefficients de partage entre le sang ou le plasma et les tissus, mais à partir des volumes des organes, des

concentrations d'albumine et d'une estimation de la concentration de L-FABP. Puisque ce modèle n'est pas basé entièrement sur des processus physiologiques, il est désigné comme modèle semi-physiologique (Grech *et al.* 2017).

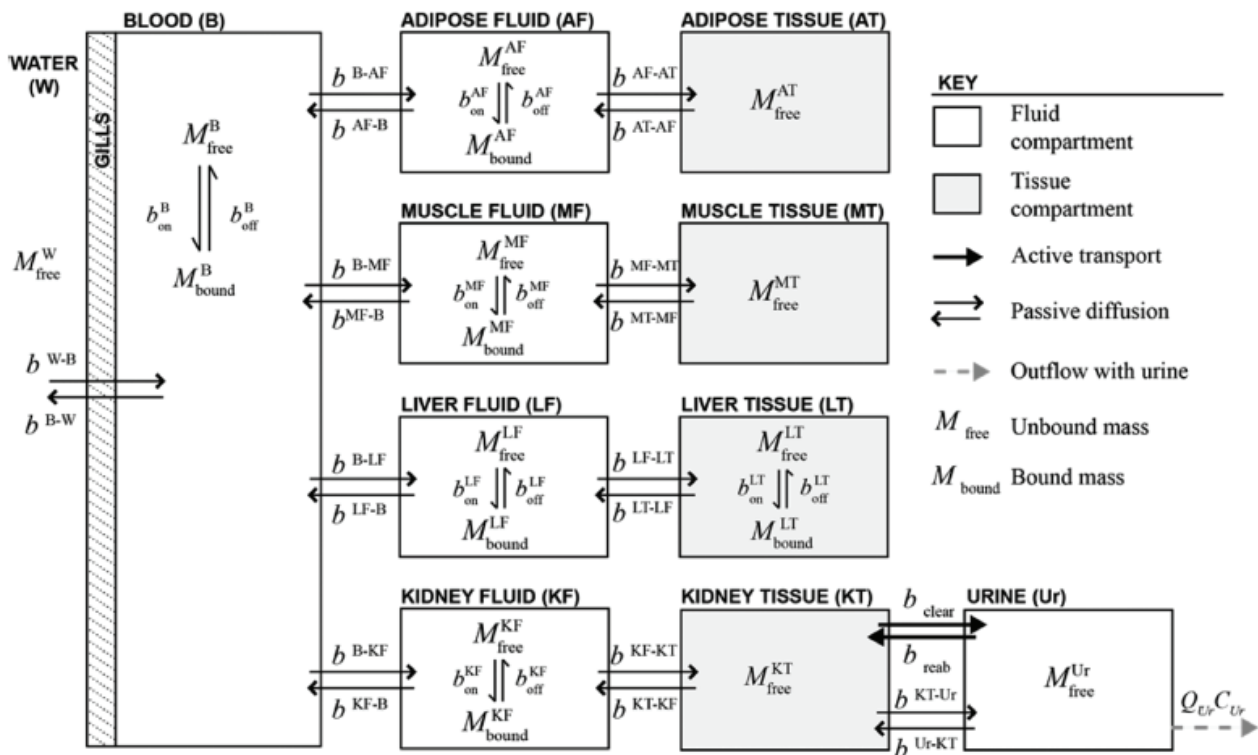


Figure 18. Schéma conceptuel du modèle de Ng et Hungerbühler (2013).

En outre, sans en préciser la raison, Ng et Hungerbühler (2013) n'ont pas utilisé les résultats de l'étude de Jones *et al.* (2003), qui était la seule étude à s'être intéressée aux interactions des PFAS avec les protéines plasmatiques chez le poisson (Jones *et al.* 2003). Depuis, Zhong *et al.* (2019) ont apporté des données supplémentaires sur les constantes d'affinité de certains PFAS avec les protéines sériques de la carpe (*Cyprinus carpio*). En revanche, aucune étude ne s'est actuellement intéressée aux interactions des PFAS avec les L-FABP. Ce manque de données mécanistiques chez les poissons a ainsi contraint Ng et Hungerbühler (2013) à utiliser celles issues de mammifères, principalement le rat, pour paramétrer les liaisons des PFAS à ces protéines. De la même manière, les mécanismes de sécrétion et de réabsorption rénales étaient basés sur les activités mesurées des transporteurs membranaires de rat. Certaines études ont démontré que les poissons possédaient des OAT (Popovic *et al.* 2010 ; Popovic *et al.* 2014 ; Steiner *et al.* 2014) mais aucune n'a été menée spécifiquement pour les PFAS. Leur modèle a tout de même permis de prédire la distribution tissulaire des PFAS et les meilleures simulations des concentrations de PFAS ont été obtenues dans le foie et dans le sang, tissus les mieux renseignés en terme d'interactions avec les protéines. Ceci souligne la faisabilité d'une extrapolation inter-espèce pour ces données afin d'expliquer la toxicocinétique des PFAS testés. Pour le PFHxS en revanche, les prédictions étaient mauvaises à la

fois dans le foie, le rein, le muscle, le tissu adipeux et le sang, faute de données. Par ailleurs, le profil de distribution des PFAS dans le rein diffère des données expérimentales sur la truite de Martin *et al.* 2003. Il est donc probable que les processus de clairance et de réabsorption ne soient pas aussi importants ou ne fonctionnent pas de la même manière chez la truite que chez le rat.

Les auteurs ont souligné que la qualité des prédictions de leur modèle étaient limitées par le manque d'informations sur l'élimination rénale des PFAS chez les poissons. Consoer *et al.* ont publié en 2014 et 2016 deux travaux répondant à ces besoins (*cf.* partie 2.5). Pour rappel, leur première recherche traite, entre autres, de la contribution des voies d'élimination urinaire et branchiale du PFOA chez la truite arc-en-ciel adulte (Consoer *et al.* 2014) et la seconde étudie celle pour le PFOS (Consoer *et al.* 2016). Afin d'obtenir les concentrations dans l'urine et l'eau expirée, les poissons ont été canulés permettant de calculer les clairances rénale et branchiale des deux composés. Ces données ont permis à Armitage *et al.* (2016) de paramétrer une nouvelle fois le modèle de Ng et Hungerbühler (2013) pour améliorer la prédiction du comportement du PFOS et du PFOA. Une meilleure concordance est obtenue en ajustant la constante de perméabilité des branchies d'un facteur 15. Par ailleurs, la vitesse d'élimination rénale déterminée par Consoer *et al.* (2014 et 2016) est bien prédite en élevant 25 fois celle du PFOA par rapport à la valeur estimée par Ng et Hungerbühler (2013) et seulement 1.6 celle du PFOS. Cependant, l'élimination fécale n'est pas prise en considération dans ces modèles. A partir du modèle initial de Ng et Hungerbühler (2013) et sur la base de la paramétrisation proposée par Armitage *et al.* 2016, Mittal et Ng (2018) intègrent ce processus dans un nouveau modèle. Ils considèrent non plus une absorption par l'eau mais une absorption par voie alimentaire qu'ils modélisent par l'introduction du composé directement dans le sang. La totalité de la substance atteint donc la circulation sanguine qui transporte le composé directement dans le compartiment *féces* du modèle (Figure 19). Celui-ci résulte du mélange des déchets biliaires et de la nourriture non digérée. Même si l'intraveineuse n'est pas une voie d'absorption réaliste, il s'agit du premier modèle toxicocinétique à incorporer la biotransformation d'un précurseur du PFOA, l'acide fluorotélomère carboxylique 8:2 (8:2 FTCA) et à prévoir simultanément la distribution du précurseur et du métabolite dans différents tissus du poisson. Globalement, ce modèle prédit correctement les concentrations des composés dans les différents tissus ainsi que dans les *féces*, mais pas dans le foie. En perspective, les auteurs suggèrent de prendre en compte l'évolution de la masse de l'organe, affectant la surface du foie, et la quantité des protéines disponibles, paramètres importants pour les échanges chimiques.

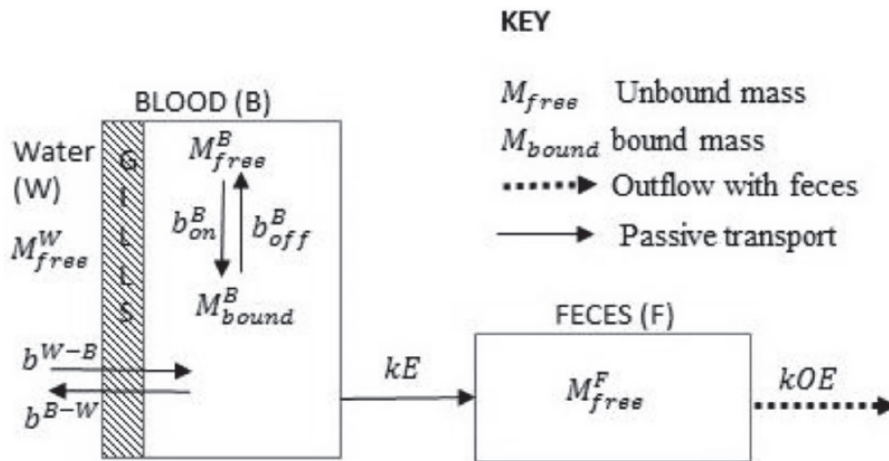


Figure 19. Modèle de Mittal et Ng (2018) avec un compartiment fèces.

Un troisième modèle multi-compartiments semi-physiologique a été développé par Khazaei et Ng en 2018, pour modéliser la biotransformation du 8:2FTCA en PFOA, chez le poisson zèbre. La structure de celui-ci, reprise du modèle de Ng et Hungerbühler (2013), inclut l'ajout du cycle entéro-biliaire, facilité par des transporteurs membranaires. Ce processus a été modélisé avec des données issues du rat.

3.3.3 Limites des modèles mécanistiques développés pour les PFAS chez le poisson

Les modèles mécanistiques décrits dans ce chapitre prédisent de manière satisfaisante les concentrations des PFAS d'intérêt dans les divers organes analysés. Cependant, ces derniers ne sont pas considérés comme physiologiques, car les transferts des composés ont été décrits non pas par les flux sanguins mais par des constantes de diffusion entre le sang et les tissus (Grech *et al.* 2017). De plus, les auteurs soulignent le manque de données des constantes d'association entre les PFAS et les protéines d'intérêt chez le poisson ainsi que des informations sur le rôle des transporteurs membranaires dans la bioaccumulation des PFAS. La disponibilité de ces données permettrait de se rapprocher de la physiologie des poissons et ainsi d'améliorer les concentrations en PFAS, actuellement mal prédites dans certains organes. Par ailleurs, l'absorption des PFAS par voie alimentaire a été représentée par injection intraveineuse, avec donc l'hypothèse que la totalité du composé était absorbée dans la circulation systémique (Mittal et Ng, 2018). Néanmoins, cette approche est artificielle et les auteurs n'ont pas représenté le GIT. Aussi, malgré les études réalisées et les modèles développés pour étudier la TK des PFAS chez le poisson, l'importance de chaque voie d'élimination est encore controversée. Enfin, certains paramètres tels que la température de l'eau ou la croissance peuvent modifier la bioaccumulation (*cf.* partie 2.6). Mise à part le modèle générique développé par Grech *et al.* (2019), les modèles PBTK ne prennent pas en compte ces deux variables chez le poisson.

Résumé du chapitre 1 « Synthèse bibliographique »

Le chapitre 1 recense les connaissances disponibles de la littérature des thèmes abordés dans cette thèse, de la bioaccumulation des PFAS à leur modélisation.

Les **PFAS** sont d'origine exclusivement anthropique et sont utilisées pour de nombreuses et diverses applications dans le domaine industriel et domestique. Leur structure chimique leur confère une extrême stabilité dans l'environnement et leur utilisation massive engendre la présence ubiquiste de certains PFAS. Après avoir découvert que ces substances se bioaccumulaient dans les organismes aquatiques, les scientifiques se sont intéressés à leur **toxicocinétique** afin de mieux comprendre leur comportement. A l'heure actuelle, ces recherches sont encore peu nombreuses chez le poisson et certains mécanismes ADME régissant le devenir des PFAS demeurent méconnus.

Chez le poisson, il existe deux voies d'entrée principales pour les produits chimiques : l'eau absorbée par les branchies et la nourriture pénétrant par le tractus gastro-intestinal. La distribution des composés chimiques au sein d'un organisme est dépendante du débit sanguin de l'organe, de sa composition, de l'état d'ionisation de la molécule, de ses affinités avec les protéines et les lipides, la perméabilité des membranes et l'existence de barrières naturelles de l'organisme. Selon les propriétés de la substance, l'élimination s'opère généralement par la bile, l'urine, les fèces ou les branchies. La TK d'un composé est par ailleurs influencée par les facteurs environnementaux. Pour les organismes aquatiques poïkilothermes, la **température de l'eau** est un déterminant clé impactant plusieurs processus physiologique (débit cardiaque, vitesse de ventilation, ...). Les PFAS, contrairement aux HAP et PCB, s'accumulent davantage dans le sang et le foie, dû à leur affinité particulière pour l'albumine plasmatique et les L-FABP. Cependant, il est difficile d'obtenir des informations sur les contributions des différentes voies d'absorption et d'élimination via des expérimentations *in vivo* ou *in situ*. Actuellement, les limites des connaissances TK sont dues au manque de données sur :

- les affinités entre les PFAS et les protéines d'intérêt,
- les voies et les mécanismes d'élimination,
- l'influence des facteurs environnementaux sur le devenir des PFAS.

Pour pallier ces questionnements, les modèles mécanistiques se révèlent être des outils performants pouvant tester différentes hypothèses. Les **modèles PBTK**, en s'appuyant de manière plus ou moins fine sur l'anatomie et la physiologie d'une espèce modèle, permettent de décrire le comportement d'un contaminant d'intérêt au sein de celui-ci. Les modèles multi-compartiments applicables à la TK unique des PFAS sont peu nombreux chez le poisson (Ng et Hungerbühler, 2013 ; Mittal et Ng, 2018) et sont considérés comme semi-physiologiques. Les prédictions des concentrations de PFAS dans les divers organes de ces modèles sont relativement satisfaisantes. Cependant ces modèles sont paramétrés sur des données mammifères et plusieurs questions mécanistiques restent en suspens.

Objectifs

Objectifs

Comme mentionné dans le chapitre précédent, les études sur le comportement environnemental des PFAS sont récentes. La première à avoir abordé la distribution du PFOS dans l'environnement a été publiée en 2001 (Giesy et Kannan, 2001). L'ubiquité de ce composé a déclenché un intérêt grandissant de la part des scientifiques pour la compréhension de la TK des PFAS. Ces travaux ont apporté des informations solides sur la bioaccumulation de ces composés, mais ils sont encore trop rares chez les organismes aquatiques pour pouvoir comprendre certains mécanismes d'absorption, de distribution et d'élimination, tels que la contribution des voies d'entrée et de sortie des PFAS chez les poissons.

En outre, il a été démontré que certains perfluorés, bien que structurellement similaires, présentaient une cinétique différente chez le poisson (Martin *et al.* 2003). Les groupements fonctionnels terminaux et le nombre total de carbones fluorés en sont en partie responsables, mais les mécanismes restent à déterminer. Néanmoins, les approches expérimentales sont parfois insuffisantes pour répondre aux questionnements sur les processus en jeu. Dans ce cas, l'utilisation des modèles peut s'avérer pertinente et adéquate. Dans le cas des PFAS, peu de modèles ont été développés pour décrire leur devenir chez le poisson. Les rares modèles existant sont considérés comme semi-physiologiques car ils sont basés sur l'hypothèse d'une diffusion simple du composé entre sang et tissu. Par ailleurs, les facteurs environnementaux, tels que la température, influencent les processus ADME chez les poïkilothermes comme le poisson. Il est donc important de connaître leurs effets sur le devenir des contaminants. A ce jour, aucune étude n'a été réalisée sur l'impact des variations des paramètres abiotiques dans le cas des PFAS.

Par conséquent, l'objectif principal de cette thèse était d'améliorer les connaissances relatives à l'absorption, la distribution et l'élimination de certaines substances perfluoroalkyles chez le poisson en développant un modèle PBTK pertinent pour l'évaluation des risques environnementaux. Plus en détails, les objectifs de cette thèse étaient :

- i) d'obtenir les données expérimentales nécessaires pour modéliser la TK du PFOS, du PFHxS et du PFNA chez la truite arc-en-ciel adulte et ainsi d'incrémenter les données existantes dans la littérature,
- ii) d'améliorer les connaissances sur l'absorption et l'élimination de ces trois perfluorés d'intérêt chez le poisson, en testant différentes hypothèses via un modèle PBTK,
- iii) de se rapprocher au mieux du réalisme environnemental en intégrant le facteur température dans le modèle,
- iv) d'étudier les différences de cinétiques des trois substances choisies.

Chapitre 2

Méthodologie

Chapitre 2. Méthodologie

Cette thèse est articulée autour de deux parties complémentaires : la partie expérimentale et la partie modélisation (Figure 1). Dans ce chapitre, le plan expérimental ayant permis d'obtenir les données relatives à la cinétique du PFOS, du PFHxS et du PFNA est détaillé, suivi de la méthodologie analytique qui a conduit aux dosages chimiques des PFAS dans les différentes matrices.

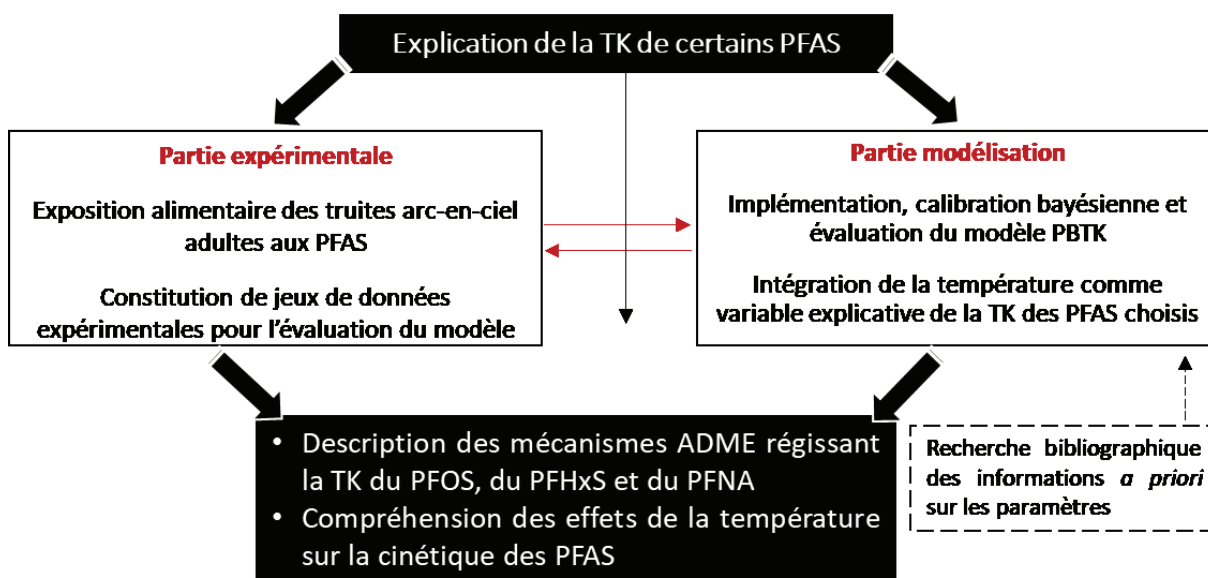


Figure 1. Méthodologie générale de la thèse.

1 Modèle d'étude : la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*)



Figure 2. Truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*).

1.1 Morphologie

La truite arc-en-ciel (Figure 2) fait partie des salmonidés et doit son nom à la couleur de son corps. En effet, le terme *arc-en-ciel* provient de la bande longitudinale rouge pourpre qui parcourt les flancs des yeux à la queue, caractéristique de cette espèce. Chez les mâles adultes, la bande rouge peut être particulièrement vive mais la couleur générale du corps est très variable selon l'âge, le milieu et le stade physiologique. La tête, le dos, les flancs, la nageoire dorsale, la nageoire adipeuse et la queue sont mouchetés de très nombreuses petites taches noires. Le corps d'une truite arc-en-ciel est allongé et fusiforme. Il est constitué de 60-66 vertèbres, 3-4 épines dorsales, 10-12 rayons mous dorsaux, 3-4 épines anales, 8-12 rayons mous anaux, 19 rayons caudaux et le pédoncule caudal est haut. La truite arc-en-ciel possède une tête courte, un museau émoussé, une bouche large de type supère. Selon les régions et le mode de vie, la taille maximale de cette truite atteint 70 cm à 1 m et peut peser au maximum 7 à 10 kg. Plus communément, les individus mesurent de 20 à 35 cm pour un poids moyen (commercial) oscillant entre 300 et 500 g (selon la FFESSM¹).

1.2 Répartition géographique

La truite arc-en-ciel vit principalement en eau douce, dans les eaux fraîches et oxygénées des rivières et des lacs de montagne. Elle peut également vivre en mer avant de revenir frayer en rivières tout en supportant des écarts importants de température. *O. mykiss* s'abrite des courants trop forts derrière des roches, de la végétation ou des souches d'arbre qui créent des zones plus calmes. Le taux d'oxygène doit être compris entre 4 mg L⁻¹ et jusqu'à 7-8 mg L⁻¹ et la température tolérée est comprise entre 0 et 25°C (Figure 3), avec l'optimum autour de 13°C (Raleigh *et al.* 1984).

¹ Fédération française d'études et de sports sous-marins : <http://doris.ffessm.fr/Especies/Oncorhynchus-mykiss-Truite-arc-en-ciel-2308>

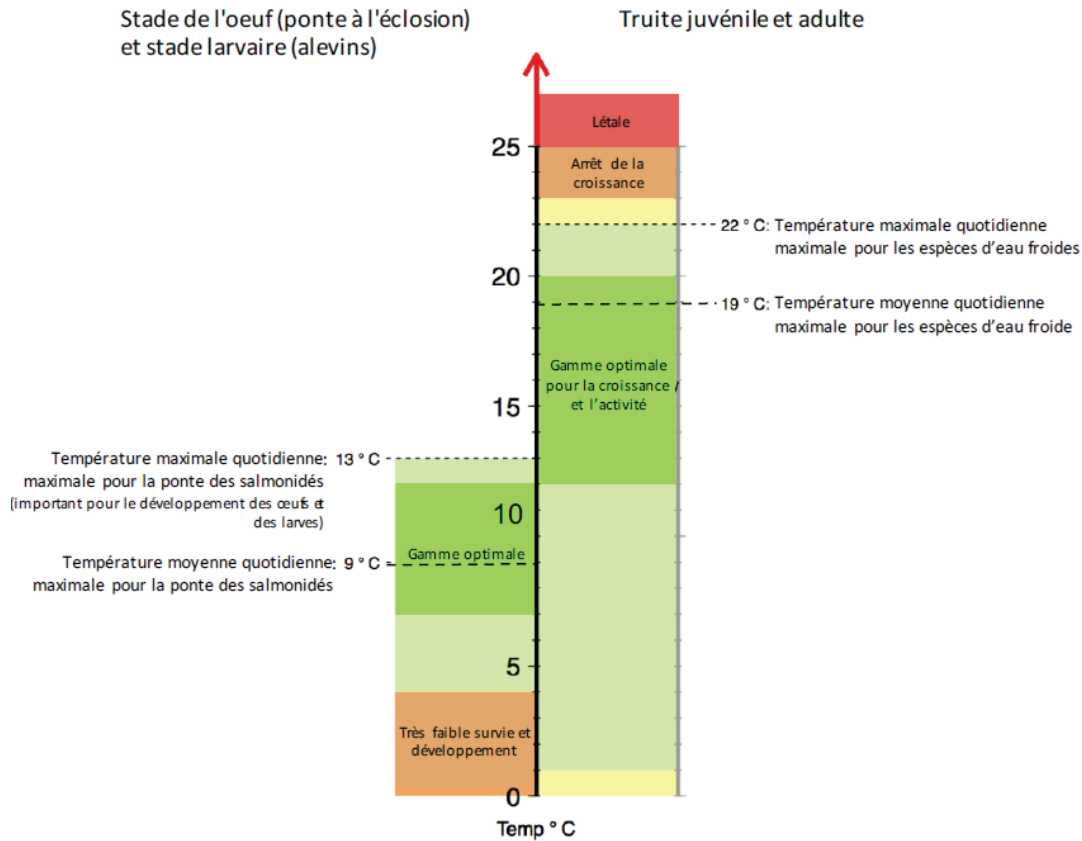


Figure 3. Gammes de températures optimales, tolérées et létales pour la truite arc-en-ciel adulte, juvénile et aux stades larvaires. Figure issue de la thèse d'Audrey Grech, 2018, à partir des données de Raleigh *et al.* (1984).

La truite arc-en-ciel est originaire des cours d'eau nord-américains, s'étendant de l'Alaska jusqu'au Nord du Mexique (MacCrimmon 1971) et a été introduite dans presque tous les pays du monde pour l'intérêt halieutique qu'elle présente : en 1874 sur la côte atlantique des Etats-Unis, en 1879 en France puis en Europe, en 1883 en Nouvelle-Zélande, en 1894 en Australie et en Afrique du Sud. Capable de s'adapter à des conditions de milieux variés, la truite arc-en-ciel est aujourd'hui la première espèce en termes de production piscicole française, ce qui lui confère une importance économique majeure.

1.3 Alimentation et cycle de vie

La truite arc-en-ciel est une espèce carnivore, se nourrissant d'invertébrés aquatiques (chironomes, daphnies et gammarès) et également de petits poissons, d'œufs et de mollusques. Les plus jeunes individus préfèrent le zoobenthos et le zooplancton.

La fraie a lieu dans des cours d'eau froids bien oxygénés, sur des fonds de graviers dans lesquels la femelle crée des lits de gravier où elle dépose les œufs (jusqu'à 2000 ovocytes par kg de leur masse). Le mâle, attiré par les phéromones, recouvre simultanément les œufs d'un nuage de sperme. L'éclosion intervient au bout de quelques semaines à quelques mois, selon les conditions de température. Pour une eau à 10°C, une quarantaine de jours suffisent alors que pour une eau entre 1 et 9°C, deux à trois

mois sont nécessaires (Jalabert et Fostier, 2010). La résorption du sac vitellin a lieu généralement dans les 3 à 7 jours qui suivent l'éclosion et la période d'alevinage s'étend de quelques mois à quelques années (Scott et Crossman 1974). La maturité sexuelle est atteinte au bout de 1 à 2 ans chez les mâles et 2 à 3 ans chez les femelles (Figure 4).

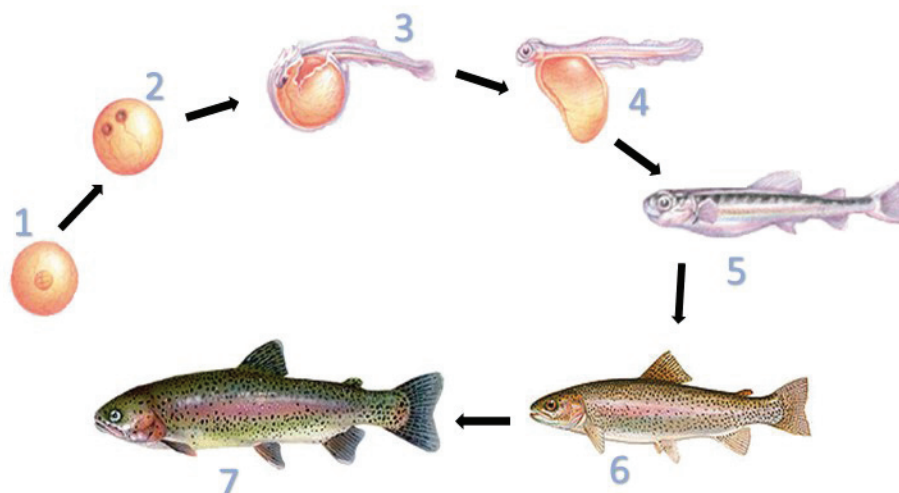


Figure 4. Cycle de vie d'*O. mykiss* de l'œuf au stade adulte. 1. Œuf fécondé (≈4mm) - 2. Œuf oeilé (yeux de l'embryon), 20 jours plus tard - 3. Éclosion de l'œuf et libération de l'alevin hors de sa capsule - 4. Alevin (15 mm) portant son sac vitellin - 5. Stade alevin résorbé, quatre à six semaines plus tard - 6. Stade truitelle, six mois plus tard - 7. Stade adulte.

Certaines truites arc-en-ciel résident toute leur vie dans des eaux douces et ont généralement une durée de vie de 3 ou 4 ans, alors que d'autres, les anadromes, grandissent en eau salée et peuvent vivre de 6 à 8 ans. Les explications de ce comportement migratoire sont encore discutées. Il pourrait être dû à des caractéristiques génétiques particulières de certains individus, à des interactions sociales ou à une réaction adaptative face aux conditions environnementales.

2 Plan expérimental

2.1 Stratégie expérimentale générale

Les expériences mises en place durant cette thèse avaient pour objectif de collecter des données cinétiques pour le PFOS, le PFNA et le PFHxS afin de calibrer notre modèle PBTK et de confronter ses prédictions aux données expérimentales. Pour toutes les expériences, les organes de cinq individus ont été récoltés à chaque temps de prélèvement pour l'analyse chimique. Parallèlement, nous sommes intéressés à l'effet de la variation de la température de l'eau sur la bioaccumulation des perfluorés d'intérêt. Trois expériences d'exposition chez la truite arc-en-ciel adulte, menées à différentes températures (7°C, 11°C et 19°C), ont donc été réalisées. Pour des raisons d'organisation et

de partenariat, la première expérience s'est déroulée à l'INRA de Thonon-les-bains (Haute-Savoie, France) et les deux autres à la plateforme expérimentale d'Irstea de Saint-Seurin-sur-l'Isle (Gironde, France). Ces trois expériences ont été basées sur le protocole OCDE 305 et les conditions expérimentales ont été principalement inspirées de l'étude de Goeritz *et al.* (2013). Les eaux alimentant les bassins expérimentaux ont été analysées pour connaître d'une part, les teneurs initiales en PFAS, et d'autre part, les caractéristiques physico-chimiques, par l'équipe chimie de l'INRA de Thonon-les-bains et par le laboratoire de chimie des milieux aquatiques (LAMA) d'Irstea Lyon-Villeurbanne. Les paramètres mesurés sont la conductivité et les teneurs en ions Cl^- , SO_4^{2-} , Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , NO_2^- , NO_3^- . Durant la période expérimentale, les valeurs de la température, du pH et de l'oxygène dissous étaient mesurés quotidiennement. Toutes ces informations sont regroupées en Annexe du chapitre 3.

2.2 Expérience réalisée à 11°C – Plateforme expérimentale INRA

200 truites arc-en-ciel (*O. mykiss*) calibrées à 280 g et âgées d'environ 15 mois nous ont été fournies par la pisciculture de Rives (Thonon-les-Bains). La moitié des individus a été transférée dans le bassin témoin, et l'autre dans le bassin contaminé. Les bassins expérimentaux, en polyester et de dimensions 2*3.2*1 m, étaient en intérieur (Figure 5). Ils fonctionnent en circuit ouvert pour permettre un maximum de réoxygénation de l'eau et sont alimentés principalement par l'eau du lac Léman (51 m de profondeur) et par une eau de source pour assurer la meilleure oxygénation possible (débit de sortie : 0.5 L s^{-1}). La température de l'eau était celle du mélange, stabilisée à $10.6^\circ\text{C} \pm 0.46$. Afin d'éviter toute contamination du milieu naturel, un bac contenant du charbon actif a été installé en sortie du bassin contaminé. Celui-ci avait pour but de piéger les perfluorés potentiellement relargués dans l'eau par les fèces, l'urine ou l'aliment directement.

Afin de limiter les contaminations extérieures en PFAS, nous nous sommes assurés d'utiliser seulement des outils en inox pour les dissections, stérilisés à chaque utilisation. Aussi, tous les échantillons (eau, nourriture, organes, fèces) ont été stockés dans des contenants en polyéthylène (PE) ou polypropylène (PP).



Figure 5. Bassins expérimentaux (contaminé et témoin) de la station expérimentale de l'INRA, Thonon-les-Bains.

Toutes les truites étaient nourries une fois par jour et la quantité d'aliment à distribuer nous a été conseillée par le fournisseur et calculée grâce à des abaques prenant en compte la température de l'eau ainsi que la masse du poisson. Pour cette expérience, les poissons étaient alimentés quotidiennement à un taux de 1.5% de la biomasse totale. Les truites ont été acclimatées pendant trois semaines avant le début de l'exposition. Les individus dans le bassin contaminé ont reçu de l'aliment dopé avec un mélange de deux perfluorés, le PFOS et le PFHxS, pendant 28 jours. Puis, les individus ont été soumis à une phase de dépuración de même durée, durant laquelle les individus recevaient de la nourriture commerciale non contaminée. Les truites témoins ont été nourries quant à elles, avec de l'aliment non dopé tout au long de l'expérience, soit 56 jours.

Pour construire le profil toxicocinétique du PFOS et du PFHxS, 5 individus du bassin contaminé ont été prélevés de manière aléatoire à l'aide d'une épuisette aux jours 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49 et 56. Chaque prélèvement s'effectuait 24h après la dernière prise de nourriture et avant celle du jour même. Les poissons étaient ensuite placés dans un bac contenant une solution d'anesthésiant (3mL d'une solution huileuse d'eugéno:éthanol 10% dans 10L d'eau) avant d'être pesés, mesurés puis euthanasiés par un coup de cutter au niveau de la nuque pour disloquer les vertèbres. Lors de la dissection, le foie, le muscle, le sang, le cerveau, les viscères, et les gonades ont été pesés et échantillonnés (Annexe du chapitre 3). Le sang a été transféré dans des tubes en PP pré-remplis d'EDTA pour éviter la coagulation. Les truites témoins étaient pesées et mesurées à chaque temps de prélèvement, puis remises dans un

troisième bac, afin de conserver la même densité dans les bacs témoin et d'exposition. Par ailleurs, les fèces ont été récoltées à chaque temps mentionné précédemment dans le fond du bac, formant un pool d'excrément pour les mesures de PFOS et de PFHxS. Tous les échantillons ont été conservés au congélateur à -20°C avant analyses. Cette première expérience préliminaire (Figure 6) a permis de préciser, à la marge, les modalités expérimentales ultérieures.



Figure 6. Etapes de prélèvements : 1. Pêche aléatoire des individus, 2. Anesthésie, 3. Pesée, 4. Mesure, 5. Prise de sang. 6, 7 et 8. Prélèvements des organes.

2.3 Expériences réalisées à 7°C et à 19°C – Plateforme expérimentale Irstea

Pour éviter les contraintes techniques liées au maintien de la température de l'eau en grand volume, nous n'avons pas réalisé ces expériences simultanément et avons préféré nous aligner sur les périodes hivernale et printanière. Par conséquent, la première expérience, à 7°C, s'est déroulée de janvier à mars 2017 et la seconde, à 19°C, d'avril à juin 2018. Les truites arc-en-ciel (*O. mykiss*) calibrées à 280 g et âgées d'environ 15 mois comme pour l'expérience préliminaire, provenaient de la pisciculture du Moulin de Boissonnie (Douzillac). Les individus ont été transférés dans des bassins expérimentaux extérieurs (mais abrités par des filets), en résine et de dimensions 2*2,7*1 m (Figure 7). Le comité d'éthique en charge d'expertiser le protocole des expériences 7°C et 19°C a émis de plus nombreuses réserves que celui affilié à l'expérience 11°C, nous limitant à 15 truites témoins et 55 individus contaminés.

Les bassins expérimentaux fonctionnent en circuit ouvert et sont alimentés principalement par l'eau de la rivière Isle avec des ajouts éventuels d'eau de forage selon la température souhaitée, avec un débit de 0.5 L sec⁻¹. Un ajustement de la température a été nécessaire durant les expériences. Au mois de janvier, nous avons utilisé l'eau de forage en faible proportion pour réchauffer celle de la rivière dans les bassins. En février et mars, les températures hivernales étaient plus élevées que les moyennes de saisons. Nous avons donc dû refroidir l'eau des bassins en mettant en place un système de bac tampon placé en amont des bassins expérimentaux, dans lequel l'eau de rivière qui l'alimentait était refroidie par un système de climatisation, avant d'être distribuée aux bassins expérimentaux. Pour l'expérience conduite à 19°C, des ajouts de l'eau de forage ont été suffisants pour maintenir l'eau à 18.6°C ± 0.41.

Tout comme dans la première expérience, les poissons ont été nourris quotidiennement durant l'intégralité de la manipulation avec une quantité de 0.5% et de 1% de la biomasse totale, à 7°C et 19°C respectivement. Les individus se trouvant dans le bassin contaminé, ont reçu de l'aliment dopé avec un mélange des trois perfluorés (PFOS, PFHxS et PFNA), pendant 42 jours. Les individus ont ensuite été soumis à une phase de dépuración de 35 jours, durant laquelle ils ont reçu de la nourriture non contaminée. Les truites témoins ont été nourries quant à elles, avec de l'aliment non dopé tout au long de l'expérience, soit 77 jours. Afin d'établir le profil toxicocinétique du PFOS, du PFHxS et du PFNA, 5 individus du bassin contaminé ont été prélevés aux jours 0, 7, 14, 28, 42, 49, 56, 63, 70 et 77. Chaque prélèvement s'effectuait 24h après la dernière prise de nourriture et avant celle du jour même. Le même protocole que celui illustré pour l'expérience 11°C (Figure 6) a été appliqué pour récupérer les organes d'intérêt : le foie, le muscle, le sang, le cerveau, les viscères, les gonades, et les reins en complément. Les truites témoins étaient pesées et mesurées à chaque temps de prélèvement. Comparé à l'expérience préliminaire, les excréments n'étaient plus récupérés dans le fond du bac mais directement

dans les viscères des poissons, constituant ainsi des échantillons individuels. La totalité des échantillons ont été conservés dans un congélateur à -20°C avant analyses des trois PFAS.



Figure 7. A. Bassins expérimentaux de la plateforme d'Irstea de St-Seurin-sur-l'Isle avec les bassins témoin et contaminé en blanc et le bac tampon en noir. B. Arrivée d'eau des bassins témoin et contaminé.

2.4 Récapitulatif du design expérimental

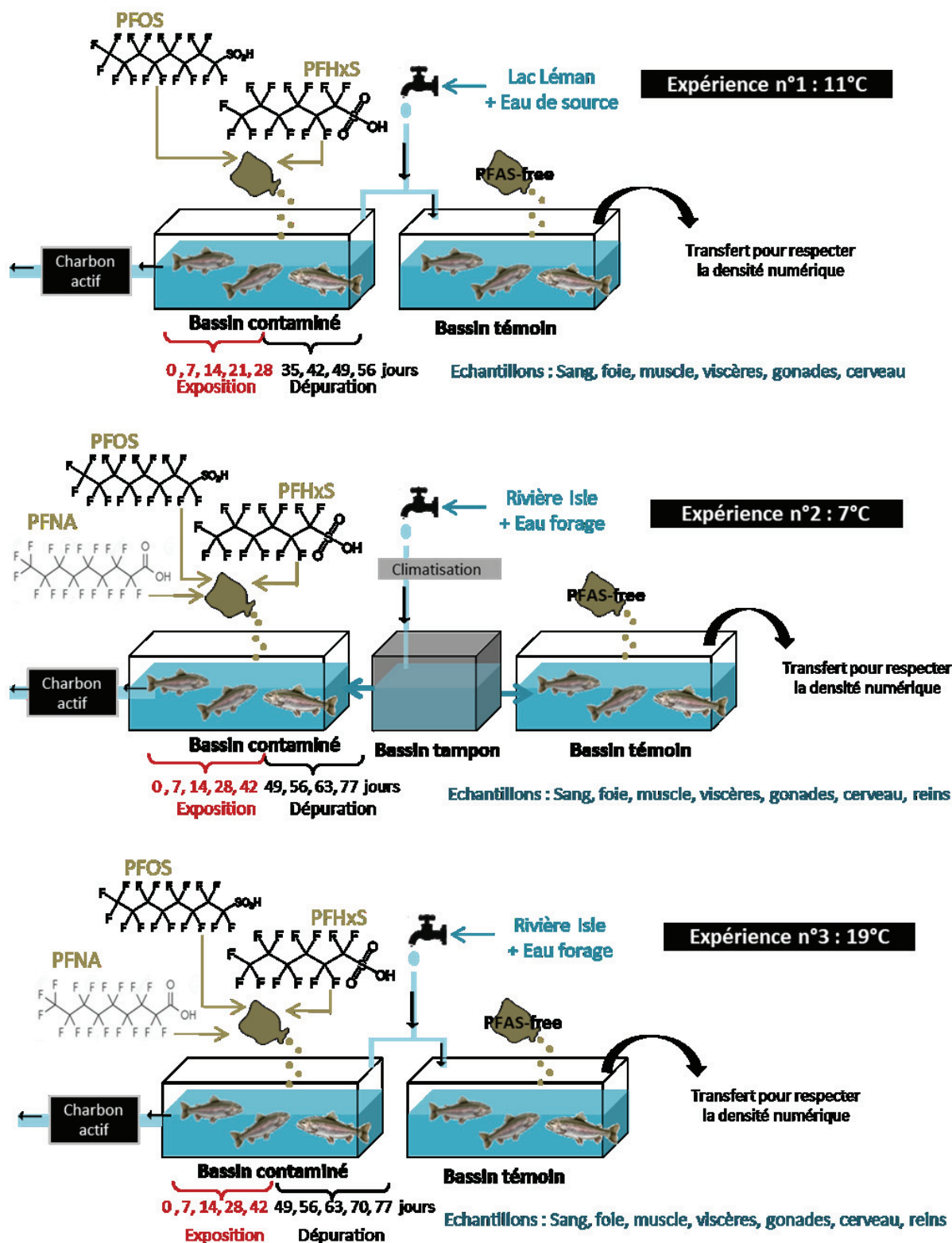


Figure 8. Récapitulatif du design expérimental des trois expériences d'exposition aux PFAS menées au cours de cette thèse.

3 Contamination de la nourriture

3.1 Description de l'aliment utilisé

La nourriture utilisée pour les expériences (Turbot Label Rouge-flot, Le Goessant) se présente sous forme de granulés de 3 mm de diamètre. Nous avons privilégié ce diamètre plutôt qu'un plus gros en émettant l'hypothèse que les PFAS pénétreraient plus facilement si la surface était plus petite. Les granulés sont composés de farine de poissons, de blé, de protéine de pois, de gluten de maïs, d'huile de poissons, d'amidon de pois et de gluten de blé avec les caractéristiques suivantes : 55% de protéine brute, 12% de matière grasse brute, 0.43% de cellulose brute, 12.49% de cendres brutes, 3.05% de calcium, 1.90% de phosphore total, 0.84% de sodium et des additifs (vitamines A, D3, E et C ; gallate de propyle et oligo-éléments : E4 Cuivre, E1 Fer, E6 Zinc, E5 Manganèse et 3b201 Iode).

3.2 Choix des PFAS d'intérêt

Comme expliqué dans le premier chapitre de ce manuscrit, les PFAS offrent un large panel de structures chimiques. Nous avons sélectionné des substances qui combinaient faisabilité analytique (composés détectables et quantifiables dans les matrices visées), disponibilité commerciale et intérêt scientifique (identifiés dans l'environnement).

En raison de l'utilisation massive historique des produits à base de PFOS, ce composé reste prédominant dans l'environnement (Land *et al.* 2018) et de nombreuses études toxicocinétiques et toxicodynamiques sont disponibles, utile pour le développement du modèle PBTK. Le PFHxS, qui se bioaccumule dans les organismes aquatiques (Martin *et al.* 2003 ; Goeritz *et al.* 2013), a également été sélectionné pour compléter les connaissances de toxicocinétique sur les alternatives fluorées. Par ailleurs, les modèles développés actuellement prédisent encore mal son devenir (Ng et Hungerbühler, 2013). Dans un second temps, nous nous sommes tournés vers les substances polyfluoroalkyléthers pour lesquelles les connaissances des risques et des dangers sont encore inexistantes alors que leur usage s'accroît (Wang *et al.* 2013 ; Krafft *et al.* 2015 ; Shi *et al.* 2015). Nous avons sélectionné deux composés dans cette famille : le composé Novec 1230 (CAS : 756-13-8), comportant un groupement cétone et utilisé dans les mousses anti-incendie à la place du PFOS et le composé Gen-X (CAS : 62037-80-3), alternative au PFOA. Malheureusement, compte tenu de leur point d'ébullition bas (avoisinant les 50°C), ces deux substances ne sont pas détectables par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse. Ainsi, nous avons décidé de rester dans la famille des perfluoroalkyles. Le choix s'est porté sur le PFNA, homologue carboxylé du PFOS (Figure 9). Le PFNA est lui aussi retrouvé dans l'environnement et se bioaccumule dans les organismes (Martin *et al.* 2003 ; Goeritz *et al.* 2013 ; Babut

et al. 2017). Les différences toxicocinétiques entre les PFSA et PFCA pourront ainsi être expliquées par le modèle.

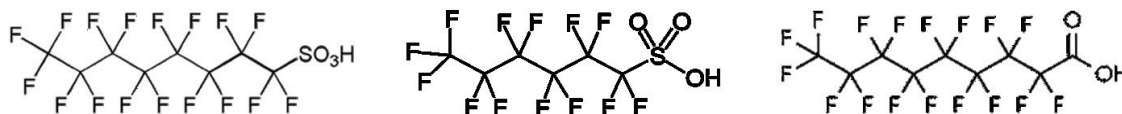


Figure 9. PFAS sélectionnés pour cette thèse : PFOS (gauche), PFHxS (milieu) et PFNA (droite).

3.3 Mise au point du protocole de contamination de la nourriture

Des tests préliminaires de contamination de la nourriture ont été réalisés sur le PFOS et le PFHxS afin de connaître le pourcentage de perte du mélange de perfluorés choisis, une fois les granulés plongés dans l'eau.

3.3.1 Choix des concentrations de contamination

Une concentration nominale de 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$ a été retenue, en référence à l'étude de Goeritz *et al.* (2013). Afin d'encadrer cette valeur, la gamme de concentrations 300 – 400 – 500 – 750 – 1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ a été testée sur une petite quantité d'aliments (25g). La concentration nominale est généralement supérieure à celle retrouvée dans l'environnement (Babut *et al.* 2017). En effet, cette concentration a été déterminée de manière à ce qu'elle soit assez élevée pour pouvoir quantifier les molécules dans les organes et les tissus analysés mais assez faible pour ne pas causer la mort des individus ou de quelconques effets aigus chez la truite arc-en-ciel (Martin *et al.* 2003). De plus, une comparaison est possible avec les travaux de Goeritz *et al.* (2013) et Martin *et al.* (2003). Pour faciliter les analyses, la concentration nominale choisie était identique pour les trois composés d'intérêt.

3.3.2 Mélange des solutions aux granulés

Environ 5 mg de PFOS et de PFHxS (quantités réelles : 8.55 mg et 6.66 mg, respectivement), sous forme de poudre blanche, ont été pesés puis dilués dans du méthanol, chacun dans une fiole jaugée de 50 mL. Les concentrations ainsi obtenues pour le PFOS étaient de 171 $\mu\text{g mL}^{-1}$ et de 133.2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ pour PFHxS. Après agitation, 1.17 mL de la solution PFOS et 1.50 mL de la solution PFHxS ont été prélevés et introduits dans une fiole jaugée de 100 mL, et du méthanol a été ajouté jusqu'au trait de jauge. La solution mère ainsi obtenue a une concentration de 2.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Afin de tester les concentrations mentionnées ci-dessus, le volume de solution à prélever pour chaque condition a été calculé (Tableau 1) puis dilué avec du méthanol jusqu'à un volume final de 25 mL. Les granulés (5 x 25 g), disposés dans 5 boîtes de pétri, ont été imprégnés de la solution PFAS/méthanol. Ces-derniers, entièrement immergés,

ont par la suite été laissés sur une bâche et sous sorbonne durant une nuit entière, à température ambiante, dans le noir pour que le méthanol s'évapore.

Tableau 1. Volumes de solution mère à prélever pour obtenir les quantités de PFAS à mélanger avec les 25 g d'aliments pour réaliser les différentes concentrations test.

Concentrations nominales de PFOS et PFHxS ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Quantité de PFOS et PFHxS à mélanger avec 25 g de nourriture (μg)	Volume de solution mère ($2.0 \mu\text{g mL}^{-1}$) à prélever pour contaminer 25g de nourriture (mL)
1000	25	12.5
750	18,75	9.375
500	12,5	6.25
400	10	5
300	7,5	3.75

3.3.3 Enrobage des granulés contaminés

Le lendemain, après évaporation totale du méthanol, nous avons procédé à l'enrobage des granulés avec l'alginate de calcium pour éviter la désagrégation de l'aliment dans l'eau et donc la perte des perfluorés. Après avoir repris la méthode de Duis *et al.* (1995), les travaux de Goeritz *et al.* (2014) démontrent qu'en réduisant la quantité d'alginate de calcium de moitié et même de quart, le pourcentage de perte est plus faible. Comme l'alginate de calcium pourrait influencer la composition chimique et donc la valeur nutritionnelle de l'alimentation, la quantité appliquée aux granulés a été maintenue aussi faible que possible. La concentration d'alginate de calcium attendue est de $95 \mu\text{g kg}^{-1}$ de nourriture. Nous avons donc préparé une solution d'alginate de sodium à 2% dans de l'eau distillée et versé 1.6 g de celle-ci sur les 25 g de nourriture. Puis, tout en remuant, nous avons incorporé 0.78 g de poudre de chlorure de calcium jusqu'à durcissement de l'alginate.

Pour évaluer le pourcentage de perte dans l'eau, 12.5 g de chaque échantillon, soit la moitié, ont été plongés dans de l'eau distillée pendant 5 minutes. Le temps nécessaire pour des poissons en bonne santé, ayant un régime alimentaire approprié, à l'ingestion de la totalité des granulés flottant dans les bassins, est généralement inférieur à 5 minutes (Goeritz *et al.* 2013). Les 5 échantillons immergés ainsi que les 5 échantillons non immergés ont ensuite été conservés et stockés à 4°C, dans le noir jusqu'à analyse chimique. Parallèlement, un batch de 40 g de nourriture non contaminée a été enrobé pour constituer l'échantillon témoin. Pour connaître la concentration des PFAS dans l'eau suite à leur immersion, des échantillons de celle-ci ont également été conservés pour analyse.

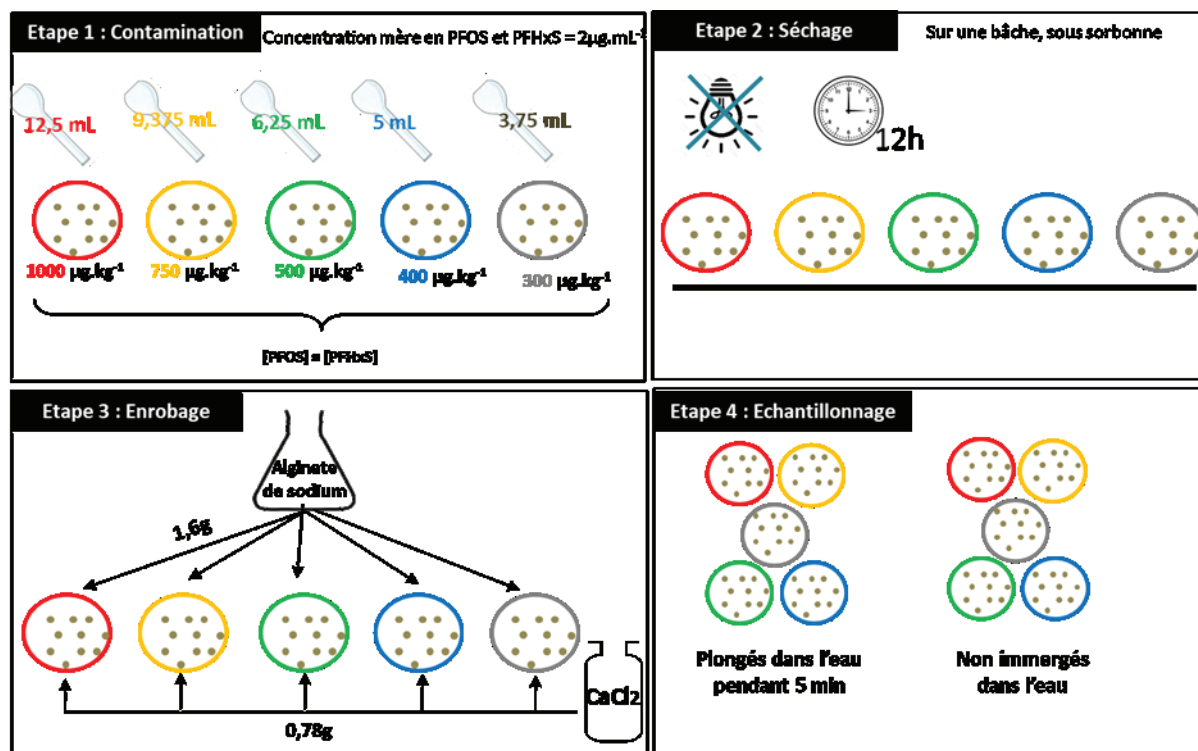


Figure 10. Protocole expérimental du test préliminaire de contamination de la nourriture.

3.3.4 Résultats des tests préliminaires de contamination

Le pourcentage de perte du dopage de la nourriture aux différentes concentrations – 300, 400, 500, 750 et $1000\ \mu\text{g}\ \text{kg}^{-1}$ – après immersion dans l'eau des granulés est de 28%, 42%, 35%, 30% et 29% pour le PFOS et de 32%, 41%, 33%, 34% et 34% pour le PFHxS. Cependant, les concentrations dans les eaux n'étaient pas quantifiables ni détectables dans la majorité des cas (Tableau 2), car les échantillons, analysés en injection directe, n'étaient pas assez concentrés pour détecter les concentrations de PFAS.

Nous avons jugé les résultats des essais préliminaires satisfaisants et validé ce protocole, que nous avons adapté par la suite à la contamination de quantités de nourriture plus importantes pour les lots expérimentaux.

Tableau 2. Résultats des concentrations de PFOS et de PFHxS dans les granulés avant et après immersion dans l'eau (ng g^{-1}) et dans l'eau récupérée (ng mL^{-1}).

	PFOS	PFHxS
AVANT IMMERSION DANS L'EAU (ng g^{-1})		
Nourriture blanche enrobée	< LOQ	< LOD
Nourriture contaminée à 300 ng g^{-1}	244.4	247.5
Nourriture contaminée à 400 ng g^{-1}	352.3	327.9
Nourriture contaminée à 500 ng g^{-1}	389.6	384.5
Nourriture contaminée à 750 ng g^{-1}	560.9	531.4
Nourriture contaminée à 1000 ng g^{-1}	761.7	776.9
APRES IMMERSION DANS L'EAU (ng g^{-1})		
Nourriture blanche enrobée	< LOQ	< LOD
Nourriture contaminée à 300 ng g^{-1}	176.5	169.0
Nourriture contaminée à 400 ng g^{-1}	202.9	194.2
Nourriture contaminée à 500 ng g^{-1}	253.9	258.4
Nourriture contaminée à 750 ng g^{-1}	390.2	348.8
Nourriture contaminée à 1000 ng g^{-1}	539.1	513.2
EAU APRES IMMERSION DES GRANULES (ng mL^{-1})		
Eau 300 ng g^{-1}	< LOQ	< LOD
Eau 400 ng g^{-1}	< LOQ	< LOD
Eau 500 ng g^{-1}	< LOQ	< LOD
Eau 750 ng g^{-1}	0.071	< LOD
Eau 1000 ng g^{-1}	0.207	< LOD

LOD = Limite de détection ; LOQ = Limite de quantification.

LOD = 5.4 ng g^{-1} (PFOS) et 3.6 ng g^{-1} (PFHxS) ; LOQ = 18.0 ng g^{-1} (PFOS) et 12.1 ng g^{-1} (PFHxS).

3.4 Protocole de contamination de la nourriture des lots expérimentaux

Un premier lot de 25 kg de nourriture a été contaminé avec un mélange de PFOS et de PFHxS (1:1) à une concentration nominale de $500 \mu\text{g kg}^{-1}$, pour l'expérience à Thonon-les-bains (11°C). Un deuxième lot de nourriture, de 25 kg également, a été contaminé avec un mélange de PFOS, PFHxS et PFNA (1:1:1) à la même concentration que le premier lot, pour les deux expériences à Saint-Seurin-sur-l'Isle (7°C et 19°C).

3.4.1 Contamination du lot de l'expérience 11°C

Deux solutions mères de 200 mL et de mêmes concentrations nominales en PFOS et en PFHxS ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) ont été préparées dans du méthanol. Les concentrations mesurées étaient de $132.4 \mu\text{g mL}^{-1}$ et $130.8 \mu\text{g mL}^{-1}$ en PFOS et en PFHxS, respectivement. Pour chacun des composés, la pureté du produit est estimée égale ou supérieure à 98%. En tenant compte de ce pourcentage, nous avons prélevé 96.3 mL de la solution de PFOS et 97.5 mL de solution de PFHxS afin d'obtenir une concentration théorique de $500 \mu\text{g kg}^{-1}$ dans la nourriture, soit une quantité de $12500 \mu\text{g}$ pour 25 kg de nourriture. Les solutions ont été mélangées dans une fiole jaugée de 500 mL, complétée avec du méthanol jusqu'au trait de jauge

afin de s'assurer que la totalité des granulés soit imbibée de la solution de contamination. Afin de maximiser l'homogénéisation du mélange, nous avons utilisé une bétonnière électrique dont l'intérieur était en acier (Leroy Merlin). Après 10 minutes de rotation, les 25 kg d'aliment dopé ont été retirés de la bétonnière et placés sur une bâche en polypropylène, sous sorbonne, toute la nuit, à température ambiante et dans le noir. Le lendemain, l'étape d'enrobage a été réalisée pour 5 kg de nourriture seulement. En effet, d'après Goeritz *et al.* (2014), l'alginate de calcium perd de son efficacité s'il est préparé trop longtemps à l'avance. C'est pourquoi, l'opération d'enrobage a été répétée chaque semaine durant les périodes d'exposition. Les 5 kg d'aliment à enrober sont introduits dans la bétonnière, 319 g de solution d'alginate de sodium à 2%, préparée dans de l'eau distillée, sont versés sur les granulés, qui sont ensuite recouverts de 156 g de chlorure de calcium. Les lots de nourriture enrobée et non enrobée sont ensuite stockés dans le noir à 4°C et un aliquot de 30 g est gardé pour les futures analyses chimiques.

3.4.2 Contamination du lot des expériences 7°C et 19°C

Le protocole expérimental suivi pour doper l'aliment au PFOS, PFHxS et PFNA, et utilisé pour les expériences à 7°C et à 19°C, est strictement le même que pour l'expérience à 11°C. Seules les concentrations des solutions mères et les volumes prélevés différaient. Pour le PFOS, la concentration mesurée était de 147.2 ng g⁻¹ et le volume prélevé de 86.7 mL. Pour le PFHxS, la concentration était de 152.8 ng g⁻¹ et le volume prélevé de 83.5 mL. Pour le PFNA, la concentration était de 122.9 ng g⁻¹ et le volume prélevé de 104.9 mL (pureté du composé ≥ 97%).



Figure 11. Protocole de contamination de la nourriture – 25 kg de granulés versés dans la bétonnière pour le mélange avec la solution de contamination, suivis de la phase de séchage sous hotte.

4 Analyses chimiques des PFAS

Tous les dosages ont été réalisés dans l'équipe TRACES de l'Institut des Sciences Analytiques (ISA) de Lyon-Villeurbanne.

Le PFOS (pureté chimique $\geq 98\%$), le PFHxS (pureté chimique $\geq 98\%$), le PFNA (pureté chimique $\geq 97\%$), l'alginate de calcium, le chlorure de sodium ont été fournis par Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). L'acétonitrile (pureté 99.97 %), le méthanol (pureté $> 99.98\%$) et l'heptane (pureté $\geq 90\%$) ont été achetés à Biosolve Chimie (Dieuze, France) et les sels acétate ammonium ont été obtenus chez Agilent Technologies (Massy, France).

4.1 Quantification par chromatographie liquide à ultra haute performance couplée à la spectrométrie de masse (UHPLC-MS/MS)

Le choix des techniques analytiques dépend des propriétés physico-chimiques des substances recherchées, telles que la polarité, la volatilité ou la solubilité, ainsi que de la sensibilité souhaitée. Les PFAS sélectionnés pour cette thèse n'étant pas volatils, nous les avons analysés par UHPLC-MS/MS, avec un spectromètre de masse à triple quadripôle Xevo TQ-S (Waters). Cette technique, sélective et

sensible, permet de détecter et de quantifier des concentrations très basses dans des matrices biologiques ou environnementales complexes. Brièvement, la chromatographie en phase liquide permet la séparation des différents constituants d'un mélange et la spectrométrie de masse permet de détecter, identifier et quantifier les composés organiques ionisés par mesure de leur masse. La sélectivité et l'identification des analytes ont donc été établies à la fois sur leurs caractéristiques chromatographiques et sur leurs fragmentations spécifiques en spectrométrie de masse.

4.1.1 Chromatographie liquide à ultra haute performance

Une chaîne de chromatographie liquide se compose d'un système permettant l'injection de l'échantillon, d'une pompe autorisant l'entrée de l'éluant et de l'analyte dans la colonne, la colonne elle-même, le tout couplé à un analyseur (spectromètre de masse dans notre cas) et un ordinateur permettant de visualiser les résultats sous forme de chromatogramme.

L'échantillon à analyser est mélangé à la phase mobile, après avoir été injecté via le système d'injection. Il est alors entraîné par la phase mobile, liquide dans le cas de l'UHPLC, à travers une colonne remplie d'une phase stationnaire (Figure 12). Chaque composé migre à une certaine vitesse qui dépend de ses propres caractéristiques (poids moléculaire et polarité) ainsi que celles des phases mobiles et stationnaires. Les phases mobiles sont des mélanges d'eau et de solvants organiques miscibles (méthanol, acétonitrile...) ou des mélanges de solvants organiques miscibles entre eux (dichlorométhane, hexane...). Souvent, la composition de la phase mobile est modifiée au cours de l'analyse (mode gradient) contrairement au mode isocratique, pour lequel la composition de la phase mobile reste la même tout du long de la période de séparation. Dans le cas d'une UHPLC, la granulométrie de la phase stationnaire est plus fine ($<2\mu\text{m}$) par rapport à l'HPLC (≈ 3 à $5\mu\text{m}$) et les diamètres des particules sont plus petits. Ceci permet de travailler à de plus hauts débits sans perte d'efficacité, entraînant une augmentation de la pression dans le système et réduisant alors le temps nécessaire à la séparation des composés. Ceci justifie l'utilisation d'un appareil UHPLC, un HPLC n'étant pas capable de supporter de telles pressions (avec un maximum ≈ 400 bars).

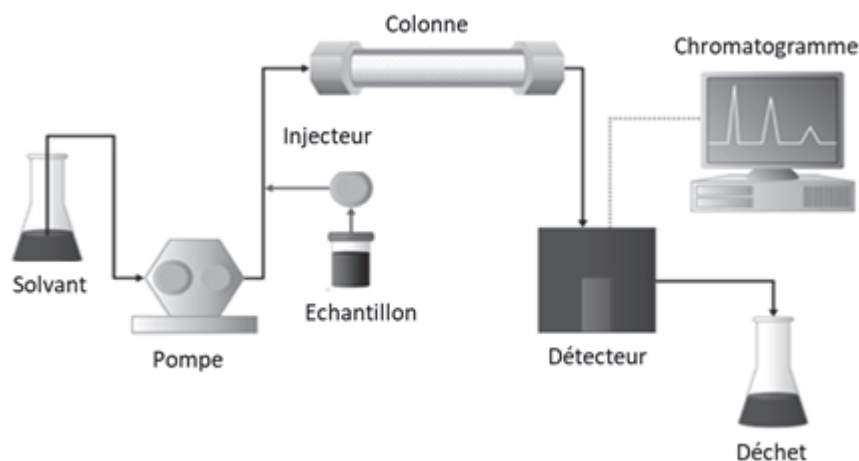


Figure 12. Schéma du principe d'une chaîne de chromatographie liquide.

4.1.2 Spectrométrie de masse

Le spectromètre de masse permet de détecter et d'identifier les molécules d'intérêt en fonction de leur masse et de caractériser leur structure chimique. C'est un détecteur universel, sensible et sélectif dont le principe réside dans la séparation en phase gazeuse de molécules chargées (ions) en fonction de leur rapport masse/charge (m/z). Pour cela, le spectromètre de masse se compose d'une source d'ionisation (ioniseur), d'un ou de plusieurs analyseurs, d'un détecteur qui compte les ions et amplifie le signal, et d'un système informatique qui traite ce signal (Figure 13).

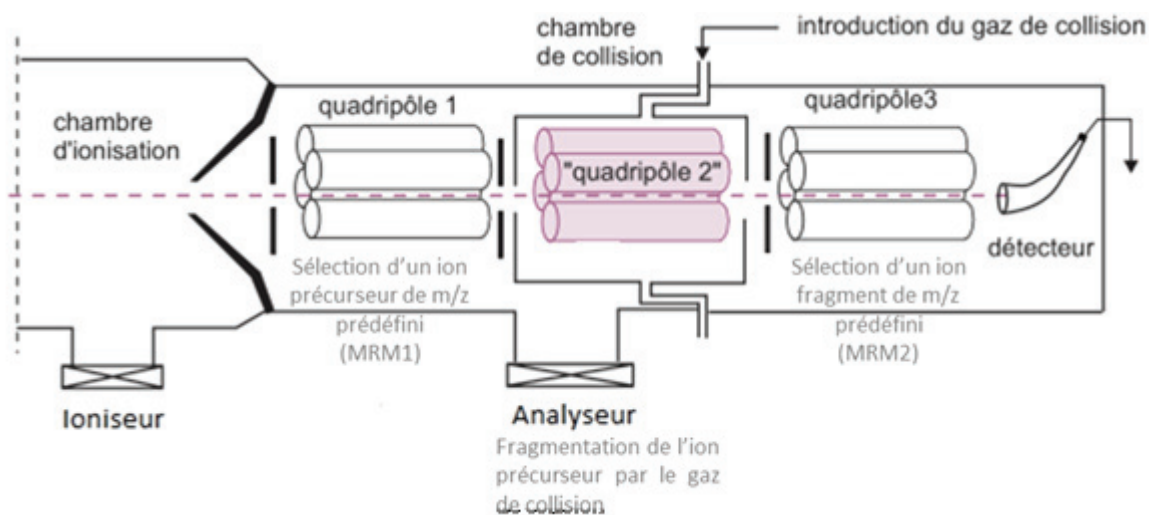


Figure 13. Schéma du fonctionnement d'un spectromètre de masse en tandem.

Pour notre étude, l'ionisation se fait par Electrospray (ESI). Brièvement l'électrospray est produit par application d'un fort champ électrique sur la phase mobile traversant un capillaire. Ce champ électrique intense provoque une accumulation de charges à la surface du liquide en sortie du capillaire, ce qui va former de fines gouttelettes hautement chargées. Dans notre cas, la source est en mode négatif et forme donc des ions chargés négativement. Sous l'effet d'un courant d'azote, le solvant s'évapore et

conduit au rétrécissement de la taille des gouttelettes jusqu'à ce que le champ électrique à leur surface soit suffisant pour provoquer la désorption des ions. Puis, les ions sont sélectionnés dans l'analyseur en fonction de leur rapport m/z . Le système triple-quadripôle, utilisé dans notre cas, est l'association de deux quadripôles en série, séparés par une cellule de collision remplie d'un gaz inerte à pression élevée (quadripôles 1 et 3 sur la Figure 13). Le mode MRM (*Multiple Reaction Monitoring*), à la fois sensible et spécifique, est utilisé pour ce projet. Il permet le dosage de plusieurs molécules en une seule analyse. En mode MRM, l'ion parent est sélectionné par le premier quadripôle et fragmenté dans la cellule de collision, tandis que l'autre quadripôle est focalisé sur un ion fils. La sélection de l'ion parent et celle des ions fils d'intérêt correspondent à des transitions MRM. Deux transitions minimum doivent être suivies, la transition la plus intense permet la quantification, la suivante sert à confirmer la présence du composé recherché. Les paramètres d'identification des trois substances perfluoroalkyles sélectionnées pour ce travail de thèse sont renseignés dans le Tableau 3. Les ions terminent leur course dans un capteur photomultiplicateur qui les convertit en signal électrique et les amplifie, puis les données sont finalement traitées informatiquement.

Tableau 3. Paramètres d'identification du PFOS, du PFHxS et du PFNA (temps de rétention, transition de quantification et de confirmation et rapport des aires des transitions).

	PFOS	PFHxS	PFNA
Temps de rétention (min)	4.00	3.31	3.70
Transition de quantification (MRM1)	499 → 99	399 → 80	463 → 419
Transition de confirmation (MRM2)	499 → 80	399 → 99	463 → 169
Rapport des transitions MRM1/MRM2	1.4	1.1	4.9

4.1.3 Conditions UHPLC-MS/MS utilisées

La chromatographie liquide a été réalisée avec un système UPLC H-class de Waters (St. Quentin en Yvelines, France) doté d'une colonne Kinetex EVO C18 (100 x 2,1 mm; 1,7 μm) de Phenomenex (Le Pecq, France). Les phases mobiles étaient composées (A) d'eau ultrapure contenant 2 mM d'acétate d'ammonium (154,4 mg de sel dans 1L d'eau) et (B) d'acétonitrile. Le gradient appliqué a permis d'éluer l'ensemble des composés en 10 minutes : 90% de la phase A pour débiter, diminué à 30% en 5 minutes puis à 0% en 0.1 minute en faveur de la phase B pendant 2 minutes jusqu'au retour des conditions initiales en 0.1 minute durant 3 minutes (Figure 14). La température de la colonne a été maintenue à 60°C, le débit à 0.5 mL min⁻¹ et le volume d'injection a été fixé à 2 μL en prenant soin de ne pas prélever directement dans le fond du vial pour éviter les potentiels dépôts biologiques.

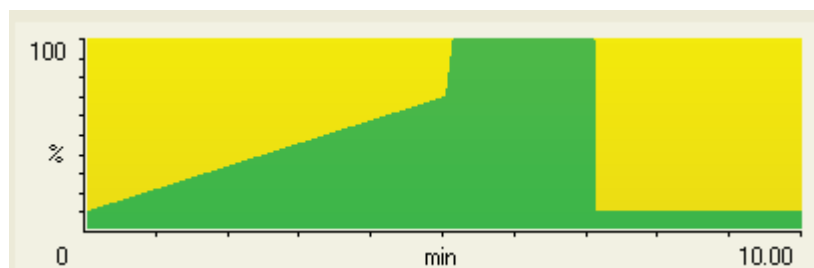


Figure 14. Schéma du gradient appliqué lors des analyses UHPLC, avec la phase A en jaune et la phase B en vert.

4.1.4 Optimisation de la méthode d'analyse

La limite de détection (LOD) correspond à la plus petite quantité d'une substance dans un échantillon pouvant être détectée mais non quantifiée comme une valeur exacte. La LOD est calculée sur la 2^{ème} transition MRM et doit avoir un rapport signal/bruit (S/N) > 3. La limite de quantification (LOQ) est le niveau de concentration le plus bas pour lequel une substance peut être quantifiée. Elle est obtenue lorsque le rapport des deux transitions MRM devient constant et que la première transition a un rapport S/N > 10. Les LOD et LOQ de chacun des composés ont été déterminées dans toutes les matrices (Tableau 4).

Afin d'analyser l'efficacité du procédé analytique mis en place, le rendement d'extraction des trois composés a été calculé pour toutes les matrices (Tableau 4). Un échantillon blanc, c'est-à-dire ne contenant pas les molécules ciblées, a été dopé à une concentration connue et extrait selon le protocole analytique décrit. Le signal alors obtenu ($S_{\text{dopé avant extraction}}$) a été comparé à celui d'un échantillon blanc dopé à la même concentration après extraction ($S_{\text{dopé après extraction}}$) et le rendement de l'extraction est donné par l'équation suivante (Equation 6).

$$\mathbf{Rendement} (\%) = \frac{S_{\text{dopé avant extraction}}}{S_{\text{dopé après extraction}}} \times 100 \quad \text{(Equation 6)}$$

Tableau 4. Rendement d'extraction (%), LOD et LOQ (ng g⁻¹ ou ng mL⁻¹) du PFOS, PFHxS et PFNA, dans les différentes matrices.

		PFOS	PFHxS	PFNA
Rendement d'extraction (%)	<i>Foie</i>	110	119	66
	<i>Sang</i>	104	107	107
	<i>Muscle</i>	102	78	71
	<i>Cerveau</i>	89	88	69
	<i>Viscères</i>	91	76	60
LOD (ng g ⁻¹)	<i>Foie</i>	17.0	16.0	1.90
	<i>Muscle</i>	0.1	0.1	0.1
	<i>Cerveau</i>	6.7	1.8	1.2
	<i>Reins</i>	0.2	0.2	1.0
	<i>Viscères</i>	3.6	4.0	9.6
LOD (ng mL ⁻¹)	<i>Sang</i>	9.0	13.0	1.4
	<i>Eau</i>	0.1	0.03	0.02
LOQ (ng g ⁻¹)	<i>Foie</i>	22.2	30.6	6.33
	<i>Muscle</i>	0.2	0.07	0.18
	<i>Cerveau</i>	8.5	2.5	1.9
	<i>Reins</i>	0.6	0.6	3.3
	<i>Viscères</i>	5.4	5.2	12.5
LOQ (ng mL ⁻¹)	<i>Sang</i>	11.3	20.2	2.2
	<i>Eau</i>	0.2	0.01	0.08

4.2 Préparation des échantillons pour les dosages chimiques - Protocoles

La méthode analytique se décompose en deux parties : la préparation des échantillons (comprenant une phase d'extraction et une de purification) et l'injection des extraits par UHPLC-MS/MS. Les méthodes d'extraction et de purification du PFOS, du PFHxS et du PFNA ont été optimisées sur du muscle de truite arc-en-ciel achetée en supermarché, ainsi que sur les granulés distribués aux poissons lors des expériences d'exposition, et sur l'eau. Les protocoles finaux sont détaillés dans les parties suivantes. Notons que pour l'ensemble des échantillons analysés, la phenacétine-éthoxy-1-C13 a été utilisée en tant que standard d'injection et l'acide perfluoro-[1,2,3,4-13C4]octanesulfonique (M-PFOS) comme standard d'extraction. Ces standards ont permis respectivement la vérification de la qualité d'injection et le contrôle de l'efficacité d'extraction.

4.2.1 Protocole d'extraction pour l'eau

Les échantillons d'eau ont été concentrés par extraction en phase solide (*Solid Phase Extraction*, SPE). Cette méthode de préparation des échantillons permet d'isoler les substances chimiques d'intérêt présentes dans un mélange (dans notre cas, l'eau) par adsorption sélective sur une phase stationnaire contenue dans une cartouche. Pour cela, les échantillons d'eau (200 mL) ont été dopés avec 50 µL de standard d'extraction (50 ng mL⁻¹) avant d'être chargés (à 10.0 mL min⁻¹) sur des cartouches Oasis HLB de 6.0 mL préalablement conditionnées avec 5.0 mL de méthanol (15.0 mL min⁻¹) puis 5.0 mL d'eau

déminéralisée (15.0 mL min^{-1}). Les cartouches ont ensuite été rincées avec 5.0 mL d'eau déminéralisée (10.0 mL min^{-1}), séchées à l'azote 10 minutes et éluées avec $2 \times 4.0 \text{ mL}$ de méthanol (5.0 mL min^{-1}). Les éluats ainsi récupérés dans des tubes en verre ont été évaporés à sec sous un courant d'azote puis reconstitués en ajoutant $100 \mu\text{L}$ d'acétonitrile et $100 \mu\text{L}$ d'une solution à 200 ppm de standard d'injection diluée dans de l'acétonitrile (200 ng mL^{-1}).

4.2.2 Protocole d'extraction pour les fèces et la nourriture

Les échantillons biologiques sont des matrices très complexes. L'étape de préparation de ces échantillons permet entre autres de diminuer la présence d'interférents pouvant perturber l'analyse. Le protocole de préparation de nos échantillons est décrit ci-après. Un aliquot de 3 g de nourriture a été introduit dans un tube de 50 mL en polypropylène afin d'être broyé et homogénéisé à l'aide d'un Geno/Grinder® (SPEX SamplePrep, Stanmore, Royaume-Uni) durant 10 minutes à 1300 rpm , en ajoutant une céramique (Agilent Technologies) dans le tube. 250 mg de l'échantillon broyé et homogénéisé ont été prélevés et transférés dans un nouveau tube de 50 mL en polypropylène afin de réaliser une extraction de type QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe), qui se veut donc rapide, facile, bon marché, robuste et fiable. Cette méthode est aujourd'hui largement employée dans le domaine analytique et s'utilise sur un large panel de matrices et pour de nombreux composés. La méthode QuEChERS est constituée de deux étapes :

- Une extraction liquide-liquide, consistant à mélanger la matrice d'intérêt dans deux phases liquides miscibles en présence de sels tampon pour améliorer l'efficacité d'extraction. L'ajout des sels tampon sature la phase aqueuse et favorise ainsi la formation de deux phases distinctes permettant de récupérer la phase organique contenant les composés d'intérêt.
- Une purification par dSPE (SPE dispersive) consistant à éliminer les impuretés encore présentes dans la phase organique à l'aide d'adsorbants tels que la *Primary Secondary Amine* (PSA) et les particules C18. En effet, la phase PSA permet de supprimer de nombreux acides organiques polaires de l'extrait (sucres, acides gras) et la phase C18 permet d'éliminer des substances interférentes non polaires comme les lipides (graisses).

Ainsi, nous avons mélangé 10 mL d'acétonitrile, 1 mL d'heptane, puis 10 mL d'eau ultra-pure, ainsi que $100 \mu\text{L}$ de standard d'extraction (200 ng mL^{-1}) dans le tube contenant déjà la matrice broyée. Nous avons ensuite ajouté un sel citrate (Agilent Technologies). Le mélange a ensuite été vortexé pendant 1 minute et centrifugé pendant 2 minutes à 5000 rpm . La phase d'acétonitrile (8 mL) a été purifiée par dSPE dans un tube de 15 mL contenant un mélange de phases PSA/C18 (Macherey Nagel, Düren, Allemagne). L'échantillon est ensuite vortexé pendant 1 minute et centrifugé durant 2 minutes à 5000 rpm et 6 mL de la phase surnageante ont été prélevés et introduits dans un tube en verre. Enfin, $400 \mu\text{L}$

de cet extrait ont été transférés dans un vial de chromatographie de 2 mL et 100 µL du standard d'injection (200 ng mL⁻¹) ont été ajoutés.

Le protocole d'extraction employé pour l'analyse des fèces est identique à celui utilisé pour la nourriture.

4.2.3 Protocoles d'extraction pour les matrices biologiques

4.2.3.1 Sang

Après décongélation et homogénéisation par vortex (1 minute), 250 µL de sang total ont été introduits dans un microtube de 2 mL contenant trois billes de zirconium (Dominique Dutscher SAS, Brumath, France). Après ajout de 1 mL d'acétonitrile, l'échantillon a été agité pendant 120 secondes à 4000 apm en utilisant un agitateur tri-positions Beadbug (Dominique Dutscher SAS) puis centrifugé durant 3 min à 5000 rpm à 5°C pour provoquer la lyse cellulaire (destruction de la cellule par éclatement membranaire). Puis, 0.5 mL ont été transférés dans un tube en verre et deux micro-extractions liquide-liquide successives ont été effectuées sur le même échantillon avec 1 mL d'acétonitrile, transféré à chaque fois, dans un même tube en verre. L'extrait final est concentré par évaporation sous un courant d'azote à température ambiante jusqu'à évaporation totale. Les résidus secs ont ensuite été repris dans un mélange de 300 µL d'acétonitrile et de 200 µL de standard d'injection (200 ng mL⁻¹). L'extrait obtenu a été vortexé durant 1 minute et 200 µL ont été transférés dans un vial de chromatographie pour l'analyse.

4.2.3.2 Muscle, foie, viscères, reins et cerveau

Dans un premier temps, les échantillons de foie, de muscle et de viscères ont été lyophilisés sous vide avant d'être broyés dans un tube en polypropylène avec une céramique à l'aide du Geno/Grinder®, 20 minutes à 1000 apm pour le foie et le muscle et 60 minutes pour les viscères compte tenu de leur forte teneur en graisse et de l'hétérogénéité des organes qui les composent (estomac, intestin, rate et caecum pylorique). Etant donné l'importante teneur en eau des reins et des cerveaux (> 90%) ainsi que la faible masse des cerveaux (≈ 200 mg), ces tissus n'ont pas été lyophilisés. Pour réaliser l'extraction, 250 mg de foie, de muscle, de viscères, de cerveau ou de rein ont été introduits dans un tube en polypropylène de 50 mL. 3 mL d'heptane et 10 mL d'une solution d'acétonitrile à 2% d'acide acétique ont été par la suite ajoutés. Dans ce cas, l'heptane sert à éliminer les lipides tandis que l'acétonitrile acidifié brise les liaisons que les PFAS forment avec les protéines, améliorant le rendement de l'extraction. Après agitation au Geno/Grinder® pendant 2 minutes à 1000 apm et centrifugation pendant 5 minutes à 7000 rpm, 9.4 mL de la phase d'acétonitrile ont été congelés durant 12 heures à -18°C. Ceci permet la précipitation des graisses, encore présentes dans l'échantillon après l'étape d'extraction. Le

lendemain, 8 mL de la phase acétonitrile sont prélevés pour être purifiés par dSPE (phase PSA/C18). L'échantillon est vortexé pendant 1 minute et centrifugé pendant 2 minutes à 7000 rpm et 6 mL de surnageant ont été prélevés et transférés dans un tube de verre. Comme pour les échantillons de sang, l'extrait a été placé sous un flux d'azote à température ambiante jusqu'à évaporation complète de l'acétonitrile et les résidus secs ont ensuite été reconstitués en ajoutant :

- 100 μL de standard d'injection (200 ng mL^{-1}) et 300 μL d'acétonitrile pour le muscle, le cerveau, les viscères et les fèces
- 250 μL de standard d'injection (200 ng mL^{-1}) et 800 μL pour les reins
- 700 μL de standard d'injection (200 ng mL^{-1}) et 2800 μL pour le foie.

Après homogénéisation, 200 μL de chaque extrait sont transférés dans un vial pour l'analyse.

Durant quelques mois, nous avons été confrontés à une contamination du système analytique, rendant les dosages impossibles. La cause de cette pollution était l'injection des échantillons trop concentrés de foie, et dans une moindre mesure de rein. Après avoir rincé intensément la colonne et le système avec diverses phases mobiles, nous avons pu poursuivre les analyses en diluant davantage les extraits des différentes matrices biologiques. Ceci explique pourquoi la dilution des échantillons de foie et de rein est plus importante que les autres matrices. En appliquant cette méthode, nous avons pu terminer les analyses en écartant le souci de pollution.

4.2.4 Stratégie analytique

Les quantifications des échantillons ont été réalisées par calibration par *matrix matched*. Cette méthode permet notamment de s'affranchir de l'effet matrice. Pour cela, des échantillons blancs des différentes matrices ont été dopés avec des concentrations connues de PFOS, de PFHxS et de PFNA pour constituer une gamme d'étalonnage. Pour chaque matrice, les échantillons préparés pour la gamme d'étalonnage sont soumis au même protocole d'extraction et de purification que les échantillons à analyser. Les gammes d'étalonnage étaient constituées de cinq ou six points de calibration, en fonction de la matrice et des concentrations attendues (d'après la littérature) :

- Eau : 0.45 – 0.90 – 1.35 – 1.80 – 9.00 ng mL^{-1}
- Sang : 30 – 50 – 100 – 300 – 500 – 800 ng mL^{-1}
- Foie : 30 – 50 – 100 – 300 – 500 – 1000 ng g^{-1}
- Muscle, viscères, cerveau et fèces : 5 – 10 – 30 – 80 – 100 – 200 ng g^{-1}
- Reins : 10 – 30 – 50 – 100 – 200 – 400 ng g^{-1}
- Nourriture : 100 – 200 – 400 – 600 – 800 ng g^{-1}

La linéarité de chaque courbe de calibration, obtenue en traçant l'intensité du pic en fonction de la concentration de l'étalon correspondant a été vérifiée avant chaque traitement de résultats (coefficient de corrélation $R^2 > 0.97$).

L'analyse de la totalité des échantillons a nécessité plusieurs mois. Une séquence d'injection comprenait les échantillons de la gamme étalon et une quinzaine d'échantillons d'une même matrice. De plus, un blanc d'acétonitrile a été injecté entre chaque échantillon afin d'éviter d'une part, une contamination croisée entre les échantillons et d'autre part, de rincer la colonne. L'acétonitrile a été analysé au préalable pour vérifier l'absence des molécules d'intérêt. Enfin, un échantillon de contrôle qualité (un des échantillons constituant la gamme d'étalonnage) a été régulièrement injecté au cours des séquences pour vérifier la stabilité de l'intensité du signal et la fiabilité des concentrations mesurées. Tous les échantillons ont été injectés en duplicat. Les données ont été analysées en utilisant le logiciel Masslynx 4.1. (Waters). Pour chacun des composés, les aires des pics ont été intégrées pour déterminer les concentrations, calculées à partir de la gamme d'étalonnage.

Chapitre 3

Elucider la toxicocinétique du PFOS via un modèle PBTK développé chez la truite arc-en-ciel

Chapitre 3. Elucider la toxicocinétique du PFOS via un modèle PBTK développé chez la truite arc-en-ciel

Les objectifs de ce chapitre sont de décrire le comportement du PFOS chez la truite arc-en-ciel adulte grâce à la modélisation PBTK et de comparer les prédictions du modèle avec l'un des jeux de données, obtenu suite aux expositions alimentaires. Ce chapitre reprend pour l'essentiel un article soumis à *Science of the Total Environment*, intitulé « *Elucidating the fate of perfluorooctanoate sulfonate using a rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) physiologically-based toxicokinetic model* ». La réalisation du modèle PBTK s'est déroulé au sein de l'équipe METO de l'INERIS, à Verneuil-en-Halatte.

1 Collecte des données expérimentales relatives au PFOS, nécessaires à la calibration et l'évaluation du modèle PBTK

Différents types de paramètres sont nécessaires pour implémenter un modèle PBTK, notamment les paramètres physiologiques, les paramètres relatifs à la substance étudiée et les paramètres d'exposition. Les informations obtenues expérimentalement doivent être incluses dans notre modélisation pour reproduire le scénario d'exposition et permettre ainsi l'ajustement entre les données prédites et expérimentales.

1.1. Données d'exposition

Avant de débiter les expériences d'exposition, des échantillons d'aliment dopé ont été analysés (Tableau 1). Pour s'assurer de la reproductibilité des mesures, quatre répliques d'un même lot de nourriture ont été injectés en double pour une analyse par UHPLC-MS/MS. Un seul et même lot a été préparé pour les expériences à 7°C et à 19°C, et les concentrations en PFOS ont été analysées deux fois, avant le début de chacune des deux expériences. Malgré les quelques mois séparant les deux expérimentations, les concentrations en PFOS sont restées stables, prouvant la non-dégradation du composé.

Les concentrations en PFAS ont également été mesurées dans l'eau des bassins expérimentaux (Tableau 1). Les résultats ont démontré la présence du PFOS en faibles concentrations dans la rivière Isle et dans le lac Léman, même si le Léman présentait des concentrations plus élevées que Isle. Ces résultats confirment que les poissons sont exposés au PFOS majoritairement par la nourriture, tandis qu'une faible quantité entre dans l'organisme par baignade. Nous avons écarté la possibilité d'une source de pollution provenant de l'urine des poissons, de l'eau expirée et de la dissolution des fèces puisque le système expérimental était un système ouvert, laissant l'eau se renouveler continuellement.

Tableau 1. Concentrations en PFOS dans l'aliment contaminé (ng g⁻¹) et dans l'eau (ng L⁻¹) des trois expériences (moyennes des doubles injections des échantillons ± écart-type). *N.A.* signifie *non analysé*. En effet, certains échantillons n'ont pas pu être analysés dû à un étiquetage effacé. *N.P.* signifie qu'il n'y a pas eu de prélèvement au jour correspondant.

		Expérience 7°C	Expérience 11°C	Expérience 19°C
Aliment				
Echantillon	1	471.6±15.3	354.7±10.7	464.2±5.5
	2	498.1±9.9	355.6±24.8	465.2±2.9
	3	455.6±10.5	373.6±19.4	
	4	435.1±6.3	362.3±12.2	
Moyenne ± sd		465.1±25.9	361.5±15.6	464.7±3.6
Eau				
Jours	0	2.89±0.09	5.40±0.04	3.76±0.26
	7	1.19±0.09	<i>N.A.</i>	1.01±0.08
	14	1.00±0.06	4.62±0.17	0.81±0.21
	28	1.45±0.08	6.46±0.09	<i>N.A.</i>
	42	1.15±0.09	2.88±0.04	0.74±0.04
	49	2.29±0.00	18.35±0.26	0.65±0.16
	56	1.51±0.00	3.20±0.08	0.52±0.01
	63	0.60±0.00		0.41±0.14
	70	<i>N.P.</i>		0.43±0.05
	77	3.31±0.12		2.15±0.06

1.2. Données physiologiques

Chaque individu a été pesé et mesuré durant les prélèvements pour récolter les informations biométriques permettant de modéliser la croissance dans le modèle PBTK. Les organes échantillonnés ont également été pesés afin de calculer les fractions que représentent chacun d'entre eux par rapport à la masse totale du poisson. La masse et la longueur des poissons contaminés, celles des poissons témoins ainsi que la masse des organes sont rapportées dans l'Annexe 1 du chapitre 3. Dans ce travail de thèse, le sexe des individus a été précisé (Annexe 1 du chapitre 3) mais l'effet genre n'a pas été étudié car le ratio mâle/femelle était trop faible et les gonades, pourtant prélevées, n'ont pas été analysées.

Ces résultats biométriques nous ont permis d'ajuster chaque semaine la quantité de nourriture distribuée aux individus en fonction de la biomasse totale et de connaître ainsi la quantité de PFOS ingérée. D'autre part, la comparaison des masses démontrent que la vitesse de croissance des poissons contaminés n'est pas différente significativement de celle des poissons témoins (*p-value* < 0.01 du test statistique ANCOVA), indiquant que l'exposition aux PFAS à la concentration choisie n'a pas altéré cette fonction (Figure 1).

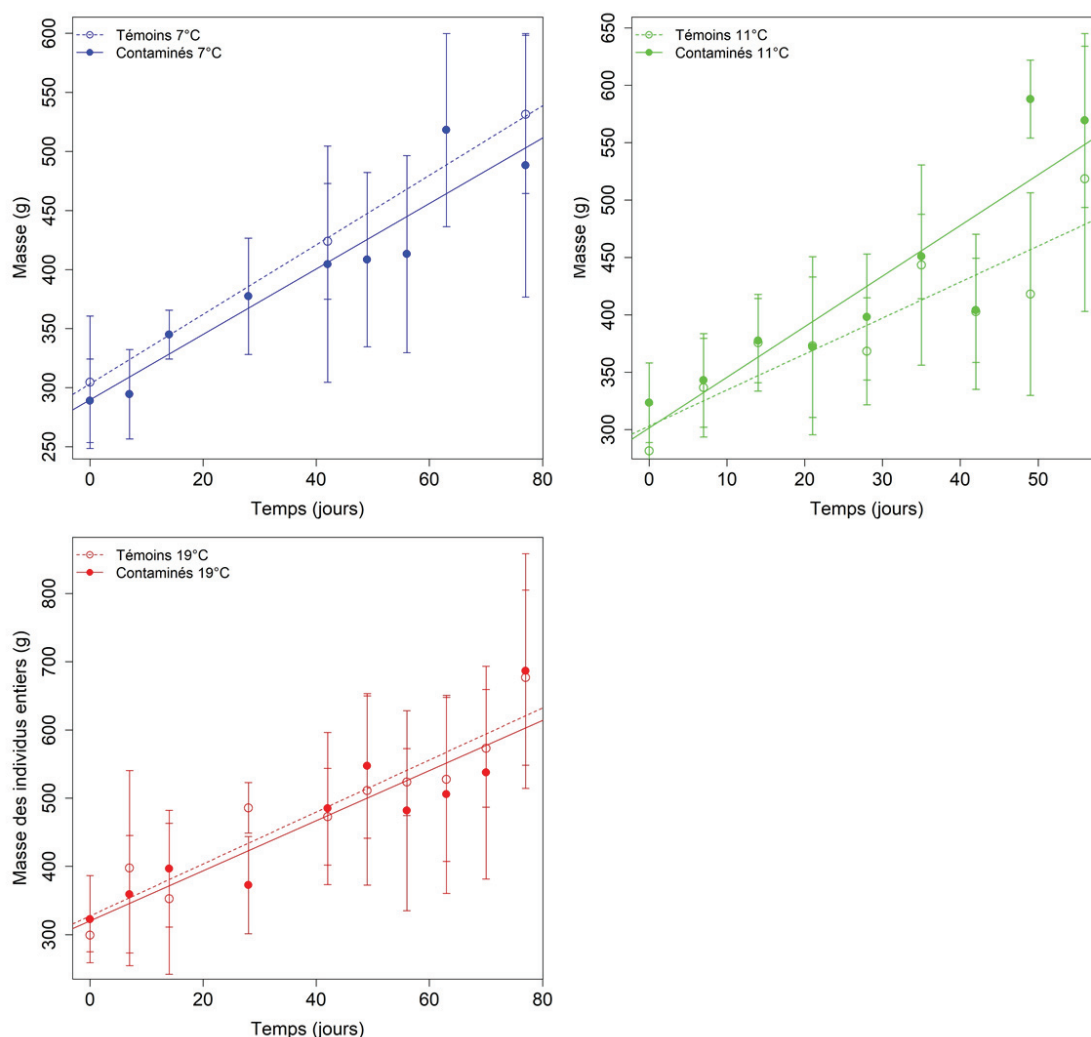


Figure 1. Masse des individus témoins (traits en pointillés) et contaminés (traits continus) des trois expériences : 7°C (bleu), 11°C (vert) et 19°C (rouge).

1.3. Concentrations en PFOS mesurées dans les divers organes

Les moyennes géométriques ($n=5$) des concentrations en PFOS dans les organes et dans les fèces des poissons échantillonnés ont été calculées et reportées dans le Tableau 2, pour chaque expérience. Ces résultats ont été nécessaires à la calibration du modèle, pour permettre l'ajustement des prédictions aux données expérimentales.

Tableau 2. Concentrations en PFOS (moyenne géométrique \pm écart-type) dans les organes et les fèces des individus des trois expériences, exprimées en ng g⁻¹ de poids frais. *N.A.* signifie *non analysé*. *N.P.* signifie qu'il n'y a pas eu de prélèvement au jour correspondant.

Jours	Sang	Foie	Muscle	Reins	Cerveau	Viscères	Fèces
Expérience 7°C							
7	37.6 \pm 11.3	43.7 \pm 6.5	21.5 \pm 7.8	24.7 \pm 12.9	7.7 \pm 2.6	164.3 \pm 67.8	124.7 \pm 7.1
14	145.3 \pm 13.1	111.9 \pm 15.1	33.4 \pm 5.3	99.6 \pm 11.9	27.5 \pm 6.4	170.4 \pm 46.0	213.8 \pm 286.2
28	205.3 \pm 36.6	140.6 \pm 18.7	62.7 \pm 21.2	115.9 \pm 22.0	45.9 \pm 8.7	209.9 \pm 67.1	383.6 \pm 5.4
42	273.4 \pm 54.6	215.0 \pm 37.6	132.8 \pm 24.8	190.1 \pm 79.9	107.3 \pm 31.3	272.5 \pm 96.7	265.6 \pm 11.7
49	178.9 \pm 55.0	181.2 \pm 6.9	94.1 \pm 32.1	141.4 \pm 60.3	94.5 \pm 27.9	155.3 \pm 45.4	314.2 \pm 123.9
56	126.7 \pm 44.4	163.0 \pm 14.6	66.1 \pm 23.7	46.2 \pm 27.2	78.4 \pm 25.8	141.1 \pm 33.7	122.6 \pm 63.2
63	97.3 \pm 43.6	113.5 \pm 25.9	57.9 \pm 23.6	47.8 \pm 34.2	75.9 \pm 16.6	122.8 \pm 60.9	97.8 \pm 17.4
77	57.5 \pm 19.6	104.4 \pm 24.6	38.0 \pm 25.2	26.4 \pm 12.9	36.6 \pm 12.4	98.8 \pm 56.9	34.1 \pm 9.8
Expérience 11°C							
7	107.9 \pm 29.6	64.3 \pm 30.1	18.0 \pm 3.2	<i>N.P.</i>	38.4 \pm 10.7	7.1 \pm 2.3	182.2 \pm 1.2
14	176.9 \pm 52.9	286.7 \pm 88.3	37.1 \pm 3.7	<i>N.P.</i>	70.9 \pm 9.0	25.5 \pm 2.5	<i>N.A.</i>
21	258.2 \pm 99.4	348.6 \pm 56.6	43.5 \pm 5.0	<i>N.P.</i>	106.2 \pm 22.8	39.7 \pm 5.8	<i>N.A.</i>
28	332.3 \pm 15.9	523.5 \pm 100.4	53.0 \pm 8.6	<i>N.P.</i>	133.2 \pm 26.9	57.6 \pm 9.3	37.6 \pm 0.6
35	260.4 \pm 19.3	414.6 \pm 46.2	45.8 \pm 6.8	<i>N.P.</i>	138.9 \pm 23.8	36.1 \pm 12.8	<i>N.A.</i>
42	152.4 \pm 87.5	226.9 \pm 78.1	28.2 \pm 6.3	<i>N.P.</i>	115.1 \pm 39.3	36.3 \pm 0.5	<i>N.A.</i>
49	97.6 \pm 47.9	117.5 \pm 113.9	20.2 \pm 8.0	<i>N.P.</i>	101.6 \pm 30.3	31.1 \pm 12.7	<i>N.A.</i>
56	100.3 \pm 25.3	97.3 \pm 59.9	16.9 \pm 10.0	<i>N.P.</i>	84.7 \pm 23.0	23.6 \pm 8.2	<i>N.A.</i>
Expérience 19°C							
7	113.9 \pm 17.9	253.3 \pm 51.4	17.2 \pm 5.1	49.7 \pm 36.3	26.4 \pm 6.4	146.3 \pm 58.9	130.9 \pm 0.0
14	224.3 \pm 59.7	424.4 \pm 89.6	39.1 \pm 14.9	119.6 \pm 40.9	90.4 \pm 27.6	170.0 \pm 65.3	141.4 \pm 128.2
28	122.9 \pm 127.5	434.9 \pm 112.9	23.3 \pm 19.4	90.0 \pm 69.8	121.9 \pm 33.7	175.7 \pm 78.7	101.9 \pm 112.2
42	236.9 \pm 76.9	598.7 \pm 104.4	47.3 \pm 20.0	138.3 \pm 55.5	158.3 \pm 41.1	266.9 \pm 48.9	249.7 \pm 96.4
49	200.3 \pm 67.9	346.4 \pm 97.1	41.4 \pm 15.1	117.9 \pm 44.9	136.4 \pm 35.3	162.0 \pm 74.8	<i>N.A.</i>
56	163.8 \pm 68.1	303.7 \pm 98.2	21.7 \pm 14.6	72.0 \pm 40.0	103.5 \pm 50.5	121.7 \pm 26.1	67.4 \pm 29.9
63	135.2 \pm 42.5	150.7 \pm 126.3	25.5 \pm 1.2	48.6 \pm 42.4	83.3 \pm 7.6	177.5 \pm 102.2	<i>N.A.</i>
70	61.1 \pm 101.6	157.8 \pm 220.2	5.8 \pm 17.8	54.5 \pm 64.2	80.3 \pm 62.6	64.9 \pm 43.3	16.7 \pm 0.0
77	99.2 \pm 53.9	207.4 \pm 27.6	9.8 \pm 10.2	73.2 \pm 37.3	51.5 \pm 21.3	50.0 \pm 29.0	12.4 \pm 0.0

2 Description de la toxicocinétique du PFOS chez la truite arc-en-ciel grâce à la modélisation PBTK

L'article " *Elucidating the perfluorooctanoate sulfonate fate using a rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) physiologically-based toxicokinetic model ?*" a été intégré ci-dessous. Les informations supplémentaires associées à l'article sont présentées à la fin du manuscrit, Annexe 2 du chapitre 3. Le code McSim de ce modèle PBTK est donné en Annexe 3 du chapitre 3.

Elucidating the fate of perfluorooctanoate sulfonate using a rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) physiologically-based toxicokinetic model

Alice Vidal^a, Rémy Beaudouin^{b*}, Jeanne Garric^a, Marc Babut^a

^a Irstea, UR RIVERLY, 5 Avenue de la Doua, CS20244, 69625 Villeurbanne Cedex, France.

^b UMR-I 02 SEBIO, Unit of Models for Ecotoxicology and Toxicology (METO), INERIS, 60550 Verneuil en Halatte, France.

*Corresponding author: remy.beaudouin@ineris.fr

Abstract

Per- and poly-fluorinated substances (PFAS) are widely found in freshwater ecosystems because of their resistance to degradation. Most of these compounds bioaccumulate in aquatic organisms but understanding of the mechanisms of absorption, distribution and elimination is still limited in fish. For this purpose, we developed a 10-compartment Physiologically-Based Toxicokinetic (PBTK) model for elucidate perfluorooctane sulfonate (PFOS) kinetic in adult rainbow trout. This PBTK model included some physiological characteristics: blood perfusion to each organ, plasmatic fraction, PFOS free fraction, and growth of individuals. Parameters were optimized using Bayesian inferences. First, only PFOS absorption by diet was considered in the model as well as its elimination by urine, bile and fèces. Then, two mechanistic hypotheses, supposed to govern PFOS toxicokinetics in fish, namely on a one hand the entero-hepatic cycle and on another hand the absorption and the elimination through gills, were tested. Improvement of model fit to the data were studied in each organ by comparing predictions with observed data using the relative error. The experimental dataset was obtained from an exposure experiment, where adult rainbow trout were fed with PFOS spiked diet during 42-d, followed by a 35-d depuration period. In all cases, PFOS concentrations were well predicted in organs and in fèces by our model. Results of our PBTK model made in evidence that fèces represented the major elimination route for PFOS while urine was a minor route. Also, PFOS branchial uptake can be important despite low concentrations of the compound in water and elimination through gills should not be neglected. Finally, enterohepatic cycle is likely to play a minor role in PFOS toxicokinetics. Overall, this PBTK model well described PFOS distribution in organism and inform about relative contribution of absorption and elimination pathways.

Keywords

Physiological multicompartment model, perfluorooctanoate sulfonate, rainbow trout, simultaneous uptake pathway, elimination route contribution

Highlights

- A PBTK model describing PFOS kinetics was calibrated for simultaneous uptake pathways
- Fish growth was modeled to correct PFOS dilution in organs
- PFOS was more eliminated by feces while urine was a minor excretion route
- Gill absorption and excretion cannot be neglected
- The enterohepatic cycle was not supported by model outputs

1. Introduction

Per- and poly-fluorinated substances (PFAS) are important environmental contaminants. They are characterized by their fluorinated chain, and the strong carbon-fluorine bonds lead to a high thermal and chemical stability in the environment (Buck *et al.* 2011). Due to their unique properties, long-chain PFAS have been manufactured and used in many industrial and commercial applications for over half a century (Renner, 2001). Nowadays, PFAS are ubiquitous in aquatic ecosystems (Houde *et al.* 2006; Ahrens and Bundschuh 2014; Krafft and Riess 2015). Among them, perfluorooctane sulfonate (PFOS) has been carefully studied for years because of its extensive use in many applications (OECD 2002). With regulatory efforts aiming to reduce PFOS emissions (e.g., European Directive 2006/122/EC), PFOS is now found at lower concentrations in the environment, although still high compared to other PFAS (Krafft and Riess 2015; Shi *et al.* 2012). Exposure experiments in fish demonstrated that PFOS mostly accumulates in liver and blood (Martin *et al.* 2003; Goeritz *et al.* 2013; Shi *et al.* 2018; Zhong *et al.* 2019). The assumption of a main elimination by the branchial route rather than by urine has been reported for rainbow trout (Consoer *et al.* 2016). However, this study neglected the potential contribution of biliary and fecal excretion. Today data remain limited and absorption and elimination mechanisms are still poorly understood.

Multicompartment models are useful tools to improve the understanding of the mechanisms involved and are increasingly used in ecotoxicology (Nichols *et al.* 1990; Grech *et al.* 2019; Péry *et al.* 2014; Brinkmann *et al.* 2014). Indeed, they are developed, for example, to quantify the internal dose of the compound of interest, providing helpful information for environmental risk assessment. A physiologically-based toxicokinetic (PBTK) model is defined as “a model that estimates the dose to target tissue by taking into account the rate of absorption into the body, distribution and storage in tissues, metabolism and excretion on the basis of interplay among critical physiological, physicochemical and biochemical determinants” (WHO, 2010). A few multicompartment models have already been developed for PFAS in fish (Ng and Hungerbühler 2013; Khazaee and Ng 2018; Mittal and Ng 2018). Contaminant transport between compartments was modeled by passive diffusion using only rate constants and can therefore be considered as semi-physiological, *i.e.*, not entirely based on physiological

processes (Grech *et al.* 2017). The aim of this study was to develop a PBTK model based on adult rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) blood flows and the substance-partition coefficients between plasma and tissues, while integrating fish growth, to elucidate PFOS toxicokinetics. Several hypotheses were then investigated by comparing the quality of model adjustment on observations. Firstly, since it was suggested that fish exposure to PFOS is more likely from food than from water (Martin *et al.* 2004; Consoer *et al.* 2016), the absorption was only modeled via the diet. Indeed, PFAS accumulated in preys (Martin *et al.* 2004; Babut *et al.* 2017) provide an enriched dietary source to the carnivorous fish species such as rainbow trout. Urinary, biliary and fecal elimination routes were considered, and the relative contribution of each route was studied. While it seems to depend on mammal species (Lupton *et al.* 2014; Cui *et al.* 2010; Gannon *et al.* 2011), the importance of each excretion route remains unknown in fish. Secondly, the role of enterohepatic reabsorption, thought to occur for this compound, which to a lesser extent might explain its long elimination, was investigated (Martin *et al.* 2003, Ulhaq *et al.* 2015). Lastly, gills were added as significant absorption and elimination routes for PFOS, as suggested by Consoer *et al.* (2016), similar to many other substances (Erickson and McKim 1990). All model simulations were evaluated with a data set obtained from an experiment in which adult rainbow trout were exposed to a PFOS-spiked diet over 42 days followed by a 35-day depuration phase.

2. Materials and methods

2.1. Toxicokinetic data: dietary exposure on adult rainbow trout

A dietary experiment was conducted at the Irstea experimental platform (St-Seurin-sur-l'Isle, France). Adult rainbow trout ($n=100$) were fed daily with a PFOS-spiked diet, at a concentration measured at 462.5 ng g^{-1} (contamination protocol detailed in Section A.1, in SI) over 42 days. Fish were then allowed to depurate for 35 days in the same conditions. Experimental conditions were adapted from the OECD 305 guideline (OECD, 2012) and accepted by the ad hoc ethics committee in charge. Fish were kept in two $2 \times 2.7\text{-m}^3$ gelcoat tanks (control and exposure tanks) with a flow-through rate of 0.5 L s^{-1} , under a natural dark:light cycle. The experiment took place in spring, with mean temperature $18.6^\circ\text{C} \pm 0.41^\circ\text{C}$ during the entire experimental period, which is slightly below the maximum of the optimum temperature range for rainbow trout (Raleigh *et al.* 1984). Temperature, pH and dissolved oxygen were recorded daily. Taking into account water temperature and mean initial body weight of the organisms ($0.32 \text{ kg} \pm 0.05 \text{ kg}$), trout were fed once a day at 12:00 to 1% of the mean total biomass. Food quantity was adapted to the biomass present during the experiments and was assumed to be the percentage *ad libitum* feeding. No mortality was observed and fish were in good condition, as demonstrated by the calculated Fulton index and hepatosomatic index (Table A.2, in SI). Five fish were sampled, anesthetized (3 mL of an eugenol oil:ethanol 10% solution in 10 L of water), measured, weighed and euthanized giving

a blow on the spine just behind the head at days 0, 7, 14, 28, 42, 49, 56, 63 and 77 to collect feces (by pressing the intestine to the anus to extract excrements), blood, liver, kidney, brain, muscle and viscera (pool of stomach, intestine, pyloric cecum and spleen) for PFOS analysis using UHPLC-MS/MS. Simultaneously, water samples were also taken in the exposure tank. Measured concentrations of PFOS in water were 1.013, 0.808, 0.739, 0.651, 0.517, 0.408, 0.426 and 2.148 ng L⁻¹ at 7, 14, 28, 42, 49, 56, 70 and 77 days.

2.2. General PBTK model structure

The reference PBTK model (Model 0) corresponds to the simplest PFOS toxicokinetics, in which only diet uptake was considered, so as to investigate the relative weight of feces and urinary excretion (Figure 1). Model 0 structure was inspired from generic PBTK models developed for organic compounds by Nichols *et al.* (2004), Nichols *et al.* (1996) and Grech *et al.* (2019) for adult rainbow trout.

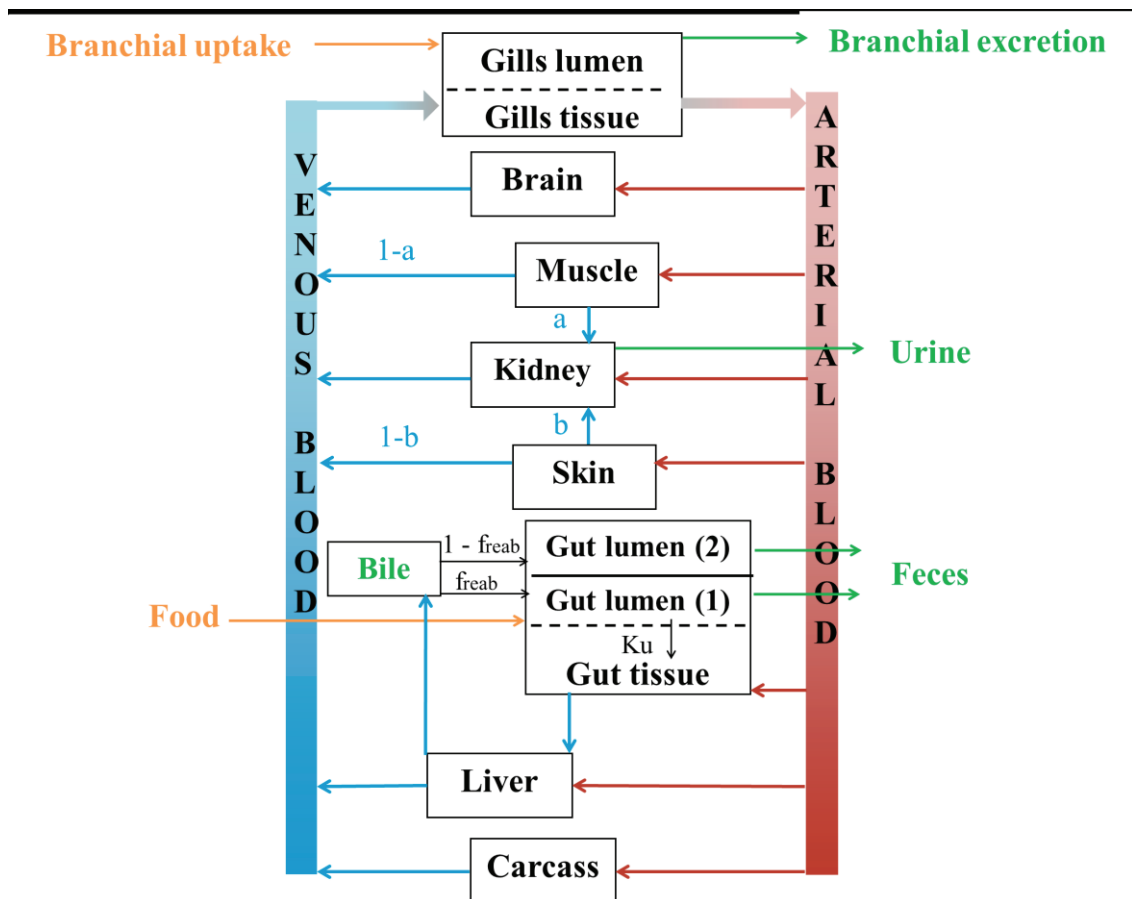


Figure 1. Schematic description of the PBTK model developed for rainbow trout. Uptake (food and branchial uptake) and excretion (feces, urine, bile and branchial excretion) sites are represented in orange and green, respectively.

Model 0 was constituted of ten compartments: arterial and venous blood, liver, kidney, viscera, muscle, brain, skin, gill and carcass (corresponding to the rest of the body, explaining PFOS residual concentration into the organism). Since PFOS quantities in muscle are a concern for health, PFOS concentrations are not negligible in skin (Goeritz *et al.* 2013) and brain content may lead to damage to fish neuronal functions (Du *et al.* 2013; Wang *et al.* 2011), we included these compartments. In fish, excretion from gills is also a general elimination route (Erickson *et al.* 2008) and branchial uptake might be high for PFOS (Consoer *et al.* 2016), explaining why we added gills to the model. Since PFOS presents a high affinity to plasma proteins in fish (Zhong *et al.* 2019; Jones *et al.* 2003), this PBTK model was built on the plasma fraction rather than total blood, similar to the PFOS PBTK model for Sprague-Dawley rats by Loccisano *et al.* (2012). Plasma is thus considered as the main PFOS carrier through the organism, and exchanges between compartments were accordingly described by physiological flows and partition coefficients between plasma and organs. In addition, only the free fraction of PFOS in plasma is assumed to be available for partitioning into tissues (Loccisano *et al.* 2012).

In this model, we assumed that PFOS was only absorbed by diet, provided once a day at 12 h. Fish were fed with food quantities adapted to their growth (growth rate: $8.14 \cdot 10^{-3} \pm 0.88 \cdot 10^{-3} \text{ g day}^{-1}$). Oral doses entered the gut, which was divided into two subcompartments (lumen and tissue). PFOS passed into the blood according to the constant of absorption (K_u). In gut lumen, we distinguished two forms of PFOS. The first corresponded to the free PFOS, which was absorbed (*gut lumen 1*), and the second was the PFOS conjugated in bile (*gut lumen 2*). In model 0, PFOS was not reabsorbed ($f_{reab}=0$) and the totality of PFOS in bile was assumed to enter the gut lumen 2, and then be eliminated by feces. All of the venous blood flowing out of the gut entered the liver and a fraction of venous blood flowing out of muscle and skin entered kidney (fraction "a" and "b", respectively), whereas the remaining flow of both tissues returned to systemic circulation (Nichols *et al.* 1996; Nichols *et al.* 2004). Furthermore, we assumed that there was no PFOS metabolism. Finally, elimination by feces, bile and urine were considered. A glossary of model parameter abbreviations, their units and their definitions are provided in Table 1.

Table 1. Glossary of parameter symbols, definitions and units used in the PBTK model.

Symbols	Definition	Unit
Biometric parameters		
α	Constant in the allometric growth equation	-
β	Constant in the allometric growth equation	-
BW	Body weight	kg
$BW_{VO_2_{ref}}$	Body weight reference at which VO_{2ref} was recorded	kg
$BW_{Qc_{ref}}$	Body weight reference at which Qc_{ref} was recorded	kg
f	Ad-libitum fraction	-
κ	Growth rate	cm h ⁻¹
L	Length	cm
Lm	Maximum length	cm
Physiological parameters		
a	Fraction of muscle going to kidney	-
b	Fraction of skin going to kidney	-
Fi	Blood flow entering tissue i	-
$Frac_i$	Relative arterial blood fraction to tissue i	-
$Free$	Free PFOS in plasma	%
K_x	Coefficient exchange between blood and water	L h ⁻¹
$Plasma$	Fraction of plasma in trout	%
Q_c	Cardiac output	L h ⁻¹
$Q_{c_{ref}}$	Cardiac output reference	L h ⁻¹ kg ⁻¹
Q_w	Effective respiratory volume	L h ⁻¹
Sc_i	Fraction of body weight	-
Vi	Volume of organ i	mL
VO_2	Oxygen consumption rate	mg _{O2} h ⁻¹
$VO_{2_{ref}}$	Oxygen consumption rate reference	mg _{O2} h ⁻¹ kg ⁻¹
Chemical specific parameters		
C_i	Concentration of chemical in tissue i <i>Excretion clearance</i>	ng g ⁻¹ ww
Cl_{bile}	Biliary	L h ⁻¹
Cl_{feces}	Fecal	L h ⁻¹
Cl_{urine}	Urinary	L h ⁻¹
f_{reab}	Reabsorbed PFOS fraction	-
K_u	Absorption rate constant	h ⁻¹
Pci	Tissue i :blood partition coefficient	-
$PC_{blood:water}$	Blood:water partition coefficient	-
Qi	Quantity of chemical in tissue i	ng
Exposure parameters		
C_{water}	Chemical concentration in water	ng L ⁻¹
C_{ox}	Dissolved oxygen concentration in water	ng L ⁻¹
t	Times	h
T	Temperature	K
TA	Arrhenius temperature	K
$T_{Qc_{ref}}$	Temperature at which Qc_{ref} was recorded	K
$T_{vo2_{ref}}$	Temperature at which VO_{2ref} was recorded	K

2.3. Model equations

2.3.1. Biometric equations

Growth of rainbow trout was based on the von Bertalanffy equation (Equation 1) integrating the feeding effect on growth rate and assuming a negligible impact of the maximum length variation due to the feeding level (fish were far from their maximum length). The body weight was determined by a mass–length relationship (Equation 2).

$$\frac{d(L)}{dt} = \kappa \times f - \frac{L}{Lm} \quad (\text{Equation 1})$$

$$BW = \alpha L^\beta \quad (\text{Equation 2})$$

where L is the total fish length at fork (cm), Lm the maximum total fork length (cm), f corresponds to ad libitum feeding, κ is the growth rate (cm h⁻¹), BW is the fish body weight (kg), α and β are constants.

2.3.2. Physiological equations

Cardiac output (Q_c), depending on both water temperature and fish mass (Barron *et al.* 1987; Wood and Shelton 1980), was corrected by the Arrhenius function (Equation 3) and then calculated as shown by Equation 4 (Grech *et al.* 2019).

$$KT = \exp\left(\left(\frac{TA}{T}\right) - \left(\frac{TA}{T_{exp}}\right)\right) \quad (\text{Equation 3})$$

T is the water temperature of the experiment (in Kelvin), TA is the Arrhenius temperature (in Kelvin) and T_{ref} is the reference temperature (in Kelvin) (Table 2).

$$Qc = Qc_{ref} \times KT \times \left(\frac{BW}{BW_{Qc_{ref}}}\right)^{-0.1} \times BW \times plasma, L.h^{-1} \quad (\text{Equation 4})$$

where $BW_{Qc_{ref}}$ is the body weight reference at which Qc_{ref} was recorded, KT is the Arrhenius function, BW the fish mass, and $plasma$ is the plasmatic fraction.

2.3.3. PFOS distribution in rainbow trout tissues

The general equation to describe PFOS amount change rate, without considering either elimination or absorption is given by Equation 5. All tissue compartments are assumed to be homogeneous and the distribution is limited by flow. Flows to tissues were calculated taking into account the free fraction of PFOS in plasma. Detailed equations for each organ are reported in Section A.2, in SI.

$$\frac{d(Q_i)}{dt} = F_i \times Free \times (C_{art}(t) - \frac{C_i(t)}{PC_i}) \quad (\text{Equation 5})$$

where Q_i is the amount of chemical in the compartment i , F_i is the arterial plasma blood flow to the compartment i , $Free$ is the free fraction of PFOS, C_{art} is the chemical concentration in arterial blood, C_i is the chemical concentration in venous blood, leaving the compartment i , and t is time. F_i was calculated by multiplying the relative fraction of each organ ($Frac_i$) by the cardiac output and volume of each organ, making it possible to calculate C_i , which was obtained by multiplying the fraction of organ (Sc_i) by the body weight.

2.3.4. PFOS elimination

Dynamic equations for PFOS elimination by bile, feces and urine depended on PFOS concentrations in liver, lumen of gut and kidney, respectively, and were described by Equations 6, 7 and 8.

$$\frac{dQ_{excret_{bile}}}{dt} = Cl_{bile} \times Free \times C_{liver} \quad (\text{Equation 6})$$

where $Q_{excret_{bile}}$ corresponds to the PFOS quantity excreted into the bile (ng), Cl_{bile} is the biliary clearance ($L h^{-1}$) and C_{liver} is the PFOS concentration in liver ($ng g^{-1}$).

$$\frac{dQ_{excret_{feces}}}{dt} = Cl_{feces} \times (C_{lumen1} + C_{lumen2}) \quad (\text{Equation 7})$$

where $Q_{excret_{feces}}$ corresponds to the PFOS quantity eliminated in the feces (ng), Cl_{feces} is fecal clearance ($L h^{-1}$) and C_{lumen1} and C_{lumen2} are the PFOS concentrations in each gut lumen compartment ($ng g^{-1}$).

$$\frac{dQ_{excret_{urine}}}{dt} = Cl_{urine} \times Free \times \frac{C_{kidney}}{PC_{kidney}} \quad (\text{Equation 8})$$

where $Q_{excret_{urine}}$ corresponds to the PFOS quantity excreted into urine (ng), Cl_{urine} is the urinary clearance ($L h^{-1}$), C_{kidney} is the PFOS concentration in kidney ($ng g^{-1}$) and PC_{kidney} is the partition coefficient between the plasma and the kidney. In this model, we did not consider a potential PFOS reabsorption by urine.

2.4. Description of model 1

Model 1 was implemented to explore the hypothesis of an enterohepatic circulation for PFOS. Model 1 equations were the same as model 0 equations and only the PFOS fraction reabsorbed by bile (f_{reab}) was modified. Since there are no data available on this process, we tested four different PFOS reabsorbed fractions: 25%, 50%, 75% and 100% ($f_{reab} = 0.25, 0.50, 0.75$ and 1, respectively).

2.5. Description of model 2

Model 2 was implemented to explore PFOS absorption and elimination by gills. The structure was similar to model 0, with additional equations. Both absorption and elimination processes were dependent on the ventilation rate (Q_w) (Equation 8), which was related to the oxygen consumption rate (VO_2 ; Equation 7). As for cardiac output, VO_2 depends on water temperature and fish mass (Barron *et al.* 1987; Wood and Shelton, 1980). Therefore, we also corrected this parameter using the Arrhenius function (Grech *et al.* 2019).

$$VO_2 = VO_{2ref} \times KT \times \left(\frac{BW}{BW_{VO_{2ref}}} \right)^{-0.1} \times BW, \text{ mgO}_2 \cdot \text{h}^{-1} \quad (\text{Equation 7})$$

where KT is the Arrhenius function, $BW_{VO_{2ref}}$ the body weight reference (kg) at which VO_{2ref} ($\text{mgO}_2 \text{ h}^{-1}$), the reference value of the process, was recorded, and BW the body weight (kg).

$$Q_w = \frac{VO_2}{C_{ox} - 0.2C_{ox}}, \text{ L} \cdot \text{h}^{-1} \quad (\text{Equation 8})$$

where C_{ox} is the dissolved oxygen concentration in water ($\text{mgO}_2 \text{ L}^{-1}$) and VO_2 is the oxygen consumption rate ($\text{mgO}_2 \text{ h}^{-1}$).

In this model, absorption and elimination by the gills were described as shown by Equations 9 and 10, respectively.

$$\frac{dQ_{admin_gill}}{dt} = Q_w \times C_{water} \quad (\text{Equation 9})$$

with Q_{admin_gill} corresponding to the quantity of PFOS absorbed into blood (ng) and C_{water} to PFOS concentrations in water (ng L^{-1}).

$$\frac{dQ_{excret_gill}}{dt} = Q_w \times Free \times \frac{C_{venous}}{PC_{blood:water}} \quad (\text{Equation 10})$$

with, Q_{excret_gill} corresponding to the quantity of PFOS eliminated by gills (ng), C_{venous} to the PFOS concentration in venous blood (ng L^{-1}) and $PC_{blood:water}$ corresponding to the partition coefficient between blood and water.

2.6. Statistical inference

Bayesian inference was used to fit the model to the experimental data obtained from toxicokinetic data. Prior distributions for each parameter estimated were defined according to information from the literature. Depending on the literature data available, either a normal or uniform prior distribution was

used (Table 2). Some parameters were not calibrated by the Bayesian inference and were fixed. The choice of fixed parameter values and prior values is explained in Section A.3, in SI. The models were fitted on the geometric mean of observed data ($n=5$) for kinetic data and on the arithmetic mean ($n=5$) for biometric data. Accordingly, the biometric data distribution was assumed to be Gaussian and the error was set at 20% for fish mass and length. Experimental data for concentrations in organs and feces were assumed to follow a log-normal distribution, and the error was estimated to be 15%, corresponding to measurement errors and inter-individual variability. Error was set at 30% for viscera because of the sample heterogeneity (mixed stomach, intestine, spleen and pyloric cecum).

The PBTK model was calibrated using the MCSim software (version 6.0.1), which is designed for Bayesian inference through Monte Carlo Markov Chain (Bois, 2009). Three independent Markov chains of 50,000 iterations were run for each calibration. To ensure chain convergence, we calculated the Gelman and Rubin convergence criterion (Gelman and Rubin, 1992), and analyzed the correlation between all parameters, the density and the distribution of prior and posterior values. The convergence diagnosis was carried out using R software (R-Core-team, 2016) within the RStudio environment (version 0.97.903).

From the joint posterior distribution, we can obtain the median and the standard deviation for each parameter. The accuracy of model parameter estimation can be visualized by comparing prior and posterior distributions: a narrow posterior distribution indicates that experimental data provided sufficient information to precisely estimate parameters. The plausibility of posterior values was also checked for all parameters.

2.7. Model comparison

The ability of the PBTK models to predict PFOS kinetics was verified by comparing simulations with the observed data geometric mean ($n=5$) for kinetic data and the arithmetic mean ($n=5$) for biometric data. Then we calculated the relative error to the mean (RE) in each organ and in feces (Equation 11). REs were used to compare the models. The model predictions associated with the lowest RE indicate the model that best fits the data.

$$\mathbf{RE} = \frac{\sum \left(\frac{|P_i - O_i|}{O_i} \right)}{n} \quad (\text{Equation 11})$$

with P_i the geometric mean predicted concentrations, O_i the geometric mean observed concentrations and n the total number of observations.

3. Results

3.1. Model 0 simulations accurately fit the data

3.1.1. Model calibration

Convergence of chains was successful for all calibrated parameters, with narrower posterior distributions compared to prior distributions (Figure A.1, in SI). The Gelman and Rubin criterion was always between 0.9 and 1.03 for all parameters (not shown). Some parameters such as the coefficient partition between gills and blood, or the coefficient partition between skin and blood, as well as urinary clearance, could not be updated due to a lack of data. Table 2 reports the maximum posterior values of calibrated parameters of all PBTK models.

Table 2. Symbols, prior distribution or value, source, estimation of mean, standard deviation (SD) and 95% credibility intervals (95% CI) for all parameters used in model 0.

Symbol	Prior distribution*	Sources	Posterior distribution	
			Mean ± SD	95% CI
Physiological parameters				
VO _{2ref}	Fixed	Elliottt, 1969	135.8	-
BW _{VO_{2_ref}}	Fixed	Elliottt, 1969	1.0	-
T _{VO_{2_ref}}	Fixed	Elliottt, 1969	283.65	-
Q _{cref}	Fixed	Baron <i>et al.</i> 1987	1.19	-
T _{Qc_ref}	Fixed	Baron <i>et al.</i> 1987	279.15	-
BW _{Qc_ref}	Fixed	Baron <i>et al.</i> 1987	0.27	-
TA	Fixed	Grech <i>et al.</i> 2017	6930	-
T _{exp}	Fixed	This study	191.75	-
Frac _{<i>i</i>}				
Liver	Fixed	Baron <i>et al.</i> 1987	0.0035	-
Muscle		Baron <i>et al.</i> 1987	0.6550	-
Kidney		Baron <i>et al.</i> 1987	0.0712	-
Viscera		Baron <i>et al.</i> 1987	0.0690	-
Brain		Péry <i>et al.</i> 2014	0.0550	-
Skin		Nichols <i>et al.</i> 1996	0.0728	-
Gill		Baron <i>et al.</i> 1987	0.0002	-
Sc _{<i>j</i>} **				
Blood	Fixed	Gingerich <i>et al.</i> 1990	0.0449	-
Liver		This study	0.0116	-
Muscle		This study	0.5660	-
Kidney		This study	0.0164	-
Viscera		This study	0.0514	-
Brain		This study	0.0010	-
Skin		Goeritz <i>et al.</i> 2013	0.0638	-
Gill		Goeritz <i>et al.</i> 2013	0.0196	-
Lumen		Nichols <i>et al.</i> 1996	0.0012	-
a	Fixed	Nichols <i>et al.</i> 1990	0.6	-
b	Fixed	Nichols <i>et al.</i> 1990	0.9	-
Plasma	Fixed	Stevens, 1968; Brill <i>et al.</i> 1998; Gingerich and Pityer, 1989 Baron <i>et al.</i> 1987	0.7	-
Free	N(0.025, 50)	Loccisano <i>et al.</i> 2011	3.2 10 ⁻² ±0.6 10 ⁻²	[2.8 10 ⁻² ;4.5 10 ⁻²]
f _{reab}	Fixed	-	0.0	
Biometric parameters				
Lm	TN(60, 30,40, 120)	Fishbase***	59.68±8.53	[50.59;81.68]
f	TN (0.9,20,0.5, 1)	This study	0.90±0.07	[0.73;0.99]
κ	U (0.0001,0.1)	-	8.73 10 ⁻³ ±8.11 10 ⁻³	[4.9 10 ⁻³ ;0.02]
α	N (0.00001, 30)	Grech <i>et al.</i> 2017	1.08 10 ⁻⁵ ±3.94 10 ⁻⁶	[6.18 10 ⁻⁶ ;2.12 10 ⁻⁵]
β	N (3.0, 10)	Grech <i>et al.</i> 2017	3.03±0.10	[2.83;3.19]
Substance-specific parameters				
PC _{<i>j</i>}				
Liver	N (2.0, 30)	Goeritz <i>et al.</i> 2013	2.09±0.13	[1.89;2.41]
Muscle	N (0.24, 30)	Goeritz <i>et al.</i> 2013	0.15±0.01	[0.13;0.17]
Kidney	N (0.70, 30)	Goeritz <i>et al.</i> 2013	0.60±0.04	[0.53;0.69]
Viscera	U (0.0, 5.0)	-	0.75±0.07	[0.67;0.95]
Brain	U (0.0, 5.0)	-	0.64±0.04	[0.57;0.74]
Skin	Fixed	Goeritz <i>et al.</i> 2013	0.40	-
Gills	Fixed	Goeritz <i>et al.</i> 2013	0.25	-
Cl _{urine}	Fixed	Consoer <i>et al.</i> 2016	0.0000179	-
Cl _{bile}	N (0.0023, 30)	Consoer <i>et al.</i> 2016	2.16 10 ⁻³ ±0.37 10 ⁻³	[1.52 10 ⁻³ ;2.53 10 ⁻³]
Cl _{feces}	N (0.0002, 30)	Clark, 1985	2.62 10 ⁻⁴ ±0.14 10 ⁻⁴	[2.28 10 ⁻⁴ ;2.87 10 ⁻⁴]
K _u	N (0.05, 50)	-	0.13±0.013	[0.11;0.16]

*N stands for the normal law (prior,coefficient variation); TN stands for the truncated normal law (prior, coefficient variation, lowest bound, highest bound); U stands for the uniform law.

**Organ mass reported in Table A.1 in SI

***<http://fishbase.org/search.php>

3.1.2. Model predictions

Predictions of growth and PFOS concentrations in organs (blood, liver, muscle, brain, kidney, viscera) and feces given by model 0 are presented in Figure 2 and Figure 3. All predictions were fit on mean data and therefore could not account for interindividual variability. Predictions of PFOS concentrations in organs for which there were no observed data, namely gill, skin and carcass, are provided in Figure A.2 in SI. The simulations recorded in Figure 2 and Figure 3 were in good agreement with observed data; those for skin, gill and carcass were on the same order of magnitude as the study by Goeritz *et al.* (2013).

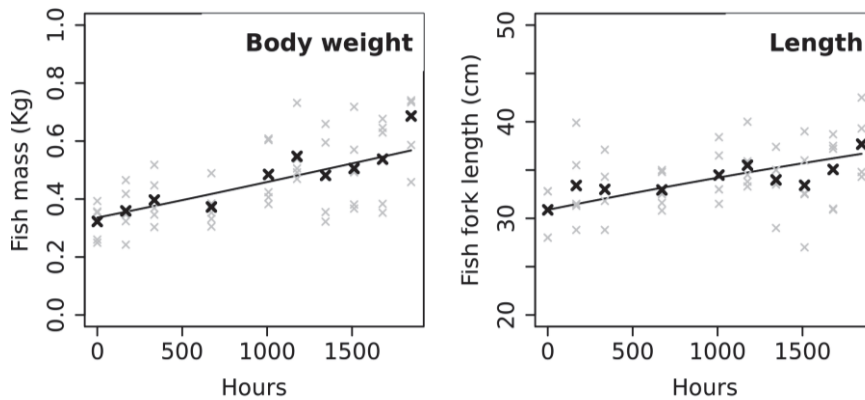


Figure 2. Predicted body weight and length of fish. In all graphs, black lines are the model predictions, black crosses are the arithmetic mean, grey crosses are the observed data ($n=5$). These simulations were made from a sample based on every 10th iteration of the last 1000 of each of three chains.

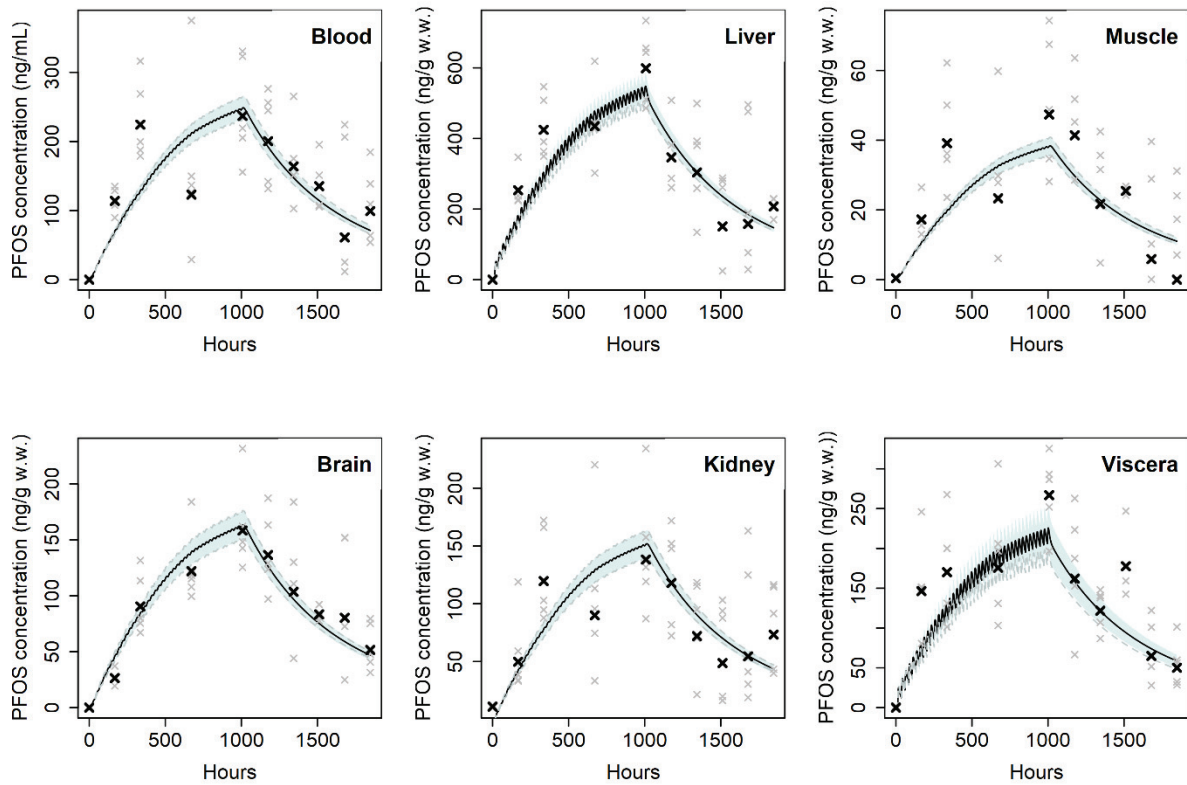


Figure 3. Predicted concentrations in the organs analyzed. In all graphs, black lines are the model predictions, black crosses are the geometric mean, grey crosses are the observed data ($n=5$) and the grey area is the 95% credibility interval of the model predictions, computed from the posterior distribution. These simulations were made from a sample based on every 10th iteration of the last 1000 of each of three chains.

3.1.3. Results of PFOS toxicokinetics hypotheses

In model 0, the only source of PFOS contamination was food. In 24 h, the PFOS in food was either absorbed in systemic circulation (70%) or excreted by fish (Figures 4.A, B, E and F). Feces predicted concentrations fitted well with the observed data (Figure 4.C) and the quantity of PFOS in bile contributed significantly to the feces concentration (Figure 4.B and D). The relative contribution of each excretion pathway is shown in Figure 4.B and these results suggest that fecal elimination was the most important route for PFOS, while elimination by urine was negligible.

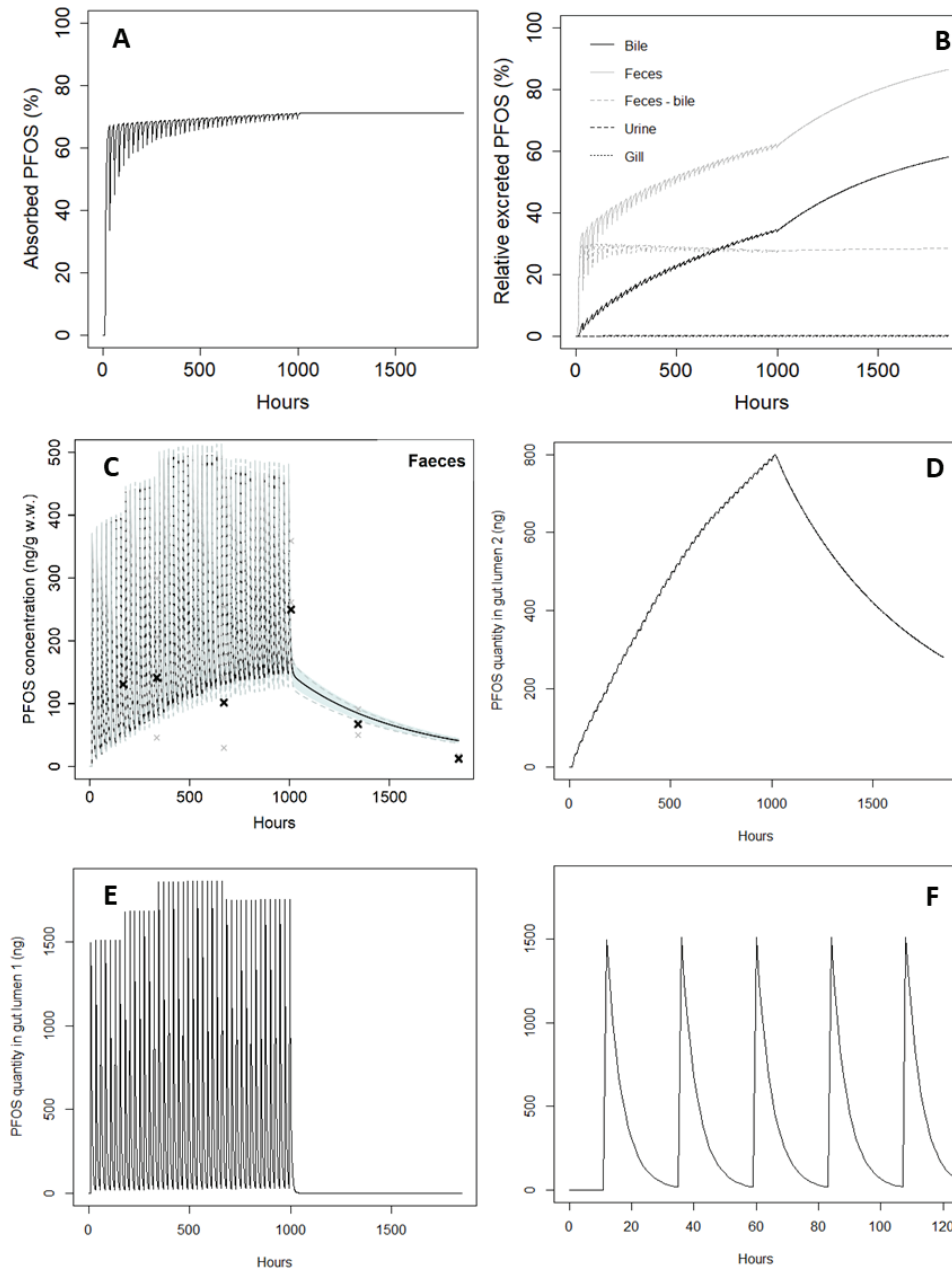


Figure 4. (A) Percentage of absorbed PFOS in organisms over time (Q_{abs}), calculated as $Q_{abs} = 1 - Q_{excret_{feces}} - Q_{excret_{bile}}$. (B) Contribution of each elimination pathway calculated as the ratio of PFOS quantity eliminated by urine, gills, bile or feces relative to the PFOS dose administrated (%). (C) Predicted concentrations in analyzed feces where the black line is the model predictions, black crosses are the geometric means, grey crosses are observed data and the grey area is the 95% credibility interval of the model predictions. (D) PFOS quantity in gut lumen 2, corresponding to the PFOS quantity excreted by the bile. (E) PFOS quantity in gut lumen 1, corresponding to PFOS fraction provided by food that has entered the organism. (F) PFOS quantity in gut lumen 1 during the first 5 days.

3.2. Model 1: Weight of the enterohepatic cycle

For model 1, biliary clearance was adapted in each case depending on the reabsorbed fraction of PFOS, but Bayesian inference did not significantly update the partition coefficients between blood and tissues, absorption rate or fecal clearance (Table A.3, in SI). Since biliary clearance was updated for each fraction tested, the PFOS quantity excreted by bile varied according to the reabsorbed fraction (Figure 5.A). However, kinetics did not significantly change compared to model 0 for any organs for either the uptake or the depuration phase, whatever fraction of reabsorbed PFOS by the enterohepatic cycle was tested (Figures 5.B and 5.C).

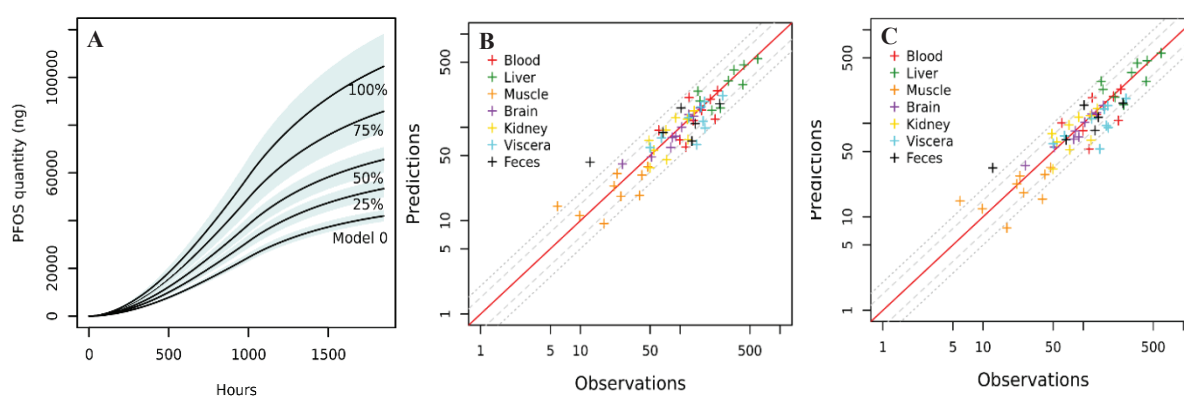


Figure 5. (A) Quantity of PFOS excreted by bile according to the reabsorbed fraction tested in model 1 compared to that simulated by model 0. Solid lines represent the mean simulated quantities and the grey area the 95% credibility interval of the model predictions. (B) Colored crosses represent concentrations in organs (model 0) and dotted lines represent 1.5-fold and twofold factors. (C) Colored crosses represent concentrations in organs (model 1 with 100% PFOS reabsorbed) and dotted lines represent 1.5-fold and twofold factors.

REs were calculated in each organ to compare results from each model and to assess the potential improvement provided by the four reabsorbed fraction hypotheses (Table 3). The sum of the REs was also calculated to qualify the best model as a whole. Even if the differences were slight, predictions from model 1 with 100% of PFOS reabsorbed presented the best overall REs, in particular in feces, compared to other fractions tested and to model 0, which had the highest overall RE.

Table 3. Calculated RE in each organ and in feces for model 0 and the four hypotheses tested in model 1; 25%, 50%, 75% and 100% correspond to the PFOS fraction reabsorbed in organisms by the enterohepatic cycle.

Organs	Reabsorbed fraction	Model 0		Model 1		
		0%	25%	50%	75%	100%
Blood		0.29	0.29	0.29	0.28	0.28
Liver		0.24	0.24	0.24	0.26	0.29
Muscle		0.42	0.42	0.42	0.43	0.44
Brain		0.14	0.12	0.12	0.11	0.10
Kidney		0.27	0.26	0.27	0.27	0.28
Viscera		0.23	0.21	0.21	0.23	0.28
Feces		0.71	0.69	0.67	0.62	0.51
Sum		2.30	2.23	2.22	2.20	2.18

Model 2 calibration provided narrow posterior distributions for all parameters (Table A.4, in SI). The mean value of the partition coefficient between blood and water was high, therefore limiting the PFOS quantity eliminated by gills. Moreover, the partition coefficients did not change significantly compared to model 0, while the kinetic parameters, namely the absorption rate constant and the biliary and the fecal clearances were lowered (Table A.4, in SI). Contrary to model 0 where PFOS entered the organism only from diet, PFOS was absorbed from both food and water in model 2. Addition of uptake and elimination of PFOS from gills changed the kinetic shapes slightly (Figure 6.A). Concentrations measured in water throughout the experiment revealed presence of PFOS, although it was low. Since water uptake was constant from the beginning to the end of the experiment, PFOS was still administrated in the organism during the depuration phase. At 42 days, water contributed 20.4% to the total PFOS administrated and 29.8% at the end of the experiment (Figure 6.B). Gill elimination accounted for 28.9% at the end of the experiment, nearly as much as feces (39.4%) (Figure 6.C). Again, urine was found to be a minor PFOS elimination route (0.10% at 42 days).

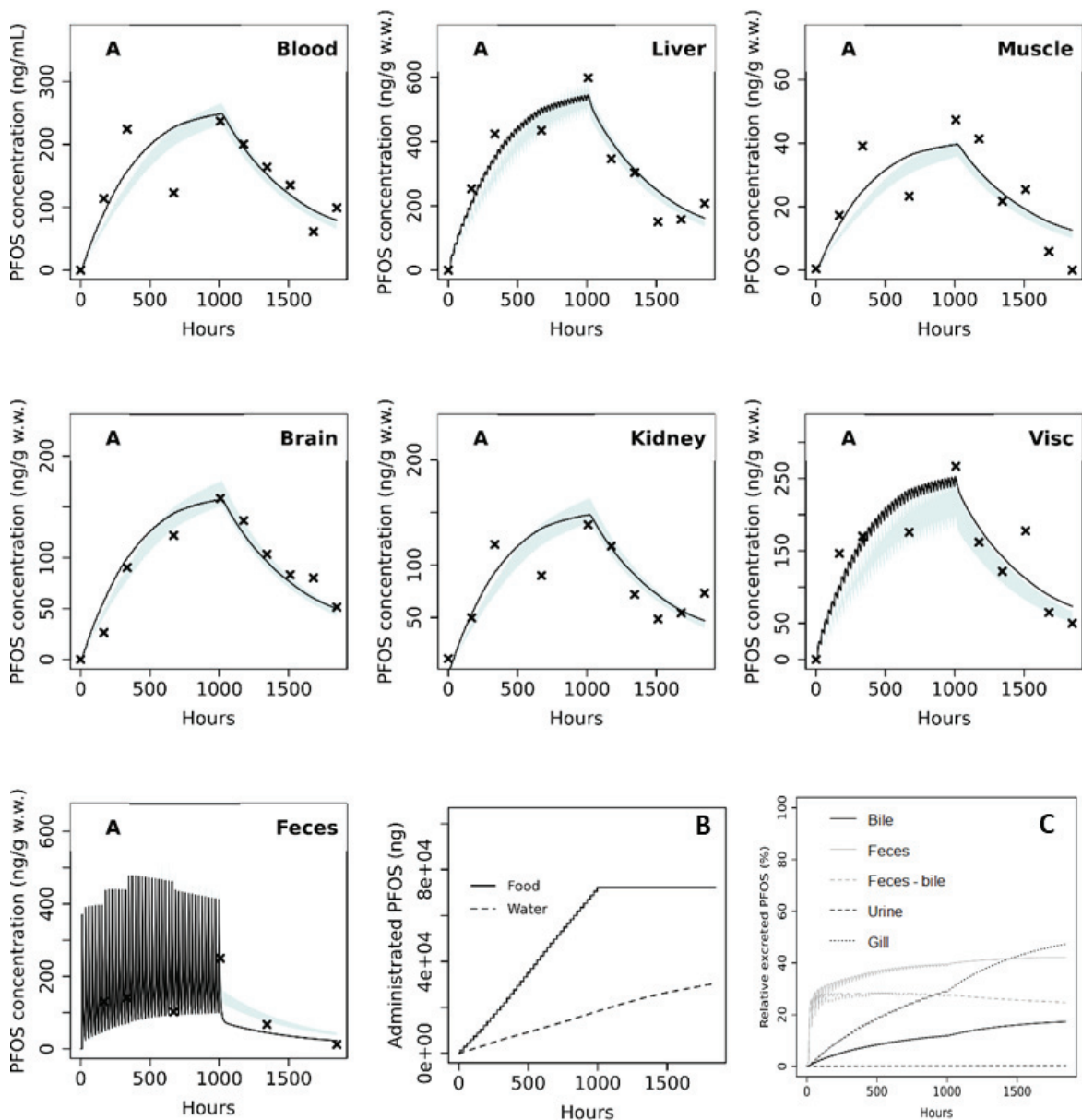


Figure 6. (A) Comparison of predictions of PFOS concentrations in organs and feces from models 0 and 2. Solid black lines are the geometric mean predictions of model 2 and the grey areas are the 95% interval of model 0 predictions. (B) Quantity of PFOS administered from food (solid black line) and water (dotted line) over time. (C) Contribution of each elimination pathway calculated as the ratio of PFOS quantity eliminated by urine, gills, bile or feces relative to the PFOS administrated dose (%).

Since kinetic curves from model 2 were slightly different from model 0, we calculated ER separately for both uptake and depuration phases (Table 4). For the uptake phase, predictions in almost all organs were better for model 2 than model 0, but this was not the case for the depuration phase. However, the overall RE was better in model 2 than model 0 because of the better model predictions in feces.

Table 4. Calculated RE in each organ and feces for models 0 and 2 – *Global* corresponds to the entire experiment (exposure and depuration phases together) and REs were also calculated for uptake and depuration phases separately.

	Model 0			Model 2		
	Global	Uptake phase	Depuration phase	Global	Uptake phase	Depuration phase
Blood	0.29	0.41	0.36	0.27	0.37	0.16
Liver	0.24	0.21	0.15	0.21	0.16	0.25
Muscle	0.42	0.38	0.32	0.41	0.34	0.45
Brain	0.14	0.19	0.30	0.20	0.28	0.06
Kidney	0.27	0.28	0.19	0.21	0.21	0.22
Viscera	0.23	0.28	0.18	0.26	0.20	0.28
Feces	0.71	0.38	0.37	0.39	0.29	0.51
Sum	2.30	2.13	1.87	1.95	1.85	1.93

4. Discussion

PBTK models developed specially for PFAS are still scarce, particularly in fish. This study proposed a PBTK model to describe PFOS distribution in adult rainbow trout tissues. This species is a good model since physiological parameters are well documented in the literature (Barron *et al.* 1987; Gingerich *et al.* 1990; Buschnell *et al.* 1998) and PBTK models already existed (Nichols *et al.* 1990; Lien and McKim 1993; Grech *et al.* 2019). In this manuscript, several mechanistic hypotheses were tested to improve the understanding of PFOS absorption and elimination.

4.1. Calibration and parametrization of the PBTK model

Bayesian inference was used to simultaneously estimate all model parameters together and thus enable a more accurate assessment of uncertainty around model predictions. Convergence diagnostics demonstrated that this approach made it possible to find *a posteriori* distributions for almost all parameters: narrow distributions were obtained, meaning that data provided enough information to estimate the parameters precisely (Figure A.1, in SI). Parameter calibration was therefore successful, as model predictions were in accordance with experimental data. A few parameters however, such as urinary clearance and partition coefficients between skin or gill and blood, could not be estimated: prior distribution is similar to posterior distribution due to the lack of measured PFOS concentrations in urine, skin and gill in this experiment. These parameters were then set at the value measured by other fish experimental studies (Consoer *et al.* 2016 and Goeritz *et al.* 2013). However, in the Consoer *et al.* study, urinary clearance for PFOS was determined from fish maintained in a respiratory chamber; this stressful design could have impacted the physiological responses. Gill and skin partition coefficients were the apparent partition coefficients calculated as the ratio of the PFOS concentration in tissue relative to that in the total blood and not in plasma. Therefore, we remain cautious in interpreting the results on PFOS accumulation in gills and skin and on urinary elimination of the compound.

Furthermore, to be closer to physiological reality, in this model we considered fish growth and the plasma fraction rather than the whole blood and estimated a free PFOS fraction. Indeed, fish growth is important in compound toxicokinetics (Paterson *et al.* 2007; Grech *et al.* 2017). When fish mass increased over time, growth dilution occurs and concentrations of compounds might be underestimated in organs. Growth is rarely considered in PBTK models however (Grech *et al.* 2017). Since fish studied in this exposure experiment were fed ad libitum, their mass increased more rapidly than those in natural streams (FAO, 2019). Indeed, fish weight gain over the entire experiment was 45.6% in only 77 days. It was therefore a step forward to consider growth, accurately predicted, in the present model to correct PFOS flows in each organ. Moreover, it was indicated that PFOS bind to serum albumin, one of the main components of plasma (Bischel *et al.* 2011; Chen and Guo, 2009; Ng and Hungerbühler, 2013), the remaining fraction (*Free*) being that eliminated or reabsorbed in enterohepatic circulation in model 1. In their study, Consoer *et al.* (2016) reported that plasma binding exceeded 99% for PFOS. To parametrize this free fraction, we used the estimated value in monkey as the prior (Loccisano *et al.* 2011) since the only two existing studies that have examined the PFAS binding to fish blood proteins did not report this parameter (Jones *et al.* 2003; Zhong *et al.* 2019). The free PFOS fraction estimated value was close to that for monkey, suggesting that a similar mechanism may explain the fate of PFOS in blood (Ng and Hungerbühler, 2013). Nevertheless, we were aware that parametrization of chemical binding to plasma protein is uncertain in our model, but it allowed us to take into account the bioavailability of chemicals and the effect on chemical distribution (Kleinow *et al.* 2008) and excretion across the gills (Erickson and McKim, 1990) or by the kidney (Pritchard and Renfro, 1984).

4.2. PFOS toxicokinetics described by the simplest model

Some studies have demonstrated that PFOS can be absorbed by food (Martin *et al.* 2003; Goeritz *et al.* 2013). For fish living in natural streams, this pathway could be the principal route for PFOS administration. Indeed, for carnivorous species such as rainbow trout, PFOS, quite hydrophobic, might be taken up mainly through prey (Martin *et al.* 2004; Babut *et al.* 2017). Therefore, we first modeled PFOS absorption only by food. The results showed that about 70% of the compound was assimilated within a few hours after the first oral uptake, suggesting that PFOS absorption is very rapid in rainbow trout and is reached at 19°C. In rats, PFOS is at least 95% absorbed following oral exposure (Chang *et al.* 2012), and some studies on rainbow trout have suggested that PFOS assimilation efficiency is close to 100% (Martin *et al.* 2003; Goeritz *et al.* 2013).

Concerning PFOS distribution, concentrations predicted by our PBTK models were generally in agreement with observed PFOS concentrations in all organs, in both the uptake and depuration phases, despite considerable interindividual variability (Figures 3). The quality of simulations was partly ensured

by updating the partition coefficients, for which the Bayesian calibration gave a narrow *a posteriori* distribution. According to RE values, the best predictions were those in brain. In this organ the data observed were less dispersed than in other organs, and PFOS kinetics was modeled as a simple transfer since no elimination was considered from this compartment. The profile of PFOS toxicokinetics in gills was slightly different from other organs (Figure A.2, SI) and can be explained by the low flow rate reported by Barron *et al.* (1987) used in this study. Indeed, they mentioned that their measured blood flow relative to the gill was underestimated and it should not be interpreted as actual perfusion rates. Nevertheless, the concentrations simulated in gills in the present study were close to those found by Falk *et al.* (2015), with experimental conditions were similar to ours. As is the case in other dietary exposure studies, liver, blood and kidney were the main organs contaminated (Falk *et al.* 2015; Martin *et al.* 2003; Shi *et al.* 2018; Gaillard *et al.* 2017), while muscle and brain were the least contaminated organs. PFOS concentrations in viscera were also relatively high; this might be the consequence of food residuals in the gut of fish.

Finally, the relative contribution of several elimination pathways was studied for the PFOS. Excretion of the compound was modeled via urine, bile and feces. Calibration of fecal and biliary clearances was successful given the availability of PFOS data in feces from the experimental work. Nevertheless, it was difficult to calibrate urinary clearance. Indeed, scarcity of available data did not help to estimate this parameter. Also, based on the assumption that PFOS does not present much affinity for the transporters involved in urinary reabsorption in rainbow trout (Consoer *et al.* 2016), this mechanism was not modeled. In mammals, PFOS is mainly excreted by feces in beef (Lupton *et al.* 2014) while it is eliminated more through urine by rodents (Cui *et al.* 2010; Gannon *et al.* 2011). Predictions of our model demonstrated that the main elimination route for PFOS in trout was via feces. This route represents the fraction of PFOS eliminated by bile and the fraction unabsorbed. These findings are consistent with Zhong *et al.* (2019), who investigated the elimination mechanisms of several PFOS isomers in carp exposed to perfluoroalkyl acids in water. They demonstrated that linear isomers, *i.e.*, the one used in the present study, were found in higher concentrations in feces than in water, containing PFOS from urine, PFOS excreted by gills and PFOS in feces dissolution. PFOS elimination by urine was on the contrary considered as minor, consistent with the finding reported by Consoer *et al.* (2016).

4.3. Additional hypotheses tested by other PBTK models

Altogether, this study provided evidence that the simplest PBTK model (model 0) accurately describes PFOS toxicokinetics. To go further, the main hypotheses on the PFOS kinetics were tested: the enterohepatic cycle, gill absorption and elimination.

Enterohepatic circulation of some PFAS has been suggested and it might be an important excretory pathway (Martin *et al.* 2003; Honda *et al.* 2017; Ulhaq *et al.* 2015). Indeed, because the oral bioavailability of PFOS is relatively high, it is also likely that the fraction eliminated to feces would be reabsorbed by the animal. Also, Ulhaq *et al.* (2015) reported the highest labeling of ¹⁴C-perfluorooctanoic acid (PFOA), another predominant PFAS in the environment, in the bile and intestines of zebrafish. However, to the best of our knowledge, there are no published studies that measure the transport of PFAS via enterohepatic circulation in fish. Also, this process is not explicitly incorporated in current models for aquatic organisms (Armitage *et al.* 2016). Therefore, we modeled this physiological process in our PBTK model by testing several arbitrary percentages of PFOS reabsorbed. Overall, the more PFOS reabsorbed, the better the RE sum was. In greater detail, REs were better for the feces compartment when the fraction of PFOS reabsorbed increased but the concentration predictions in viscera decreased. However, the differences between the REs of model 1 with 100% PFOS reabsorbed was only slightly lower compared to these differences with model 0. These results indicated that improvement of predictions when the enterohepatic cycle is considered is not significant, suggesting that this process plays a minor role in PFOS toxicokinetics. The multicompartiment model developed by Khazaee and Ng (2018) for PFOA in zebrafish, integrated the enterobiliary circulation as facilitated by membrane transporters. This process was parametered with rat data, which is probably responsible for the low predicted PFOA levels in bile relative to the values measured in fish used for evaluation. Furthermore, in their study, Consoer *et al.* (2016) found very low bile-to-plasma concentration ratios, suggesting that PFOS was not actively secreted into bile. In the study reported by Honda *et al.* (2017), PFOS concentrations in bile over time were not detected because the values were under the analytical limit of detection. Yet, our results showed that bile contributed to the PFOS elimination process. In these water exposure studies (Consoer *et al.* 2016; Honda *et al.* 2017), fish were not fed, so the biliary elimination of PFOS might be less active than in fed animals, because of lower bile flow rates. Indeed, the gallbladder does not stock bile when fish are fed ad libitum. Bile is spilled into the gastrointestinal tract while the gallbladder progressively fills as the fasting period lengthens (Talbot and Higgins, 1982). However, to our knowledge, PFAS concentrations have never been dosed in fish bile during a dietary exposure. Experimental tracking of labeled PFOS in organisms should therefore be carried out to contribute further knowledge on the importance of the enterohepatic cycle for this compound.

Furthermore, the branchial pathway is known to be a significant uptake and elimination route in fish for many chemicals (Erickson and McKim, 1990). Some authors reported that PFOS present in water is taken up (Martin *et al.* 2003b; Consoer *et al.* 2016; Zhong *et al.* 2019). However, it is difficult to distinguish experimentally whether PFOS in fish came from water flowing through gills or through the gut, after swallowing water. Some authors have used cannula in fish to provide information on these

different absorption pathways and to collect urine (Nichols *et al.* 1990; Consoer *et al.* 2014; Consoer *et al.* 2016). Fish are reared in stressful conditions, however, and the kinetic results obtained from these studies have to be interpreted cautiously because the experimental conditions might be questioned even though they should not influence fish physiological characteristics (McKim and Goeden, 1982). In our model (model 2), we analyzed PFOS uptake from food and water simultaneously. To our knowledge, this PBTK model is the first reporting the bioaccumulation of PFOS from several uptake routes simultaneously and completes previous studies that examined PFAS uptake either from water exposure (Ng and Hungerbühler, 2013) or by intravenous injection (Mittal and Ng, 2018). In our model, absorption through the gills was investigated by modeling PFOS exchanges with water limited by the effective respiratory volume (Equation 9), as suggested by Nichols *et al.* (1990). PFOS in water was continuously absorbed through gills over time. The results demonstrated the important relative contribution of this pathway (Figure 6) despite low PFOS concentrations in water (<5 ng L⁻¹ for all sampling times) and negligible compared to those in spiked food. Kinetic curves were somewhat different for the uptake phase and associated REs were slightly better for most organs when uptake and elimination by gills was considered. The assumption that all PFOS present in water was absorbed by the organism implies that gills are permeable enough for the compound to enter.

Like absorption routes, urinary and gill clearances cannot easily be assessed separately in fish except using a cannula. Gills may be an important elimination organ for many compounds (Erickson and McKim, 1990). For PFOS, the possibility of branchial elimination cannot be ruled out as an additional depuration mechanism for fish (Martin *et al.* 2003b). The design of the Consoer *et al.* (2016) experiment made it possible to study branchial and urinary elimination of PFOS in rainbow trout by collecting urine separately from water eliminated by gills. They determined that fish eliminate approximately 81% of PFOS across the gills, while renal elimination accounted for most of the remainder. Their findings were consistent with ours since the results of model 2 showed that 1) like model 0, urine was a minor route and feces the main elimination route; 2) the contribution of PFOS elimination through gills was not negligible. Simulations of model 2 for the depuration phase were not improved compared to those of model 0, but this did not prevent a good fit of the predicted concentrations on the observed data. Since the calibration of the PFOS partition coefficient between blood and water provided a high value of this parameter, we may suggest that PFOS elimination through gills is not governed by passive diffusion.

5. Conclusion

In this study, we proposed a PBTK model developed for adult rainbow trout to elucidate the fate of PFOS, by testing several mechanistic hypotheses. This model was qualified as physiologic because we considered fish growth, plasmatic fraction and relative blood flows for each organ. Predictions of PFOS

kinetics from our PBTK model were in agreement with our experimental data. The dietary exposure experiment strengthens PFAS kinetic data in fish, in particular for feces and brain, for which reported PFAS concentrations are scarce. This PBTK model accurately described the PFOS absorption by diet through the gut and improves current knowledge on elimination pathways, currently contested. Indeed, by simulating both gill and dietary uptake routes, the model can predict the amount of PFOS observed in rainbow trout that has come from PFOS exposure from the diet or water. Feces are the most important excretion pathway for PFOS in fish while urine is a minor route. Enterohepatic circulation played a minor role in the PFOS toxicokinetics and PFOS elimination, although gills should not be neglected even when concentrations in water are low. Abiotic factors, such as water temperature, might be added to this model to be closer to environmental conditions as they can drastically change the compound's toxicokinetics (Grech *et al.* 2017). This PBTK model can be used to describe the fate of other PFAS, such as alternatives to the old generation. A predictive model capable of simulating complex exposures can be used in ecological risk assessment, because conducting experimental studies for one chemical or a combination of chemicals is expensive and time-consuming.

Acknowledgements

The experiments were funded by the Rhone-Mediterranean and Corsica Water Agency; the Rhone-Alps Region provided a doctoral fellowship grant (ARC3 Environnement) for Alice Vidal. We thank Charline Gesset, Patrick Chevre and Louis Jacob (Irstea, St-Seurin-sur-l'Isle experimental station) for their kind and active support during the experiments. We also thank Linda Northrup (English Solutions, Voiron, France) for copy-editing the manuscript.

References

- Ahrens, L., and Bundschuh, M., 2014. Fate and effects of poly- and perfluoroalkyl substances in the aquatic environment: A review. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 33, 1921–1929.
- Armitage, J. M., Erickson, R. J., Luckenbach, T., Ng, C. A., Prosser, R. S., Arnot, J. A., Schirmer, K., Nichols, J. W. (2016). Assessing the bioaccumulation potential of ionizable organic compounds: Current knowledge and research priorities. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 36(4), 882–897.
- Babut, M., Labadie, P., Simonnet-Laprade, C., Munoz, G., Roger, M.-C., Ferrari, B.J.D., Budzinski, H., Sivade, E., 2017. Per- and poly-fluoroalkyl compounds in freshwater fish from the Rhône River: influence of fish size, diet, prey contamination and biotransformation. *Sci. Tot. Environ.* 605-606, 38-47.
- Barron, M.G., Tarr, B.D., Hayton, W.L., 1987. Temperature-dependence of cardiac output and regional blood flow in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish Biol.* 31, 735–744. doi:10.1111/j.1095-8649.1987.tb05276.x

- Bischel, H.N., Macmanus-Spencer, L.A., Zhang, C., Luthy, R.G., 2011. Strong associations of short-chain perfluoroalkyl acids with serum albumin and investigation of binding mechanisms. *Environ. Toxicol. Chem.* 30, 2423–2430. doi:10.1002/etc.647
- Bois, F. Y. (2009). GNU MCSim. *Journal Bioinformatics*, 25, 1453–1454
- Brill, R.W., Cousins, K.L., Jones, D.R., Bushnell, P.G., & Steffensen, J.F. 1998. blood volume, plasma volume and circulation time in a high-energy-demand teleost, the yellowfin tuna (*Thunnus albacares*), 654, 647–654.
- Brinkmann, M., Eichbaum, K., Kammann, U., Hudjetz, S., Cofalla, C., Buchinger, S., Reifferscheid, G., Schüttrumpf, H., Preuss, T., Hollert, H., 2014. Physiologically-based toxicokinetic models help identifying the key factors affecting contaminant uptake during flood events. *Aquatic Toxicology*, 152, 38–46. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.03.021>
- Bushnell, P.G., Conklin, D.J., Duff, D.W., Olson, K.R., 1998. Tissue and whole-body extracellular, red blood cell and albumin spaces in the rainbow trout as a function of time: a reappraisal of the volume of the secondary circulation, *J.Exp. Biol.*, 201, 1381–1391.
- Buck, R.C., Franklin, J., Berger, U., Conder, J.M., Cousins, I.T., de Voogt, P., Jensen, A.A., Kannan, K., Mabury, S.A., van Leeuwen, S.P.J., 2011. Perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances in the environment: terminology, classification, and origins. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 7, 513-541.
- Chang, S-C., Gorman, G.S., Gibson, S.J., Hart, J.A., Ehresman, D.J., Butenhoff, J.L., 2012. Comparative pharmacokinetics of perfluorooctanesulfonate (PFOS) in rats, mice and monkey. *Reprod. Toxicol.* 33, 428–440.
- Chen Y and Guo L., 2009. Fluorescence study on site-specific binding of perfluoroalkyl acids to human serum albumin. *Arch Toxicol.* 83, 255–261.
- Clark, E.R., and Harman, J.P. 1985. Production of metabolic and waste products by intensively farmed rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish Biol.* 27, 381–393.
- Consoer, D. M., Hoffman, A. D., Fitzsimmons, P. N., Kosian, P. A., & Nichols, J. W. 2014. Toxicokinetics of perfluorooctanoate (PFOA) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*, 156, 65–73. doi:10.1016/j.aquatox.2014.07.022
- Consoer, D.M., Hoffman, A.D., Fitzsimmons, P.N., Kosian, P.A., Nichols, J.W., 2016. Toxicokinetics of Perfluorooctane Sulfonate in Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*). *Environ. Toxicol. Chem.* 35, 717–727. doi:10.1002/etc.3230
- Cui, L., Liao, C., Zhou, Q., Xia, T., Yun, Z., & Jiang, G., 2009. Excretion of PFOA and PFOS in Male Rats During a Subchronic Exposure. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology.* 58, 205–213. doi:10.1007/s00244-009-9336-5
- Du, G., Hu, J., Huang, H., Qin, Y., Han, X., Wu, D., Song, L., Xia, Y., Wang, X. 2012. Perfluorooctane sulfonate (PFOS) affects hormone receptor activity, steroidogenesis, and expression of endocrine-related genes in vitro and in vivo. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 32, 353–360.
- Elliott, J. W., 1969. The Oxygen Requirements of Chinook Salmon. *The Progressive Fish-Culturist.* 31, 67-73.

- Erickson, R. J., McKim, J. M., 1990. A model for exchange of organic chemicals at fish gills: flow and diffusion limitations. *Aquatic Toxicology*. 18, 175-197.
- Erickson R., Nichols J., Cook P. et Ankley G., 2008. Bioavailability of Chemical Contaminants in Aquatic Systems. In: Hinton D. et Di Giulio R., editors, *The Toxicology of Fishes*, pp. 9-54.
- European Union. 2006. Directive 2006/122/EC of the European Parliament and of the Council of 12 December 2006 amending for the 30th time Council Directive 76/769/EEC on the approximation of the laws, regulations and administrative provisions of the Member States relating to restrictions on marketing and use of certain dangerous substances and preparations (perfluorooctane sulfonates). *Off J Eur Union* L372:32–34.
- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. ©FAO, 2019. <http://www.fao.org/fishery/affris/species-profiles/rainbow-trout/growth/en/>
- Falk, S., Failing, K., Georgii, S., Brunn, H., Stahl, T., 2015. Tissue specific uptake and elimination of perfluoroalkyl acids (PFAAs) in adult rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after dietary exposure. *Chemosphere* 129, 150–156. doi:10.1016/j.chemosphere.2014.06.061
- Gaillard, J., Veyrand, B., Thomas, M., Dauchy, X., Boiteux, V., Marchand, P., Bizec, B. Le, Banas, D., Feidt, C., 2017. Tissue Uptake, Distribution, and Elimination of Perfluoroalkyl Substances in Juvenile Perch through Perfluorooctane Sulfonamidoethanol Based Phosphate Diester Dietary Exposure. *Environ Sci Technol*. 51, 7658–7666. doi:10.1021/acs.est.6b05598
- Gannon, S., Johnson, T., Nabb, D., Serex, T., Buck, R., Loveless, S., 2011. Absorption, distribution, metabolism, and excretion of [¹⁴C]-perfluorohexanoate ([¹⁴C]-PFHx) in rats and mice. *Toxicology*. 283, 55–62.
- Gelman, A. and Rubin, D. 1992. Inference from iterative simulation using multiple sequences. *Statistical science*, 7, 457–511.
- Gingerich, W.H., Pityer, R.A., Rach, J.J. 1990. Whole body and tissue blood volumes of two strains of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. Biochem. Physiol.* 97, 615–620.
- Goeritz, I., Falk, S., Stahl, T., Schäfers, C., Schlechtriem, C., 2013. Biomagnification and tissue distribution of perfluoroalkyl substances (PFASs) in market-size rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ. Toxicol. Chem.* 32, 2078–2088. doi:10.1002/etc.2279
- Grech, A., Brochot, C., Dorne, J.-L., Quignot, N., Bois, F. Y., Beaudouin, R. 2017. Toxicokinetic models and related tools in environmental risk assessment of chemicals. *Science of The Total Environment*, 578, 1–15. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.10.146
- Grech, A., Tebby, C., Brochot, C., Bois, F. Y., Bado-Nilles, A., Dorne, J.-L., Quignot, N., Beaudouin, R. 2018. Generic physiologically-based toxicokinetic modeling for fish: Integration of environmental factors and parameterisation species variability. *Science of The Total Environment*.
- Honda, M., Muta, A., Shimazaki, A., Akasaka, T., Yoshikuni, M., Shimasaki, Y., & Oshima, Y. 2017. High concentrations of perfluorooctane sulfonate in mucus of tiger puffer fish *Takifugu rubripes*: a laboratory exposure study. *Environmental Science and Pollution Research*, 25, 1551–1558.
- Houde, M., Martin, J.W., Letcher, R.J., Solomon, K.R., Muir, D.C., 2006. Biological monitoring of polyfluoroalkyl substances: A review. *Environ Sci Technol*. 40, 3463–3473.

- Jones, P.D., Hu, W., De Coen, W., Nested, J.L., Giesy, J.P., 2003. Binding of perfluorinated fatty acids to serum proteins. *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 2639–2649. Doi:10.1897/02-553
- Khazaei, M., Ng, C., 2018. Evaluating parameter availability for physiologically based pharmacokinetic (PBPK) modeling of perfluorooctanoic acid (PFOA) in zebrafish. *Environmental Science Processes & Impacts.* 20, 105-119.
- Kleinow, K.M., Nichols, J.W., Hayton, W.L., McKim, J.M., Barron, M.C., 2008. Toxicokinetics in Fishes. In Di Giulio RT, Hinton DE, eds, *The Toxicology of Fishes*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp 55–153
- Kooijman, S. A., 2010. *Notation of Dynamic Energy Budget theory for metabolic organisation*. Cambridge University Press.
- Krafft, M.P., Riess, J.G., 2015. Per- and polyfluorinated substances (PFASs): Environmental challenges. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 20, 192–212. doi:10.1016/j.cocis.2015.07.004
- Lien, G.J., and McKim, J.M., 1993. Predicting branchial and cutaneous uptake of 2,2',5,5'-tetrachlorobiphenyl in fathead minnows (*Pimephales promelas*) and Japanese medaka (*Oryzias latipes*): Rate limiting factors. *Aquatic Toxicology.* 27,15-32.
- Loccisano, A.E., Jr, J.L.C., Andersen, M.E., Iii, H.J.C., 2011. Evaluation and prediction of pharmacokinetics of PFOA and PFOS in the monkey and human using a PBPK model. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 59, 157–175. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2010.12.004>
- Loccisano, A.E., Campbell, J.L., Butenhoff, J.L., Andersen, M.E., & Clewell, H.J., 2012. Comparison and evaluation of pharmacokinetics of PFOA and PFOS in the adult rat using a physiologically based pharmacokinetic model, 33, 452–467. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2011.04.006>
- Lupton, S.J., Huwe, J.K., Smith, D.J., Dearfield, K.L., & Johnston, J.J., 2014. Distribution and Excretion of Perfluorooctane Sulfonate (PFOS) in Beef Cattle (*Bos taurus*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 1167–1173. doi:10.1021/jf404355b
- Martin, J.W., Mabury, S.A., Solomon, K.R., Muir, D.C.G., 2003. Dietary accumulation of perfluorinated acids in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Environmental Toxicology and Chemistry.*
- Martin, J.W., Mabury, S.A., Solomon, K.R., & Muir, D.C.G., 2003. Bioconcentration and tissue distribution of perfluorinated acids in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22, 196–204. doi.org/10.1002/etc.5620220126
- Martin, J.W., Whittle, D.M., Muir, D.C.G., Mabury, S.A., 2004. Perfluoroalkyl contaminants in a food web from Lake Ontario. *Environ Sci Technol* 38, 5379–5385.
- McKim J. M. et Goeden H. M., 1982. A direct measure of the uptake efficiency of a xenobiotic chemical across the gills of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) under normoxic and hypoxic conditions. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology.* 72, 65-74.
- Ng, C.A., Hungerbühler, K., 2013. Bioconcentration of Perfluorinated Alkyl Acids: How Important Is Specific Binding? *Environ. Sci. Technol.* 47, 7214–7223. doi: 10.1021/es400981a
- Nichols, J. W., Fitzsimmons, P. N., Whiteman, F. W., Dawson, T. D., Babeu, L., Juenemann, J., 2004. A physiologically based toxicokinetic model for dietary uptake of hydrophobic organic compounds by fish: I. Feeding studies with 2,2',5,5'-tetrachlorobiphenyl. *Toxicological Sciences.* 77, 206-18.

- Nichols, J. W., McKim, J. M., Andersen, M. E., Gargas, M. L., Clewell, H. J., Erickson, R. J., 1990. A physiologically based toxicokinetic model for the uptake and disposition of waterborne organic chemicals in fish. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 106, 433-447.
- Nichols, J. W., McKim, J. M., Lien, G. J., Hoffman, A. D., Bertelsen, S. L., Elonen, C. M., 1996. A physiologically based toxicokinetic model for dermal absorption of organic chemicals by fish. *Fundamental and Applied Toxicology*. 31, 229-242.
- OECD. 2002. Hazard Assessment of Perfluorooctane Sulphonate (PFOS) and its Salts. Organisation for Economic Co-operation and Development.
- OECD. 2012. Bioaccumulation in Fish: Aqueous and dietary exposure. (OECD guidelines for testing of chemicals, TG 305.) Organisation for Economic Co-operation and Development.
- Paterson, G., Drouillard, K.G., Haffner, G.D., 2007. PCB elimination by yellow perch (*Perca flavescens*) during an annual temperature cycle. *Environ. Sci. Technol.* 41, 824–829. doi :10.1021/es060266r
- Pery, A. R. R., Devillers, J., Brochot, C., Mombelli, E., Palluel, O., Piccini, B., Brion, F., Beaudouin, R., 2014. A Physiologically Based Toxicokinetic Model for the Zebrafish *Danio rerio*. *Environmental Science & Technology*. 48, 781-790.
- Pritchard, J. B., Renfro, J. L., 1984. Interactions of xenobiotics with teleost renal function. *Aquatic Toxicology*. 2, 51-106.
- Raleigh R. F., Hickman T., Solomon R. C. et Nelson P. C. Habitat Suitability Index Models: Rainbow trout. FWS/OBS, 1984.
- Renner, R. 2001. Growing concern over perfluorinated chemicals. *Environ. Sci. Technol.* 35, 154A–160A.
- Shi, Y., Wang, J., Pan, Y., Cai, Y., 2012. Tissue distribution of perfluorinated compounds in farmed freshwater fish and human exposure by consumption. *Environ. Toxicol. Chem.* 31, 717–723.
- Shi, Y., Vestergren, R., Nost, T.H., Zhou, Z., Cai, Y., 2018. Probing the Differential Tissue Distribution and Bioaccumulation Behavior of Per- and Polyfluoroalkyl Substances of Varying Chain-Lengths, Isomeric Structures and Functional Groups in Crucian Carp. *Environ. Sci. Technol.* 52, 4592–4600. doi:10.1021/acs.est.7b06128
- Stadnicka, J., Schirmer, K., & Ashauer, R. 2012. Predicting Concentrations of Organic Chemicals in Fish by Using Toxicokinetic Models. *Environmental Science & Technology*. 46, 3273-3280.
- Stevens, E.D. 1968. The effect of exercise on the distribution of blood to various organs in rainbow trout. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 25, 615–625.
- Talbot, C., and Higgins, P. J., 1982. Observations on the gall bladder of juvenile Atlantic salmon *Salmo salar* L., in relation to feeding. *Journal of Fish Biology*. 21, 663-669.
- Ulhaq M, Sundström M, Larsson P, Gabrielsson J, Bergman Å, Norrgren L, et al. 2015. Tissue uptake, distribution and elimination of ¹⁴C-PFOA in zebrafish (*Danio rerio*). *AquatToxicol.* 163, 148–57.
- Von Bertalanffy, L., 1938. A quantitative theory of organic growth (inquiries on growth laws II). *Human Biol.* 10, 181-213.

Wang, M., Chen, J., Lin, K., Chen, Y., Hu, W., Tanguay, R. L., Huang, C., Dong, Q. 2011. Chronic zebrafish PFOS exposure alters sex ratio and maternal related effects in F1 offspring. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 30, 2073–2080. doi:10.1002/etc.594

World Health Organization (WHO), *Characterization and Application of Physiologically Based Pharmacokinetic Models in Risk Assessment*, World Health Organization, International Programme on Chemical Safety, Geneva, Switzerland, 2010.

Wood C. M. et Shelton G., 1980. Cardiovascular dynamics and adrenergic responses of the rainbow trout in vivo. *Journal of Experimental Biology*. 87, 247-70.

Zhong, W., Zhang, L., Cui, Y., Chen., M., Zhu, L. 2019. Probing mechanisms for bioaccumulation of perfluoroalkyl acids in carp (*Cyprinus carpio*): Impacts of protein binding affinities and elimination pathways. *Sci. Tot. Environ.* 647, 992-999. doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.099

Résumé du chapitre 3

« Elucider la toxicocinétique du PFOS via un modèle PBTK développé chez la truite arc-en-ciel »

Les substances perfluorées et polyfluorées (PFAS) sont largement répandues dans les écosystèmes d'eau douce en raison de leur résistance à la dégradation. La plupart de ces composés se bioaccumulent dans les organismes aquatiques, mais la compréhension des mécanismes d'absorption, de distribution et d'élimination est encore limitée chez les poissons. À cette fin, nous avons mis au point un modèle PBTK (toxicocinétique à base physiologique) à 10 compartiments pour élucider la cinétique du sulfonate de perfluorooctane (PFOS) chez la truite arc-en-ciel adulte. Ce modèle PBTK prend en compte certaines caractéristiques physiologiques : perfusion sanguine de chaque organe, fraction plasmatique, fraction libre de PFOS dans l'organisme et croissance des individus. Les paramètres ont été optimisés par inférence bayésienne. Premièrement, seule l'absorption du PFOS par l'alimentation a été prise en compte dans le modèle, de même que son élimination par l'urine, la bile et les fèces. Ensuite, deux hypothèses mécanistiques, censées régir la toxicocinétique du PFOS chez les poissons, à savoir d'une part le cycle entéro-hépatique et d'autre part l'absorption et l'élimination par les branchies, ont été testées. L'amélioration de l'ajustement du modèle aux données a été étudiée dans chaque organe en comparant les prédictions aux observations grâce au calcul de l'erreur relative. Les données expérimentales ont été obtenues à partir d'une expérience d'exposition, dans laquelle des truites arc-en-ciel adultes ont été nourries avec des aliments enrichis en PFOS pendant 42 jours, suivie d'une période de dépuración de 35 jours. Dans tous les cas, les concentrations de PFOS ont été bien prédites dans les organes et les fèces par notre modèle. Les résultats de notre modèle PBTK ont démontré que les fèces représentent la principale voie d'élimination du PFOS, alors que l'urine est une voie mineure. De plus, l'absorption branchiale du PFOS peut être importante malgré les faibles concentrations du composé dans l'eau, et son élimination par les branchies ne devrait pas être négligée. Enfin, le cycle entérohépatique est susceptible de jouer un rôle mineur dans la toxicocinétique du PFOS. Dans l'ensemble, ce modèle PBTK décrit bien la distribution du PFOS dans l'organisme et renseigne sur la contribution relative des voies d'absorption et d'élimination.

Chapitre 4

Comparaison de la toxicocinétique du PFHxS et du PFNA avec celle du PFOS chez la truite arc-en-ciel

Chapitre 4.

Comparaison de la toxicocinétique du PFHxS et du PFNA avec celle du PFOS chez la truite arc-en-ciel

1 Introduction

Même si le PFOS, le PFHxS et le PFNA appartiennent à la même famille des perfluoroalkyles, leur structure chimique diffère soit par leur nombre de carbones fluorés, soit par leur groupement fonctionnel en bout de chaîne. En effet, le PFNA possède le même nombre de carbones fluorés que le PFOS mais le groupement fonctionnel en fin de chaîne diffère : acide carboxylique pour le PFNA et groupement sulfonate pour le PFOS. Le PFHxS, est similaire au PFOS mais possède deux carbones fluorés de moins. Des études d'exposition à des mélanges de PFAS par l'eau ou par la nourriture chez le poisson ont démontré que la cinétique variait en fonction de chaque substance (Martin *et al.* 2003 ; Goeritz *et al.* 2013 ; Zhong *et al.* 2018). Les PFAS à longue chaîne et les PFAS sulfonés s'éliminent plus difficilement que leurs homologues à courte chaîne et leurs homologues carboxylés, respectivement.

L'objectif de ce chapitre est de comparer les profils TK du PFOS, du PFHxS et du PFNA. Pour cela, nous explorons tout d'abord les résultats expérimentaux relatifs au PFHxS et au PFNA obtenus au cours de cette thèse suite aux expériences réalisées à 7°C et à 19°C dont la méthodologie est détaillée chapitre 2. Seuls les résultats des expériences 7°C et 19°C sont discutés ici car l'aliment utilisé pour l'exposition à 11°C n'a pas été contaminé en PFNA. Afin de discuter de la distribution du PFHxS et du PFNA dans l'organisme, nous avons étudié leur répartition dans les organes. Par la suite, pour comparer les profils de TK de ces deux substances avec celle du PFOS, les cinétiques d'absorption et d'élimination ont été calculées pour chacune d'entre elle. Ceci a permis d'émettre des hypothèses sur les mécanismes susceptibles d'expliquer le devenir du PFHxS et du PFNA au sein de l'organisme. Ces hypothèses, difficilement vérifiables par des études statistiques simples avec nos données expérimentales, seront étudiées grâce au modèle PBTK calibré initialement pour le PFOS, en comparant les distributions *a posteriori* des paramètres, obtenues par ajustement du modèle sur les différents jeux de données.

2 Méthodologie

2.1. Répartition du PFOS, du PFHxS et du PFNA dans les organes d'intérêt

Les proportions de chacun des trois composés ont été calculées dans les organes analysés comme décrit par l'Equation 1 afin d'être comparées entre elles. Celles-ci ont été déterminées à partir des

concentrations en PFAS dans chaque tissu à la fin de la période d'exposition (j 42), rapportées à la somme des concentrations à ce même temps :

$$\mathbf{Répartition} (\%) = \frac{[\mathbf{PFAS}]_{\mathbf{organe}, \mathbf{J42}}}{\sum [\mathbf{PFAS}]_{\mathbf{organe}, \mathbf{J42}}} \times \mathbf{100} \quad (\text{Equation 1})$$

2.2. Modèle à un compartiment : calcul des cinétiques d'absorption et d'élimination

Les cinétiques d'absorption (Ka) et d'élimination (Ke) ont été calculées pour les trois substances et comparées entre elles. Un calcul simultané a été appliqué pour connaître la valeur des deux constantes de vitesse. Etant donné que les concentrations en PFAS n'ont pas été analysées dans les individus entiers, les valeurs de Ka et Ke ont été estimées à partir du sang, vecteur des substances dans l'intégralité de l'organisme (Equation 2).

Les calculs ont été réalisés par la fonction *ode* implémentée dans le package *DeSolve* dans le logiciel R (R-Core-team, 2016) avec l'environnement RStudio (version 0.97.903). Les valeurs de Ka et de Ke ont été calculées grâce à l'Equation 2 et optimisées en appliquant la méthode des moindres carrés pondérés (fonction *optim* implémentée dans le package *stats*).

$$\frac{dC_i(t)}{dt} = (Ka \times C_{\text{nourriture}}) - (Ke \times C_i(t)) \quad (\text{Equation 2})$$

Avec $C_i(t)$ et $C_{\text{nourriture}}$ les concentrations en PFAS dans le sang et dans la nourriture, respectivement (ng g^{-1}), Ka , la constante de vitesse d'absorption ($\text{g}_{\text{organisme}}^{-1} \text{h}^{-1}$) et Ke , la constante de vitesse d'accumulation (h^{-1}).

2.3. Modèle PBTK : comparaison des paramètres a posteriori

La structure du modèle 0 développé pour le PFOS (modèle à la description physiologique la plus simple) ainsi que les équations régissant le transfert des substances entre les divers compartiments ont été conservées telles quelles (*cf.* chapitre 3). Ce modèle a été appliqué au PFHxS et au PFNA afin de comparer les valeurs des paramètres *a posteriori* de ces deux molécules avec celle du PFOS. La stratégie de paramétrisation des modèles développés pour le PFHxS et pour le PFNA est la même que celle employée pour le modèle PFOS (*cf.* chapitre 3). Les valeurs des paramètres physiologiques et des paramètres d'exposition sont identiques à celles du modèle PFOS, tandis que les valeurs des paramètres propres à la substance (fraction libre de composé, coefficients de partage tissu:plasma, clairances urinaire, fécale et biliaire et constante de vitesse d'absorption) ont été estimées par inférence bayésienne. Les distributions *a priori* choisies sont identiques à celles du modèle PFOS, exceptées les

distributions des coefficients de partage viscères:plasma et cerveau:plasma, pour lesquelles la loi uniforme a été transformée en loi normale. Les valeurs *a priori* pour ces deux paramètres correspondent aux valeurs *a posteriori* optimisées pour le PFOS.

Une comparaison utilisant le critère statistique proposé par Goussen *et al.* (2015) a été réalisée sur les distributions *a posteriori*, afin de déterminer si les valeurs des paramètres relatifs au PFHxS et au PFNA étaient significativement inférieures ou supérieures à celles du PFOS. Les valeurs sont significativement différentes si 80% des distributions *a posteriori* sont soit supérieures, soit inférieures à l'intervalle de crédibilité à 95% des paramètres relatifs à notre molécule référence, le PFOS. 80% est le risque β classiquement utilisé en statistique, soit 20% de chevauchement entre les distributions *a priori* et *a posteriori* (Figure 1).

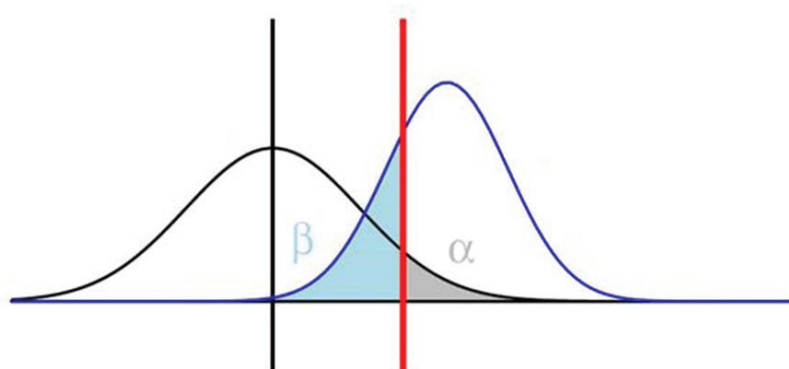


Figure 1. Représentation du risque statistique (α et β). Dans notre cas, la courbe noire correspond à la distribution *a posteriori* des paramètres du PFOS et la courbe bleue à la distribution *a posteriori* des paramètres du PFHxS ou du PFNA. La ligne verticale rouge représente la borne de l'IC 95% et l'aire colorée en bleu correspond à un chevauchement de 20%.

3 Résultats

3.1. Collecte des données expérimentales relatives au PFHxS et au PFNA

De la même manière que pour le PFOS (*cf* chapitre 3), les concentrations en PFHxS et en PFNA ont été analysées dans l'aliment contaminé, dans l'eau, dans les divers organes et dans les fèces (Tableaux 1, 2 et 3).

Les résultats d'analyse dans l'aliment démontrent, comme pour le PFOS, la stabilité du PFHxS et du PFNA dans les granulés contaminés (Tableau 1). Les concentrations des deux substances mesurées dans l'eau sont peu élevées et du même ordre de grandeur que celles du PFOS (Tableau 1). Ainsi, pour ces deux substances, les résultats confirment que les poissons ont été exposés au PFHxS et au PFNA majoritairement par la nourriture.

Tableau 1. Concentrations en PFHxS et en PFNA dans l'aliment contaminé (ng g⁻¹) et dans l'eau (ng L⁻¹) des trois expériences (moyennes des doubles injections des échantillons ± écart-type). *N.A.* signifie *non analysé*. *N.P.* signifie qu'il n'y a pas eu de prélèvement au jour correspondant.

		PFHxS			PFNA	
		Expérience 7°C	Expérience 11°C	Expérience 19°C	Expérience 7°C	Expérience 19°C
Aliment						
Echantillon	1	472.6±15.4	425.3±10.6	456.9±8.4	463.9±16.9	435.4±1.6
	2	482.3±3.4	423.9±13.3	449.7±4.5	442.3±8.7	419.4±0.5
	3	435.3±1.0	419.7±22.8		366.7±0.8	
	4	420.8±1.2	418.5±15.0		376.7±17.1	
Moyenne ± sd		452.8±27.9	421.9±12.5	453.3±6.9	412.4±47.5	427.4±9.3
Eau						
Jours	0	1.10±0.13	4.74±0.05	2.86±0.02	0.21±0.01	0.21±0.02
	7	0.86±0.00	<i>N.A.</i>	0.36±0.02	0.75±0.06	1.11±0.03
	14	0.92±0.00	7.19±0.42	0.32±0.08	0.99±0.13	0.89±0.36
	28	1.56±0.19	7.79±0.16	<i>N.A.</i>	0.89±0.00	<i>N.A.</i>
	42	1.19±0.01	7.45±0.08	0.64±0.05	1.28±0.08	0.91±0.03
	49	1.81±0.00	8.74±0.31	0.15±0.00	1.37±0.00	1.30±0.25
	56	1.12±0.00	2.96±0.15	0.11±0.00	0.04±0.00	0.81±0.02
	63	0.94±0.00		0.02±0.00	0.67±0.00	0.74±0.00
	70	<i>N.P.</i>		0.03±0.03	<i>N.P.</i>	0.77±0.02
	77	2.21±0.02		3.65±0.04	1.65±0.02	0.63±0.01

Les moyennes géométriques des concentrations mesurées ($n=5$) ont été calculées pour chaque temps de prélèvement et pour chacun des organes (Tableaux 2 et 3). Des similitudes existent entre les trois PFAS étudiés, telles qu'une accumulation plus importante dans le foie et dans le sang, puis dans une moindre mesure dans le rein et les viscères. D'une manière générale, les concentrations en PFHxS et en PFNA sont plus faibles que celles en PFOS dans les organes analysés.

Tableau 2. Concentrations en PFHxS (moyenne géométrique ($n=5$) \pm écart-type) dans les organes et les fèces des individus des trois expériences, exprimées en ng g⁻¹ de poids frais. *N.A.* signifie *non analysé* et *N.P.* signifie qu'il n'y a pas eu de prélèvement au jour correspondant.

Jours	Sang	Foie	Muscle	Reins	Cerveau	Viscères	Fèces
Expérience 7°C							
7	54.5±15.7	39.4±20.7	11.3±6.8	34.4±14.5	14.5±3.6	159.2±61.5	83.9±35.2
14	114.1±20.0	113.9±29.5	17.7±8.9	110.3±23.1	33.7±8.2	199.2±63.0	175.7±126.4
28	122.5±25.2	147.9±33.4	37.3±18.0	129.6±25.5	41.1±12.0	282.3±102.4	448.9±40.8
42	235.0±30.6	185.0±77.7	92.1±21.4	212.0±91.0	86.5±23.2	338.8±139.5	316.3±34.9
49	154.8±52.6	187.5±36.5	55.7±33.3	142.4±76.1	54.3±16.4	196.5±56.2	332.4±217.4
56	131.2±31.7	147.2±45.1	32.2±17.4	47.1±25.0	38.9±14.2	163.8±53.3	138.7±113.2
63	109.2±37.0	135.7±32.8	28.0±25.0	54.0±48.9	33.9±10.5	130.5±92.0	103.5±36.5
77	46.1±12.2	69.7±40.7	18.5±12.8	25.0±6.2	13.9±6.1	84.5±49.0	35.3±10.5
Expérience 11°C							
7	81.5±26.9	88.9±38.2	2.7±1.3	<i>N.P.</i>	40.5±13.6	28.20±13.8	<i>N.A.</i>
14	165.2±57.1	243.3±59.6	20.6±10.4	<i>N.P.</i>	64.4±15.3	53.6±10.2	<i>N.A.</i>
21	234.7±100.5	299.7±45.6	20.0±6.7	<i>N.P.</i>	83.2±17.1	79.7±36.2	<i>N.A.</i>
28	333.0±25.3	374.2±54.7	43.6±6.3	<i>N.P.</i>	92.0±17.8	92.5±22.4	49.5±0.4
35	239.2±19.6	301.8±67.6	39.7±6.7	<i>N.P.</i>	76.0±16.0	45.1±18.0	<i>N.A.</i>
42	114.7±64.0	180.3±58.3	16.9±7.4	<i>N.P.</i>	54.1±25.8	29.7±22.6	<i>N.A.</i>
49	61.7±27.9	67.8±38.8	11.0±21.3	<i>N.P.</i>	40.6±18.1	42.9±13.0	<i>N.A.</i>
56	57.0±30.1	31.7±38.2	5.2±5.3	<i>N.P.</i>	27.9±16.7	23.3±20.	16.9±0.3
Expérience 19°C							
7	121.5±20.3	196.4±56.5	11.0±3.7	30.4±27.8	27.0±4.2	170.5±72.7	126.1±0.0
14	215.4±52.9	390.1±78.7	28.5±13.4	95.9±31.5	63.3±17.4	158.3±67.9	137.2±135.5
28	74.7±116.0	313.9±136.4	12.9±16.6	53.9±54.0	44.5±30.4	148.9±85.2	86.5±73.3
42	182.3±66.0	467.4±95.0	27.4±15.6	94.3±38.7	68.8±15.8	253.2±54.4	229.5±120.0
49	138.3±37.5	223.2±43.7	22.3±7.8	74.6±25.9	49.6±9.7	132.8±81.8	<i>N.A.</i>
56	95.9±60.9	150.8±97.0	14.2±9.4	57.0±24.1	42.4±15.1	83.8±21.5	65.8±20.2
63	69.5±28.5	98.9±50.1	6.2±3.2	35.6±17.3	18.1±8.6	104.4±64.8	<i>N.A.</i>
70	35.8±42.0	96.4±82.5	0.8±4.0	17.0±26.0	15.7±14.4	2.4±20.7	<i>N.A.</i>
77	33.9±25.2	82.6±41.9	0.8±3.8	22.9±16.3	10.3±5.4	15.5±9.5	7.7±0.0

Tableau 3. Concentrations en PFNA (moyenne géométrique ($n=5$) \pm écart-type) dans les organes et les fèces des individus des trois expériences, exprimées en ng g^{-1} de poids frais. *N.A.* signifie *non analysé*.

Jours	Sang	Foie	Muscle	Reins	Cerveau	Viscères	Fèces
Expérience 7°C							
7	31.4 \pm 10.8	6.1 \pm 11.0	8.0 \pm 2.4	29.6 \pm 22.4	6.2 \pm 2.4	179.6 \pm 65.8	111.6 \pm 35.6
14	52.0 \pm 11.7	51.6 \pm 6.6	10.8 \pm 2.0	87.7 \pm 8.9	11.6 \pm 2.2	209.9 \pm 67.8	253.3 \pm 66.8
28	45.2 \pm 35.2	77.6 \pm 27.9	28.8 \pm 14.2	104.2 \pm 30.7	14.7 \pm 3.9	212.6 \pm 40.7	364.6 \pm 11.0
42	122.8 \pm 45.7	138.5 \pm 76.3	50.7 \pm 22.3	160.9 \pm 102.5	32.8 \pm 13.3	285.7 \pm 140.6	360.8 \pm 36.9
49	57.7 \pm 47.6	99.7 \pm 30.3	30.2 \pm 35.5	145.1 \pm 69.6	21.0 \pm 6.9	114.7 \pm 39.1	284.5 \pm 71.1
56	47.6 \pm 34.7	95.5 \pm 24.1	34.5 \pm 17.0	33.4 \pm 27.5	19.0 \pm 11.9	100.8 \pm 46.3	120.7 \pm 62.3
63	42.6 \pm 18.6	25.9 \pm 18.4	28.1 \pm 32.5	34.3 \pm 43.5	12.9 \pm 6.3	73.5 \pm 72.6	89.6 \pm 33.1
77	14.6 \pm 5.0	11.9 \pm 7.6	23.6 \pm 18.9	15.9 \pm 12.8	6.5 \pm 2.2	26.4 \pm 12.4	15.9 \pm 5.9
Expérience 19°C							
7	100.7 \pm 16.6	81.7 \pm 22.8	9.6 \pm 2.9	30.5 \pm 33.3	13.6 \pm 1.5	173.5 \pm 67.5	215.6 \pm 0.0
14	210.4 \pm 59.5	164.2 \pm 47.0	23.8 \pm 12.4	115.0 \pm 48.3	32.6 \pm 10.7	120.4 \pm 14.0	207.5 \pm 133.5
28	70.6 \pm 114.1	129.8 \pm 80.4	3.7 \pm 13.6	67.3 \pm 58.1	23.4 \pm 12.4	158.9 \pm 172.1	146.4 \pm 94.5
42	190.8 \pm 80.9	208.8 \pm 43.9	23.2 \pm 14.7	129.9 \pm 70.8	37.5 \pm 13.6	252.9 \pm 71.3	355.9 \pm 109.3
49	131.2 \pm 56.4	98.7 \pm 26.0	17.2 \pm 9.6	87.9 \pm 42.3	28.2 \pm 7.6	111.9 \pm 54.5	<i>N.A.</i>
56	104.7 \pm 53.1	100.5 \pm 57.5	11.8 \pm 7.9	71.8 \pm 34.5	27.1 \pm 10.9	151.2 \pm 87.4	86.7 \pm 56.0
63	78.3 \pm 33.3	70.4 \pm 36.5	7.7 \pm 1.3	64.2 \pm 44.9	15.0 \pm 7.5	13.7 \pm 5.9	<i>N.A.</i>
70	41.5 \pm 63.0	55.8 \pm 75.4	1.0 \pm 6.6	22.6 \pm 50.3	10.3 \pm 10.8	41.6 \pm 40.2	3.7 \pm 0.0
77	41.6 \pm 41.5	51.9 \pm 61.3	0.6 \pm 5.6	41.2 \pm 49.4	6.6 \pm 5.9	34.5 \pm 59.5	10.8 \pm 10.3

3.2. Répartition du PFHxS et du PFNA dans les organes d'intérêt

Les concentrations mesurées en PFOS, PFHxS et PFNA dans les granulés sont proches de la concentration nominale ($500 \mu\text{g kg}^{-1}$), ce qui a permis d'étudier et de comparer les répartitions de chacun des trois composés dans les organes (Figure 2). Le PFHxS et le PFOS s'accumulent davantage dans le sang, le foie et les viscères, en comparaison au muscle, au rein et au cerveau. Le profil de répartition du PFNA diffère légèrement, avec une accumulation favorisée dans le rein, en plus du sang, du foie et des viscères.

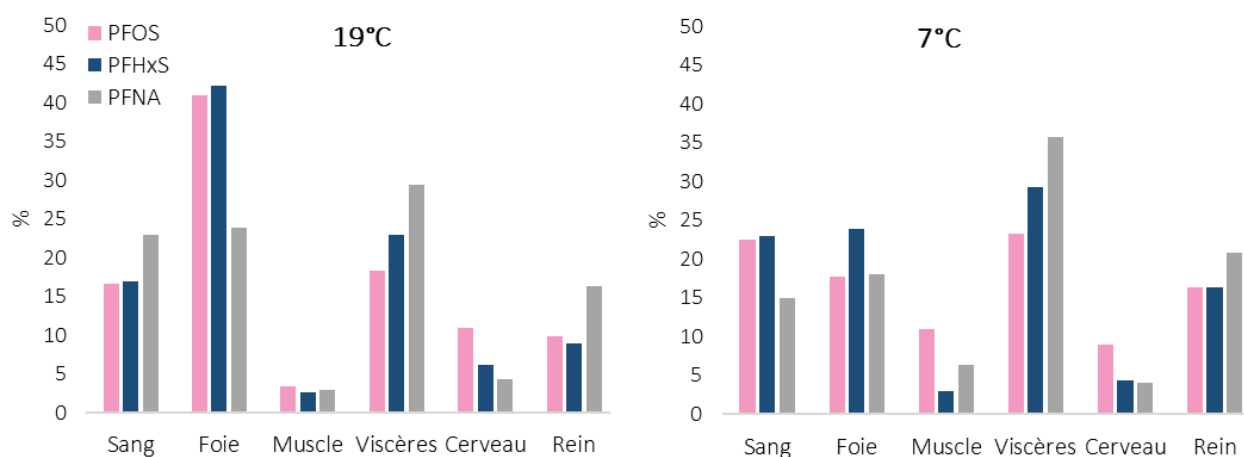


Figure 2. Répartition (%) du PFOS (rose), du PFHxS (bleu) et du PFNA (gris) dans les tissus analysés (sang, foie, muscle, viscères, cerveau et reins).

3.3. Résultats des cinétiques d'absorption et d'élimination du modèle un compartiment

La comparaison des constantes de vitesse est également réalisable car, comme mentionné précédemment, les quantités de PFOS, PFHxS et PFNA administrées aux poissons via la nourriture sont similaires. Quelle que soit l'expérience, les concentrations en PFOS dans le sang sont supérieures à celles du PFHxS et du PFNA (Figure 3).

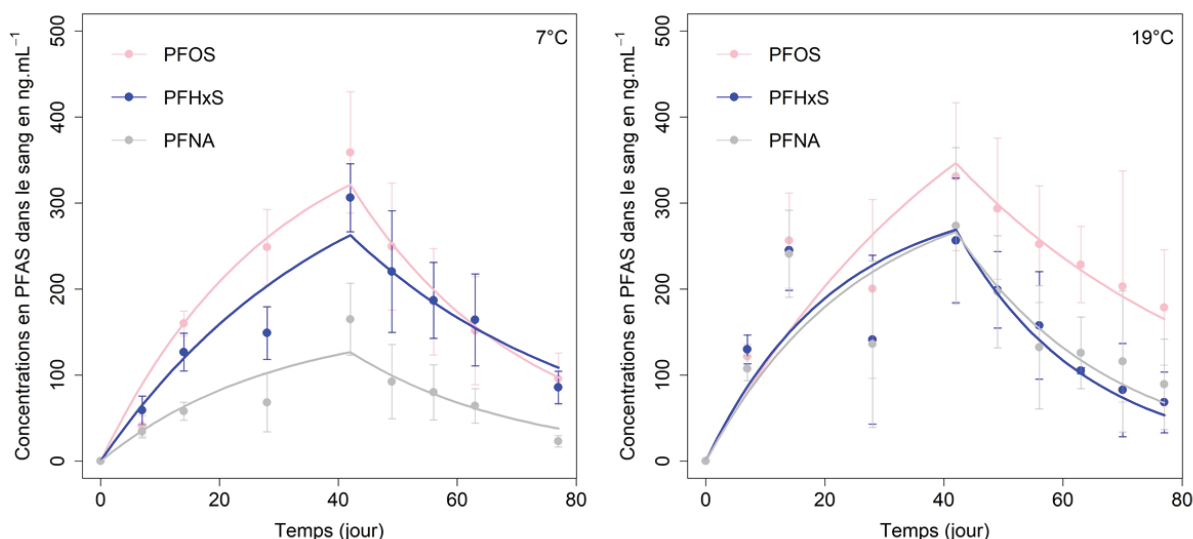


Figure 3. Concentrations en PFOS, en PFHxS et en PFNA dans le sang (ng mL^{-1}) pour les expériences à 7°C et 19°C. Les concentrations simulées sont représentées par les lignes colorées et les points représentent les moyennes \pm écart-type.

Par ailleurs, le PFOS a la vitesse d'accumulation la plus rapide pour l'expérience à 7°C, tandis que le PFHxS s'accumule plus rapidement dans l'expérience à 19°C (Tableau 4). De la même manière, le PFOS

s'élimine plus lentement que les deux autres PFAS à 19°C, alors que le PFHxS présente la vitesse d'élimination la plus lente à 7°C. Même si aucun schéma général ne peut être décrit sur la manière dont varient les vitesses d'accumulation et d'élimination, nous pouvons conclure qu'elles sont significativement différentes selon le composé.

Tableau 4. Constantes d'absorption (K_a) et d'élimination (K_e), calculées simultanément à partir des concentrations mesurées dans le sang, pour les expériences 7°C et 19°C. K_a est exprimée en $\text{g g}_{\text{organisme}}^{-1} \text{h}^{-1}$ et K_e est exprimée en h^{-1} .

	PFOS	PFHxS	PFNA
	$K_a (\text{g g}_{\text{organisme}}^{-1} \text{h}^{-1})$		
7°C	0.0310±0.0002	0.0224±0.0002	0.0126±0.0002
19°C	0.0268±0.0002	0.0320±0.0003	0.0285±0.0003
	$K_e (\text{h}^{-1})$		
7°C	0.0341±0.0004	0.0252±0.0004	0.0344±0.0009
19°C	0.0212±0.0003	0.0462±0.0005	0.0391±0.0005

3.4. Résultats du modèle PBTK

3.4.1. Résultats de la calibration du modèle PBTK

Dans l'ensemble, l'optimisation des paramètres a été fructueuse et les résultats des diagnostics de convergence des chaînes de Markov sont présentés Figures A.1. et A.2 (Annexes du chapitre 4). La Figure 4 permet de connaître la qualité des ajustements dans les différents organes pour le PFOS, le PFHxS et le PFNA. Les ajustements sont satisfaisants dans les trois cas, ce qui permet ainsi la comparaison des paramètres calibrés pour chacune des substances étudiées. Les moyennes (\pm écart-type) des distributions *a posteriori* de l'ensemble des paramètres ainsi que les intervalles de crédibilité à 95% sont référencés Tableau 5.

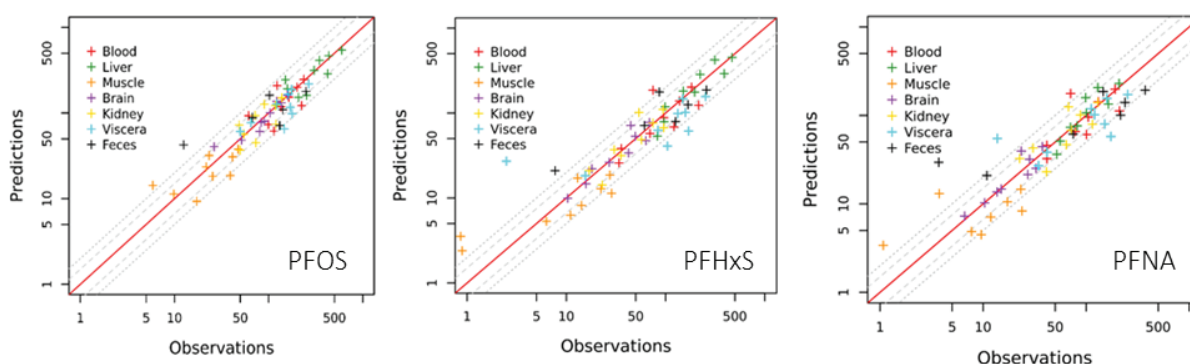


Figure 4. Concentrations prédites en fonction des concentrations mesurées expérimentalement pour le PFOS (gauche), le PFHxS (milieu) et le PFNA (droite). Les croix de couleur représentent les concentrations dans les différents organes, la ligne rouge est la ligne d'équation $x = y$ et les lignes grises représentent 50% et 100% d'erreur.

Pour faciliter la distinction des différences significatives entre les valeurs des paramètres répertoriées dans le Tableau 5, les données ont été écrites en rouge pour indiquer les valeurs significativement supérieures à celles du PFOS, et en bleu pour indiquer les valeurs significativement inférieures à celles du PFOS. Les incertitudes autour des paramètres calibrés sont relativement élevées, donc la probabilité que plus de 80% des distributions *a posteriori* des paramètres relatifs au PFHxS et au PFNA se trouvent hors des IC 95% du PFOS est peu élevée. Par conséquent, les valeurs en gris indiquent les valeurs pour lesquelles les distributions *a priori* et *a posteriori* se chevauchent à 50%. Ces différences sont de faible intensité, mais apportent tout de même de l'information à l'interprétation des résultats.

Tableau 5. Symboles, distribution *a priori*, estimation de la moyenne \pm écart-type et intervalles de crédibilité à 95 % (IC 95 %) pour les paramètres calibrés dans les modèles *PFHxS* et *PFNA*, en comparaison avec les distributions *a posteriori* trouvées pour le PFOS.

Symboles	Distribution <i>a priori</i> *	PFHxS		PFNA		PFOS	
		Distribution <i>a posteriori</i>		Distribution <i>a posteriori</i>		Distribution <i>a posteriori</i>	
		Moyenne \pm sd	IC 95%	Moyenne \pm sd	IC 95%	Moyenne \pm sd	IC 95%
Free (10^{-2})	N(0.025, 50)	3.9 \pm 0.4	[3.3;4.7]	5.9 \pm 0.9	[6.3;7.8]	3.2 \pm 0.6	[2.8 ;4.5]
PC _i							
Foie	N (2.0, 30)	2.19 \pm 0.14	[1.98;2.49]	1.15 \pm 0.08	[1.05;1.34]	2.09 \pm 0.13	[1.89;2.41]
Muscle	N (0.24, 30)	0.09 \pm 0.006	[0.08;0.11]	0.07 \pm 0.004	[0.07;0.08]	0.15 \pm 0.01	[0.13;0.17]
Reins	N (0.70, 30)	0.55 \pm 0.04	[0.49;0.61]	0.70 \pm 0.05	[0.64;0.82]	0.60 \pm 0.04	[0.53;0.69]
Viscères	N(0.75, 30)	0.68 \pm 0.06	[0.61;0.86]	0.80 \pm 0.08	[0.71;1.02]	0.75 \pm 0.07	[0.67;0.95]
Cerveau	N(0.64, 30)	0.37 \pm 0.02	[0.34;0.43]	0.22 \pm 0.01	[0.20;0.26]	0.64 \pm 0.04	[0.57;0.74]
Cl _{bile} (10^{-3})	N (0.0023, 30)	2.61 \pm 0.27	[2.26;3.22]	2.25 \pm 0.43	[2.01;2.39]	2.16 \pm 0.37	[1.52;2.53]
Cl _{fèces} (10^{-4})	N (0.0002, 30)	2.82 \pm 0.16	[2.54;3.13]	2.91 \pm 0.15	[2.62;3.18]	2.62 \pm 0.14	[2.28;2.87]
K _u	N (0.05, 50)	0.16 \pm 0.016	[0.13;0.20]	0.08 \pm 0.007	[0.07;0.09]	0.13 \pm 0.013	[0.11;0.16]

*N représente la loi normale (valeur *a priori*, coefficient de variation (%)).

Globalement, le PFHxS présente moins de différences significatives avec le PFOS que le PFNA, en accord avec les résultats de la partie 3.2. La fraction libre du PFNA (Free) est significativement plus élevée que celle du PFOS, alors que la constante d'absorption (K_u) est significativement plus faible. Par ailleurs, les coefficients de partage du PFHxS et du PFNA entre le muscle et le plasma, et entre le cerveau et le plasma sont significativement plus faibles que celui du PFOS, et le coefficient de partage entre le foie et le plasma est également significativement plus faible, uniquement pour le PFNA.

3.4.2. Concentrations prédites dans les organes

Les prédictions des modèles *PFHxS* et *PFNA* ont été confrontées aux données issues de l'expérience à 19°C (Figures 5 et 6), de la même manière que pour le PFOS (*cf* chapitre 3). Malgré une légère sous-estimation des prédictions du modèle dans le muscle et les viscères, les résultats démontrent que, dans l'ensemble, les concentrations simulées s'ajustent bien aux données observées, tant pour le PFHxS que pour le PFNA.

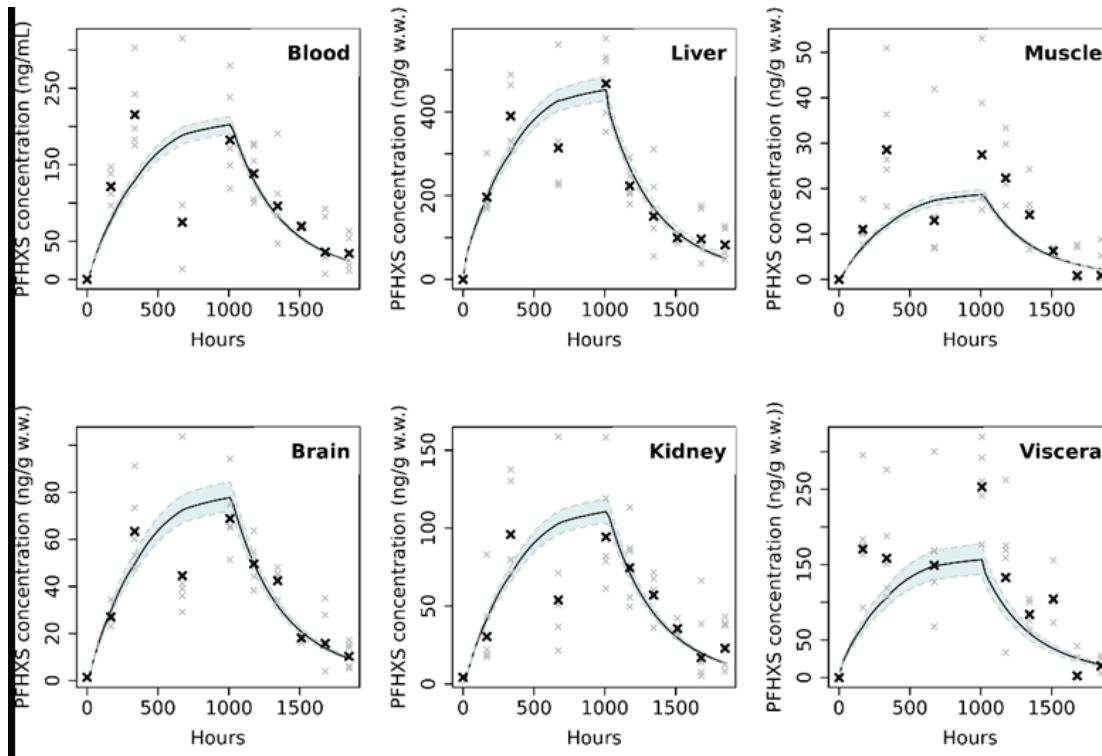


Figure 5. Prédictions des concentrations en PFHxS dans les organes (sang, foie, muscle, cerveau, reins et viscères). Dans tous les graphiques, les lignes noires sont les prédictions du modèle, les croix noires sont les moyennes géométriques des données expérimentales ($n=5$) et les aires grises représentent les intervalles de crédibilité à 95%. Ces graphiques ont été réalisés à partir d'un fichier constitué d'un pas de 10 itérations des 1000 dernières de chacune des trois chaînes.

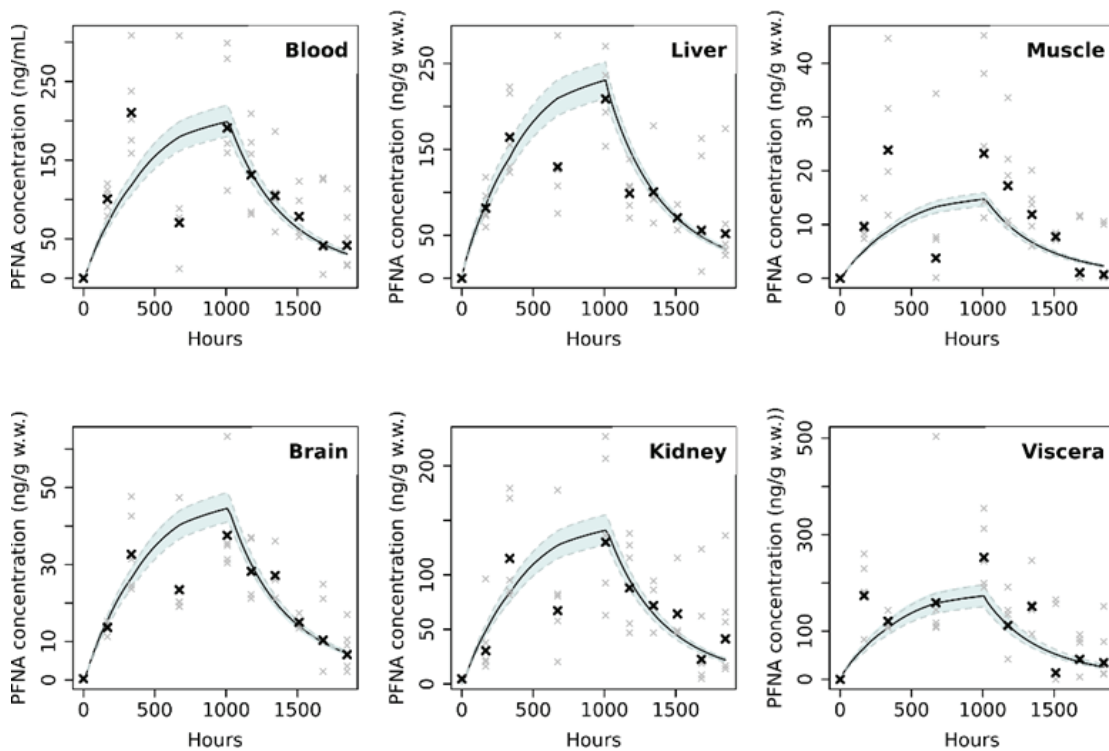


Figure 6. Prédictions des concentrations en PFNA dans les organes (sang, foie, muscle, cerveau, reins et viscères). Dans tous les graphiques, les lignes noires sont les prédictions du modèle, les croix noires sont les moyennes

géométriques des données expérimentales ($n=5$) et les aires grises représentent les intervalles de crédibilité à 95%. Ces graphiques ont été réalisés à partir d'un fichier constitué d'un pas de 10 itérations des 1000 dernières de chacune des trois chaînes.

3.4.3. Absorption et élimination des substances

L'absorption du PFHxS et du PFNA, et la contribution relative des différentes voies d'excrétion ont pu être étudiées grâce au modèle PBTK (Figures 7 et 8). La cinétique du PFHxS et du PFNA a ainsi pu être comparée à celle du PFOS. Les Figures 7.A et 8.A montrent que 73.36% du PFHxS et 57.04% du PFNA ont été absorbés respectivement, contre 71.20% pour le PFOS (moyenne du $Ku_{PFHxS} >$ moyenne du $Ku_{PFOS} >$ moyenne du Ku_{PFNA}). Le PFOS est donc moins absorbé par l'organisme que le PFHxS mais plus que le PFNA, en accord avec le Ka expérimental selon l'expérience 19°C (Tableau 4).

Les concentrations en PFHxS et en PFNA dans les fèces sont tout de même prédites de manière satisfaisante (Figures 7.C et 8.C) malgré une légère sous-estimation (Figure 4). Les fèces restent la voie d'élimination majoritaire pour ces deux substances (Figures 7.B et 8.B) et les quantités de PFHxS et de PFNA dans la bile sont plus faibles que celle du PFOS (Figures 7.D et 8.D). Comme pour le PFOS, l'urine est une voie d'excrétion minoritaire pour le PFHxS et le PFNA.

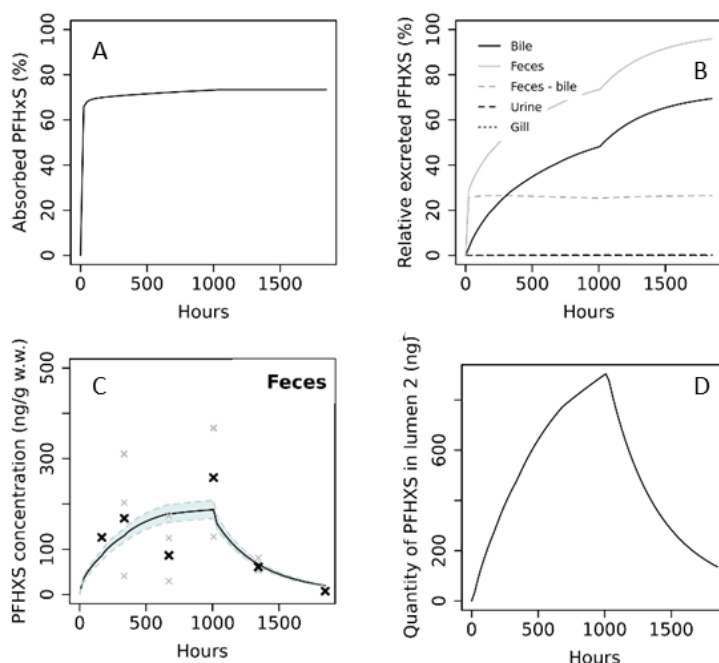


Figure 7. (A) Pourcentage de PFHxS absorbé dans l'organisme au cours du temps (Q_{abs}), calculé comme $Q_{abs} = 1 - Q_{excret_{fèces}} - Q_{excret_{bile}}$ - (B) Contribution de chaque voie d'élimination calculée comme le rapport entre la quantité de PFHxS éliminée par l'urine, par les branchies, par la bile ou par les fèces et la dose administrée de PFHxS (%) - (C) Concentrations prédites dans des fèces (ligne noire). Les croix noires représentent les moyennes géométriques des données expérimentales, les croix grises sont les données observées et la zone grise est l'intervalle de crédibilité à 95 % des prédictions du modèle - (D) Quantité de PFHxS dans la lumière intestinale 2, correspondant à la quantité de PFHxS excrétée par la bile.

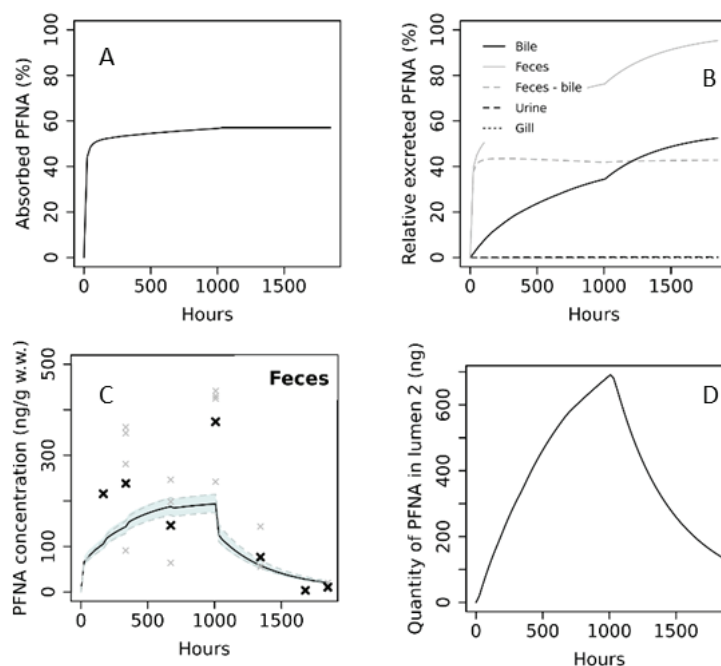


Figure 8. (A) Pourcentage de PFNA absorbé dans l'organisme au cours du temps (Q_{abs}), calculé comme $Q_{abs} = 1 - Q_{excret_{feces}} - Q_{excret_{bile}}$ - (B) Contribution de chaque voie d'élimination calculée comme le rapport entre la quantité de PFNA éliminée par l'urine, par les branchies, par la bile ou par les fèces et la dose administrée de PFNA (%) - (C) Concentrations prédites dans des fèces (ligne noire). Les croix noires représentent les moyennes géométriques des données expérimentales, les croix grises sont les données observées et la zone grise est l'intervalle de crédibilité à 95 % des prédictions du modèle - (D) Quantité de PFNA dans la lumière intestinale 2, correspondant à la quantité de PFNA excrétée par la bile.

4 Discussion, conclusion et perspectives

Ces résultats font l'objet d'une première étude descriptive globale du devenir du PFHxS et du PFNA. Les observations issues des expériences d'exposition ont permis de mettre en évidence certaines similitudes et d'émettre des hypothèses mécanistiques pouvant expliquer les différences des profils TK du PFOS, du PFHxS et du PFNA. Cependant, dans cette partie expérimentale, les concentrations mesurées dans les organes ainsi que les processus ADME sont étudiés séparément. La modélisation PBTK, prenant en compte l'intégralité des tissus et analysant simultanément les processus ADME, a été utilisée pour tenter de lever les verrous mécanistiques. Ainsi, le modèle PBTK développé initialement pour le PFOS a été appliqué et calibré pour le PFHxS et le PFNA. Les distributions *a posteriori* plus étroites traduisent l'apport des informations par les données lors de la calibration bayésienne (Annexe du chapitre 4). La qualité des prédictions des concentrations, en accord avec les concentrations observées, suggère que la structure simple du modèle développée pour le PFOS (alimentaire uniquement et excrétion par l'urine et par les fèces sans tenir compte du cycle entéro-hépatique, ni de l'absorption et de l'élimination branchiales) permet d'expliquer en grande partie le devenir du PFHxS et du PFNA. Ceci a permis de comparer leur cinétique par rapport à celle du PFOS, sur la base des valeurs des paramètres re-calibrés (Tableau 5).

Le profil de répartition du PFHxS est plus proche de celui du PFOS que ne l'est le PFNA (Figure 2). Par exemple, le PFNA se répartit davantage dans le rein comparativement au PFOS ou au PFHxS. L'étude de Zhong *et al.* (2019) traite des mécanismes de bioaccumulation des acides perfluoroalkyles chez la carpe. Les auteurs ont comparé la distribution des PFAS d'intérêt en calculant leurs pourcentages cumulés par organe (la somme des concentrations des PFAS est égale à 100% dans chaque organe). Leurs résultats sont en accord avec les nôtres (Figure 2), puisque la proportion relative de PFOS est plus importante dans le foie que celle du PFNA, tandis que la proportion relative de PFNA est plus importante dans le rein que celle du PFOS. D'après Armitage *et al.* (2017), il est possible que les PFCA soient de meilleurs substrats pour les transporteurs membranaires dans le rein du poisson que les PFSA. Par ailleurs, le PFHxS s'accumule légèrement plus dans le foie que le PFOS. Ces résultats sont en accord avec ceux de Goeritz *et al.* (2013) qui montrent d'une part, que les concentrations en PFHxS dans le foie sont supérieures à tous les autres PFAS étudiés et d'autre part, que les PFSA sont généralement plus accumulés dans le foie que les PFCA. Au contraire, l'accumulation du PFNA dans le foie est moins importante que le PFOS, reflété par le coefficient de partage foie:plasma significativement inférieur pour le PFNA par rapport au PFOS. Les différences d'affinité pour le foie pourraient être expliquées par une différence d'affinité de liaison avec les L-FABP.

Dans le cas du cerveau et du muscle, les coefficients de partage entre ces tissus et le plasma sont significativement plus faibles à la fois pour le PFHxS et pour le PFNA, par rapport à ceux du PFOS. Dans le cas du cerveau, les prédictions du modèle s'ajustent bien aux données mesurées des trois molécules (Figure 4). L'accumulation du PFOS est donc favorisée dans cet organe par rapport aux deux autres substances. Ceci suggère une affinité particulière pour certains composants du cerveau, plus importante pour les PFSA que pour les PFCA. Le cerveau est composé d'acides gras, tels que les phospholipides et certaines études stipulent que les PFAS présentent une certaine affinité pour ces composés (Armitage *et al.* 2012 ; Armitage *et al.* 2013). Dans le cas du muscle, les mises à jour par la calibration bayésienne des coefficients de partage du PFHxS et du PFNA entre cet organe et le plasma n'ont pas suffi à expliquer correctement l'accumulation de ces deux molécules. Il en est de même dans le cas des viscères (Figures 5 et 6). Pour le muscle, comme pour les viscères, la sous-estimation de leur absorption pourrait être due à un mécanisme supplémentaire, non pris en compte dans notre modèle, tel qu'une affinité pour certaines protéines, et/ou une absorption/élimination par l'eau, et/ou un cycle entéro-hépatique. En effet, les PFAS pourraient présenter des affinités particulières avec les FABP caractérisés dans les intestins et dans le muscle du poisson (Londrville et Sidel, 1996 ; Andre *et al.* 2000 ; Pierce *et al.* 2000). Par ailleurs, la prise en compte d'une absorption par l'eau et d'une élimination des substances par les branchies permettrait sans doute un gain faible de précision, comme pour le PFOS.

Les concentrations en PFOS dans le sang plus élevées que celles du PFNA et du PFHxS pourraient provenir de son affinité particulière pour les protéines plasmatiques de la truite. Les résultats de calibration démontrent que la fraction libre des trois substances dans l'organisme est spécifique à chacune. La valeur moyenne du PFOS (3.2 ± 0.6) est très légèrement inférieure à celle du PFHxS (3.9 ± 0.4), tandis que celle du PFNA (5.9 ± 0.9) est significativement plus élevée. Ce résultat reflète une affinité plus importante du PFOS pour les protéines plasmatiques, suivi du PFHxS, puis du PFNA. L'étude de Zhong *et al.* (2019), traite des mécanismes de bioaccumulation des acides perfluoroalkyles chez la carpe. Les auteurs ont démontré que la constante d'association du PFOS avec les protéines sériques de la carpe était supérieure à celle du PFNA et du PFHxS. Chez le poisson, plus la chaîne du PFAS est longue, plus l'interaction aux protéines plasmatiques serait forte à cause du contact hydrophobe des PFAS avec les sites de liaison de la protéine (Zhong *et al.* 2019 ; Wen *et al.* 2017). La fraction libre du PFNA, significativement plus élevée que le PFOS, peut expliquer par ailleurs les concentrations en PFNA plus faibles dans les organes, d'une manière générale, que celles du PFOS.

Enfin, les vitesses d'absorption et d'élimination des trois molécules ont pu être comparées entre elles (Tableau 5). Le PFHxS et le PFNA sont absorbés aussi rapidement que le PFOS mais le PFHxS présente l'efficacité d'assimilation la plus élevée (Figure 7.A). Ceci peut être expliqué par la taille de cette molécule, plus petite que les deux autres, dû au nombre inférieur de carbones fluorés. En revanche, Ku_{PFNA} est significativement plus faible que Ku_{PFOS} et le PFNA présente ainsi l'efficacité d'assimilation la moins élevée (Figures 8.A). Concernant l'élimination des PFAS, l'étude de Martin *et al.* (2003) stipule d'une part, que les PFAS à longue chaîne s'éliminent plus lentement que leurs homologues à courte chaîne et d'autre part, que les PFAS sulfonés s'éliminent plus lentement que leurs homologues carboxylés. Cette hypothèse a pu être vérifiée en partie grâce aux résultats du modèle PBTK. Même si les valeurs *a posteriori* des clairances biliaires et fécales du PFHxS et du PFNA ne sont pas significativement différentes de celle du PFOS en raison des intervalles de crédibilité 95% importants, la valeur moyenne de ces deux paramètres est tout de même légèrement plus élevée que celle du PFOS, suggérant ainsi une élimination plus rapide pour les deux substances par rapport au PFOS. Le modèle décrit les fèces comme la voie d'excrétion prédominante pour le PFNA et le PFHxS, tout comme le PFOS. Dans leur étude, Zhong *et al.* (2019) indique un pourcentage de PFOS, PFHxS et PFNA plus important dans les fèces que dans ce qu'ils considèrent comme l'eau d'élimination. L'eau d'élimination est celle dans laquelle les poissons ont été transférés lors de la phase de dépuración. Cependant, les concentrations mesurées de l'isomère linéaire du PFHxS (le même que celui utilisé dans ce travail de thèse) sont plus élevées dans l'eau d'élimination que dans les fèces. Par ailleurs, les auteurs utilisent des aquariums en système fermé, dont l'eau est renouvelée tous les deux jours durant la phase de dépuración. Celle-ci contient donc l'urine, l'eau expirée par les poissons ainsi que les fèces en

dissolution. Malgré la suggestion d'une élimination de l'isomère linéaire du PFHxS majoritaire par l'urine, il demeure difficile de conclure avec un tel design expérimental. Ceci est à l'encontre des résultats d'autres études, stipulant que les PFSA (famille à laquelle appartiennent le PFOS et le PFHxS) ne seraient pas activement sécrétés dans les reins des poissons, contrairement aux PFCA (famille à laquelle appartient le PFNA) (Armitage *et al.* 2017 ; Consoer *et al.* 2016). Dans notre étude, la clairance urinaire paramétrée pour les deux substances dans le modèle a été fixée à la valeur utilisée pour le PFOS (la seule trouvée dans la littérature). Il est donc important de noter que la contribution de la voie urinaire est peut-être sous-estimée par notre modèle pour le PFHxS et pour le PFNA, et en particulier pour le PFNA.

Résumé du chapitre 4

« Comparaison de la toxicocinétique du PFHxS et du PFNA avec celle du PFOS chez la truite arc-en-ciel »

Le PFHxS, le PFNA et le PFOS appartiennent à la famille des perfluoro-alkyles mais diffèrent par leur nombre de carbones fluorés (PFHxS < PFOS) ou par leur groupement fonctionnel en fin de chaîne (PFNA : acide carboxylique ; PFOS : groupement sulfoné). Ce chapitre fait l'objet d'une première étude descriptive globale du devenir du PFHxS et du PFNA, comparé ensuite à celui du PFOS.

Dans un premier temps, les concentrations expérimentales en PFHxS, en PFNA et en PFOS issues des expositions par voie alimentaire chez la truite arc-en-ciel, réalisées à 7°C et à 19°C, ont été analysées et comparées dans le sang, le foie, le muscle, le cerveau, les viscères, le rein et les fèces. Celles-ci nous ont permis de déterminer la répartition tissulaire des trois molécules d'une part, et leurs taux d'absorption (K_a) et d'élimination (K_e) par un modèle un compartiment d'autre part. K_a et K_e ont été calculés à partir des concentrations sanguines, car aucun dosage n'a été réalisé sur l'organisme entier et parce que le sang est considéré comme vecteur des substances dans l'intégralité du corps. Les résultats ont mis en évidence des similitudes et des différences de TK entre les trois molécules, et plusieurs hypothèses ont été émises : le PFOS présenterait des affinités plus importantes pour les protéines tissulaires que le PFHxS et le PFNA, et l'absorption et l'élimination de ces deux composés seraient plus rapides que celles du PFOS.

Cependant l'approche expérimentale limite la vérification de ces hypothèses, puisque les processus ADME sont étudiés séparément. Une analyse mécanistique a donc été réalisée via le modèle PBTK, afin d'explorer plus finement les profils TK du PFHxS et du PFNA. Pour cela, le modèle PBTK avec la description physiologique la plus simple, décrite dans le chapitre 3, a été appliqué et calibré pour les deux substances. Les distributions *a posteriori* des paramètres (fraction libre de substance, clairances biliaire et fécale, et coefficients de partage entre les différents tissus et le plasma) ont été mises à jour par rapport à celles du PFOS. Le critère statistique proposé par Goussen *et al.* (2015) a été appliqué sur les distributions *a posteriori*, pour déterminer si les valeurs des paramètres relatifs au PFHxS et au PFNA sont significativement inférieures ou supérieures à celles du PFOS et les résultats ont permis de répondre aux questions mécanistiques initiales : le PFOS présente l'affinité aux protéines plasmatiques la plus importante, et le PFHxS et le PFNA sont éliminés plus rapidement que le PFOS.

Chapitre 5

Influence de la température sur la toxicocinétique des substances perfluoroalkyles chez la truite arc-en-ciel

Chapitre 5. Influence de la température sur la toxicocinétique des substances perfluoroalkyles chez la truite arc-en- ciel

Les vitesses d'absorption et d'élimination des substances, présentées dans le chapitre 4, ne sont pas les mêmes selon les expériences (7°C et 19°C), suggérant une influence de la température sur leur TK. Ce chapitre présente les effets de la température sur la distribution et l'élimination du PFOS et du PFHxS chez la truite arc-en-ciel, à partir des résultats expérimentaux des expositions conduites à trois températures. Ces expériences ont été présentées dans l'article "*Does water temperature influence the distribution and the elimination of perfluorinated substances in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) ?*", accepté dans *Environmental Science and Pollution Research*, qui constitue ce chapitre. Les informations supplémentaires associées à l'article sont présentées à la fin du manuscrit, Annexes du chapitre 5.

Does water temperature influence the distribution and elimination of perfluorinated substances in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)?

Authors: Alice Vidal^a, Florent Lafay^b, Gaëlle Daniele^b, Emmanuelle Vulliet^b, Eric Rochard^c, Jeanne Garric^a and Marc Babut^{a*}

^a Irstea, RIVERLY Research Unit, 5 rue de la Doua CS 20244, 69625 Villeurbanne Cedex, France

^b Univ Lyon, CNRS, Université Claude Bernard Lyon 1, ENS de Lyon, Institut des Sciences Analytiques, UMR 5280, 5 rue de la Doua, F-69100 Villeurbanne, France

^c Irstea, EABX Research Unit, 33612 Cestas, France.

*Corresponding author: Marc Babut (marc.babut@irstea.fr); RIVERLY Research Unit, 5 rue de la Doua, CS 20244, 69625 Villeurbanne, France.

Abstract

Per- and polyfluorinated substances (PFASs) are widely found in freshwater ecosystems because of their resistance to degradation and their ability to accumulate in aquatic organisms. While water temperature controls many physiological processes in fish, knowledge of the effects of this factor on PFAS toxicokinetic is still limited. This study presents experimental results of internal distribution and elimination rates of two perfluorinated acid compounds, namely perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorohexane sulfonate (PFHxS) in adult rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to three temperatures. Dietary exposure experiments were conducted at 7°C, 11°C and 19°C and liver, blood, muscle, brain and kidney were sampled for analysis. PFOS concentrations were comparable to or exceeded those of PFHxS, while PFHxS was eliminated faster than PFOS, whatever the temperature. Internal distribution changed significantly for both substances when fish were exposed to a range of temperatures from 7°C to 19°C. Indeed, PFOS and PFHxS relative distribution increased in blood, liver and brain while they decreased in muscle when the water temperature rose. The water temperature variation affected the elimination half-lives, depending on the substances and organs.

Keywords

Perfluoroalkyl substances; rainbow trout; temperature; elimination rate; internal distribution

1. Introduction

Per- and polyfluorinated compounds (PFASs) are an important class of environmental contaminants. They are characterized by their fluorinated chain, and the strong carbon-fluorine bonds lead to a high thermal and chemical stability of PFASs in the environment (Buck *et al.* 2011). Due to their unique properties, long-chain PFASs (*i.e.*, with seven perfluorinated carbons or more) have been manufactured and used in many industrial and commercial applications for over half a century (Renner, 2001). PFASs have excellent surfactant properties and are used for example in textile stain and soil repellents, grease-proof and food-contact paper, coatings, aqueous film-forming foams, electronic components, etc. Nowadays, the PFASs identified among the multitude of existing fluorinated substances are ubiquitous in aquatic ecosystems (Houde *et al.* 2006; Arhens and Bundschuh, 2014; Krafft and Riess, 2015). Among them, perfluorooctane sulfonate (PFOS) could be considered as the representative molecule of the perfluorinated sulfonic acid family because of its extensive use for years, in many applications (OECD 2002). With regulatory efforts for reducing PFOS emissions (e.g. European Directive 2006/122/EC), PFOS is now found at lower concentrations in the environment, though still high compared to other PFASs (Krafft and Riess, 2015; Shi *et al.* 2012). PFOS has been replaced in industrial processes by compounds with shorter fluorinated chains, such as perfluorohexane sulfonate (PFHxS) (Scheringer *et al.* 2014; Wang *et al.* 2015).

Some PFASs, including PFOS and PFHxS, accumulate in various aquatic organisms (Houde *et al.* 2011; Martin *et al.* 2003; Goeritz *et al.* 2013). Fish exposure to PFASs is acknowledged to be greater from food than from water for many of them, including PFOS (Martin *et al.* 2004; Consoer *et al.* 2016). Indeed, PFASs accumulate in prey items (Martin *et al.* 2004; Babut *et al.* 2017), providing an enriched dietary source of these chemicals to predator fish such as the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), a carnivorous fish species occupying a high trophic level in freshwater food webs. Freshwater streams, besides being under chemical pressure, may also be subjected to temperature variations as a consequence of industrial releases. Moreover, warmer waters are expected in the context of climate change (IPCC, 2013). Salmonids are poikilotherm organisms submitted to seasonal changes in temperature, and are thus likely to be impacted by this phenomenon (Williams *et al.* 2018). Indeed, water temperature controls many physiological processes in fish, such as cardiac output, feeding, respiration, fecal egestion and growth (Barron *et al.* 1987; James and Kleinow 2014). Since these processes govern the absorption, distribution, metabolism and elimination (ADME) mechanisms of chemicals, a variation of temperature may influence their toxicokinetics (Borga *et al.* 2010). For example, uptake and elimination rates of bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*) exposed to benzo(a)pyrene, were lower at 13°C compared to 23°C (Jimenez *et al.* 1987) and significant differences in depuration of PCB congeners were observed with temperature fluctuations in yellow perch (*Perca*

flavescens) by Paterson *et al.* (2007). We thus expect that PFAS distribution and elimination in fish would also be affected by temperature variations. In particular, PFAS elimination might be accelerated at higher temperatures. However, to the best of our knowledge, no study was carried out on the influence of water temperature on PFAS toxicokinetic in fish. Therefore, internal PFOS and PFHxS distribution in blood, liver, kidney, brain and muscle, as well as their related elimination kinetics were investigated in rainbow trout exposed to spiked diet at three temperatures (7°C, 11°C and 19°C). In addition, toxicokinetic data from Goeritz *et al.* (2013) study were considered in complement to our results, so as to strengthen discussion of water temperature influence on PFAS toxicokinetics. In this study, adult rainbow trout were exposed to a diet spiked with several PFASs, including PFOS and PFHxS, at a water temperature set between 14°C and 16°C.

2. Material and methods

2.1. Chemicals and solvents

Perfluorooctane sulfonic acid (chemical purity $\geq 98\%$), perfluorohexane sulfonic acid (chemical purity $\geq 98\%$), calcium alginate and sodium chloride were acquired from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). Ultra-performance liquid chromatography (UPLC)-grade acetonitrile (99.97% purity), methanol (purity $> 99.98\%$) and heptane (purity $\geq 90\%$) were purchased from Biosolve Chimie (Dieuze, France) and acetate ammonium salts were obtained from Agilent Technologies (Massy, France).

2.2. Food preparation

Three-millimeter pellets (Le Goessant, Turbot Label Rouge-flot) were spiked with PFOS and PFHxS at a nominal concentration of $500 \mu\text{g kg}^{-1}$ each, following a protocol adapted from Goeritz *et al.* (2013). This concentration was chosen because it is the same as the concentration used in previously conducted dietary studies, which was shown to be nontoxic to juvenile and adult rainbow trout (Goeritz *et al.* 2013; Martin *et al.* 2003). Briefly, pellets were spiked with a PFOS and PFHxS mixture, and prepared in methanol. After total evaporation of methanol, pellets were coated with calcium alginate (95 g kg^{-1}). The full description of the contamination protocol is described in the supplementary information (SI).

2.3. Experimental design

Experimental conditions were adapted from the OECD 305 guideline (OECD, 2012). Since in their experiment Goeritz *et al.* (2013) set the water temperature around 15°C, we chose three more conditions, so as to test a wide range of exposure temperatures: 7°C, 11°C and 19°C. The resulting range exceeded the OECD 305 guideline recommended range (13 – 17 °C), but they are supported by rainbow trout and would not compromise their well-being (Raleigh *et al.* 1984). For practical reasons, the 11°C dietary experiment was conducted before the two others in a different facility, allowing slight

experimental design adjustments for the two others (Figure S1 in SI): extension of exposure and depuration phases and sampling of kidney, detailed below.

For the three experiments, fish were fed daily and manually so as to optimize individual food intake and to limit PFAS dispersion in water. Fish were fed until satiety (*i.e. ad libitum*) corresponding to 1.5%, 0.5% and 1.0% of body weight for 11°C, 7°C and 19°C, respectively. This amount is in accordance with food supplier recommendations, taking into account water temperature and fish mass. For each experiment, temperature, pH and dissolved oxygen were recorded daily. Water samples were collected in the exposure tanks at day 0, at the end of the uptake period and at the end of the depuration phase so as to control PFOS and PFHxS concentrations. During all the experiments, we took care to use PFAS-free material as well as stainless steel dissection tools. Solvents were checked by UHPLC-analysis and all sample containers, tubes and bottles were in polypropylene or high-density polyethylene. All sample preparation equipment and accessories were cleaned with acetone and dried to prevent any PFAS cross-contamination.

Fish were about 15 months old and weighed 300 g at the start of the experiments. 200 rainbow trout were bought in the Rives fish farm, Thonon-les-Bains (France) for the 11°C experiment and in the Saint-Seurin du Moulin de Boissonnie fish farm, Douzillac (France) for the 7°C and the 19°C experiment. Before exposure, fish of the 11°C experiment were kept three weeks in two 2×3.2×1-m polyester tanks (control and exposed tanks) with a flow-through rate of 0.5 L s⁻¹, under a natural dark:light cycle. The tanks were filled with a mixture of Lake Geneva water (taken at 51 m deep) and a nearby spring water, so as to ensure a good oxygenation and a constant temperature (Table S2, in SI). For the 7°C and the 19°C experiments, fish were kept three weeks in two 2×2.7×1-m gelcoat tanks (control and exposed tanks) before exposure, with a flow-through rate of 0.5 L s⁻¹, under a natural dark:light cycle. The Isle River was used to fill experimental tanks and temperature was managed with a cooling system.

For the 11°C, fish of exposed condition were then fed with PFAS spiked pellets for 28 days, and then allowed to depurate for the next 28 days, while being fed with unspiked food. Five individuals were randomly sampled in the exposure tank at days 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49 and 56. Since steady states of PFOS and PFHxS were not reached at 28 days in the 11°C experiment, both exposure and depuration phases were extended to 42 and 35 days for the 7°C and the 19°C experiments, respectively. Five individuals were then randomly sampled in the exposure tanks at days 0, 7, 14, 28, 42, 49, 56, 63 and 77. For all experiments, fish were gently anesthetized (3 mL of an eugenol oil:ethanol 10% solution in 10 L of water), measured and weighed. Sex was determined when possible. Approximately 4 mL of blood was sampled from the caudal vein and transferred to EDTA prefilled tubes and were stored at -20°C. The anesthetized fish were then euthanized giving a blow on the spine just behind the head. Muscle, liver, brain and kidney were then collected, weighed and stored at -20°C in polypropylene bags until PFAS analysis. Note that kidney was not sampled for the 11°C experiment. Five control fish were also

captured, weighted and measured at each sampling time. Control fish ($n=5$) were weighted and measured at each sampling time for the 11 and the 19°C experiments, and at days 0, 42 and 77 for the 7°C experiment.

2.4. Sample processing

A 3-g aliquot of food pellets (uncontaminated and contaminated) was weighed in a 50-mL polypropylene centrifuge tube. Pellets were ground and homogenized using a Geno/Grinder® (SPEX SamplePrep, Stanmore, UK) 10 min at 1300 shock per min (spm), with a ceramic rod (Agilent Technologies) in the tubes. A sample aliquot (250 mg) was then subjected to a Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe (QuEChERS) liquid/liquid extraction using a mixture of heptane (1 mL), ultrapure water (10 mL), acetonitrile (10 mL) and a citrate buffering salt (Agilent Technologies). The sample was vortexed for 1 min and centrifuged 2 min at 5000 rpm. Then the acetonitrile phase (8 mL) was purified with a dispersive Solid Phase Extraction (dSPE) PSA/C18 phase (Macherey Nagel, Düren, Germany). The supernatant (6 mL) was recovered and 400 μL was transferred in a chromatographic vial containing 100 μL of an injection standard (^{13}C -phenacetin at 200 ng mL^{-1} in acetonitrile) for the liquid chromatography coupled to tandem-mass spectrometry (LC-MS/MS) analysis.

Liver and muscle samples were freeze-dried under vacuum before being ground with a Geno/Grinder® (10 min at 1000 spm) using a ceramic rod. Then a 250-mg-aliquot of liver, muscle, brain or kidney was placed in a 50-mL polypropylene tube. Samples were then subjected to extraction with a mixture of 3 mL of heptane and 10 mL of acetonitrile containing 2% acetic acid. After homogenization and centrifugation (5 min at 7000 rpm), 9.4 mL of the acetonitrile phase was frozen 12 h at -18°C . Then it was purified using a dSPE PSA/C18 clean-up, vortexed (1 min) and centrifuged (2 min at 7000 rpm). The supernatant (6 mL) was transferred in a glass tube and acetonitrile was evaporated to dryness under a gentle nitrogen flow at 25°C . The extract was then reconstituted into acetonitrile (400 μL and 2800 μL for muscle and liver, respectively). Finally, 100 μL of ^{13}C -phenacetin (200 ng mL^{-1} in acetonitrile) was added to the reconstituted extract. After homogenization, the extract (100 μL) was placed in a chromatographic vial for the LC-MS/MS analysis.

After vortexing, 250 μL of total blood were placed in a 2-mL microtube containing zirconium beads (Dominique Dutscher SAS, Brumath, France). After addition of 1 mL of acetonitrile, the sample was shaken (120 s at 4000 apm) using a Beadbug homogenizer (Dominique Dutscher SAS) and was centrifuged (3 min at 5000 rpm, at 5°C) for cellular lysis. Then 0.5 mL was removed and placed in a glass tube and two successive liquid–liquid micro-extractions were performed on the sample with 1 mL of acetonitrile. Extracts were gathered in a glass tube and acetonitrile was evaporated to dryness under a gentle nitrogen stream at room temperature. Dry residues were then dissolved in 300 μL of acetonitrile

and 200 μL of ^{13}C -phenacetin (200 ng mL^{-1} in acetonitrile). Lastly, 200 μL was transferred to a chromatographic vial for LC-MS/MS analysis.

2.5. PFAS analysis and quantification

Liquid chromatography was performed with an H-Class UPLC system from Waters (St. Quentin-en-Yvelines, France). Separation was achieved with a Kinetex EVO C18 (100 \times 2.1 mm; 1.7 μm) column from Phenomenex (Le Pecq, France). Mobile phases were composed of (A) ultrapure water containing 2 mM of ammonium acetate and (B) acetonitrile. The following gradient was applied: start at 90% (A), then decrease to 30% (A) in 5 min, and to 0% (A) in 0.1 min; remain 2 min and return to initial conditions in 0.1 min, for 3 min. The flow rate was set at 0.5 mL min^{-1} . The column temperature was maintained at 60°C. The injection volume was set at 2 μL . The chromatographic system was coupled to a Xevo TQ-S triple-quadrupole mass spectrometer (Waters). The multiple reaction monitoring (MRM) mode was performed for the MS/MS detection with the electrospray source functioning in negative mode (ESI⁻). Two transitions were followed for each analyte (Table S1 in SI). The target ion transition with the highest sensitivity (MRM1) was used for quantification and the second one (MRM2) for confirmation of each target compound. Retention time and MRM ratios between both target ion transitions were also used as identification parameters (Table S1 in SI).

Replicate procedural blanks were analyzed for each series of samples and a blank sample was injected between each matrix sample. PFAS concentrations were blank-corrected when applicable.

2.6. Data processing and statistics

Statistical analyses were performed using R software (R-Core-team, 2016) within the RStudio environment (version 0.97.903) and XLSTAT software (2017). Significance for all tests was set at 0.05.

2.7. Biometric data analysis

The condition of the fish was monitored by calculating the hepatic-somatic index (HSI) and Fulton's condition factor (K-factor), whose equations are shown in SI. Fish growth was best fit to an exponential growth model; growth rates were thus calculated by fitting fish weights following Equation 1 (Buckman *et al.* 2004).

$$\ln(\text{FW}) = a + b \times \text{time} \quad (\text{Equation 1})$$

where a is a constant, b the growth rate and FW the fish weight (g), and time is expressed in days. PFOS and PFHxS concentrations were corrected for growth dilution by multiplying tissue concentrations by a factor of $(1 + b \times \text{time})$ (Buckmann *et al.* 2004). A Kolmogorov-Smirnov test, followed by a covariance

analysis (ANCOVA) were applied to assess the effect of contamination on growth of both control and contaminated fish.

2.8. Distribution data analysis

As previously mentioned, the amount of food provided to fish varied depending on the temperature. As a consequence, the quantities of PFOS and PFHxS ingested by individuals were different, making it impossible to compare uptake rates. However, PFOS and PFHxS distribution was determined by evaluating the distribution of both substances between organs and blood. To this end, we calculated the organ-to-blood ratios at all sampling times, for both substances (Equation 2).

$$\text{organ:blood ratio} = \frac{[PFAS]_{organ,t}}{[PFAS]_{blood,t}} \quad (\text{Equation 2})$$

where $[PFAS]_{organ,t}$ is a PFOS or PFHxS concentration in the organ of interest at one sampling time and $[PFAS]_{blood,t}$ is the concentration in blood at the same time. A Kruskal-Wallis test, followed by a Dunn post-hoc test, were applied to test the effect of temperature on these ratios.

In addition, we were also interested in the effect of temperature on PFOS and PFHxS distribution in tissues, calculating the proportional distributions (%) in fish at the end of the exposure period for the 7°C and the 19°C experiments (day 42), following Equation 3:

$$\text{Proportional distribution (\%)} = \frac{[PFAS]_{organ,t} \times \text{mass}(organ),t}{\sum [PFAS]_{organ,t} \times \text{mass}(organ),t} \times 100 \quad (\text{Equation 3})$$

where $[PFAS]_{organ,t}$ is the PFOS or PFHxS concentration in the organ of interest at one sampling time, $\text{mass}(organ),t$ is the mass of the organ considered or by the volume of blood at one sampling time and $\sum [PFAS]_{organ,t} \times \text{mass}(organ),t$ is to the sum of the five tissue burdens. Liver, muscle, brain and kidney were weighed when sampled, and blood volume was estimated at 4.49% of the total fish mass (Gingerich *et al.* 1990). Then the Kruskal-Wallis and Dunn post-hoc tests were applied to examine PFAS proportional distribution differences depending on temperature, for each organ.

2.9. PFOS and PFHxS elimination

Depuration rate constants (k_e) were determined by fitting measured concentrations in organs during the depuration phase to a first-order decay model (Equation 4).

$$C_{\text{tissue}}(t) = a \times e^{-k_e \times \text{time}} \quad (\text{Equation 4})$$

where $C_{\text{tissue}}(t)$ is growth-corrected concentrations (ng g^{-1}), a is a constant and time is expressed in days. Half-life values ($t_{1/2}$) of PFOS and PFHxS were calculated according to Equation 5 and expressed in

days. The Kruskal-Wallis test followed by the Dunn post-hoc test were applied to examine PFAS half-life differences.

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_e} \quad \text{(Equation 5)}$$

3. Results

The temperatures (mean \pm standard deviation) measured throughout the experiments were $7.1^\circ\text{C} \pm 1.6$, $10.6^\circ\text{C} \pm 0.46$ and $18.6^\circ\text{C} \pm 0.41$.

3.1. PFAS analysis in food and water

PFOS and PFHxS concentrations in commercial pellets were below the method's limit of detection (Table S1 in SI). Measured concentrations of PFOS and PFHxS in the spiked food batch used in the experiment at 11°C were $361.5 \pm 11.9 \text{ ng g}^{-1} \text{ dw}$ (dry weight) and $421.9 \pm 10.9 \text{ ng g}^{-1} \text{ dw}$, respectively. Measured PFOS and PFHxS concentrations in the second spiked food batch, used for the experiments at 7°C and 19°C , were $465.1 \pm 26.0 \text{ ng g}^{-1} \text{ dw}$ and $452.8 \pm 27.1 \text{ ng g}^{-1} \text{ dw}$, respectively. In water, concentrations of PFOS and PFHxS were $< 20 \text{ ng L}^{-1}$ (data not presented), during both accumulation and depuration periods. Water column contamination by food was therefore considered negligible, excluding water as a significant exposure route.

3.2. Fish condition and growth

No fish mortality occurred in either exposure or control tanks. Fish always ate voraciously and consumed all the food provided within a few minutes. Given that the sex ratio was not balanced (respectively, 18%, 23% and 35% males for the 7°C , 11°C and 19°C experiments), the sex of the individuals was not taken into account in this study. Neither visible signs of distress nor macroscopic injuries on the organs were observed at any time in exposed fish, nor in controls. Overall, the fish condition was good throughout the experiments, as illustrated by calculated Fulton's condition factor (Table S3 in SI), higher than 1 (Fulton, 1902), and hepato-somatic index (Table S3 in SI). In addition, no significant difference was reported for growth rates (Table 1) between control and exposed organisms (p -value > 0.05), whatever the temperature.

Table 1. Exposed fish growth rate (GR) at 7°C, 11°C and 19°C (GR ± standard deviation), initial mass and final mass (mean of fish mass (g) ± standard deviation (n=5)).

	7°C	11°C	19°C
GR (10 ⁻³ g day ⁻¹)	6.64 ± 0.77	9.33 ± 0.99	8.14 ± 0.88
Initial mass (g)	296.7 ± 35.3	308.2 ± 37.2	310.9 ± 39.9
Final mass (g)	557.34 ± 82.4	518.6 ± 90.4	681.6 ± 118.4

So, these results suggested that neither food contamination nor the temperature affected fish condition.

3.3. PFOS and PFHxS distribution

3.3.1. Tissue concentrations

Both substances were quantified in liver, blood, muscle, brain and kidney, over the course of the experiments (Fig.1). PFOS and PFHxS concentrations in all tissues increased continually during exposure, but the steady state was not reached, after neither 28 days (11°C experiment) nor 42 days (7°C and 19°C experiments). PFOS concentrations were comparable to or exceeded those of PFHxS, whatever the exposure temperature (Table 2). In the same way, PFOS and PFHxS concentrations were always higher in blood or liver, as well as in kidney, to a lesser extent, than in brain and muscle.

Table 2. Mean PFOS and PFHxS concentrations in blood, liver, muscle, brain and kidney of exposed rainbow trout (n=5) at d=28. Concentrations were adjusted for fish growth ($1 + b \times \text{time}$) and are expressed in ng g⁻¹ wet weight for liver, muscle, brain and kidney and expressed in ng mL⁻¹ for blood. NA: not available

°C	Liver		Blood		Muscle		Brain		Kidney	
	PFOS	PFHxS	PFOS	PFHxS	PFOS	PFHxS	PFOS	PFHxS	PFOS	PFHxS
7	278.4±35.7	253.0±76.6	354.7±52.1	302.5±30.3	172.1±25.1	120.1±18.0	142.2±34.4	113.9±23.8	256.6±70.2	287.3±86.4
11	671.1±96.9	476.0±56.5	419.5±17.3	421.0±21.6	67.5±7.5	55.5±6.1	170.6±21.9	117.8±15.3	NA	NA
19	812.2±115.3	637.2±107.3	330.6±85.9	256.5±72.4	67.9±21.7	40.9±16.5	217.1±37.4	94.12±15.3	195.7±53.5	133.9±41.6

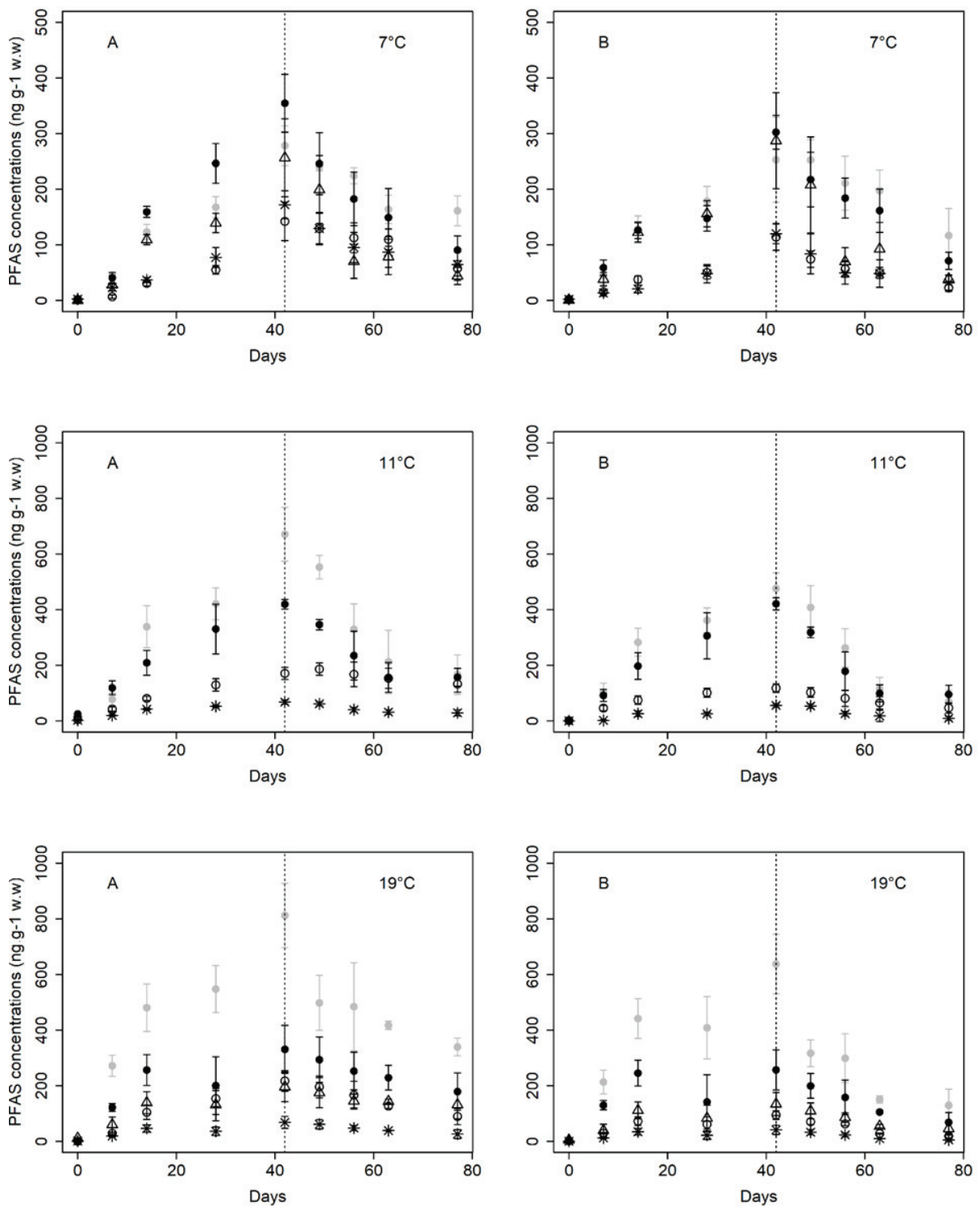


Fig.1 Mean concentrations ($n=5$) of PFOS (A) and PFHxS (B) in the organs studied (ng g^{-1} wet weight) at 7°C, 11°C and 19°C. Grey dots correspond to liver, black dots to blood, triangles to kidney, open dots to brain, and stars to muscle. The vertical dotted line marks the end of the accumulation phase and the beginning of the depuration period. The concentration axis scale was reduced for the 7°C graphs to a better reading.

3.3.2. Organ:blood concentration ratios

Concentrations reported by Goeritz *et al.* (2013) were comprised in the range of those found in the present work. Therefore, PFOS and PFHxS organ:blood ratios were calculated at each sampling time, for each of the four experiments, and used to construct the box plots for both substances presented in Fig.2.

For both PFOS and PFHxS, the liver:blood ratios were significantly higher at 15°C and 19°C compared to 7°C and 11°C. In contrast, the muscle:blood ratio was significantly higher at 7°C than at 11°C, 15°C and 19°C. While the brain:blood ratios increased significantly with temperature for PFOS, this was not the case for PFHxS. Conversely, PFOS kidney:blood ratios did not differ according to temperature, while they were significantly lower at 11°C compared to 7°C and 19°C for PFHxS (Table S4 in SI).

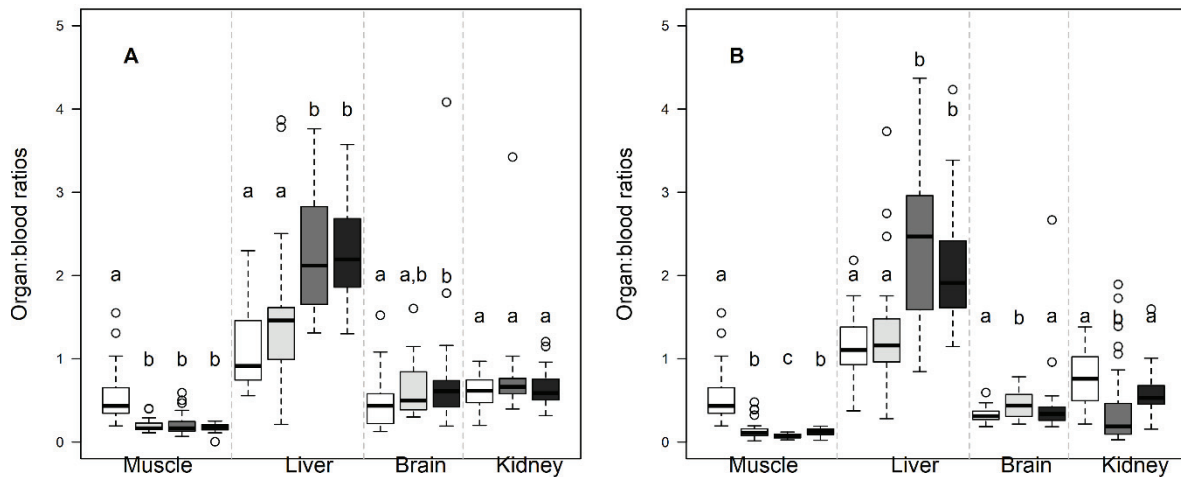


Fig.2 Boxplots of the organ:blood ratios of PFOS (A) and PFHxS (B) for our three experiments and that of Goeritz *et al.* (2013). White boxes correspond to 7°C, light grey boxes to 11°C, dark grey boxes to 14°C-16°C (Goeritz *et al.* 2013) and black boxes to 19°C. Letters (a,b,c) point to significant differences. Note that kidney was not sampled in the 11°C experiment and brain was not sampled in the 15°C experiment.

3.3.3. Proportional distribution

Within the range of the temperatures tested, PFOS and PFHxS exhibited similar relative distribution among the organs analyzed. As already shown (Falk *et al.* 2015; Goeritz *et al.* 2013), PFOS and PFHxS concentrations in muscle were relatively low compared to the concentrations measured in liver and blood (Fig.1 and Fig.2). However, considering the muscle weight, which accounted for more than half of the total fish body, this organ contained the major part of PFOS and PFHxS at 42 days compared to liver, blood, kidney and brain (Fig.3). Despite the low liver and blood weights (about 1.5% and 4.5% of total body mass, respectively), PFOS and PFHxS relative burdens in both tissues were important (Fig.3), supporting their preferential accumulation in liver and blood.

Between 7°C and 19°C, we observed a significant increase of PFOS and PFHxS proportion in liver, brain and blood (p -value < 0.05). In contrast, between 7°C and 19°C, PFAS proportion in muscle decreased significantly (p -value < 0.05). In kidney, distributions were not significantly different with a water temperature modification.

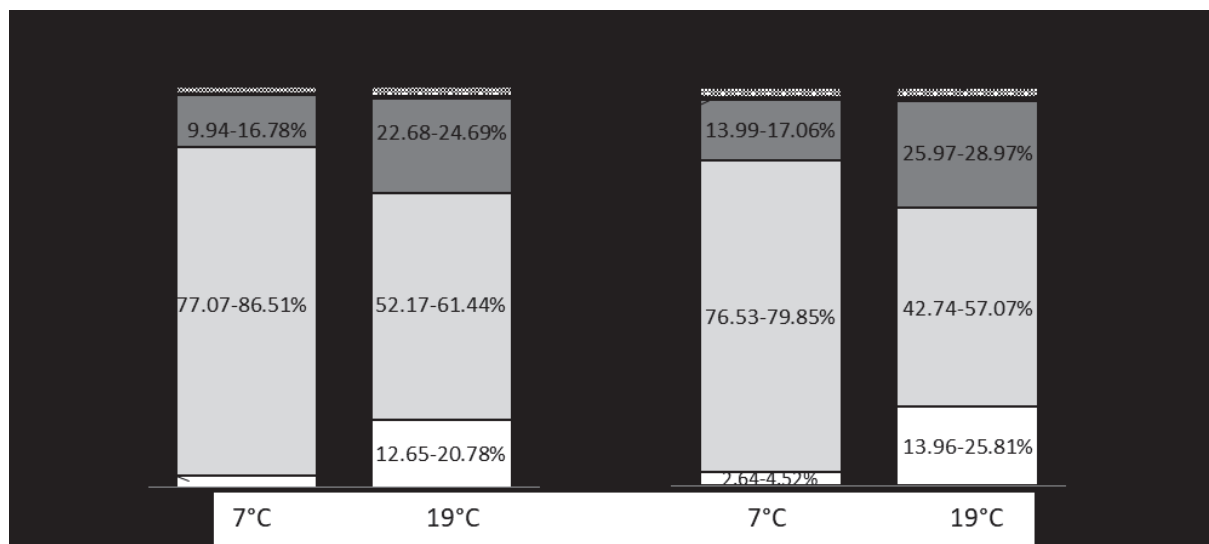


Fig.3 Proportional distributions of PFOS (A) and PFHxS (B) in liver (white), muscle (pale grey), blood (dark grey) brain (black) and kidney (hatched) at the end of the exposure period (42 days) and at 7°C and 19°C. The percentages represent ranges for 5 fish.

3.4. PFOS and PFHxS elimination

Mean elimination rates (k_e) and half-lives of PFOS and PFHxS for each tissue were listed in Table 3. All individual concentrations were accounted for in the regression (Fig.S2 and Fig.S3 in SI). The temperature modified differently the elimination rate according to the organs. Indeed, for both PFOS and PFHxS, the longest half-life time was reported at 7°C in liver, while it was reported at 11°C in brain and at 19°C in kidney. However, muscle half-lives were not sensitive to temperature variation. Temperature influenced the elimination rate differently depending on the compound. Firstly, PFOS half-life times were generally longer than those of PFHxS. In addition, the PFOS half-life time in blood was significantly longer at 19°C compared to the other two temperatures, but this was not the case for PFHxS. In the same manner, only the PFHxS half-life time in blood was significantly shorter at 11°C compared to the two other temperatures.

Table 3. Elimination rate constants (k_e) \pm standard deviation, R^2 and estimated mean tissue-specific half-life times ($t_{1/2}$) of PFOS and PFHxS at 7°C, 11°C and 19°C. NA: not available.

	7°C			11°C			19°C		
	PFOS								
	$k_e \pm sd$ (d ⁻¹)	R^2	$t_{1/2}$ (d)	$k_e \pm sd$ (d ⁻¹)	R^2	$t_{1/2}$ (d)	$k_e \pm sd$ (d ⁻¹)	R^2	$t_{1/2}$ (d)
Liver	0.018±0.0030	0.63	38.88	0.051±0.0071	0.75	13.69	0.023±0.0062	0.35	30.86
Blood	0.042±0.0063	0.72	16.58	0.041±0.0056	0.73	17.11	0.018±0.0064	0.26	39.31
Muscle	0.031±0.0065	0.55	22.10	0.034±0.0054	0.67	20.34	0.028±0.0075	0.41	24.80
Brain	0.021±0.0054	0.45	33.15	0.010±0.0048	0.15	74.87	0.021±0.0061	0.34	33.66
Kidney	0.062±0.0132	0.62	11.14	NA			0.012±0.0062	0.13	59.96
	PFHxS								
	$k_e \pm sd$ (d ⁻¹)	R^2	$t_{1/2}$ (d)	$k_e \pm sd$ (d ⁻¹)	R^2	$t_{1/2}$ (d)	$k_e \pm sd$ (d ⁻¹)	R^2	$t_{1/2}$ (d)
	Liver	0.019±0.0058	0.37	35.99	0.056±0.0074	0.80	12.35	0.055±0.0080	0.75
Blood	0.036±0.0053	0.73	19.48	0.059±0.0060	0.86	11.70	0.039±0.0078	0.60	17.79
Muscle	0.046±0.0105	0.53	15.10	0.054±0.0113	0.60	12.80	0.057±0.0124	0.62	12.28
Brain	0.045±0.0070	0.72	15.45	0.031±0.0065	0.54	22.55	0.043±0.0057	0.78	16.26
Kidney	0.066±0.0149	0.60	10.47	NA			0.034±0.0076	0.53	20.13

4. Discussion

In this work, results from four dietary exposure experiments were used in order to discuss on the influence of temperature on the distribution of PFOS and PFHxS in adult rainbow trout organs, and on their elimination kinetics. Neither the slight differences of water physical-chemical characteristics, nor the selected temperatures altered the fish well-being. Since PFOS or PFHxS were administered through food, the compound bioavailability was not affected by water chemistry, making it possible to compare the four experiments.

4.1. PFOS and PFHxS distribution in the different organs

Rainbow trout bioaccumulated both PFOS and PFHxS during the whole dietary exposure period, as we were able to quantify both substances in blood, liver, kidney, brain and muscle over the course of the four experiments. PFOS and PFHxS concentrations are consistent with the study conducted by Goeritz *et al.* (2013). As expected, liver and blood were the main PFAS target organs (Martin *et al.* 2003; Shi *et al.* 2012, Goeritz *et al.* 2013, Gaillard *et al.* 2017), while the concentrations were lower in kidney followed by brain and muscle. This distribution can be explained by the high PFAS affinities with specific proteins, as shown for human serum albumin (Chen and Guo, 2009; Bischel *et al.* 2011) or for liver fatty-acid-binding proteins (FABPs) in rat (Luebker *et al.* 2002). Orthologs to mammalian FABPs have been identified in a number of fish species (Ando *et al.* 1998; Liu *et al.* 2003; Jordal *et al.* 2006; Torstensen *et al.* 2009), and the interaction of PFASs with fish serum albumin was also investigated by Jones *et al.* (2003). Binding affinities to these proteins is claimed to depend on the chain length of PFASs (Ng and Hungerbühler, 2013; Zhang *et al.* 2013, Zhong *et al.* 2018), consistent with the higher PFOS

concentrations compared to those of PFHxS found in this study, in agreement with earlier studies (Martin *et al.* 2003; Shi *et al.* 2018). Indeed, some molecular docking analyses have shown that the binding stability with proteins may be weaker for short-chain than for long-chain PFASs (Ren *et al.* 2016; Zhang *et al.* 2013).

4.2. Organ depuration kinetics

PFOS and PFHxS half-lives on the same order of magnitude were also found by Gaillard *et al.* (2017) and Falk *et al.* (2015). One of the reasons for this long elimination duration for PFOS (between 11.14 and 74.87 days, depending on organs and water temperatures) and for PFHxS (between 10.47 and 35.99 days) could be the enterohepatic cycle of these substances (Martin *et al.* 2003). We observed that PFOS half-lives tend to be longer than those of PFHxS, which might be due to the longer fluorinated chain of PFOS compared to PFHxS, making the substance more hydrophobic, consequently slowing its elimination. Delayed elimination of PFOS and its higher accumulation in tissues compared to PFHxS are in accordance with the results of Wen *et al.* (2017). These authors showed that elimination rate constants and concentrations in tissues of short-chain PFASs decreased in the presence of long-chain PFASs in zebra fish (*Danio rerio*). This suggests that there is competition for transporters and protein binding sites in fish between PFASs.

4.3. Temperature effect on PFOS and PFHxS distribution

Whatever the temperature, the overall PFOS and PFHxS distribution remained unchanged with liver and blood considered as target organs, followed by kidney and finally by muscle and brain. However, temperature affected PFOS and PFHxS proportional distribution when organs are considered independently. Such changes in PFAS distribution were expected to occur, since bioaccumulation of contaminants might be affected by temperature variation, likely to occur with climate change for example (Borga *et al.* 2010; Houde *et al.* 2011). Salmonids are likely to be particularly vulnerable to this phenomenon, since they are dependent on cold water habitats (Williams *et al.* 2015). In this study, when temperature rose, liver: blood ratios and brain: blood ratios increased, while they decreased for muscle. Relative distributions of PFOS and PFHxS between analyzed organs also changed, confirming previous results. This suggests a better accumulation in highly perfused organs when temperatures rise, as a consequence of an increase of the cardiac output with temperature. Indeed, Barron *et al.* (1987) raised rainbow trout at three temperatures (6°C, 12°C and 18°C), and demonstrated an increase of the cardiac output for fish acclimated to warmer temperatures, leading to modification of organ perfusion. Changes in PFOS and PFHxS distribution with temperature can also stem from a likely modification of PFAS-protein affinity constants. Indeed, it is known that the protein content of tissues varied according to

certain conditions, such as season (Borga *et al.* 2004), and that liver is a sink of serum albumin (production organ) and L-FABP, important proteins in PFAS bioaccumulation. This assumption is even more important to consider in that temperature is a key variable in the calculation of the dissociation constant of a protein.

4.4. Temperature effect on PFOS and PFHxS elimination

Half-life times were modified by water temperature, and the modifications depended on both organs and substances. For example, in brain, PFOS and PFHxS half-lives were similar at 7°C and 19°C but lower compared to 11°C. Since 11°C is close to the optimal temperature for rainbow trout, modifications in brain occurred for extreme temperatures, *i.e.*, 7°C and 19°C. This adaptation might be either physiological or biochemical. Moreover, PFOS and PFHxS half-lives were not sensitive to a change of temperature in muscle, not involved in the excretion process, while they were modified in blood, liver and kidney, tissues actively participating in elimination mechanisms. Indeed, we demonstrated that half-life times in liver were longer at 7°C compared to half-lives in other organs, which was not the case at 11°C or 19°C, suggesting a slower biliary elimination at cold temperatures. This is supported by Curtis *et al.* (1986) who demonstrated an accelerated biliary excretion with increasing temperature. In fish, enzymatic activities are slowed down at low temperatures, which will reduce the elimination of organic pollutants (Jimenez *et al.* 1987). The enterohepatic cycle, to which PFOS and PFHxS could be subjected (Martin *et al.* 2003), can therefore be slowed down. This is consistent with the longer gut transit times in fish acclimated to low temperatures reported by some authors (Hofer *et al.* 1982). Even if data on PFAS concentrations in feces is scarce in fish, we can suggest that this physiological adaptation might also explain the longer half-life of PFOS and PFHxS, especially since feces gather both the unabsorbed fraction of a chemical and its fraction excreted in the bile.

In the same way, it is known that urine production is likely to decrease for fish acclimated at cold temperatures (James and Kleinow 2014; Paterson *et al.* 2007). Unexpectedly, in this study we observed a faster elimination from kidney for both compounds at 7°C compared to 19°C. Although, Consoer *et al.* (2016) suggested that renal elimination is not the main elimination way for PFOS, we can hypothesize the implication of organic anion transporters (Ng and Hungerbühler, 2013) that may be sensitive to temperature variation. Unfortunately, no study on the effect of temperature on organic anion transporters in fish has been conducted to date and knowledge on PFAS elimination in fish is still rare, limiting our interpretation.

4.5. What is the temperature effect on PFOS and PFHxS absorption?

Finally, because bioenergetic requirements increase as temperatures rise (Fry, 1971; Brett and Groves, 1979), the absorption process is also influenced by water temperature in fish (Sijm *et al.* 1992). Unfortunately, we were not able to study this phenomenon herein for PFAS exposure, because we fed fish with quantities adapted to the water temperature. Modeling absorption kinetics taking into account temperature as variable and interactions between organs would allow us to assess modifications of uptake rates. This would help complete current information about the temperature effect on ADME processes relative to PFAS.

5. Conclusion

With human activities and actual climate change, temperature variations are expected to become more important in the environment. Hence, it is crucial to elucidate how water temperature influences distribution and elimination processes in fish exposed to contaminants. Herein, we report three dietary experiments conducted at 7°C, 11°C and 19°C and we included results obtained by Goeritz *et al.* (2013) to address the issue of the influence of water temperature on the distribution and elimination of PFOS and PFHxS in adult rainbow trout. Distribution of both substances in organs were significantly different between 7°C and 19°C treatments, with levels increasing in liver, blood and brain and decreasing in muscle with the rise in temperature. Since both PFOS and PFHxS belong to the perfluorinated sulfonic acid family and the effects of temperature on their distribution are similar, we can assume common mechanisms for both substances. Elimination rates depend on both the organ and the substance according to the exposure temperature, whereas a faster elimination rate of both PFOS and PFHxS from kidney was observed for fish acclimated at the colder temperatures. In fish, many physiological processes are impacted by temperature. It is therefore difficult to conclude on mechanistic changes specific to PFAS. Nevertheless, temperature is a key factor influencing the distribution and elimination of PFOS and PFHxS in rainbow trout. Further investigations dealing with the influence of temperature on affinities to specific proteins involved in the distribution and the elimination of PFASs within organisms would be meaningful. Also, an explicative model based on rainbow trout physiology and taking into account the variation of temperature should be developed to better understand the mechanisms governing the ADME processes of PFOS and PFHxS.

Acknowledgement

The experiments were funded by the Rhone-Mediterranean and Corsica Water Agency; the Rhone-Alps Region provided a doctoral fellowship grant (ARC3 Environnement) for Alice VIDAL. We thank Emilien Lasne and Laurent Espinat (INRA Thonon-les-Bains research station), Charline Gesset, Patrick Chevre

and Louis Jacob (Irstea, St-Seurin-sur-l'Isle experimental station) for their kind and active support during the experiments, as well as Ina Goeritz for providing her experimental data and metadata. We also thank Linda Northrup (English Solutions, Voiron, France) for copy-editing the manuscript.

Role of the funding source

The experiments, including the analyses, were funded by the Rhone-Mediterranean and Corsica Water Agency. The Rhone-Alpes Region provided a doctoral fellowship grant for Alice VIDAL. Study design, experimental and analytical work, and data processing were done by the authors, in particular Alice VIDAL, with support from technical staff. None of the funding sources were involved in the study design, in data processing, or in the decisions related to manuscript writing and submission.

Declaration of interest

We confirm that there are no known conflicts of interest associated with this publication and there has been no significant financial support for this work that could have influenced its outcome.

References

- Ando, S., Xue, X.H., Tibbits, G.F., Haunerland, N.H., 1998. Cloning and sequencing of complementary DNA for fatty acid binding protein from rainbow trout heart. *Comp. Biochem. Phys. B*, 119, 213–217.
- Babut, M., Labadie, P., Simonnet-Laprade, C., Munoz, G., Roger, M.-C., Ferrari, B.J.D., Budzinski, H., Sivade, E., 2017. Per- and poly-fluoroalkyl compounds in freshwater fish from the Rhône River: influence of fish size, diet, prey contamination and biotransformation. *Sci. Tot. Environ.* 605-606, 38-47.
- Barron, M.G., Tarr, B.D., Hayton, W.L., 1987. Temperature-dependence of cardiac output and regional blood flow in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish Biol.* 31, 735–744. doi:10.1111/j.1095-8649.1987.tb05276.x
- Bischel, H.N., Macmanus-Spencer, L.A., Zhang, C., Luthy, R.G., 2011. Strong associations of short-chain perfluoroalkyl acids with serum albumin and investigation of binding mechanisms. *Environ. Toxicol. Chem.* 30, 2423–2430. doi:10.1002/etc.647
- Borga, K., Fisk, A.A., Hoekstra, P.F., Muir, D.C.G., 2004. Biological and chemical factors of importance in the bioaccumulation and trophic transfer of persistent organochlorine contaminants in Arctic marine food webs. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 2367–2385.
- Borga, K., Saloranta, T.M., Ruus, A. 2010. Simulating climate change induced alterations in bioaccumulation of organic contaminants in an Arctic marine food web. *Environ. Toxicol. Chem.* 29, 1349–1357.
- Brett JR and Grove TDD, 1979. Physiological energetic. In: Hoar WS, Randall DJ, Brett JR (Eds.), *Fish Physiology. Bioenergetics and Growth*, vol. VIII. Academic Press, New York, 279 – 352.

- Buck, R.C., Franklin, J., Berger, U., Conder, J.M., Cousins, I.T., de Voogt, P., Jensen, A.A., Kannan, K., Mabury, S.A., van Leeuwen, S.P.J., 2011. Perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances in the environment: terminology, classification, and origins. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 7, 513-541.
- Buckman, A.H., Brown, S.B., Hoekstra, P.F., Solomon, K.R., Fisk, A.T., 2004. Toxicokinetics of Three Polychlorinated Biphenyl Technical Mixtures in Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*). *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 1725. doi:10.1897/03-336
- Chen Y and Guo L., 2009. Fluorescence study on site-specific binding of perfluoroalkyl acids to human serum albumin. *Arch Toxicol.* 83, 255–261.
- Consoer, D.M., Hoffman, A.D., Fitzsimmons, P.N., Kosian, P.A., Nichols, J.W., 2016. Toxicokinetics of Perfluorooctane Sulfonate in Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*). *Environ. Toxicol. Chem.* 35, 717–727. doi:10.1002/etc.3230
- Curtis L. R., 1983. Glucuronidation and biliary excretion of phenolphthalein in temperature acclimated steelhead trout (*Salmo gairdneri*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology.* 76, 107-111.
- Duis, K., Inglis, V., Beveridge, M.C.M., Hammer, C., 1995 Leaching of four different antibacterials from oil- and alginate-coated fish-feed pellets. *Aquacult Res.* 26, 549–556.
- European Union. 2006. Directive 2006/122/EC of the European Parliament and of the Council of 12 December 2006 amending for the 30th time Council Directive 76/769/EEC on the approximation of the laws, regulations and administrative provisions of the Member States relating to restrictions on marketing and use of certain dangerous substances and preparations (perfluorooctane sulfonates). *Off J Eur Union* L372:32–34.
- Falk, S., Failing, K., Georgii, S., Brunn, H., Stahl, T., 2015. Tissue specific uptake and elimination of perfluoroalkyl acids (PFAAs) in adult rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after dietary exposure. *Chemosphere* 129, 150–156. doi:10.1016/j.chemosphere.2014.06.061
- Fry F.E.J., 1971. The effects of environmental factors on the physiology of fishes. In *Fish Physiology* (Edited by Hoar W. S. and Randall D. J.). Academic Press. New York. 6, 1-98.
- Fulton. 1902. Rate of growth of seas fishes. *Sci. Invest. Fish. Div. Scot. Rept.*, 20: 1035–1039.
- Gaillard, J., Veyrand, B., Thomas, M., Dauchy, X., Boiteux, V., Marchand, P., Bizec, B. Le, Banas, D., Feidt, C., 2017. Tissue Uptake, Distribution, and Elimination of Perfluoroalkyl Substances in Juvenile Perch through Perfluorooctane Sulfonamidoethanol Based Phosphate Diester Dietary Exposure. *Environ Sci Technol.* 51, 7658–7666. doi:10.1021/acs.est.6b05598
- Gingerich, W.H., Pityer, R.A., Rach, J.J. 1990. Whole body and tissue blood volumes of two strains of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. Biochem. Physiol.* 97(4), 615–620.
- Goeritz, I., Falk, S., Stahl, T., Schäfers, C., Schlechtriem, C., 2013. Biomagnification and tissue distribution of perfluoroalkyl substances (PFASs) in market-size rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ. Toxicol. Chem.* 32, 2078–2088. doi:10.1002/etc.2279
- Goeritz, I., Atorf, C., Whalley, P., Seymour, P., Klein, M., Schlechtriem, C., 2014. Investigation into feed preparation for regulatory fish metabolism studies. *J. Sci. Food Agric.* 94, 438–444. doi:10.1002/jsfa.6262

Chapitre 5.

- Hofer, R., Forstner, H., Rettenwander, R., 1982. Duration of gut passage and its dependence on temperature and food consumption in roach, *Rutilus rutilus* L: laboratory and field experiments. *Journal of Fish Biology*. 20, 289-299.
- Houde, M., Martin, J.W., Letcher, R.J., Solomon, K.R., Muir, D.C., 2006. Biological monitoring of polyfluoroalkyl substances: A review. *Environ Sci Technol*. 40, 3463–3473.
- Houde, M., De Silva, A.O., Muir, D.C.G., Letcher, R.J., 2011. Monitoring of perfluorinated compounds in aquatic biota: An updated review. *Environ. Sci. Technol*. 45, 7962–7973. doi:10.1021/es104326w
- IPCC, 2013. Climate change 2013: the physical science basis. In: Stocker, T. F., Qin, D., Plattner, G.-K., Tignor, M., Allen, S.K., Boschung, J., Nauels, A., Xia, Y., Bex, V., Midgley, P.M. (Eds.)
- James, M.O., Kleinow, K.M., 2014. Seasonal influences on PCB retention and biotransformation in fish. *Environ. Sci. Pollut. Res*. 21, 6324–6333. doi:10.1007/s11356-013-1611-3
- Jimenez, B.D., Cirimo, C.P., McCarthy, J.F., 1987. Effects of feeding and temperature on uptake, elimination and metabolism of benzo(a)pyrene in the bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*). *Environmental Sciences*. 10, 41-57.
- Jones, P.D., Hu, W., De Coen, W., Nsted, J.L., Giesy, J.P., 2003. Binding of perfluorinated fatty acids to serum proteins. *Environ. Toxicol. Chem*. 22, 2639–2649. doi:10.1897/02-553
- Jordal, A.E.O., Hordvik, I., Pelsers, M., Bernlohr, D.A., Torstensen, B.E., 2006. FABP3 and FABP10 in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)-General effects of dietary fatty acid composition and life cycle variations. *Comp. Biochem. Phys. B*. 145, 147–158
- Kleinow, K.M., Nichols, J.W., Hayton, W.L., McKim, J.M., Barron, M.C., 2008. Toxicokinetics in Fishes. In Di Giulio RT, Hinton DE, eds, *The Toxicology of Fishes*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp 55–153
- Krafft, M.P., Riess, J.G., 2015. Per- and polyfluorinated substances (PFASs): Environmental challenges. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci*. 20, 192–212. doi:10.1016/j.cocis.2015.07.004
- Liu, R., Denovan-Wright, E.M., Wright, J.M., 2003. Structure, linkage mapping and expression of the heart-type fatty acid-binding protein gene (fabp3) from zebrafish (*Danio rerio*). *Eur. J. Biochem*. 270, 3223–3234.
- Luebker, D.J., Hansen, K.J., Bass, N.M., Butenhoff, J.L., Seacat, A.M., 2002. Interactions of fluorochemicals with rat liver fatty acid-binding protein. *Toxicology* 176, 175–185. doi:10.1016/S0300-483X(02)00081-1
- Martin, J.W., Mabury, S.A., Solomon, K.R., Muir, D.C.G., 2003. Dietary accumulation of perfluorinated acids in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Environmental Toxicology and Chemistry*. doi:10.1002/etc.5620220125
- Martin, J.W., Whittle, D.M., Muir, D.C.G., Mabury, S.A., 2004. Perfluoroalkyl contaminants in a food web from Lake Ontario. *Environ Sci Technol* 38, 5379–5385.
- Ng, C.A., Hungerbühler, K., 2013. Bioconcentration of Perfluorinated Alkyl Acids: How Important Is Specific Binding? *Environ. Sci. Technol*. 47, 7214–7223.
- OECD. 2012. Bioaccumulation in Fish: Aqueous and dietary exposure. (OECD guidelines for testing of chemicals, TG 305.) Organisation for Economic Co-operation and Development.

- OECD. 2002. Hazard Assessment of Perfluorooctane Sulphonate (PFOS) and its Salts. Organisation for Economic Co-operation and Development.
- Paterson, G., Drouillard, K.G., Haffner, G.D., 2007. PCB elimination by yellow perch (*Perca flavescens*) during an annual temperature cycle. *Environ. Sci. Technol.* 41, 824–829. doi:10.1021/es060266r
- Raleigh R. F., Hickman T., Solomon R. C. et Nelson P. C. Habitat Suitability Index Models: Rainbow trout. FWS/OBS, 1984.
- Ren, X.M., Qin, W.P., Cao, L.Y., Zhang, J., Yang, Y., Wan, B., Guo, L.H. 2016. Binding interactions of perfluoroalkyl substances with thyroid hormone transport proteins and potential toxicological implications. *Toxicology*. 366–367, 32–42.
- Renner, R. 2001. Growing concern over perfluorinated chemicals. *Environ. Sci. Technol.* 35 (7), 154A–160A.
- Scheringer, M., Trier, X., Cousins, I.T., de Voogt, P., Fletcher, T., Wang, Z., Webster, T.F., 2014. Helsingør Statement on poly- and perfluorinated alkyl substances (PFASs). *Chemosphere*. 114, 337–339. doi:10.1016/j.chemosphere.2014.05.044
- Shi, Y., Wang, J., Pan, Y., Cai, Y., 2012. Tissue distribution of perfluorinated compounds in farmed freshwater fish and human exposure by consumption. *Environ. Toxicol. Chem.* 31, 717–723. doi:10.1002/etc.1758
- Shi, Y., Vestergren, R., Nost, T.H., Zhou, Z., Cai, Y., 2018. Probing the Differential Tissue Distribution and Bioaccumulation Behavior of Per- and Polyfluoroalkyl Substances of Varying Chain-Lengths, Isomeric Structures and Functional Groups in Crucian Carp. *Environ. Sci. Technol.* 52, 4592–4600. doi:10.1021/acs.est.7b06128
- Sijm, D.T.H.M., Seinen, W., Opperhuizen, A. 1992. Life-cycle biomagnification study in fish. *Environ. Sci. Technol.* 26, 2162–2174.
- Torstensen, B., Nanton, D., Olsvik, P., Sundvold, H., Stubhaug, I. 2009. Gene expression of fatty acid-binding proteins, fatty acid transport proteins (cd36 and FATP) and β -oxidation-related genes in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed fish oil or vegetable oil. *Aquacult. Nutr.* 15, 440–451.
- Wang, Z., Cousins, I.T., Scheringer, M., Hungerbuehler, K., 2015. Hazard assessment of fluorinated alternatives to long-chain perfluoroalkyl acids (PFAAs) and their precursors: Status quo, ongoing challenges and possible solutions. *Environ. Int.* 75, 172–179. doi:10.1016/j.envint.2014.11.013
- Wen, W., Xia, X., Hu, D., Zhou, D., Wang, H., Zhai, Y., & Lin, H. 2017. Long-chain perfluoroalkyl acids (PFAAs) affect the bioconcentration and tissue distribution of short-chain PFAAs in zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Science & Technology*, 51, 12358–12368. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b03647>
- Williams, J. E.; Isaak, D. J.; Imhof, J.; Hendrickson, D. A.; McMillan, J. R. 2015. Cold-water fishes and climate change in North America. Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences. doi: 10.1016/B978-0-12-409548-9.09505-1.
- Zhang, L.; Ren, X. M.; Guo, L. H. 2013. Structure-based investigation on the interaction of perfluorinated compounds with human liver fatty acid binding protein. *Environ. Sci. Technol.* 47, 11293–11301.
- Zhong, W.; Zhang, L.; Cui, Y.; Chen, M.; Zhu, L. 2019. Probing mechanisms for bioaccumulation of perfluoroalkyl acids in carp (*Cyprinus carpio*): Impacts of protein binding affinities and elimination pathways. *Sci. Tot. Environ.* 647, 992–999. doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.099

Résumé du chapitre 5

« Influence de la température sur la toxicocinétique des substances perfluoroalkyles chez la truite arc-en-ciel »

Les substances perfluorées et polyfluorées (PFAS) sont largement répandues dans les écosystèmes aquatiques en raison de leur résistance à la dégradation et de leur capacité d'accumulation dans les organismes aquatiques. Bien que la température de l'eau contrôle de nombreux processus physiologiques chez les poissons, les connaissances sur les effets de ce facteur sur la toxicocinétique du PFAS sont encore limitées. Cette étude présente les résultats expérimentaux concernant la distribution interne et les taux d'élimination de deux acides perfluoroalkyles sulfoniques (PFSA), le sulfonate de perfluorooctane (PFOS) et le sulfonate de perfluorohexane (PFHxS), chez la truite arc-en-ciel adulte (*Oncorhynchus mykiss*) exposée à trois températures. Des expériences d'exposition par voie alimentaire ont été effectuées à 7°C, 11°C et 19°C et des échantillons de foie, de sang, de muscle, de cerveau et de rein ont été prélevés pour analyse. Les concentrations de PFOS étaient comparables ou supérieures à celles du PFHxS, tandis que le PFHxS était éliminé plus rapidement que le PFOS, indépendamment de la température. À l'inverse, la distribution interne a changé de façon significative pour les deux substances lorsque les poissons ont été exposés à une plage de températures allant de 7 °C à 19 °C. En effet, la distribution relative du PFOS et du PFHxS a augmenté dans le sang, le foie et le cerveau alors qu'elle diminuait dans les muscles lorsque la température de l'eau augmentait. La variation de la température de l'eau a affecté les demi-vies d'élimination, selon les substances et les organes.

Chapitre 6

Effet de la température sur la TK du PFOS chez la truite arc-en-ciel : exploration via un modèle PBTK

Chapitre 6.

Effet de la température sur la TK du PFOS chez la truite arc-en-ciel : exploration via un modèle PBTK

1 Introduction

Les résultats expérimentaux acquis durant cette thèse nous ont permis de mettre globalement en évidence l'influence de la température de l'eau sur le devenir des substances perfluoroalkyles étudiées chez la truite arc-en-ciel (*cf* chapitre 5). Chez les poissons, de nombreux processus physiologiques sont influencés par la température, tels que la croissance, le débit cardiaque ou encore la vitesse de respiration, pouvant ainsi affecter l'ensemble des processus ADME d'un composé. Cependant, il est difficile de déterminer expérimentalement quelles fonctions physiologiques sont responsables du changement de TK des substances au sein d'un organisme. Pour pallier cette difficulté, la modélisation PBTK est un outil pertinent car elle permet d'intégrer l'influence de la température sur chaque processus ADME, décrit simultanément, ce qui offre l'avantage d'étudier l'influence de la température plus finement qu'une simple analyse des données brutes.

L'objectif de ce chapitre est d'intégrer la température comme facteur influençant différents processus physiologiques pour tester leur importance respective sur la TK des substances perfluoroalkyles, en étudiant le cas du PFOS. Pour cela, la structure du modèle précédemment développé pour cette substance (*cf* chapitre 3) a été modifiée et les jeux de données expérimentales obtenus grâce aux expériences réalisées au cours de cette thèse à 7°C, 11°C et 19°C ont été utilisés pour la calibration et l'évaluation du modèle. Un autre jeu de données, provenant de l'étude de Goeritz *et al.* (2013) a également été utilisé en tant que quatrième scénario d'exposition, la température de l'eau expérimentale ayant été maintenue à 15°C tout du long de l'expérience. Dans un premier temps, le modèle brut a été appliqué à ces températures pour analyser l'ajustement des prédictions aux données expérimentales.

La croissance des poissons est une variable importante pour la description de la TK des substances (Grech *et al.* 2019 ; Branka, 2010). Par ailleurs, la température influence la croissance de façon déterminante (Azevedo *et al.* 1998 ; Hilton et Slinger, 1981). Pour notre étude, il est important de modéliser correctement la croissance des individus pour chaque expérience réalisée afin d'expliquer la TK des PFAS. Ainsi, la température et la quantité de nourriture, propres à chaque expérience, ont été intégrées à la croissance des individus. En effet, il est bien connu que la croissance dépend à la fois de

la température et de la quantité d'aliment ingérée par les poissons (Grech *et al.* 2019 ; Branka, 2010). Enfin, la température a été intégrée à différentes fonctions physiologiques décrites dans notre modèle PBTK, connues pour leur sensibilité face à une variation de température, et susceptibles d'expliquer les modifications de TK du PFOS : le débit cardiaque, la perfusion des organes, les coefficients de partage entre les tissus et le plasma, la constante de vitesse d'absorption et les clairances urinaire, fécale et biliaire.

2 Matériels et méthodes

Afin d'intégrer la température de l'eau comme facteur modulateur des processus physiologiques, la structure du modèle de référence, avec la description physiologique la plus simple (modèle 0) décrite dans le chapitre 3, a été utilisée comme modèle de base. Dans un premier temps, le modèle 0 a été utilisé en appliquant les scénarii d'exposition des expériences 7°C, 11°C et 15°C, sans aucune modification des paramètres (pas de calibration des paramètres) et sans que les processus physiologiques ne tiennent compte de l'effet de la température. Dans un second temps, la température a été intégrée à plusieurs fonctions physiologiques : croissance, débit cardiaque, perfusion des organes, constantes de vitesse d'absorption, clairances et coefficients de partage.

2.1. Application directe du modèle aux résultats des expérimentations à 7°C, 11°C et 15°C

Pour l'application directe du modèle aux expérimentations à 7°C, 11°C et 15°C, les valeurs des paramètres ajustées aux données observées à la température 19°C ont été utilisées, et seuls la longueur moyenne initiale des poissons, la quantité de PFOS administrée par la nourriture et le scénario d'exposition (durée des phases d'exposition et de dépuraction) ont été modifiés. Cette étape préliminaire permet d'analyser les écarts entre les observations et les prédictions du modèle sans considérer la température, ce qui permet d'identifier quelles cinétiques ont été impactées.

2.2. Ajustement de la croissance des individus selon les expériences (température et quantité de nourriture distribuée)

Dans le modèle, la croissance est contrôlée par la vitesse de croissance (κ), par la quantité de nourriture (f) et par la longueur maximale (L_m). Ces paramètres ont été calibrés pour la température de 19°C et ne correspondent donc pas aux autres expériences. En effet, pour chaque expérience, les poissons ont été nourris avec une quantité dépendant de la température (en % de la biomasse totale). Dans l'expérience de Goeritz *et al.* (2013), la quantité de nourriture distribuée aux poissons équivalait à 2.6% de la biomasse totale, soit entre 1.6 et 5 fois plus que dans nos expériences. En supposant que les poissons ont été nourris *ad libitum* dans leur expérience, soit 100% ($f = 1$), les valeurs de la vitesse de

croissance et de la longueur maximale ont été ajustées pour correspondre à leurs données biométriques ($\kappa=0.012 \text{ cm j}^{-1}$ et $L_m=99.91 \text{ cm}$). Une fois la croissance des poissons de l'étude de Goeritz *et al.* (2013) bien prédite, chaque f a été déterminé en conséquence pour les autres températures, avec : $f = 0.56$, $f = 0.60$ et $f = 0.58$, pour les expériences 7°C, 11°C et 19°C, respectivement. Par conséquent, dans notre cas, f intègre à la fois la diminution de la quantité de nourriture et l'effet de la température, afin de ne pas ajouter trop de paramètres pour faciliter la calibration. Ainsi, cette nouvelle version du modèle, dans laquelle la température a été intégrée à la croissance, devient la référence pour les prochaines étapes.

2.3. Différentes hypothèses sur les processus ADME

A partir de notre nouveau modèle de référence, la température a été intégrée aux différents processus physiologiques, de manière successive. Cette stratégie nous permet (i) de suivre les améliorations ou *a contrario* la détérioration des prédictions du modèle, apportées par ces changements, et (ii) de connaître les processus sensibles à la variation de température, responsables du changement de la TK du PFOS et ceux ayant le plus de poids sur la TK du PFOS.

- **Hypothèse 1** : Intégration de la température au débit cardiaque.
- **Hypothèse 2** : Intégration de la température aux coefficients de partage entre les tissus et le plasma.
- **Hypothèse 3** : Intégration de la température à la constante de vitesse d'absorption et aux clairances urinaire, fécale et biliaire.
- **Hypothèse 4** : Somme des hypothèses 1, 2 et 3, *i.e.* intégration de la température à la fois au débit cardiaque, aux coefficients de partage tissu:plasma, à la constante de vitesse d'absorption et aux clairances urinaire, fécale et biliaire.
- **Hypothèse 5** : Hypothèse 4 + intégration de la température à la perfusion sanguine des organes.

2.3.1. Description de l'hypothèse 1 : débit cardiaque

Chez la truite arc-en-ciel, une augmentation de la température provoque une accélération du débit cardiaque (Barron *et al.* 1987). Les travaux de Grech *et al.* (2019) ont démontré que l'augmentation du débit cardiaque avec la température était mieux expliquée en corrigeant le processus par le facteur d'Arrhenius que par une simple correction linéaire, comme le suggérait Barron *et al.* (1987). En effet, les processus physiologiques n'évoluent pas de manière linéaire la plupart du temps, et la loi d'Arrhenius permet de prendre en compte les variations d'un processus soumis à un changement de température. Cette équation est communément utilisée pour prédire la variation de la vitesse d'un processus soumis

à un changement de température autour de la température optimale propre à chaque espèce (Kooijman, 2010).

$$\dot{k}(T) = \dot{k}_1 \exp\left(\left(\frac{TA}{T_{ref}}\right) - \left(\frac{TA}{T_{exp}}\right)\right) \quad (\text{Equation 1})$$

Avec T_{exp} la température de l'eau à laquelle est réalisée l'expérience, TA la température d'Arrhenius, T_{ref} la température de référence, à laquelle a été mesurée le processus physiologique de référence (\dot{k}_1) à corriger et $\dot{k}(T)$ est la vitesse de réaction. Toutes les températures sont exprimées en Kelvin et sont indiquées dans le Tableau 1. Les valeurs références utilisées dans ce modèle sont les valeurs *a posteriori* du modèle calibré pour 19°C (cf. chapitre 3).

Pour le débit cardiaque, l'équation utilisée est la même que pour le modèle décrit dans le chapitre 3, avec la valeur de TA fixée à 6930 K (Grech *et al.* 2019).

2.3.2. Description de l'hypothèse 2 : coefficient de partage

Les données relatives à l'influence de la température sur les coefficients de partage tissu:sang ou tissu:plasma sont rares chez le poisson. Néanmoins, elle est un peu plus étudiée chez le mammifère (Hägerdal *et al.* 1975 ; Chen *et al.* 1980). Hägerdal *et al.* (1975) ont démontré que le coefficient de partage entre le cerveau et le sang pour le xénon dépend directement de la température chez le rat, ce qui peut être expliqué par les différences de solubilité du composé dans le plasma. Dans leurs travaux, Fisher *et al.* (2018) intègrent la température dans leurs équations des coefficients de partage. Dans notre cas, les coefficients de partage sont alors transformés par la loi d'Arrhenius comme décrit par l'Equation 2.

$$PC_i = PC_{i_{ref}} \times \dot{k}(T) \quad (\text{Equation 2})$$

Avec PC_i les coefficients de partage organe:plasma, $PC_{i_{ref}}$ le coefficient de partage de référence (Tableau 1) et $\dot{k}(T)$ la loi d'Arrhenius. Les valeurs références utilisées dans ce modèle sont les valeurs *a posteriori* du modèle calibré pour 19°C (cf. chapitre 3).

Pour le muscle cependant, puisque les concentrations augmentent quand la température diminue, de manière empirique, le coefficient de partage muscle:plasma référence a été multiplié par l'inverse de $\dot{k}(T)$.

2.3.3. Description de l'hypothèse 3 : constante de vitesse d'absorption et clairances

Chez le poisson téléostéen, il est connu que le comportement alimentaire dépend de la température de l'eau, changeant la vitesse d'absorption des substances. Par exemple, Karara et Hayton (1989) ont montré une augmentation de la vitesse d'absorption du phthalate (DEHP) avec la température chez *Cyprinodon variegatus*, et il en est de même pour *Lepomis macrochirus* exposé au [¹⁴C]BaP (Jimenez *et*

al. 1987). D'autres études ont montré que la température impacte la vitesse à laquelle s'élimine les composés par la bile (Curtis, 1983 ; Curtis *et al.* 1986 ; Kemp et Curtis, 1987), par les fèces (Hofer *et al.* 1982 ; Rajasilta, 1980 ; Shrable *et al.* 1969 ; Fauconneau *et al.* 1983) et par l'urine (Haywood et Clapp, 1942 ; Mackay, 1974 ; Pora et Precup, 1960).

Par conséquent, les équations de notre modèle de la constante de vitesse d'absorption et des clairances biliaires, fécale et urinaire ont été corrigées par la loi d'Arrhenius (Equations 3, 4, 5 et 6).

$$Ku = Ku_{ref} \times k(T) \quad \text{(Equation 3)}$$

Avec Ku la constante de vitesse d'absorption (h^{-1}), Ku_{ref} la constante de vitesse d'absorption référence (h^{-1}) (Tableau 1).

$$Cl_{bile} = Cl_{bile_{ref}} \times k(T) \quad \text{(Equation 4)}$$

Avec Cl_{bile} la clairance biliaire ($L h^{-1}$), $Cl_{bile_{ref}}$ la clairance biliaire référence ($L h^{-1}$) (Tableau 1).

$$Cl_{feces} = Cl_{feces_{ref}} \times k(T) \quad \text{(Equation 5)}$$

Avec Cl_{feces} la clairance fécale ($L h^{-1}$), $Cl_{feces_{ref}}$ la clairance fécale référence ($L h^{-1}$) (Tableau 1).

$$Cl_{urine} = Cl_{urine_{ref}} \times k(T) \quad \text{(Equation 6)}$$

Avec Cl_{urine} la clairance urinaire ($L h^{-1}$), $Cl_{urine_{ref}}$ la clairance urinaire référence ($L h^{-1}$) (Tableau 1).

Toutes les valeurs références utilisées dans ces équations sont les valeurs *a posteriori* du modèle calibré pour 19°C (*cf.* chapitre 3).

2.3.4. Description de l'hypothèse 5 : flux sanguins

Chez la truite arc-en-ciel, le changement du débit sanguin avec la température impacte les flux sanguins des organes (Barron *et al.* 1987). En effet, ces travaux ont démontré que les flux sanguins relatifs au débit cardiaque ne se distribuaient pas de la même manière dans les différents organes selon la température (Figure 1). Par exemple, la part du débit sanguin (% du débit cardiaque) vers le foie et le tractus gastro-intestinal a diminué de manière significative à 18°C par rapport à celle des poissons acclimatés à 6°C. Par ailleurs, le muscle reçoit la fraction la plus importante du débit cardiaque, et la distribution du flux sanguin vers ce tissu augmente considérablement avec la température.

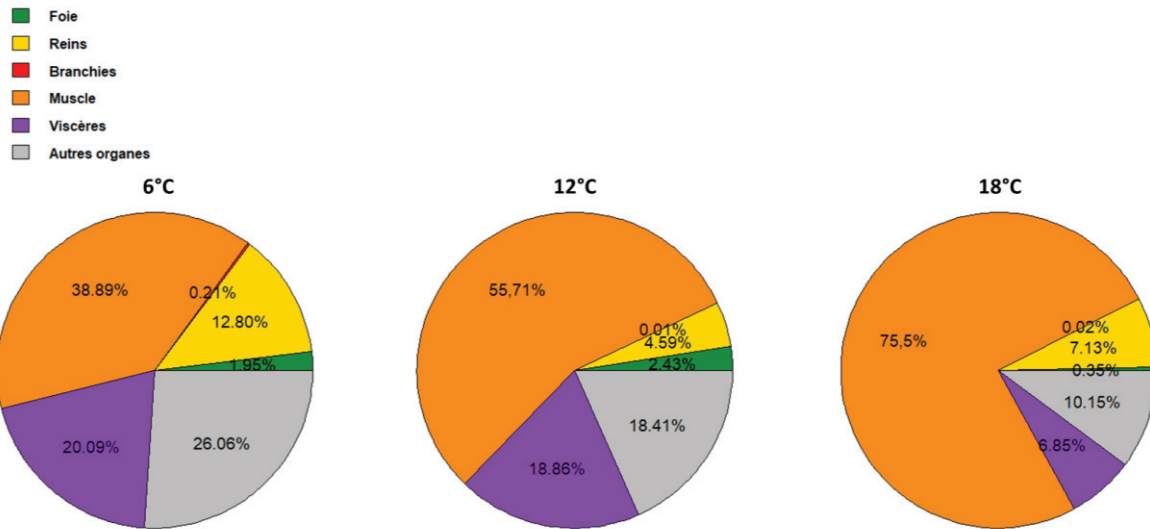


Figure 1. Répartition des flux sanguins, calculés à partir des données des trois expériences réalisées par Barron *et al.* (1987), à 6°C, 12°C et 18°C. Les pourcentages ont été obtenus à partir des fractions calculées pour chaque organe. Les fractions ont été calculées comme le produit de la masse de l'organe et de la perfusion de celui-ci. Le compartiment « autres organes » correspond à la peau et au cerveau, que Barron *et al.* (1987) n'ont pas étudiés.

Le muscle étant le seul organe pour lequel la perfusion augmente avec la température, l'équation employée pour décrire l'influence de la température dans cet organe est une simple correction par la loi d'Arrhenius (Equation 7). Les pertes occasionnées par l'augmentation de la température sont décrites par l'Equation 8 et sont ainsi réparties dans les autres organes (Equations 9,10 et 11). Même si la fraction *autres organes* est impactée par la température (Figure 6), aucune information n'est directement disponible sur la perfusion de la peau et du cerveau dans la littérature. De ce fait, la perfusion de ces organes ne change pas avec la température dans notre étude. Il en est de même pour les branchies, dont la perfusion est très faible comparée aux autres organes.

$$frac_{muscle} = frac_{muscle_{ref}} \times (1 - k(T)) \quad \text{(Equation 7)}$$

$$\Delta = frac_{muscle_{ref}} \times (1 - k(T)) \quad \text{(Equation 8)}$$

$$frac_{foie} = frac_{foie_{ref}} \times \Delta \times \frac{frac_{foie_{ref}}}{(frac_{foie_{ref}} + frac_{viscères_{ref}} + frac_{rein_{ref}})} \quad \text{(Equation 9)}$$

$$frac_{viscères} = frac_{viscères_{ref}} \times \Delta \times \frac{frac_{viscères_{ref}}}{(frac_{foie_{ref}} + frac_{viscères_{ref}} + frac_{rein_{ref}})} \quad \text{(Equation 10)}$$

Les termes $\frac{frac_{foie_{ref}}}{(frac_{foie_{ref}} + frac_{viscères_{ref}} + frac_{rein_{ref}})}$ et $\frac{frac_{viscères_{ref}}}{(frac_{foie_{ref}} + frac_{viscères_{ref}} + frac_{rein_{ref}})}$ sont regroupés en x et y, respectivement.

$$frac_{rein} = frac_{rein_{ref}} \times \Delta \times (1 - x - y - z) \quad \text{(Equation 11)}$$

Avec z , représentant la fraction sanguine restante (non expliquée ni par x , ni par y), supposée aller dans les autres organes ou dans le reste du corps (compartiment *carcass*).

Pour toutes ces équations, $frac_i$ représentent la fraction relative de sang arrivant au tissu i et $frac_{iref}$ correspond à la fraction relative de référence (Tableau 1). Toutes les valeurs références utilisées dans ces équations sont les valeurs *a posteriori* du modèle calibré pour 19°C (cf. chapitre 3).

2.4. Calibration du modèle PBTK

L'inférence bayésienne a été utilisée pour ajuster simultanément le modèle aux données expérimentales obtenues aux différentes températures en même temps. Les températures d'Arrhenius impliquées dans la correction des coefficients de partage (TA_{PC}), dans celle des cinétiques d'absorption et d'élimination ($TA_{cinetique}$) et dans celle des fractions de perte des flux sanguin (x , y , et z) ont été calibrées. Les coefficients de partage branchies:plasma et peau:plasma ont également été calibrés grâce aux données mesurées par Goeritz *et al.* (2013) dans ces deux organes. Les distributions *a priori* ainsi que les moyennes \pm écart-type des distributions *a posteriori* et les intervalles de crédibilité à 95% (IC95%) des paramètres sont rapportées dans le Tableau 1. Les valeurs références, qui n'ont pas été optimisées, sont identiques à celles du modèle PBTK développé pour le PFOS à une seule température (cf article présenté chapitre 3) et ne sont donc pas ré-écrites dans ce chapitre.

L'étape de calibration a été réalisée à l'aide du logiciel McSim (version 6.0.1). Trois chaînes de Markov, avec 20 000 itérations, ont été exécutées pour chaque hypothèse. Pour s'assurer de la convergence des chaînes, nous avons calculé le critère de convergence de Gelman et Rubin (1992), et analysé la densité des distributions *a priori* et *a posteriori*. Ce diagnostic de convergence a été réalisé à l'aide du logiciel R (R-Core-team, 2016) dans l'environnement RStudio (version 0.97.903).

2.5. Simulations du modèle PBTK

Pour chaque expérience, les simulations intégraient la température de l'eau enregistrée, la concentration en oxygène enregistrée, la longueur initiale moyenne des poissons, la quantité de nourriture donnée et la quantité de PFOS administrée (en fonction de la quantité de nourriture donnée). Pour les expériences conduites à 11°C, 15°C et 19°C les variations de température durant l'expérience étaient négligeables. Les valeurs des températures de l'eau indiquées dans le modèle sont donc les moyennes des valeurs mesurées quotidiennement. Pour l'expérience à 7°C, il a été plus difficile de maintenir la température de l'eau constante à cause des variations saisonnières entre janvier et mars

2017, période à laquelle s'est déroulée l'expérimentation. Par conséquent, la température de l'eau a été indiquée pour chacun des jours de l'expérience, en utilisant la fonction *Ndose* du logiciel McSim.

Les prédictions du modèle ont été ajustées sur la moyenne géométrique des données observées : $n=5$ pour les expériences 7°C, 11°C et 19°C et $n=4$ pour l'expérience de Goeritz *et al.* (2013). Les données expérimentales des concentrations dans les organes et dans les fèces ont été supposées suivre une distribution log-normale et l'erreur a été estimée à 15 %. Celle-ci correspond aux erreurs de mesure et à la variabilité interindividuelle. L'erreur a été fixée à 30 % pour les viscères en raison de l'hétérogénéité de l'échantillon (mélange d'estomac, d'intestin, de rate et de caecum pylorique).

2.6. Comparaison des hypothèses

La capacité du modèle PBTK à prédire le comportement du PFOS a été vérifiée pour chacune des hypothèses en calculant la racine carrée de l'erreur quadratique moyenne (RMSE, *Root Mean Squared Error*) pour chaque organe et pour les fèces (Equation 12). Les prédictions du modèle associées au RMSE le plus petit indiquent le modèle dont les prédictions correspondent le mieux aux données. Par rapport à l'erreur relative utilisée dans le chapitre 3, le RMSE donne un poids plus important aux erreurs dans les organes présentant des concentrations élevées.

$$RMSE = \sqrt{\sum_{i=1}^n \frac{(P_i - O_i)^2}{n}} \quad (\text{Equation 12})$$

Avec P_i la moyenne géométrique des concentrations prédites, O_i la moyenne géométrique des concentrations observées et n le nombre total d'observations.

3 Résultats

3.1. Application directe du modèle aux expérimentations à 7°C, 11°C et 19°C

Les résultats des prédictions sont présentés ci-après (Figures 2 et 3, et Annexe 1 du chapitre 6). Ceux-ci montrent que l'application seule des scénarii d'exposition ne suffit pas à expliquer correctement ni la croissance, ni les concentrations en PFOS dans les diverses matrices analysées. Les paramètres calibrés pour l'expérience 19°C ne sont donc pas extrapolables à d'autres températures. Ceci confirme que la température de l'eau est un facteur important pour la description du profil TK du PFOS.

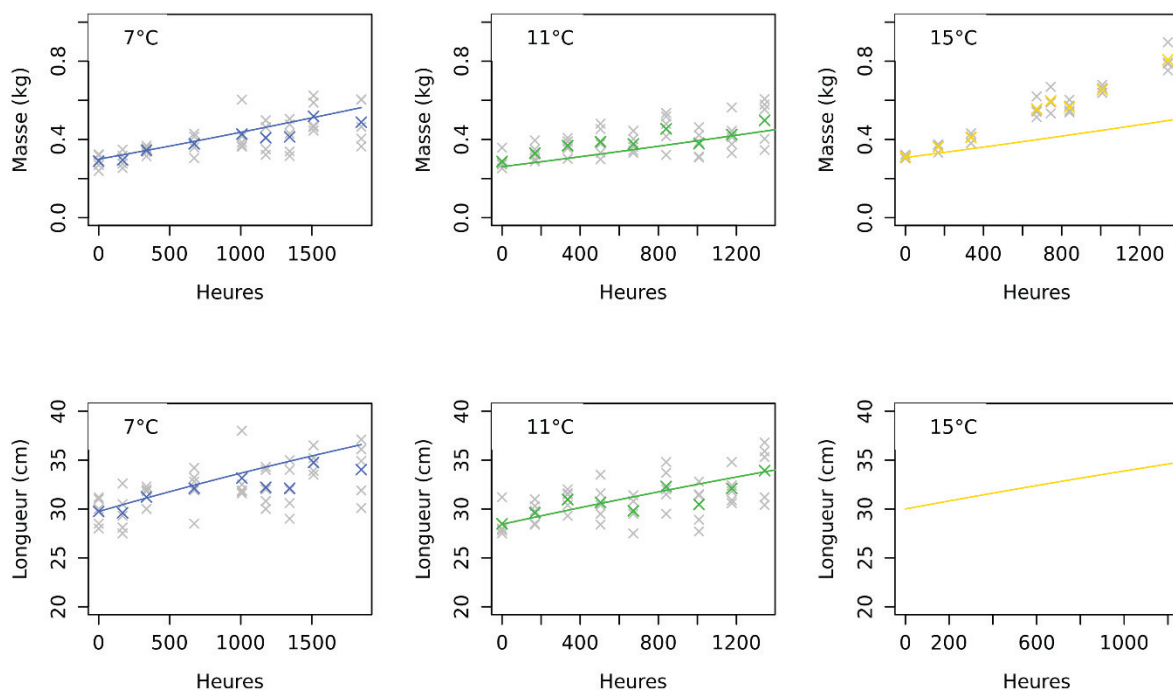


Figure 2. Prédications du modèle de la masse et de la taille des poissons aux trois températures (7°C, 11°C et 15°C, lignes bleues, vertes et jaunes, respectivement), sans appliquer de correction par la température aux processus physiologiques. Les croix de couleurs sont les moyennes arithmétiques de la masse et de la taille et les croix grises sont les données observées pour chaque individu. Les données de taille de l'étude de Goeritz *et al.* (2013) ne sont pas rapportées dans leur manuscrit.

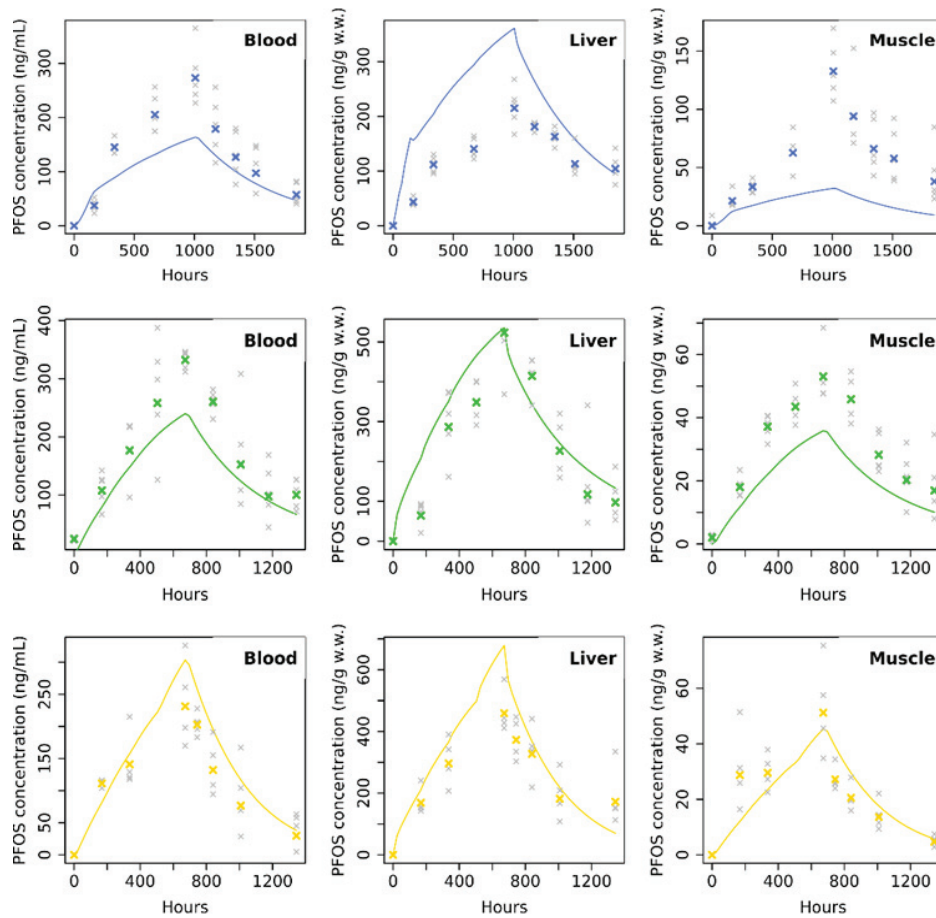


Figure 3. Prédiction du modèle des concentrations en PFOS dans quelques organes aux trois températures (7°C, 11°C et 15°C, lignes bleues, vertes et jaunes, respectivement), sans appliquer de correction par la température aux processus physiologiques. Les croix de couleurs sont les moyennes géométriques des concentrations en PFOS mesurées et les croix grises sont les données observées pour chaque individu.

3.2. Ajustement de la croissance des individus selon les expériences

La correction apportée au modèle PBTK pour prendre en compte l'effet de la température et de la quantité de nourriture sur la croissance a permis d'ajuster correctement les prédictions aux données observées, à la fois pour la taille et pour la masse, pour toutes les expériences (Figure 4 comparée à la Figure 2). Nous n'avons cependant pas pu vérifier l'ajustement des prédictions aux données de taille de Goeritz *et al.* (2013), car les auteurs ne les mentionnent pas dans leur étude.

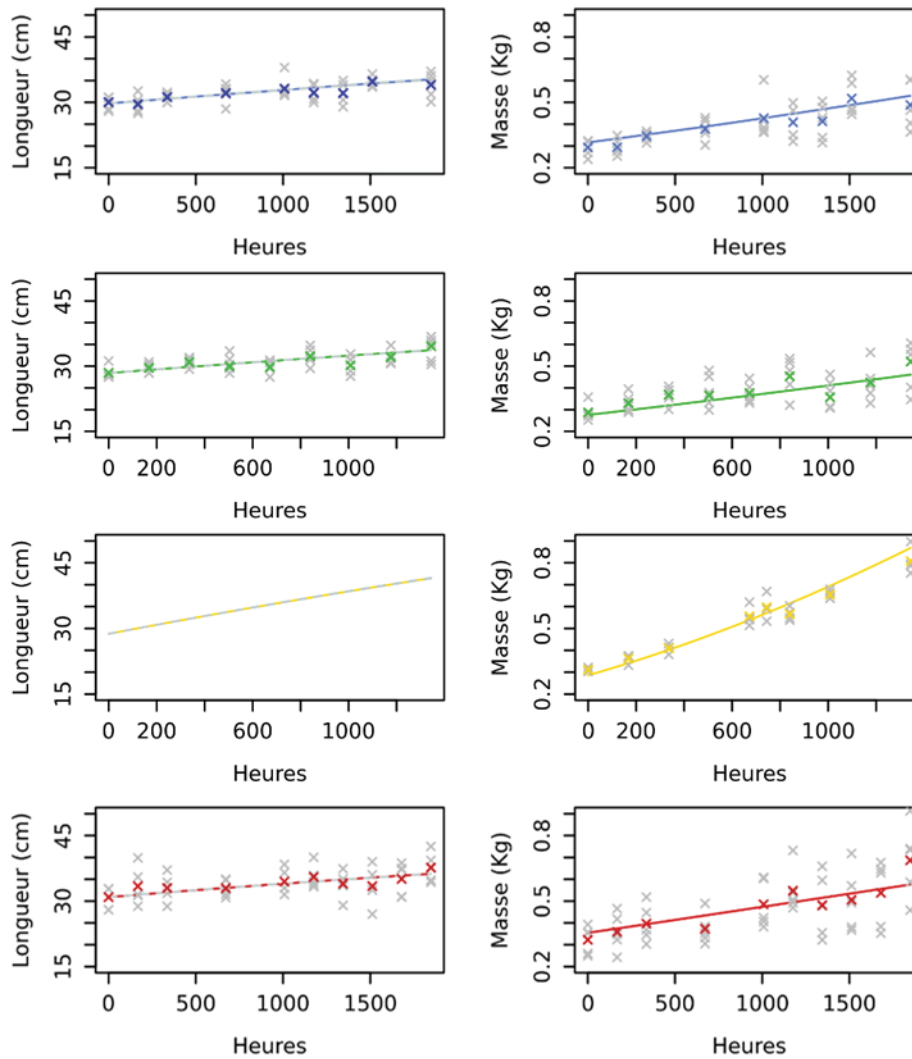


Figure 4. Prédiction du modèle de la taille (colonne de gauche) et de la masse (colonne de droite) des individus aux quatre températures (7°C, 11°C, 15°C et 19°C, lignes bleues, vertes, jaunes et rouges, respectivement). Les croix de couleur sont les moyennes arithmétiques des données et les croix grises sont les données observées pour chaque individu. Les données de taille de l'étude de Goeritz *et al.* (2013) ne sont pas rapportées dans leur manuscrit.

3.3. Comparaison de l'ajustement de la TK selon les hypothèses

La qualité des ajustements des prédictions aux données expérimentales est présentée dans l'Annexe 2 du chapitre 6.

3.3.1. Résultats de la calibration bayésienne

Les résultats de convergence des chaînes de Markov pour les paramètres calibrés sont présentés en Annexe 3 du chapitre 6. Les distributions *a posteriori* des températures d'Arrhenius, des coefficients de partage peau:plasma et branchies:plasma et des fractions y et z sont plus étroites que les distributions *a priori*, indiquant que les données expérimentales ont fourni suffisamment d'informations pour estimer précisément la valeur des paramètres. La valeur de la fraction x en revanche, n'a pas été mise à jour par

la calibration. Les résultats de la calibration pour les paramètres $TA_{cinétique}$ et TA_{PC} proposent des valeurs inférieures à celles de référence, fixée à 6930 K. Toutes les valeurs *a posteriori* sont référencées dans le Tableau 1.

Tableau 1. Symboles, définitions (unités), références, distributions *a priori* & *a posteriori* : estimation de la moyenne \pm écart type et intervalles de crédibilité 95% (IC95%) pour tous les paramètres utilisés dans le modèle PBTK.

Symboles	Définitions (unités)	Distribution <i>a priori</i> *	Sources	Distribution <i>a posteriori</i>	
				Moyenne \pm sd	IC 95%
Paramètres physiologiques					
Hypothèse 2 $TA_{cinétique}$	Température d'Arrhenius des processus de cinétique (K)	N(6930, 30)	Grech <i>et al.</i> 2017	2902.91 \pm 157.4	[2635.6;3230.7]
Hypothèse 3 TA_{PC}	Température d'Arrhenius les coefficients de partage (K)	N(6930, 30)	Grech <i>et al.</i> 2017	3767.9 \pm 121.9	[3511.2;4017.1]
Hypothèse 4 $TA_{cinétique}$ TA_{PC}		N(6930, 30) N(6930, 30)	Grech <i>et al.</i> 2017 Grech <i>et al.</i> 2017	2506.1 \pm 219.7 3702.6 \pm 144.4	[2080.4;2947.6] [3443.1;3965.5]
Hypothèse 5 $TA_{cinétique}$ TA_{PC}		N(6930, 30) N(6930, 30)	Grech <i>et al.</i> 2017 Grech <i>et al.</i> 2017	2159.7 \pm 201.1 3507.4 \pm 136.9	[1765.3;2585.8] [3249.4;3781.8]
x	Fractions sanguines relatives aux organes	N(0.024, 30)	-	0.022 \pm 0.011	[0.005;0.046]
y		N(0.48, 30)	-	0.96 \pm 0.096	[0.75;1.13]
z		N(0.40, 30)	-	0.067 \pm 0.085	[0.006;0.305]
Paramètres spécifiques à la substance					
$PC_{i_{ref}}$	Coefficient de partage tissu:plasma				
<i>Peau</i>		N(0.40, 30)	Goeritz <i>et al.</i> 2013	0.29 \pm 0.01	[0.26;0.32]
<i>Branchies</i>		N(0.25, 30)	Goeritz <i>et al.</i> 2013	0.35 \pm 0.03	[0.30;0.43]

*N représente la loi normale (valeur *a priori*, coefficient de variation (%)).

3.3.2. Analyse des RMSE

Les RMSE ont été calculés pour tous les organes et les fèces, chaque fois qu'une hypothèse a été testée afin de connaître quel modèle était le plus précis (Figures 5 et 6, et Annexe 4 du chapitre 6). Le modèle ayant le RMSE le plus bas est le modèle décrit par l'hypothèse 5, *i.e.* le modèle dans lequel l'ensemble des processus physiologiques a été corrigé (débit cardiaque, cinétiques d'absorption et d'élimination, coefficients de partage et fractions sanguines relatives à chaque organe). La comparaison des RMSE du modèle appliqué sur l'hypothèse 5 avec celle du modèle de référence montre à la fois des améliorations et des détériorations des ajustements selon les organes et la température. Par exemple, les prédictions du foie sont améliorées par l'hypothèse 5 mais celles du cerveau se dégradent. Les prédictions du muscle sont considérablement meilleures à 7°C avec l'hypothèse 5 tandis qu'elles sont moins bonnes à 11°C. Au contraire, les prédictions des viscères ont été améliorées à 11°C avec l'hypothèse 5 tandis qu'elles sont moins bonnes à 7°C.

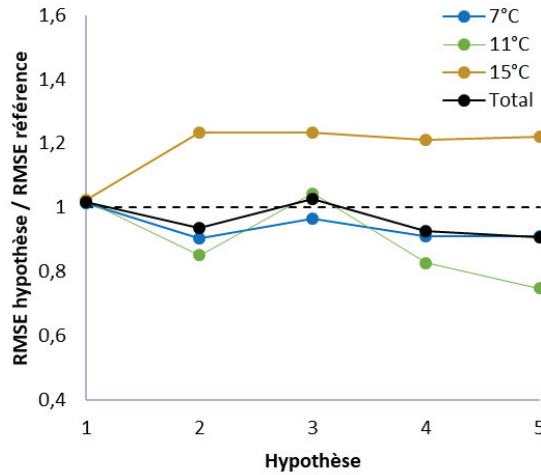


Figure 5. Graphique représentant les ratios des sommes des RMSE de chaque température et de la somme des RMSE du modèle de référence (bleu, vert et jaune) pour chaque hypothèse testée, et le ratio du total des RMSE de chaque température et de la somme des RMSE du modèle de référence (noir), pour chaque hypothèse testée.

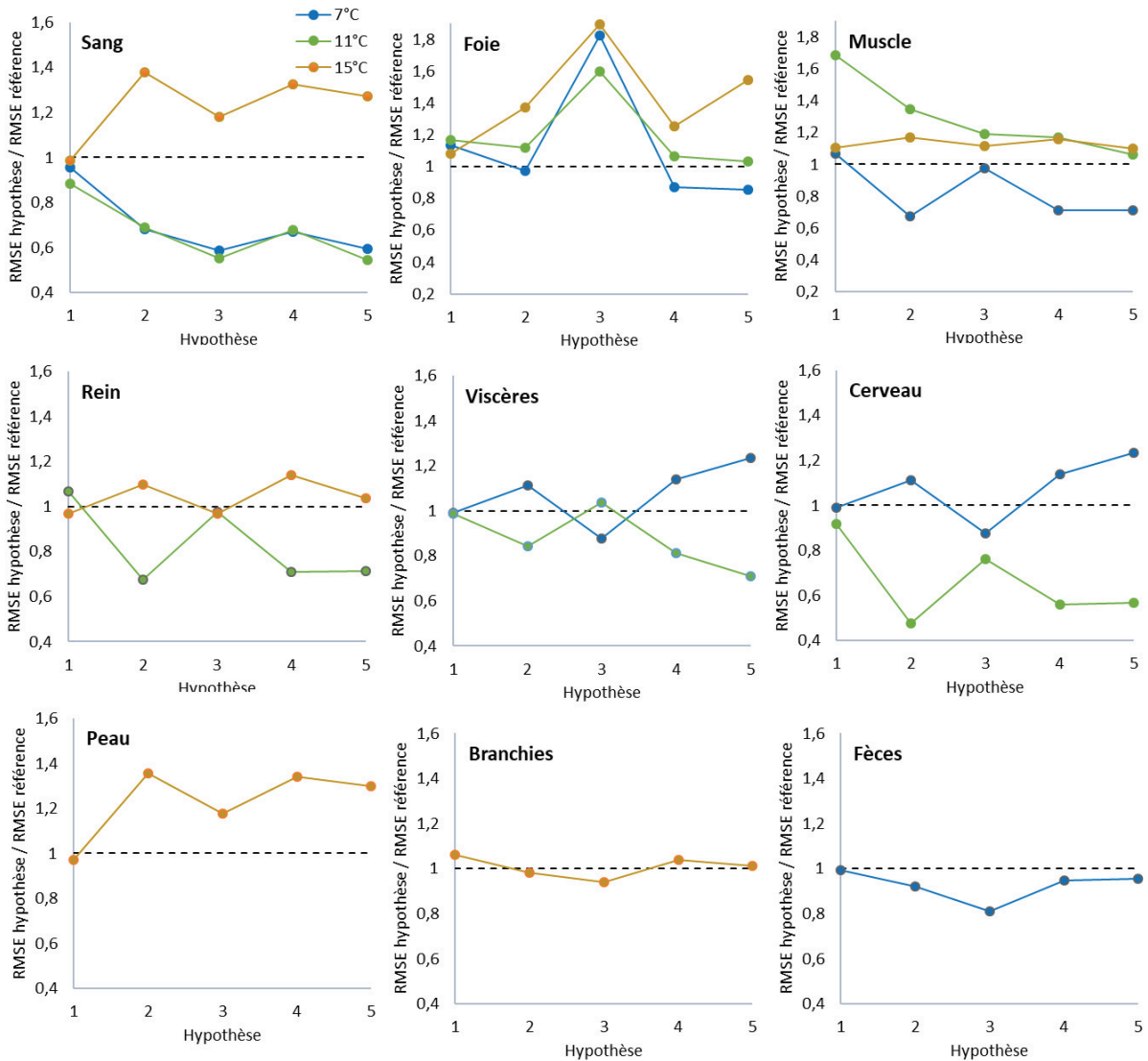


Figure 6. Graphique représentant les ratios des RMSE de chaque organe à chaque hypothèse testée et des RMSE de chaque organe du modèle de référence, à chaque température.

3.4. Prédictions du modèle PBTK (hypothèse 5)

Les prédictions du modèle basé sur l'hypothèse 5, ayant le RMSE total le plus bas, sont présentées dans les sections suivantes (sections 3.4.1, 3.4.2 et 3.4.3).

3.4.1. Prédictions du débit cardiaque et des flux sanguins

Le débit cardiaque dépend à la fois de la température et de la croissance des poissons. Les valeurs trouvées par notre modèle sont proches de celles trouvées par Barron *et al.* (1987). Les fractions sanguines relatives aux organes ont été calculées avant et après calibration, afin de les comparer à celles calculées à partir des données de Barron *et al.* (1987) (Figure 7). Leurs données sont bien prédites par les fractions calculées à partir des valeurs *a priori*, tandis que les mises à jour faites par la calibration bayésienne engendrent des écarts plus importants avec les flux relatifs des reins et des viscères.

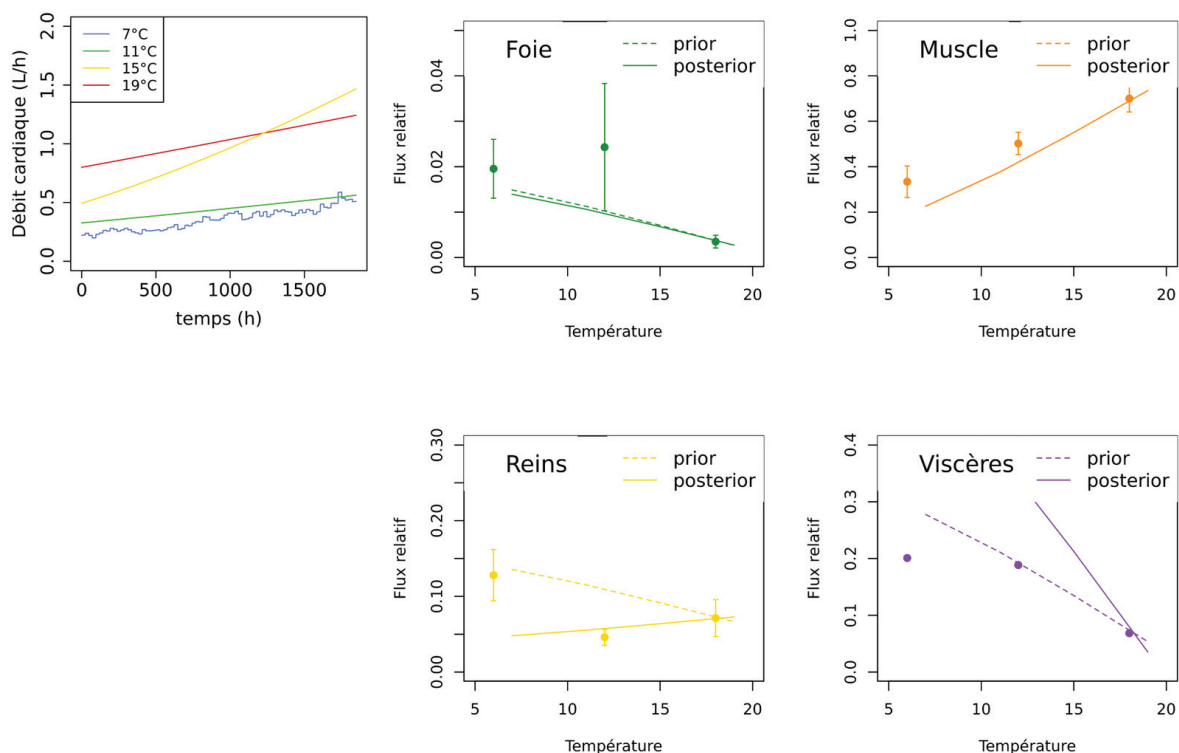
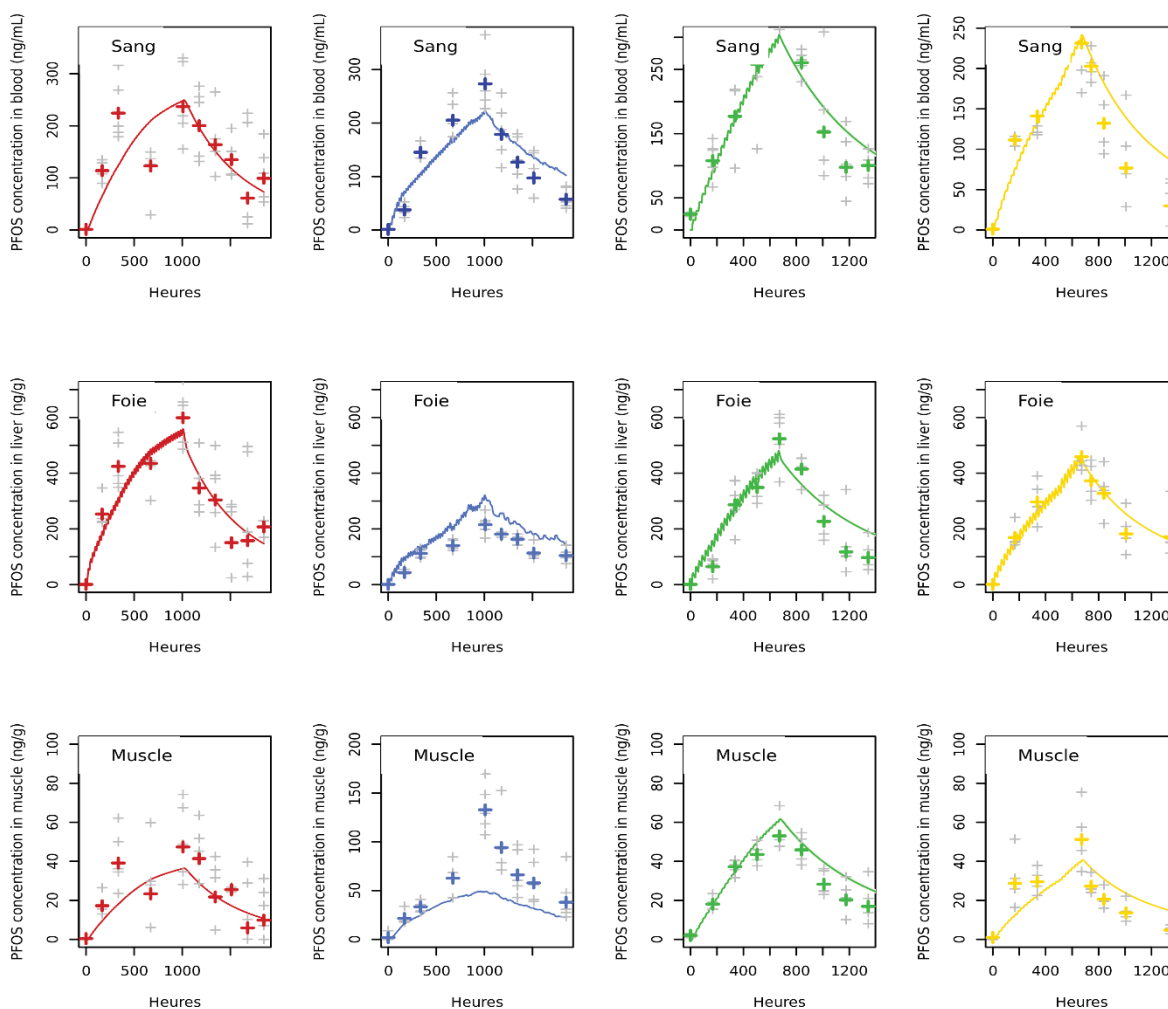


Figure 7. Débit cardiaque corrigé par la loi d'Arrhenius et flux relatifs de sang arrivant aux organes (foie, muscle, reins et viscères) ayant été corrigés par la température. Les traits en pointillés représentent les prédictions des flux calculées à partir des valeurs *a priori* de x , y et z et les traits pleins représentent les prédictions des flux calculées à partir des valeurs *a posteriori* de x , y et z . Les points représentent les flux relatifs des organes mesurés par Barron *et al.* (1987) et les barres d'erreurs représentées sur les graphiques sont les erreurs-standard*0.96. Celles des viscères n'ont pas été calculées car cet organe est un pool d'organes (rate, intestin, estomac et caecum pylorique). Pour l'ensemble des graphiques, la température d'Arrhenius = 6930 K.

3.4.2. Concentrations en PFOS prédites dans les différents organes analysés

Les prédictions des concentrations en PFOS dans les organes du modèle basé sur l'hypothèse 5 sont présentées Figure 8. Dans l'ensemble, les prédictions sont bien ajustées avec les données expérimentales, même si certaines concentrations mesurées sont mieux expliquées dans certains organes, selon la température. Les prédictions dans le sang, le foie, le muscle du modèle 7°C sont notablement améliorées, au détriment de celles des viscères et des reins. Ceci est confirmé par les valeurs des RMSE (Annexe 4 du chapitre 6) et par les graphiques confrontant les prédictions avec les observations (Annexe 2 du chapitre 6). Les prédictions des branchies à 15°C cependant, ne s'ajustent pas bien avec les données de Goeritz *et al.* (2013).



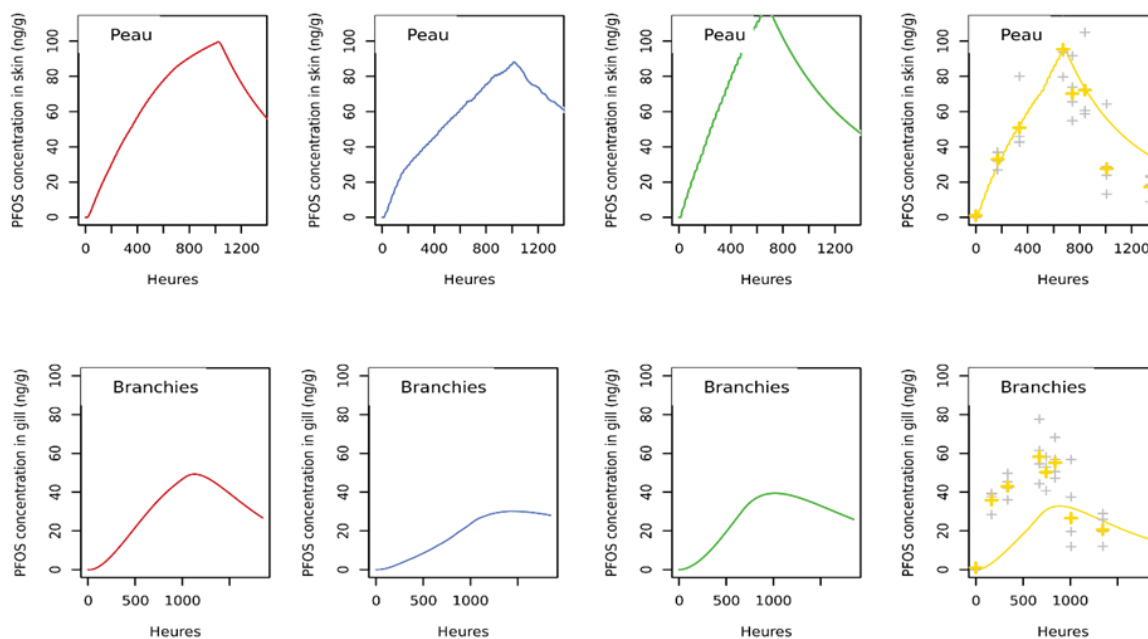


Figure 8. Prédiction du modèle des concentrations en PFOS dans quelques organes aux quatre températures (7°C, 11°C, 15°C et 19°C, lignes bleues, vertes, jaunes et rouges respectivement). Les croix de couleurs sont les moyennes géométriques des concentrations en PFOS mesurées et les croix grises sont les données observées pour chaque individu.

3.4.3. Prédiction des processus de cinétique du PFOS

Afin d'étudier l'effet de la température sur la cinétique du PFOS, les prédictions de son absorption, sa quantité dans la lumière de l'intestin, dans la bile, dans l'urine, dans les fèces ainsi que sa concentration dans les fèces sont présentées Figure 9. Du fait de la correction par la loi d'Arrhenius, les mécanismes d'absorption et d'élimination du PFOS sont accélérés à 19°C par rapport aux températures les plus basses (Figure 9.A, 9.B, 9.C et 9.D). Les graphiques 9.E montrent l'apport journalier de la quantité de PFOS via la nourriture contaminée. Chaque pic représente une dose orale et la phase descendante de celui-ci caractérise la rapidité de la distribution du composé vers le reste du corps ou la rapidité de son excrétion. Par ailleurs, les concentrations en PFOS dans les fèces sont bien décrites à 11°C et à 19°C (pas de donnée expérimentale pour 15°C) mais sont sous-estimées à 7°C.

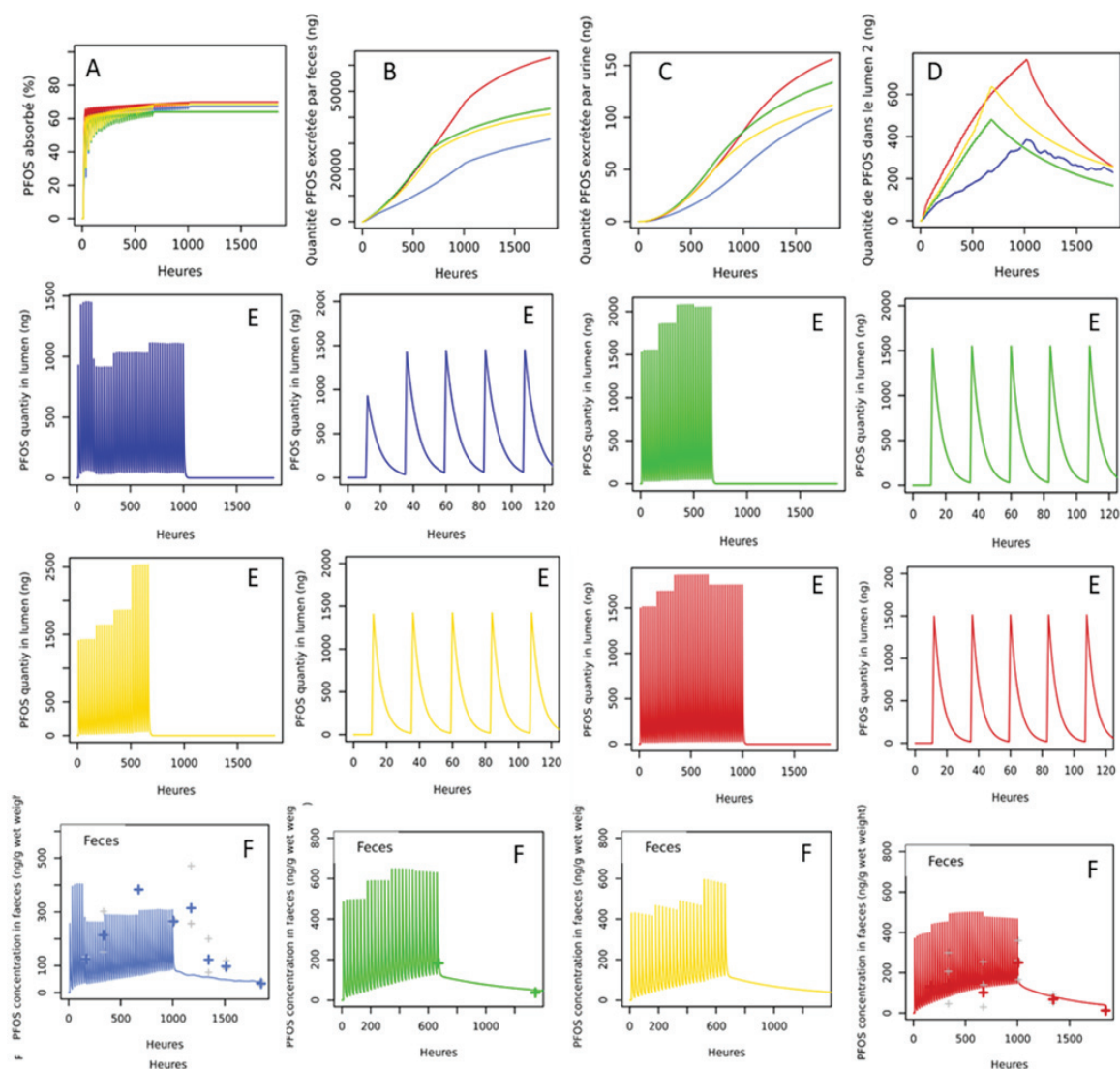


Figure 9. A. Absorption du PFOS (%) en fonction de la température. B. Quantité de PFOS excrétée par les fèces en fonction de la température. C. Quantité de PFOS excrétée par l’urine en fonction de la température. D. Quantité de PFOS dans la lumière intestinale 2, soit la quantité de PFOS dans la bile en fonction de la température. E. Quantité de PFOS dans la lumière de l’intestin en fonction de la température, durant la totalité de l’expérience et sur les cinq premiers jours. F. Concentrations en PFOS prédites dans les fèces (lignes), comparées aux données observées (croix). Pour l’intégralité des graphiques, la couleur rouge correspond aux prédictions à 19°C (référence), la couleur bleue aux prédictions à 7°C, la couleur verte aux prédictions à 11°C et la couleur jaune aux prédictions à 15°C.

4 Discussion, limites et perspectives du modèle PBTK

La prise en compte de l’influence de la croissance et de la température sur les mécanismes impliqués dans les processus ADME est une amélioration mécanistique essentielle pour l’explication de la TK des PFAS (Grech *et al.* 2019). Pourtant, encore peu de modèles PBTK intègrent ces deux facteurs (Grech *et al.* 2017). Dans notre modèle, la croissance des individus a été prise en compte. Comme attendu, nos données de croissance montrent que la taille et la masse des poissons varient avec la température et avec la quantité de nourriture. Par conséquent, l’effet de la température et de la quantité de nourriture

sur la croissance des individus a été intégré dans ce modèle, par la correction des fractions d'alimentation *ad libitum* (f) pour chacune des expériences. Ces valeurs tiennent compte de la quantité de nourriture donnée aux poissons propre aux différentes expériences, calculée à partir de la biomasse totale et de l'effet de la température. Les valeurs de f ont été basées sur l'étude de Goeritz *et al.* (2013), durant laquelle les poissons ont été nourris à 2.6 % de la biomasse totale, quantité plus importante que les nôtres. En procédant de cette manière, les prédictions de notre modèle s'ajustent correctement à la fois à la longueur et à la masse des individus, pour toutes les températures. Ainsi, cette version du modèle est devenue la référence pour les tests des hypothèses.

La simple application du modèle PBTK optimisé à 19°C aux autres températures n'a pas pour autant permis d'expliquer correctement les concentrations en PFOS dans les tissus. De ce fait, la température a été intégrée comme facteur modulant plusieurs processus physiologiques, séparément dans un premier temps, puis, simultanément. Un tableau de synthèse qualitatif, proposé ci-après, résume les améliorations apportées par les différentes hypothèses pour chaque température par rapport au modèle de référence (Tableau 2). Les prédictions du modèle sont mieux ajustées aux données issues des expériences réalisées à 7°C et à 11°C. Ce n'est pas le cas pour les prédictions du modèle à 15°C, dont l'ajustement avec les données expérimentales se sont, au contraire, détériorées. Ce résultat pourrait provenir d'une différence des conditions d'exposition entre l'étude de Goeritz *et al.* (2013) et la nôtre. Cependant, la qualité des prédictions du modèle, quand celui-ci est considéré dans sa globalité (total), est améliorée par les hypothèses émises. Les résultats des RMSE, calculés pour chaque hypothèse, ont montré que le modèle le plus précis est celui dans lequel l'ensemble des hypothèses est considéré (Figure 5 et Annexe 4 du chapitre 6). Ceci suggère que l'effet de la température sur la TK du PFOS est mieux expliqué quand tous les processus physiologiques sont simulés en même temps. Une comparaison plus robuste des modèles pourrait être effectuée en calculant le BIC (*Bayesian Information Criterion*) ou le DIC (*Deviance Information Criterion*) de chacune des hypothèses. En effet, lors de l'ajustement des modèles, la vraisemblance peut augmenter en ajoutant des paramètres, pouvant entraîner un surajustement. Le BIC et le DIC tentent de résoudre ce problème en introduisant un terme de pénalité pour le nombre de paramètres du modèle, contrairement au RMSE.

Tableau 2. Récapitulatif des améliorations/détériorations apportées par les hypothèses testées par le modèle PBTK. Les + représentent une amélioration de la qualité des prédictions par rapport au modèle PBTK de référence et les – représentent une détérioration de la qualité des prédictions par rapport au modèle PBTK de référence en se basant sur la somme des RMSE.

	Hypothèse 1	Hypothèse 2	Hypothèse 3	Hypothèse 4	Hypothèse 5
	Débit cardiaque	Coefficient de partage tissu:plasma	Cinétique d'absorption/d'élimination	Tous les processus	Tous les processus + fractions sanguines
7°C	-	++	+	++	++
11°C	-	+++	-	+++	+++
15°C	-	---	---	---	---
Total	-	++	-	+++	+++

+/- : amélioration/détérioration < 5% par rapport au modèle de référence

++/-- : amélioration/détérioration entre 5% et 10% par rapport au modèle de référence

+++/-- : amélioration/détérioration > 10% par rapport au modèle de référence

Les valeurs *a posteriori* des paramètres $TA_{cinétique}$ et TA_{pc} sont inférieures à la valeur *a priori*, proposée par Grech *et al.* (2017). D'après la loi d'Arrhenius, ce résultat signifie que le modèle minimise l'effet de la température sur les cinétiques d'absorption et d'élimination ainsi que sur les coefficients de partage, pour ajuster les prédictions aux données expérimentales. Ceci suggère que l'effet de la température a moins de poids sur ces processus que sur le débit cardiaque, pour lequel TA_{qc} est fixé à 6930 K. Cette valeur n'a pas été optimisée dans notre travail, car Grech *et al.* (2019) l'ont déjà mise à jour pour que les prédictions du débit cardiaque de la truite arc-en-ciel s'ajustent au mieux avec les données de Barron *et al.* (1987). La modification des coefficients de partage par la température améliore pourtant de manière notable les prédictions par rapport au modèle de référence, tandis que les modifications par la température des cinétiques et du débit cardiaque ne suffisent pas à expliquer les changements de TK du PFOS (Tableau 2). En effet, le RMSE total de l'hypothèse 2 est inférieur au RMSE total du modèle référence, ce qui n'est pas le cas pour les hypothèses 1 et 3 (Figure 5 et Annexe 4 du chapitre 6). Par conséquent, nos résultats suggèrent que les fonctions modulées avec la température qui tiennent compte de la chimie du PFOS ont plus d'importance dans les variations de TK du PFOS, que la physiologie du poisson. Une analyse de sensibilité sur le modèle basé sur l'hypothèse 5 permettrait d'identifier les paramètres ayant le plus d'impact sur les résultats de celui-ci et pourrait ainsi aider à une interprétation plus fine de l'influence de la température.

Les valeurs *a posteriori* des paramètres relatifs aux fractions sanguines des organes (x , y et z), optimisées par inférence bayésienne, respectent la tendance des flux observés par Barron *et al.* (1987) dans le foie et dans le muscle, tandis que les prédictions pour le rein et les viscères s'en éloignent. Ces résultats peuvent expliquer la sous-estimation des prédictions des concentrations en PFOS dans le rein

à 7°C durant la phase d'accumulation et dans les viscères à cette même température. La prédiction de la variation des flux sanguins vers ces organes n'est néanmoins pas aberrante, ce qui suppose que notre modèle se rapproche tout de même des mécanismes physiologiques réels. En effet, les données de Barron *et al.* (1987) laissent penser que la perfusion sanguine du rein est élevée à basse température, qu'elle diminue à une température médiane et qu'elle augmente de nouveau à des températures élevées. Cependant, l'incertitude autour de leurs données est relativement élevée, mais ces dernières sont actuellement les seules référencées dans la littérature. A l'inverse, l'étude de Paterson *et al.* (2007) explique que l'élimination des substances ralentie en hiver pourrait provenir, du moins en partie, d'une baisse du métabolisme du poisson. Dans ce cas, l'ajustement du modèle monotone d'Arrhenius pour le rein confirme l'hypothèse de Paterson *et al.* (2007) et va à l'encontre des données de Barron *et al.* (1987). Comme le montrent Lefébure *et al.* (2011) et Hovel *et al.* (2015) dans le cas de l'épinoche à trois épines (*Gasterosteus aculeatus*), la relation d'Arrhenius explique correctement l'effet de la température sur certains processus physiologiques seulement dans une certaine plage de températures. Dans leur modèle de vie entière développé pour *G. aculeatus* et basé sur la théorie DEB (*Dynamic Energy Budget*), Leloutre *et al.* (2016) proposent donc une fonction alternative pour la correction de ces processus par la température. Il serait intéressant d'intégrer l'équation utilisée par Leloutre *et al.* (2016) dans notre étude.

D'une manière générale, les prédictions des concentrations en PFOS issues du meilleur modèle PBTK (hypothèse 5) s'ajustent bien aux données expérimentales, excepté dans le cas des branchies, pour lesquelles les simulations ne décrivent pas bien les données de Goeritz *et al.* (2013). Ceci est probablement dû à la valeur du flux sanguin vers les branchies, extraite de l'étude de Barron *et al.* (1987). Nous avons sélectionné la valeur issue de leur expérience réalisée à 6°C, soit la valeur la plus élevée des trois expériences conduites pour leur étude (6°C, 12°C et 18°C). Les auteurs mentionnent que leurs valeurs de flux sanguin vers les branchies sont sous-estimées et qu'elles devraient être interprétées avec précaution, ce qui pourrait donc expliquer la mauvaise prédiction de notre modèle dans cet organe. La précision des prédictions dans les autres organes varie en fonction de l'expérience simulée, les concentrations en PFOS pouvant être sous-estimées ou au contraire surestimées. Les prédictions des concentrations en PFOS dans le muscle, par exemple, ont été largement améliorées pour l'expérience à 7°C lors de l'ajout de l'effet de la température sur les coefficients de partage entre cet organe et le plasma. En effet, la dynamique du PFOS dans le muscle est inversée en comparaison avec les autres organes : plus la température de l'eau augmente et plus l'affinité du PFOS entre le muscle et le sang diminue. Pour le moment, notre modèle décrit ce phénomène par une approche empirique car aucune justification physiologique n'a été trouvée. Cette correction contrebalance ainsi l'effet de la température sur la perfusion du muscle qui s'accélère à 19°C, supposé donc favoriser l'accumulation

des substances dans cet organe à des températures élevées. Toutes fois, malgré l'amélioration apportée par les coefficients de partage, les concentrations en PFOS demeurent sous-estimées à 7°C.

Par ailleurs, les prédictions des concentrations en PFOS dans le cerveau sont légèrement sous-estimées par rapport aux moyennes géométriques mesurées à 7°C et 11°C durant la phase de dépuration. Ceci suggère que l'élimination est trop rapide et qu'un mécanisme d'affinité avec des protéines présentes dans le cerveau devrait être pris en compte. Le cerveau possède une importante concentration en phospholipides (Ng & Hungerbühler 2014) et certains travaux suggèrent une affinité avec les PFAS dans cet organe (Lehmler *et al.* 2006 ; Xie *et al.* 2010). Une récente étude (Dassuncao *et al.* 2019) s'est intéressée au rôle des phospholipides dans l'accumulation des PFAS dans plusieurs tissus d'un mammifère marin, le globicéphale commun (*Globicephala melas*). Leurs résultats démontrent l'importance de l'association des phospholipides dans le cerveau de cette espèce pour les PFAS à longue chaîne (nombre de carbones fluorés > 10), mais les affinités du PFOS pour les phospholipides ne sont pas négligeables. Les résultats du modèle de Ng et Hungerbühler (2013) suggèrent des similitudes des liaisons protéines-PFAS entre le mammifère et le poisson. De la même manière, on pourrait émettre l'hypothèse que la liaison phospholipides-PFAS existe dans le cerveau des poissons, pour lequel les données d'accumulation des PFAS dans cet organe sont encore rares.

D'autre part, il a été démontré qu'une diminution de la température favorise la rétention des composés organiques dans différents organes du poisson (Collier *et al.* 1978 ; Paterson *et al.* 2007). Ceci suggère que les taux d'élimination varient directement avec la température, en accord avec les résultats de cinétique du PFOS obtenus par le modèle (Figure 9). Plusieurs études confirment cette hypothèse. Certaines rapportent l'effet direct de la température sur le flux urinaire chez les poissons téléostéens. Par exemple, Haywood et Clapp (1942) ont montré que le flux urinaire chez *Catostomus commersonii* était beaucoup plus lent en hiver qu'au printemps. Il en est de même pour *Cyprinus carassius* (Pora et Precup, 1960), et *Carassius auratus L* (Mackay, 1974). Malgré ces résultats, le fait que l'urine soit négligeable dans le cas du PFOS n'a pas apporté d'explication pertinente aux changements de TK. D'autres études ont mis en évidence une augmentation de l'excrétion biliaire lors d'une élévation de la température chez la truite arc-en-ciel (Curtis, 1983 ; Curtis *et al.* 1986 ; Kemp et Curtis, 1987), supposé être en lien avec la modification du débit sanguin relatif au foie, facteur limitant de l'excrétion biliaire (Kleinow *et al.* 2008). Un changement de température peut également influencer la vitesse de digestion du poisson. En effet, il a été montré qu'avec l'augmentation de la température d'acclimatation des poissons, le temps de transit gastro-intestinal d'une substance diminuait et l'élimination fécale était plus rapide (Hofer *et al.* 1982 ; Rajasilta, 1980 ; Shrable *et al.* 1969 ; Fauconneau *et al.* 1983). Ce résultat est

probablement en lien avec l'augmentation de l'activité des enzymes de détoxification, accélérant la production d'urine et de fèces (Jimenez *et al.* 1987).

L'accélération des clairances fécale et biliaire avec l'augmentation de la température prédite par notre modèle est en accord avec l'ensemble des recherches effectuées chez le poisson (Curtis, 1983 ; Curtis *et al.* 1986 ; Kemp et Curtis, 1987 ; Hofer *et al.* 1982 ; Rajasilta, 1980 ; Shrable *et al.* 1969 ; Fauconneau *et al.* 1983). Cependant, les concentrations en PFOS prédites dans les fèces à 7°C sont sous-estimées. L'intégration de l'absorption et de l'élimination par les branchies pourrait améliorer légèrement les prédictions du modèle, comme pour le modèle dans lequel la température n'est pas prise en compte (*cf* chapitre 3). En effet, chez le poisson, il est connu que la dynamique d'absorption de l'oxygène au niveau des branchies est impactée par ce facteur abiotique. Ceci s'explique par la diminution de la concentration en oxygène dans l'eau avec l'augmentation de la température, forçant le poisson à accélérer sa vitesse de ventilation (Kleinow *et al.* 2008 ; Fry 1971 ; Brett et Groves, 1979). De ce fait, le flux d'eau augmente et l'exposition au contaminant peut être favorisée en cas d'élévation de la température (Jimenez *et al.* 1987). Par ailleurs, la température peut également altérer la structure moléculaire de l'épithélium branchial, modifiant ainsi sa perméabilité aux composés (Crockett et Hazel, 1995). Des modèles PBTK récents ont décrit l'effet de la température sur la respiration du poisson (Pery *et al.* 2014 ; Brinkmann *et al.* 2015 ; Brinkmann *et al.* 2016 ; Grech *et al.* 2019). Les résultats du modèle PBTK pour le PFOS, décrit précédemment dans le chapitre 3, montrent l'importance de la voie branchiale comme voie d'entrée et de sortie de cette substance. Ainsi, prendre en compte l'exposition par la voie branchiale et adapter la vitesse de ventilation de la truite permettrait peut-être une meilleure description des variations de la TK du PFOS avec la température. Une seconde piste d'amélioration serait de décrire les affinités aux protéines spécifiques des organes pour lesquels les prédictions sont à améliorer. En effet, les résultats de ce chapitre indiquent que la distribution du PFOS diffère dans chaque organe, quand l'individu est soumis à un changement de température. Les affinités protéines-substances sont sensibles à la température puisque le calcul de la constante d'association à l'équilibre est directement dépendant de ce paramètre (Ng et Hungerbühler, 2015). Finalement, même si les prédictions sont améliorées dans certains cas, les connaissances actuelles de la toxicocinétique du PFOS ne sont pas suffisantes pour expliquer l'intégralité des effets de la température.

Résumé du chapitre 6

« Effet de la température sur la TK du PFOS chez la truite arc-en-ciel : exploration via un modèle PBTK »

Les variations de température dans l'environnement, dues notamment aux saisons, influencent certains paramètres physiologiques chez le poisson (Barron *et al.* 1987 ; Kleinow *et al.* 2008), impactant la TK des substances organiques. Les résultats expérimentaux discutés dans le chapitre 5 ont mis en évidence des effets de la température sur la distribution et l'élimination du PFOS et du PFHxS chez la truite arc-en-ciel. Cette approche expérimentale ne permet cependant pas de définir les mécanismes responsables des changements de TK des PFAS. Ainsi, la température a été intégrée à divers processus physiologiques dans notre modèle PBTK précédemment développé pour le PFOS (*cf.* chapitre 3). La fonction d'Arrhenius a été utilisée pour modéliser l'influence de la température sur la croissance, le débit cardiaque, les flux sanguins relatifs aux organes, les coefficients de partage entre les tissus et le plasma, la constante de vitesse d'absorption et les clairances fécale et biliaire. Tout d'abord, l'influence de chacun des processus intégrant la température a été testée sur la TK du PFOS, un par un, puis simultanément.

Les trois expériences réalisées au cours de cette thèse à 7°C, 11°C et 19°C, ainsi que le jeu de données de l'étude de Goeritz *et al.* (2013), dont la température de l'eau était stabilisée à 15°C, ont été utilisés pour la calibration et l'évaluation des prédictions du modèle. Afin d'analyser les améliorations des prédictions du modèle, les RMSE, calculés pour chaque hypothèse et pour chaque température, ont été comparés. Le modèle basé sur l'hypothèse qui prend en compte l'ensemble des processus modulés par la température (simultanément) est considéré être le meilleur (RMSE le plus bas). De tous les processus, les coefficients de partage impactent davantage les changements de TK du PFOS.

D'une manière générale, les changements réalisés dans ce modèle améliorent les prédictions dans certains cas mais les connaissances actuelles de la TK du PFOS ne sont pas suffisantes pour expliquer l'intégralité des effets de la température. Deux pistes d'amélioration sont à envisager. La première est d'intégrer la température à l'absorption et à l'élimination branchiales. La deuxième est d'intégrer les interactions entre le PFOS et les protéines, seulement dans les organes pour lesquels les concentrations sont mal prédites et d'intégrer alors l'effet de la température sur ce processus d'association.

Discussion générale & perspectives

Discussion générale et perspectives

1 Objectifs de thèse

L'objectif général de cette thèse était de mieux comprendre la cinétique des PFAS chez le poisson, en utilisant un modèle PBTK. Deux principales problématiques ont été abordées dans ce manuscrit :

- (i) la description des toxicocinétiques du PFOS, du PFHxS et du PFNA chez la truite arc-en-ciel et leur comparaison, et
- (ii) l'étude des effets de la température de l'eau sur la TK de ces trois PFAS d'intérêt.

La première problématique a été traitée en testant certaines hypothèses mécanistiques supposées régir le devenir des PFAS chez le poisson, par le modèle PBTK, appliqué au PFOS (chapitre 3). Les concentrations en PFOS, PFHxS et PFNA mesurées dans les organes d'intérêt ont permis d'émettre des hypothèses sur les différences de TK entre les trois substances, vérifiées par la suite par le modèle PBTK (chapitre 4). La deuxième problématique a été traitée en deux étapes : en étudiant d'abord les effets de la température de l'eau sur la TK du PFOS et du PFHxS à l'aide des données expérimentales (chapitre 5), puis en intégrant dans le modèle PBTK l'effet de la température de l'eau sur diverses fonctions physiologiques, permettant d'étudier l'influence de la température sur la TK du PFOS, plus finement que par simple analyse des données expérimentales (chapitre 6).

2 Synthèse des principaux résultats expérimentaux

La truite arc-en-ciel est un bon modèle d'étude en écotoxicologie car cette espèce est assez résistante aux conditions environnementales, ce qui facilite son élevage et son maintien durant les expériences scientifiques. En conséquence, de nombreux paramètres physiologiques sont référencés et disponibles dans la littérature, utiles pour la mise en œuvre des modèles PBTK.

Les trois perfluoroalkyles étudiés dans cette thèse (PFOS, PFHxS et PFNA) ont été détectés et quantifiés dans toutes les matrices analysées. Comme reporté dans les nombreuses études menées sur les PFAS, le sang et le foie sont les deux tissus dans lesquels s'accumulent principalement les composés fluorés étudiés, et les concentrations dans le rein ne sont pas négligeables (Martin *et al.* 2003 ; Goeritz *et al.* 2013 ; Gaillard *et al.* 2017 ; Zhong *et al.* 2019). D'une manière générale, les concentrations en PFOS sont plus élevées dans les tissus que celles en PFHxS et en PFNA. Ce résultat pourrait être expliqué d'une part, par l'affinité du PFOS plus importante pour certaines protéines tissulaires auxquelles se lient les PFAS et d'autre part, par sa plus lente élimination en raison de sa structure chimique (Martin *et al.* 2003 ; Zhong *et al.* 2019).

Par ailleurs, du fait des variations de la température de l'eau, principalement dues aux saisons et susceptibles de s'amplifier avec le changement climatique, et du fait de la large répartition géographique des organismes poïkilothermes, les études portant sur les effets de la température sur les mécanismes physiologiques du poisson ont gagné de l'intérêt. Nos résultats expérimentaux ont montré que ce facteur impacte la distribution et l'élimination des PFAS chez la truite arc-en-ciel, indiquant qu'il est donc important d'en tenir compte dans les études de toxicité.

Finalement, les trois expériences d'exposition menées sur cette espèce au cours de cette thèse ont confirmé d'une part, l'importance de l'accumulation des PFAS d'intérêt par voie trophique, et ont montré d'autre part, l'influence de la température sur le devenir de ces derniers. Ces expérimentations ont donc permis (i) d'acquérir des jeux de données robustes et complets pour les étapes de calibration et d'évaluation de notre modèle PBTK, et de compléter les données nécessaires pour évaluer les modèles d'une manière générale, et (ii) de compléter les données de bioaccumulation et de cinétique des PFAS disponibles dans la littérature, relatives aux résultats d'une exposition par voie alimentaire, notamment celles pour le cerveau et les fèces, très peu analysés.

3 Discussion de la modélisation de la TK des PFAS

La modélisation est de plus en plus développée dans le domaine de l'écotoxicologie pour améliorer la compréhension du devenir des substances et plus largement dans un contexte d'évaluation des risques (Grech *et al.* 2017). Le développement de modèles PBTK, pouvant être utilisés dans un but prédictif ou descriptif², répond de façon pertinente à la problématique de cette thèse. En effet, ils permettent de décrire la bioaccumulation des composés chimiques dans les tissus d'intérêt, d'évaluer la quantité interne à partir d'une dose externe (et inversement dans certains cas), et de considérer l'influence des facteurs abiotiques. Un modèle PBTK permet donc de simuler des conditions d'exposition complexe, tandis que la réalisation d'une exposition *in vivo* pour un produit chimique ou pour des mélanges de produits chimiques, à une ou plusieurs concentrations, peut s'avérer coûteuse et chronophage.

Le travail de modélisation a tout d'abord débuté par une analyse des modèles PBTK existants dans la littérature et développés spécifiquement pour les PFAS chez le poisson, présentés dans le Tableau 1. Ce tableau comporte les détails relatifs à chacun d'entre eux, tels que l'espèce de poisson sélectionnée, le choix des substances fluorées, les compartiments représentés, les processus ADME modélisés... Cette synthèse permet de comparer les différentes approches de modélisation entre les modèles existants et

² Descriptif : dans le cas où l'ajustement d'un modèle se fait sur des données expérimentales – Prédictif : dans le cas où il n'y a pas de données expérimentales.

celui développé dans cette thèse : prise en compte des interactions avec les protéines ou utilisation des coefficients de partage entre les tissus et le plasma, considération de certains processus physiologiques... Elle résume également les principaux résultats de chaque modèle, leurs faiblesses et leurs pistes d'amélioration.

Tableau 1. Synthèse des modèles PBTK développés spécifiquement pour les PFAS chez le poisson.

	Ng & Hungerbühler, 2013	Mittal <i>et al.</i> 2018	Khazaei & Ng, 2018	Modèle PBTK développé pendant cette thèse
Objectif	Améliorer les connaissances sur la TK des PFAS chez le poisson			
Type modèle TK (Grech <i>et al.</i> 2017)*	Semi-physiologique	Semi-physiologique	Semi-physiologique	Physiologique
Substances	PFOA, PFDA, PFUnDA, PFDoDA, PFHxS, PFOS	PFOA et 8:2 FTCA	PFOA	PFOS, PFHxS, PFNA
Espèce de poisson & stade de vie	Représentation d'un poisson de 8 g	Représentation d'un poisson de 47 g	Poisson zèbre adulte	Truite arc-en-ciel adulte
Compartiments	Tissu adipeux, muscle, foie, reins (tous divisés en fluides et tissus), sang et urine	Ng & Hungerbühler (2013) + un compartiment fèces	Ng & Hungerbühler (2013) + un compartiment bile	Sang, foie, muscle, viscères, cerveau, reins, peau, banchies, bile, fèces
Différenciation du genre	Non	Non	Oui	Non
Mode d'exposition	Eau	Injection intraveineuse	Eau	Eau et aliment
Voies d'absorption modélisées	Respiration	Alimentaire (100% PFAS absorbé)	Respiration	Respiration + alimentaire (évaluation du % de PFAS absorbé)
Voies d'élimination modélisées	Branchies Urine	Branchies Urine Fèces	Branchies Urine	Branchies Urine Fèces
Processus physiologiques pris en compte	Association des PFAS avec l'albumine dans le sang et dans les fluides des compartiments et avec les FABP dans le foie Réabsorption facilitée par les OAT	Association des PFAS avec l'albumine dans le sang et dans les fluides des compartiments et avec les FABP dans le foie Réabsorption facilitée par les OAT Biotransformation Taux de croissance incluse comme processus de pseudo-perte (dilution de croissance)	Association avec des protéines plasmatiques dans le sang et avec les FABP dans le foie Réabsorption entéro-hépatique	Fraction plasmatique Fraction libre des PFAS Réabsorption entéro-hépatique Croissance des individus Prise en compte de la température sur certains processus physiologiques
Paramètres physiologiques & paramètres spécifiques aux PFAS	Données poissons quand disponibles et mammifères cas échéant (constantes d'association)	Paramètres relatifs à l'élimination branchiale et rénale identiques à Armitage <i>et al.</i> (2016) + données d'exposition de Butt <i>et al.</i> (2010, 2010b)	Données poisson zèbre quand disponibles et autres espèces de poissons ou mammifère, cas échéant.	Données truites arc-en-ciel et un seul paramètre basé sur les données mammifères : fraction libre
Evaluation du modèle	Concentrations en PFAS mesurées dans les tissus de la truite arc-en-ciel de l'étude de Martin <i>et al.</i> (2003) et de la carpe commune de l'étude d'Inoue <i>et al.</i> (2012).	Concentrations en PFAS dans les tissus de la truite arc-en-ciel des études de Butt <i>et al.</i> (2010 et 2010b).	Concentrations mesurées dans les tissus de poissons zèbre des études de Ulhaq <i>et al.</i> (2015) et de Chen <i>et al.</i> (2016).	Concentrations en PFAS issues des expériences 7°C, 11°C, 19°C (cette thèse) et concentrations en PFAS mesurées dans les tissus de la truite arc-en-ciel de l'étude de Goeritz <i>et al.</i> (2013).

<p>Résultats principaux des prédictions des concentrations en PFAS</p>	<p>Concentrations prédites satisfaisantes <u>sauf PFHxS</u>. Sous-estimations : PFHxS dans le foie, PFOA & PFDoDA dans les reins, PFDoDA, PFDA, PFUnDA et PFHxS dans le sang et PFHxS dans le tissu adipeux. Surestimation : PFDA dans le muscle. Description insuffisante des processus de clairance et de réabsorption rénales conduisant à des prédictions peu satisfaisantes des concentrations dans le rein.</p>	<p>Concentrations en PFOA dans le foie des femelles (surestimées) >> foie des mâles (bien prédites). Concentrations en PFOA dans les autres organes des femelles << autres organes des mâles. Mauvaises prédictions des concentrations en PFOA dans le sang, dans le muscle et dans la bile.</p>	<p>Meilleures prédictions dans le foie, pour lequel les liaisons aux protéines sont décrites. Mauvaises prédictions dans le muscle, pour lequel les liaisons aux protéines ne sont pas considérées.</p>	<p>Prédictions satisfaisantes de la croissance et des concentrations en PFOS, PFHxS et PFNA. Description simultanée de plusieurs voies d'élimination et d'absorption. L'intégration de la température aux coefficients de partage tissu:plasma impacte fortement la TK du PFOS.</p>
<p>Résultats principaux des analyses de sensibilité</p>	<p>Modèle particulièrement sensible aux paramètres liés aux interactions PFAS-protéines : constantes d'association, disponibilité des sites de liaison et nombre de sites de liaison.</p>	<p>Modèle particulièrement sensible aux paramètres liés aux interactions PFAS-protéines et au volume sanguin.</p>	<p>D'une manière générale, pour mâle et femelle, modèle sensible à l'efficacité de la perméabilité membranaire, le volume du rein et les surfaces rénale et branchiale.</p>	<p>Aucune analyse réalisée.</p>
<p>Principales conclusions</p>	<p>Interactions protéines-PFAS similaires chez le poisson et le mammifère. Interactions PFAS-OAT chez le poisson ≠ de celles du mammifère.</p>	<p>Prédiction simultanée de la distribution du précurseur et du métabolite. Prédiction de la source d'exposition (directe ou biotransformation).</p>	<p>Cycle entéro-hépatique : manque de données chez le poisson zèbre. Identification des paramètres les plus influents sur la TK du PFOA chez le poisson zèbre femelle et male.</p>	<p>Bonne description générale de la TK du PFOS, du PFHxS et du PFNA. Différences de TK entre les trois PFAS expliquées notamment par leur affinité plasmatique, la clairance fécale et biliaire et les coefficients de partage tissu:plasma. Température & croissance = facteurs importants à considérer pour la description de la TK du PFOS.</p>
<p>Faiblesses-du modèle</p>	<p>Forte incertitude sur les données répertoriées des constantes d'association protéines-PFAS. Valeur unique de la constante d'affinité albumine-PFHxS, d'où la mauvaise prédiction du composé. Manque de données sur le rôle des OAT chez le poisson.</p>	<p>Forte incertitude et variabilité importante sur les paramètres physiologiques utilisés dans le modèle.</p>	<p>Manque de données sur les interactions protéines-PFAS spécifiques aux organes pour lesquels la prédiction est mauvaise. Manque de données spécifiques au poisson zèbre.</p>	<p>Manque de données sur le suivi des PFAS dans le GIT poisson → Description limitée du cycle entéro-hépatique. Vérification impossible des concentrations de PFAS prédites dans l'urine. L'influence de la température sur la TK du PFOS n'a pas pu être intégralement expliquée par le modèle.</p>

Pistes d'améliorations pour le modèle	Besoin d'études spécifiques sur les interactions entre PFAS et les protéines chez le poisson.	Besoin d'études spécifiques sur les interactions entre PFAS et les protéines chez le poisson. Tenir compte de la variation de la masse du foie par rapport à la masse totale.	Besoin d'études spécifiques sur les interactions entre PFAS et protéines chez le poisson, surtout pour la bile.	Besoin de données supplémentaires relatives aux concentrations en PFAS dans les urines, fèces et bile. Intégration de la température à d'autres processus physiologiques.
Originalité du modèle	1 ^{er} modèle PBTK de la bioaccumulation des PFAS chez le poisson. Modélisation des liaisons aux protéines. Evaluation des prédictions sur 2 espèces pour plusieurs PFSA et PFCA.	1 ^{er} modèle PBTK intégrant la biotransformation de PFAS chez le poisson. Prédictions simultanées de la distribution du précurseur et du métabolite dans les divers organes.	Modèle PBTK développé pour les PFAS chez le poisson-zèbre Modélisation du cycle entéro-hépatique.	Intégration de la température et de la croissance dans le modèle. Modélisation du cycle entéro-hépatique. Détermination de la contribution des différentes voies d'absorption et d'élimination, modélisées simultanément.

*D'après la revue scientifique publiée par Grech *et al.* (2017), la catégorie des modèles semi-physiologiques a été définie comme celle des modèles qui ne reposent pas entièrement sur des processus physiologiques : la distribution des substances n'est pas basée sur les flux sanguins mais paramétrée avec des taux de diffusion entre le sang et les tissus estimés à l'aide de données empiriques.

3.1. Stratégie de développement du modèle PBTK

Après étude des modèles de Ng & Hungerbühler (2013), de Mittal *et al.* (2018) et de Khazae & Ng (2018), nous avons fait le choix de réduire la complexité mécanistique de notre modèle PBTK. Contrairement à ces travaux, les compartiments représentés dans notre modèle sont décrits comme des compartiments entiers, sans distinction du tissu et du fluide, sauf pour les viscères et les branchies. Puisque notre recherche est axée sur la description de la TK des PFAS chez la truite arc-en-ciel, notre modèle a été paramétré, autant que possible, avec des données sur cette espèce (excepté la fraction libre de PFOS dans l'organisme). Ainsi, les liaisons aux protéines paramétrées avec des valeurs de mammifères décrites dans les modèles existants, n'ont pas été incluses dans notre modèle. De même, plutôt que d'expliquer le devenir des PFAS par des constantes de diffusion basées sur des valeurs de mammifères, nous avons préféré utiliser les coefficients de partage entre le tissu et le plasma, optimisés à partir de données disponibles chez la truite arc-en-ciel.

Finalement, notre modèle est moins complexe d'un point de vue mécanistique que ceux de Ng & Hungerbühler (2013), de Mittal *et al.* (2018) et de Khazae & Ng (2018), mais il se rapproche davantage de la physiologie du poisson. D'autre part, les paramètres ont été optimisés par inférence bayésienne, et donc ajustés spécifiquement pour la truite arc-en-ciel. Cette méthodologie a pour avantages de (i) résumer l'information disponible dans la littérature sur les paramètres du modèle, grâce aux distributions *a priori*, (ii) de donner des informations sur les corrélations entre paramètres à travers les

distributions *a posteriori* jointes, et (iii) de pallier au problème d'estimation simultanée de tous les paramètres. Aucun des autres modèles cités dans le Tableau 1 n'a utilisé une telle méthode d'optimisation des valeurs de paramètres. Puisque les concentrations en PFAS d'intérêt ont été prédites de manière satisfaisante dans l'ensemble des organes par le modèle dans lequel la température de l'eau ne varie pas, il ne semble donc pas nécessaire d'inclure les affinités aux protéines si l'objectif est de décrire simplement le devenir de certains PFAS (du moins celui des PFSA et des PFCA). Cependant, selon l'usage souhaité et l'objectif scientifique, l'utilisation d'un modèle plutôt qu'un autre sera alors à débattre.

Par ailleurs, les études expérimentales d'exposition aux PFAS chez le poisson ont souvent été réalisées en mélange, constitués de PFCA et de PFSA de longueurs de chaîne différentes (Martin *et al.* 2003 ; Goeritz *et al.* 2013 ; De Silva *et al.* 2009). Les auteurs n'ont cependant pas considéré les éventuelles interactions entre les PFAS, pouvant avoir des répercussions sur leur TK. Ainsi, dans notre étude, nous n'avons pas tenu compte d'éventuelles interactions entre le PFOS, le PFHxS et le PFNA, faute de données expérimentales adéquates. L'acquisition de ces données expérimentales aurait impliqué un design très complexe, qui n'aurait pas été gérable dans le contexte de cette thèse. Par conséquent, nous avons émis l'hypothèse que les profils toxicocinétiques des trois composés étaient indépendants les uns des autres. Cependant, très récemment, une étude s'est intéressée aux compétitions entre certains PFSA et PFCA, longues et courtes chaînes, vis-à-vis des sites de liaison des protéines d'intérêt chez le poisson zèbre (Wen *et al.* 2017). Les auteurs ont mis en évidence qu'en présence de PFAS à longues chaînes la bioaccumulation des PFAS à courtes chaînes étaient affectée. Ces résultats suggèrent donc qu'il y a bien compétition entre les PFAS vis-à-vis des protéines, ce qui aura des conséquences toxicocinétiques, à considérer pour l'évaluation des risques.

3.2. Performances du modèle PBTK développé pour les substances perfluoroalkyles

3.2.1. Intégration dans le modèle des processus clés de la TK des composés chimiques chez le poisson

La croissance des poissons est une variable importante à considérer dans les études de toxicité puisqu'elle modifie la concentration d'un composé chimique dans les organes du poisson ou dans le poisson entier (dilution par la croissance) et que le métabolisme varie en fonction du stade de vie des individus et donc de la croissance. Par ailleurs, les poissons téléostéens supportent des amplitudes plus ou moins larges de température selon l'espèce. Les fonctions physiologiques de ces organismes poïkilothermes s'adaptent donc en fonction des variations de la température de l'eau. La croissance ainsi que la température de l'eau sont donc deux facteurs clés pour la description de la TK des composés chimiques chez les poissons (Grech *et al.* 2017). Néanmoins, la considération de la croissance des

individus et l'intégration de la température de l'eau dans les modèles PBTK demeure rare. Dans leur modèle, Mittal et Ng (2018) intègrent la croissance mesurée pour les poissons de l'étude de Butt *et al.* (2010), par une autre approche que la nôtre (sans la relation de von Bertalanffy). Le taux de croissance (valeur fixée) a été intégrée dans le processus d'élimination lors de la phase d'exposition de l'expérience uniquement, car les poissons n'ont pas grandi de manière significative durant la phase de dépuration. En fait, leur objectif n'était pas de représenter la croissance des poissons au cours du temps mais de prendre en considération ce facteur dans leur processus d'élimination qu'ils considèrent être une combinaison de la biotransformation du composé, de l'élimination par l'urine, par les fèces et par les branchies, et de la dilution par la croissance. Par conséquent, l'une des plus-values notables de notre modèle est de considérer la croissance des truites arc-en-ciel.

Dans notre modèle PBTK, la variation de la taille et de la masse des poissons des différentes expériences est dépendante de la croissance, en lien avec la température, et de la quantité de nourriture. Comme les quantités de nourriture ont été ajustées en fonction de la température, nous ne pouvons pas intégrer l'influence de ces deux processus sur la croissance de manière indépendante. La température a également été prise en compte pour d'autres mécanismes physiologiques, connus pour dépendre de ce facteur abiotique : débit cardiaque, coefficients de partage entre le tissu et le plasma et cinétiques d'absorption et d'élimination (constante d'absorption et clairances). Un intérêt du modèle est de déterminer quels mécanismes sont responsables de la variation de la TK du PFOS. Nos premiers résultats montrent que les coefficients de partage entre les tissus et le plasma, modulés par la température, ont eu plus d'effet sur la qualité des prédictions du modèle, que les autres processus. Ceci suggère que lors de variations de température, la TK du PFOS est plus influencée par des changements liés aux propriétés chimiques de la substance que par des changements liés à la physiologie de la truite. Toutefois, cette hypothèse reste à confirmer par une analyse de sensibilité qui permettrait d'étudier l'effet principal et l'effet total (les interactions) des différents processus considérés dans le modèle sur la TK du PFOS.

3.2.2. Description des processus d'absorption, de distribution et d'élimination des substances perfluoroalkyles chez la truite arc-en-ciel.

Notre modèle représente simultanément deux voies d'absorption, par l'alimentation et par la respiration, tandis que les trois autres ne modélisent qu'une seule voie d'entrée du contaminant (Tableau 1). Cette modélisation permet de décrire de manière plus réaliste l'exposition des poissons aux substances dans l'environnement. Les informations obtenues sur la cinétique d'absorption grâce au modèle sont cohérentes avec celles disponibles dans la littérature : l'absorption du PFOS par la voie alimentaire est rapide et les branchies sont perméables à l'entrée du composé. L'efficacité d'absorption du PFOS, du PFHxS et du PFNA a été évaluée à la fin de la période d'exposition par notre modèle à

71.20%, 73.36% et 57.04% respectivement, indiquant que l'absorption des composés n'est pas totale, comme le supposent Mittal *et al.* (2018) en modélisant l'absorption du PFOA par voie alimentaire suite à une exposition par voie intraveineuse.

Par ailleurs, les auteurs des modèles PBTK décrits dans le Tableau 1 indiquent que les meilleures prédictions des concentrations en PFAS sont celles qui concernent le foie et le sang, pour lesquels les liaisons aux protéines étaient le plus détaillées (avec les données de mammifère). Les prédictions des concentrations en PFAS dans les autres organes sont souvent soit surestimées, soit sous-estimées (pouvant aller jusqu'à des facteurs 100 pour certaines prédictions). Ceci est dû à un manque de données *a priori* relatives aux constantes d'associations entre les protéines d'intérêt et les PFAS étudiés dans les organes d'intérêt chez le poisson. Cette méthodologie impose donc d'avoir des connaissances sur les interactions protéines-PFAS dans les autres organes du poisson, mais qui sont à ce jour, inexistantes dans la littérature. Les mauvaises prédictions des concentrations en PFHxS dans les organes par le modèle de Ng et Hungerbühler (2013) se justifient par le manque de ces données. En effet, le devenir du PFHxS est le moins bien décrit dans leur modèle, comparativement aux autres PFAS testés. Ceci est dû à l'unique valeur de la constante d'association à l'albumine répertoriée dans la littérature, induisant une sous-estimation importante des concentrations de cette molécule dans l'ensemble des organes. Dans notre cas, la fraction plasmatique, une fraction libre pour les trois molécules et des coefficients de partage entre les tissus et le plasma, optimisés par inférence bayésienne, ont suffi à décrire correctement la distribution du PFOS, du PFHxS et du PFNA dans les organes quand la température de l'eau ne varie pas.

Enfin, les voies d'excrétion chez le poisson représentent une des questions actuellement non résolues de la TK des PFAS. Les résultats de notre modèle ont montré que l'excrétion du PFOS se fait principalement par les fèces, qu'elle peut être importante par les branchies, tandis que l'urine est considérée comme une voie négligeable, et que le cycle entéro-hépatique joue un rôle mineur. Le modèle de Mittal *et al.* (2018) est le seul à considérer l'excrétion fécale du 8:2 FTCA (précurseur) et du PFOA (métabolite), avec de bonnes prédictions pour le PFOA, tandis que les concentrations du 8:2 FTCA sont moins satisfaisantes. Cependant, contrairement à l'étude réalisée ici, les auteurs ne comparent pas la contribution des différentes voies d'élimination entre elles, n'apportant pas de connaissance sur la contribution des fèces, de l'urine et des branchies, dans l'excrétion des PFAS.

3.2.3. Généricité de l'application du modèle PBTK aux substances perfluoroalkyles

Les résultats de prédictions du modèle PBTK sont satisfaisants pour les trois molécules étudiées : PFOS, PFHxS et PFNA. Ces molécules, appartenant à la famille des perfluoroalkyles, présentent des similitudes de TK mais aussi des différences. Ces différences peuvent être expliquées par les coefficients

de partage entre les tissus et le plasma, la fraction libre de substance dans l'organisme et les cinétiques d'absorption et d'élimination. En effet, les résultats de modélisation ont confirmé que le PFHxS et le PFNA présentent une affinité moindre pour les protéines plasmatiques par rapport au PFOS, et que ces deux substances sont plus facilement excrétées en raison de l'augmentation de leurs clairances biliaire et fécale comparées à celles du PFOS. Ceci est en accord avec les résultats de Martin *et al.* (2003) montrant une élimination plus rapide pour les homologues carboxylés des PFSA, et pour les perfluoroalkyles à courte chaîne comparé aux perfluoroalkyles à longue chaîne. Finalement, la bioaccumulation du PFHxS, du PFNA et du PFOS chez la truite arc-en-ciel peut donc s'expliquer par le même modèle PBTK. Celui-ci peut, par conséquent, être considéré comme générique aux substances perfluoroalkyles, si les paramètres physico-chimiques propres aux substances sont intégrés dans le modèle.

3.3. Faiblesses du modèle PBTK développé pour les substances perfluoroalkyles : disponibilité limitée des données

Pour des prédictions précises, les modèles PBTK ont besoin de paramètres spécifiques de la substance ainsi que de l'espèce d'intérêt. La recherche bibliographique des valeurs des paramètres physiologiques et des paramètres ADME permet d'identifier le manque de données expérimentales, limitant la paramétrisation d'un modèle PBTK (Grech *et al.* 2019). Les auteurs des modèles PBTK existants pour les PFAS chez le poisson ont tous souligné le manque de données expérimentales relatives à ces substances chez le poisson, ou de données physiologiques propres à l'espèce d'intérêt (Tableau 1). Dans notre cas, la principale difficulté pour l'estimation des paramètres par inférence bayésienne est la large incertitude sur les données physiologiques ou l'insuffisance des données sur la cinétique des PFAS, limitant la complexité du modèle proposé et conduisant à des distributions *a posteriori* incertaines et/ou peu mises à jour pour certains paramètres. En effet, l'étape de paramétrisation a nécessité de fixer les paramètres les plus certains (la plupart sont des paramètres physiologiques) pour permettre l'optimisation des valeurs de certains autres (la plupart sont des paramètres liés à la cinétique des PFAS), lorsque tous ne peuvent pas être estimés simultanément : corrélation entre paramètres conduisant à des solutions multiples de paramétrisation. Ceci a pu induire un biais puisque que certains des paramètres fixés pourraient avoir une influence sur l'estimation des autres. Une analyse devrait être menée pour déterminer la sensibilité des prédictions du modèle à chaque paramètre et conclure sur la pertinence de fixer certains paramètres plutôt que d'autres.

Par ailleurs, même si les données physiologiques relatives à la truite arc-en-ciel sont bien documentées dans la littérature, l'incertitude est importante sur certaines d'entre elles. Par exemple, les données extraites de l'étude de Barron *et al.* (1987) et utilisées dans notre modèle, sont les seules à

renseigner les perfusions sanguines des organes de la truite arc-en-ciel à différentes températures. Les auteurs ont utilisé l'approche la plus courante pour déterminer la perfusion tissulaire, qui consiste à mesurer la distribution relative du débit cardiaque des tissus spécifiques au moyen de microsphères synthétiques. Chez la truite arc-en-ciel, les microsphères sont injectées dans l'aorte dorsale et sont piégées dans les lits capillaires³ formés par les tissus, en proportion directe avec le flux sanguin total (Barron *et al.* 1987 ; Schultz *et al.* 1999). Cependant, les auteurs mentionnent des incertitudes élevées sur leurs résultats (surtout des perfusions des organes), en partie dues à la complexité des mesures des flux sanguins vers les organes, et du nombre réduit de poissons utilisés (3 ou 5 poissons selon les organes). Il serait donc pertinent d'acquérir de nouvelles données de débit sanguin et de perfusion des organes et évaluer l'amélioration potentielle des prédictions des modèles. Linton *et al.* (2004) présentent plusieurs méthodes pour mesurer le débit sanguin chez les poissons. Cette mesure peut par exemple se faire de manière directe : préparations de cœur perfusé, dilution des indicateurs, sondes débit-métriques.

Un manque de données spécifiques aux PFAS est également constaté dans la littérature. Malgré les études de plus en plus nombreuses sur la TK des PFAS chez le poisson, les valeurs des coefficients de partage entre les tissus et le sang (ou le plasma) ne sont pas disponibles. D'une manière générale, il est difficile de déterminer expérimentalement des coefficients de partage pour les vertébrés aquatiques, qui doivent être estimés dans la plupart des cas (Salmina *et al.* 2016). En écotoxicologie aquatique, une approche typique consiste à utiliser le coefficient de partage octanol:eau (K_{ow}) pour déterminer l'affinité d'une substance dans un des tissus du poisson (Mackay, 1982 ; Niimi et Oliver, 1983). Néanmoins, en raison de leurs propriétés à la fois hydrophobes et lipophobes, cette méthode n'est pas performante dans le cas des PFAS (Consoer *et al.* 2016 ; Salmina *et al.* 2016). Il est d'autant plus utile d'obtenir les valeurs de ces coefficients de partage de la molécule entre le tissu et le plasma puisque, d'après notre modèle, ces paramètres ont une influence déterminante sur la TK des PFAS étudiés, lorsque l'organisme est soumis à une variation de la température de l'eau. L'étude de Salmina *et al.* (2016) a contribué au développement d'outils de prédiction des concentrations internes des composés chimiques chez le poisson. Plusieurs approches ont été testées pour estimer des coefficients de partage d'une substance ayant un comportement complexe, autrement qu'avec le K_{ow} . Pour cela, les auteurs ont paramétré et évalué un modèle PBTK chez la truite arc-en-ciel. Les résultats sont prometteurs, et des approches alternatives telles que les leurs pourraient être utilisées dans le cas des PFAS. Par ailleurs, les paramètres relatifs à l'association entre les PFAS et les protéines dans les modèles PBTK existants dans la littérature (Tableau 1) ne proviennent pas des études sur le poisson. Bien que certaines, comme pour l'albumine,

³ Le lit capillaire est le maillage formé par les vaisseaux à l'intérieur de chaque tissu afin que la distance de diffusion des molécules entre le sang et la cellule soit la plus faible possible.

soient disponibles dans la littérature (Jones *et al.* 2003 ; Zhong *et al.* 2019), aucune donnée n'est encore publiée sur les interactions des PFAS avec les FABP, les phospholipides ou encore les OAT. Si l'on considère que l'ajout de ces liaisons aux protéines pourrait améliorer les prédictions dans le cas où la température est prise en compte dans le modèle PBTK, le manque de données spécifiques aux poissons constituerait néanmoins un obstacle important.

En outre, le manque de données sur la cinétique des PFAS telles que les vitesses d'absorption, les vitesses d'élimination, ainsi que de données de concentrations en PFAS dans l'urine, les fèces et la bile est une réelle limitation pour le développement des modèles PBTK. Par exemple, le rôle du cycle entéro-hépatique n'a pas pu être entièrement défini, ni dans l'étude de Khazaei & Ng (2018), ni dans la nôtre. La voie urinaire est considérée comme négligeable pour l'excrétion du PFOS, du PFHxS et du PFNA par notre modèle, mais il demeure une incertitude sur son rôle effectif, qui pourrait être revisité si des données sur les concentrations de ces composés dans les urines chez le poisson devenaient disponibles. Cependant, la mise en place d'expérimentations spécifiques à la mesure des concentrations de substances dans les urines est complexe. Consoer *et al.* (2014 et 2016) ont utilisé des canules (*cf* partie 2.8 du chapitre 1), soulevant des questions d'éthique. En raison de ce manque d'information, la clairance urinaire du PFOS, du PFHxS et du PFNA est identique dans notre modèle, puisqu'aucune optimisation des distributions *a priori* (paramétrée à partir du PFOS) n'a pu être réalisée. Ainsi, la comparaison de la contribution de la voie urinaire entre ces substances n'a pas pu être étudiée, tandis que Consoer *et al.* (2016) rapportent que celle-ci est une voie d'excrétion importante pour le PFOA, sinon pour l'ensemble des PFCA. Par ailleurs, la description de la réabsorption rénale est problématique dans la plupart des modèles actuels chez le poisson, car les données des interactions PFAS-OAT ne sont disponibles que chez le mammifère et le mécanisme semble différent chez le poisson (Ng et Hungerbühler, 2013 ; Mittal *et al.* 2018 ; Khazaei & Ng, 2018). D'après Consoer *et al.* (2014) la réabsorption rénale pourrait tout de même être un processus déterminant dans la TK du PFOA, molécule étudiée commune aux trois modèles.

4 Perspectives d'amélioration de la description de la TK des substances perfluoroalkyles

4.1 Considération de processus mécanistiques supplémentaires

Le modèle PBTK développé dans cette thèse intègre plusieurs processus physiologiques, pertinents pour la description du devenir des PFAS étudiés. Certains n'améliorent pas les prédictions (par exemple, le cycle entéro-hépatique pour lequel les données sont insuffisantes pour conclure de son rôle dans la TK du PFOS) tandis que d'autres sont importants à considérer pour une bonne description du devenir

des substances (par exemple, la croissance). Dans l'ensemble, nos prédictions sont satisfaisantes mais des pistes d'amélioration pourraient être testées et rajoutant à notre modèle une plus grande complexité, comme considérer d'autres processus physiologiques ou des mécanismes biochimiques supplémentaires.

Premièrement, il a été démontré que certaines substances perfluoroalkyles s'accumulaient dans les gonades des poissons, comme montré chez le carassin (*Carassius carassius*) (Shi *et al.* 2018) et chez la truite arc-en-ciel (Martin *et al.* 2003), ainsi que dans les œufs, comme montré chez l'esturgeon chinois (*Acipenser sinensis*) (Peng *et al.* 2010). Ceci suggère un transfert maternel pendant la formation du vitellus (Giesy et Kannan 2001) et donc une voie d'élimination pour ces molécules. Par conséquent, il pourrait être pertinent d'intégrer les gonades comme compartiment supplémentaire dans notre modèle, en tenant compte du niveau de maturité et du sexe des individus, et ajouter une voie d'élimination via les œufs, voire le sperme. Dans leur modèle, Khazae & Ng (2018) ont différencié le genre des poissons mais n'ont pas inclu les gonades et n'ont donc pas considéré l'élimination par la ponte ou par le sperme. Les auteurs ont seulement comparé les concentrations en PFOA dans le sang, le foie et le muscle des poissons zèbres femelles et mâles. Lors des prélèvements des tissus des poissons durant cette thèse, nous avons également échantillonné et congelé les gonades des individus contaminés. L'analyse de ces échantillons permettrait de calibrer et d'évaluer les prédictions du modèle PBTK pour cet organe.

Deuxièmement, pour mieux répondre à la problématique des variations de TK des PFAS avec la température, il pourrait être intéressant de tester si l'ajout des affinités aux protéines dans les organes améliore les prédictions, notamment dans les viscères, le rein, le cerveau et le muscle. Malheureusement, comme mentionné précédemment, les données expérimentales chez le poisson sont actuellement rares pour certaines protéines voire absentes pour d'autres. Pour pallier ce manque d'information, il a été envisagé au cours de cette thèse, d'utiliser une méthode de docking permettant d'obtenir les constantes de dissociation entre le PFOS, le PFHxS et le PFNA avec les L-FABP et l'albumine de la truite arc-en-ciel et de leurs homologues chez l'humain, aux trois températures testées (7°C, 11°C et 19°C). Brièvement, le docking est une technique *in silico* qui permet de représenter la structure moléculaire des protéines d'intérêt et ainsi d'étudier les fixations avec les substances sélectionnées. Les résultats préliminaires de cette étude ont montré (i) qu'il est possible d'utiliser une telle approche pour estimer les constantes de dissociation du PFOS, PFHxS et PFNA avec les protéines spécifiques de la truite arc-en-ciel, pour lesquelles aucune donnée expérimentale n'a pu être obtenue, et (ii) que les estimations de ces constantes de dissociation entre les PFAS étudiés et les protéines humaines sont du même ordre de grandeur que celles obtenues par des approches expérimentales. Ce travail, en

collaboration avec un chercheur de l'équipe ECOTOX d'Irstea Lyon-Villeurbanne, est en cours de réalisation et promet des résultats pertinents à prendre en compte ultérieurement dans le modèle.

Enfin, la distinction entre l'absorption orale et l'absorption par les branchies dans notre modèle PBTK est une avancée. Cependant, ceci ne permet pas de connaître la quantité de PFAS ingérée par l'eau, entrant dans le tractus gastro-intestinal. Par souci de réalisme physiologique, il serait intéressant d'étudier la quantité d'eau consommée par les poissons, non quantifiée dans les études TK et donc jamais considérée dans les modèles PBTK des poissons (Grech *et al.* 2017).

4.2 Extrapolations possibles pour le modèle PBTK

Le modèle PBTK mis au point au cours de cette thèse est de nature physiologique et prédit les changements de concentrations des PFAS étudiés dans différents compartiments de l'organisme, aussi bien pour la phase d'absorption que de dépuración. Dans une perspective plus éloignée, notre modèle PBTK semble donc prometteur pour une application plus large à d'autres espèces de poissons et/ou divers composés chimiques.

Notre modèle PBTK pourrait, en effet, être généralisé à un panel plus étendu de PFAS, notamment aux nouvelles alternatives fluorées des PFAS de l'ancienne génération. La synthèse des PFAS à longue chaîne diminue au profit des PFAS à chaîne plus courte d'une part, et des PFAS comportant un hétéroatome dans leur chaîne, d'autre part. Si la production de ces alternatives augmente, la diversité des structures chimiques de ces substances s'accroît également (Wang *et al.* 2013 ; Gomis *et al.* 2015). Extrapoler le modèle PBTK actuel à ces substances fluorées pourrait présenter de l'intérêt dans un contexte d'évaluation des risques. Les propriétés physico-chimiques propres aux PFAS (nombre de carbones fluorés et le groupement fonctionnel en bout de chaîne ou au cœur de la molécule) influençant la TK, on pourrait s'attendre à un profil différent pour ces alternatives. Si le potentiel de bioaccumulation des PFSA et les PFCA est lié à leurs interactions avec les L-FABP et l'albumine, cette similitude sera-t-elle valable pour ces nouvelles alternatives ? Les PFAS plus volumineux peuvent-ils occuper les mêmes poches hydrophobes des protéines que les substances perfluoroalkyles (D'Eon *et al.* 2010) ? Les fèces des poissons seront-elles la voie d'élimination majeure de ces substances ?

Toujours dans un contexte d'évaluation des risques, le modèle PBTK actuel pourrait aussi être extrapolé à d'autres espèces de poissons que la truite arc-en-ciel. Grech *et al.* (2019) ont mis en évidence la variabilité inter-espèce est importante dans la caractérisation de la TK des substances organiques. En effet, les processus physiologiques sont très variables au sein des poissons téléostéens. Par exemple, l'osmorégulation est différente entre les poissons téléostéens d'eau douce et les poissons téléostéens marins et pourrait avoir une influence sur les processus ADME. Dans le cas spécifique des

PFAS, Honda *et al.* (2018) ont mis en évidence que le mucus présent à la surface de la peau de *Takifugu rubripes*, une espèce marine, pourrait constituer une voie d'élimination majeure (voire unique) pour le PFOS. Afin d'étendre le modèle à d'autres espèces de poissons téléostéens, certains processus physiologiques différenciant les poissons téléostéens marins des poissons téléostéens d'eau douce devront alors être intégrés dans le modèle.

Conclusion générale

Conclusion générale

Le couplage de la modélisation avec l'expérimentation a été un réel atout pour ce travail de thèse. Cette stratégie a nécessité l'acquisition de données, ce qui a facilité la calibration et l'évaluation du modèle PBTK, pouvant ainsi répondre spécifiquement à la problématique posée. Inversement, les prédictions du modèle ont pu confirmer ou non les hypothèses émises à partir des études expérimentales. Cette approche a ainsi permis de répondre à l'objectif principal de cette thèse qui consistait à améliorer les connaissances relatives à la TK de certaines substances perfluoroalkyles chez le poisson. En outre, les données issues des expériences réalisées au cours de cette thèse participent à l'incrémentation des données encore peu nombreuses dans la littérature concernant la bioaccumulation des PFAS chez le poisson. En ce sens, cette thèse contribue donc à pallier au manque de données expérimentales des études de cinétiques, qui représente un réel frein pour la conception et l'évaluation des modèles.

Le modèle PBTK proposé a permis de représenter correctement la TK des substances d'intérêt et de décrire de manière satisfaisante les concentrations en PFOS, PFHxS et PFNA dans les organes analysés. L'intégration de la croissance et de la température dans le modèle est une avancée importante car peu de modèles PBTK intègrent ces deux facteurs, primordiaux pour la description de la TK des substances chez le poisson. Enfin, notre approche permet d'ajouter facilement une complexité supplémentaire, lorsque les données de la littérature le permettent, afin de mieux représenter les processus physiologiques ou biochimiques propres aux substances d'intérêt (intégration des interactions protéiques, de la température sur d'autres processus et des paramètres physico-chimiques spécifiques aux PFAS).

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- 3M, 2000. Phase-Out Plan for POSF-based products. U.S. EPA Docket OPPT-2002-0043; Specialty Materials Markets Group, 3M, St. Paul, MN.
- AGDD (Australian Government Department of Defence), 2018. PFAS investigation & management program. Available at: <http://www.defence.gov.au/Environment/PFAS/>, Accessed date: 6 May 2018.
- Ahrens L. 2011. Polyfluoroalkyl compounds in the aquatic environment: A review of their occurrence and fate. *J Environ Monit* 13: 20–31.
- Ahrens, L., & Bundschuh, M. 2014. Fate and effects of poly- and perfluoroalkyl substances in the aquatic environment: A review. *Environmental Toxicology and Chemistry* 33: 1921–1929.
- Andersen ME. 1995. Development of physiologically based pharmacokinetic and physiologically based pharmacodynamic models for applications in toxicology and risk assessment. *Toxicology Letters* 79: 35-44.
- Ando, S., Xue, X.-H., Tibbits, G.F., Haunerland, N.H. 1998. Cloning and sequencing of complementary DNA for fatty acid binding protein from rainbow trout heart. *Comp. Biochem. Phys. B* 119, 213–217.
- Andre, M., Ando, S., Ballagny, C., Durliat, M., Poupard, G., Briancon, C., Babin, P.J. 2000. Intestinal fatty acid binding protein gene expression reveals the cephalocaudal patterning during zebrafish gut morphogenesis. *Int J Dev Biol* 44, 249–252.
- ANSES. 2011. Campagne nationale d'occurrence les eaux destinées perfluorés dans des composés alkyls à la consommation humaine. <https://solidarites-sante.gouv.fr/IMG/pdf/rap0511-2.pdf>
- Appelkvist, E.L., Dallner, G., 1980. Possible involvement of fatty acid binding protein in peroxisomal α -oxidation of fatty acids. *Biochim. Biophys. Acta* 617, 156–160.
- Armitage, J. M., Arnot, J. A., & Wania, F. 2012. Potential Role of Phospholipids in Determining the Internal Tissue Distribution of Perfluoroalkyl Acids in Biota. *Environmental Science & Technology*, 46, 12285–12286.
- Armitage, J. M., Arnot, J. A., Wania, F., & Mackay, D. 2013. Environmental Chemistry development and evaluation of a mechanistic bioconcentration model for ionogenic organic chemicals in fish. *Environmental Chemistry*, 32, 115–128.
- Armitage, J. M., Erickson, R. J., Luckenbach, T., Ng, C. A., Prosser, R. S., Arnot, J. A., Schirmer, K., Nichols, J. W. 2016. Assessing the bioaccumulation potential of ionizable organic compounds: Current knowledge and research priorities. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 36, 882–897.
- Armitage, J. M., Erickson, R. J., Luckenbach, T., Ng, C. A., S, P. R., Arnot, J. A., ... Nichols, J. W. 2017. Assessing the bioaccumulation potential of ionizable organic compounds: current knowledge and research priorities. *Environmental Toxicology & Chemistry*, 36, 882–897.
- Aslamkhan, A.G., Thompson, D.M., Perry, J.L., Bleasby, K., Wolff, N.A., Barros, S., Miller, D.S., Pritchard, J.B. 2006. The flounder organic anion transporter fOat has sequence, function, and substrate specificity similarity to both mammalian Oat1 and Oat3. *Am. J. Physiol.: Regul., Integr. Comp. Physiol.*, 291, 1773–1780.
- Ayanda, I. O., Yang, M., Yu, Z., & Zha, J. 2018. Cytotoxic and genotoxic effects of per fluorododecanoic acid (PFDoA) in Japanese medaka. *Knowl. Manag. Aquat. Ecosyst.* 419, 9.

Références bibliographiques

- Azevedo, P. A., Cho, C. Y., Leeson, S., & Bureau, D. P. 1998. Effects of feeding level and water temperature on growth, nutrient and energy utilization and waste outputs of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Living Resour*, 11, 227–238.
- Babut, M., Labadie, P., Simonnet-Laprade, C., Munoz, G., Roger, M.-C., Ferrari, B.J.D., Budzinski, H., Sivade, E., 2017. Per- and poly-fluoroalkyl compounds in freshwater fish from the Rhône River: influence of fish size, diet, prey contamination and biotransformation. *Sci. Tot. Environ.* 605-606, 38-47.
- Banks R.E., Smart B.E., Tatlow J.C., 1994. Organofluorine chemistry: Principles and commercial applications, in: Plemum (Ed.), New York
- Banks, W. A., 2009. Characteristics of compounds that cross the blood-brain barrier. *BMC Neurology*. 9.
- Barron, M. G., Tarr, B. D., Hayton, W. L., 1987. Temperature dependence of cardiac output and regional blood flow in rainbow trout, *Salmo gairdneri Richardson*. *Journal of Fish Biology*. 31, 735-744.
- Barton, H. A.; Chiu, W.; DeWoskin, R.; Foureman, G.; Krishnan, K.; Lipscomb, J.; Schlosser, P.; Sonawane, B.; Thompson, C. Approaches for the Application of Physiologically Based pharmacokinetic (PBPK) Models and Supporting Data in Risk Assessment [Report] / U.S. Environmental Protection Agency (EPA); National Center for Environmental Assessment. - Washington, DC; 2006.
- Benskin JP, De Silva AO, Martin JW. 2010. Isomer profiling of perfluorinated substances as a tool for source tracking: a review of early findings and future applications. *Rev Environ Contam Toxicol* 208:111–160.
- Benskin, J.P., Holt, A., Martin, J.W. 2009. Isomer-specific biotransformation rates of a perfluorooctane sulfonate (PFOS)-precursor by cytochrome P450 isozymes and human liver microsomes. *Environ Sci Technol* 43, 8566–8572.
- Benskin, J.P., Muir, D.C. G., Scott, B. F., Spencer, C., De Silva, A. O., Kylin, H., Martin, J.W., Morris, A., Lohmann, R., Tomy, G., Rosenberg, B., Taniyasu, S., Yamashita, N. 2012. Perfluoroalkyl acids in the Atlantic and Canadian Arctic Oceans. *Environ Sci Technol* 46, 5815–5823.
- Bernillon, P., and F. Y. Bois, 2000. Statistical issues in toxicokinetic modeling: A Bayesian perspective. *Environmental Health Perspectives*. 108,883-893.
- Berthelot C, Brunet F, Chalopin D, Juanchich A, Bernard M, Noël B, Bento P, Dasilva C, Labadie K, Alberti A, Aury J-M, Louis A, Dehais P, Bardou P, Montfort J, Klopp C, Cabau C, Gaspin C, Thorgaard GH, Boussaha M, Quillet E, Guyomard R, Galiana D, Bobe J, Volff J-N, Genêt C, Wincker P, Jaillon O, Roest Crollius H, Guiguen Y. 2014. The rainbow trout genome provides novel insights into evolution after whole-genome duplication in vertebrates. *Nature Communications*, 22 avril.
- Betts, K.S. 2007. Perfluoroalkyl acids: What is the evidence telling us? *Environmental Health Perspectives*, 11, 250–256. doi.org/10.1289/ehp.115-a250
- Bischel, H.N., Macmanus-Spencer, L.A., Zhang, C., Luthy, R.G., 2011. Strong associations of short-chain perfluoroalkyl acids with serum albumin and investigation of binding mechanisms. *Environ. Toxicol. Chem.* 30, 2423–2430. doi:10.1002/etc.647
- Bischoff, K.B., Dedrick, R.L., Zaharko, D.S., 1970. Preliminary model for methotrexate pharmacokinetics. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 59, 149-154.
- Boaru, D.A., Dragoş, N., Schirmer, K. 2006. Microcystin-LR induced cellular effects in mammalian and fish primary hepatocyte cultures and cell lines: A comparative study. *Toxicology*, 218, 134–148.
- Bois, F.Y. 2009. GNU MCSim. *Journal Bioinformatics*, 25, 1453–1454.

- Borga, K., Fisk, A.A., Hoekstra, P.F., Muir, D.C.G., 2004. Biological and chemical factors of importance in the bioaccumulation and trophic transfer of persistent organochlorine contaminants in Arctic marine food webs. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 2367–2385.
- Borga, K., Saloranta, T.M., Ruus, A. 2010. Simulating climate change induced alterations in bioaccumulation of organic contaminants in an Arctic marine food web. *Environ. Toxicol. Chem.* 29, 1349–1357.
- Branka, L. 2010. Physiologically-Based Pharmacokinetic Models and Their Application in Ecotoxicology.
- Brett JR and Grove TDD, 1979. Physiological energetic. In: Hoar WS, Randall DJ, Brett JR (Eds.), *Fish Physiology. Bioenergetics and Growth*, vol. VIII. Academic Press, New York, 279 – 352.
- Brill, R.W., Cousins, K.L., Jones, D.R., Bushnell, P.G., & Steffensen, J.F. 1998. blood volume, plasma volume and circulation time in a high-energy-demand teleost, the yellowfin tuna (*Thunnus albacares*), 654, 647–654.
- Brinkmann, M., Eichbaum, K., Kammann, U., Hudjetz, S., Cofalla, C., Buchinger, S., Reifferscheid, G., Schüttrumpf, H., Preuss, T., Hollert, H., 2014. Physiologically-based toxicokinetic models help identifying the key factors affecting contaminant uptake during flood events. *Aquatic Toxicology*, 152, 38–46. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.03.021>
- Brinkmann, M., M. Freese, J.-D. Pohlmann, U. Kammann, T. G. Preuss, S. Buchinger, G. Reifferscheid, A. Beiermeister, R. Hanel, and H. Hollert, 2015. A physiologically based toxicokinetic (PBTK) model for moderately hydrophobic organic chemicals in the European eel (*Anguilla anguilla*). *Science of the Total Environment*. 536,279-287.
- Brochot, C., M.E. Willemin, and F. Zeman. 2014. Chapitre 13. La modélisation toxico-pharmacocinétique à fondement physiologique : son rôle en évaluation du risque et en pharmacologie. Pages 453 - 492 in F. Varenne, M. Silberstein, and S. Dutreuil, editors. *Modéliser & simuler - tome 2. Epistémologies et pratiques de la modélisation et de la simulation* Editions Matériologiques, Paris.
- Buck, R.C., Franklin, J., Berger, U., Conder, J.M., Cousins, I.T., de Voogt, P., Jensen, A.A., Kannan, K., Mabury, S.A., van Leeuwen, S.P., 2011. Perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances in the environment: terminology, classification, and origins. *Integr Environ Assess Manag* 7, 513-541.
- Buckman, A.H., Brown, S.B., Hoekstra, P.F., Solomon, K.R., Fisk, A.T., 2004. Toxicokinetics of Three Polychlorinated Biphenyl Technical Mixtures in Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*). *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 1725.
- Bungay, P.M. Dedrick R.L. and Guarino A.M., 1976. Pharmacokinetic modeling of the dogfish shark (*Squalus acanthias*): Distribution and urinary and biliary excretion of phenol red and its glucuronide, *J. Pharmacokinet. Biopharm.*, 4, 377–388.
- Buschnell, P.G., Conklin, D.J., Duff, D.W. and Olson, K.R. 1998. Tissue and whole-body extracellular, red blood cell and albumin spaces in the rainbow trout as a function of time: a reappraisal of the volume of the secondary circulation, *J. Exp. Biol.*, 201, 1381–1391.
- Butt, C.M., Muir, D.C.G., Mabury, S.A. 2014. Biotransformation pathways of fluorotelomer-based polyfluoroalkyl substances: A review. *Environ Toxicol Chem* 33, 243–267.
- Butt, C.M., Muir, D.C.G., Mabury, S.A., 2010. Elucidating the pathways of poly- and perfluorinated acid formation in rainbow trout. *Environ. Sci. Technol.* 44, 4973-4980.
- Carlson, D. P.; Schmiegel, W. Chapter: Fluoropolymers, Organic, in *Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, Germany, 2000.

Références bibliographiques

- Chang, S-C., Gorman, G.S., Gibson, S.J., Hart, J.A., Ehresman, D.J., Butenhoff, J.L., 2012. Comparative pharmacokinetics of perfluorooctanesulfonate (PFOS) in rats, mice and monkey. *Reprod. Toxicol.* 33, 428–440.
- Chen Y and Guo L., 2009. Fluorescence study on site-specific binding of perfluoroalkyl acids to human serum albumin. *Arch Toxicol.* 83, 255–261.
- Chen, J., Tanguay, R.L., Tal, T.L., Gai, Z., Ma, X., Bai, C., Tilton, S.C., Jin, D., Yang, D., Huang, C., Dong, Q., 2014. Early life perfluorooctanesulphonic acid (PFOS) exposure impairs zebrafish organogenesis. *Aquat. Toxicol.* 156, 124-132.
- Chen, R., Fan, F.-C., Kim, S., Jan, K.-M., Usami, S., & Chien, S. (1980). Tissue-blood temperature partition coefficient for xenon: and hematocrit dependence. *Journal of Applied Physiology*, 49, 178–183.
- Cheng, W., & Ng, C. A. 2017. A Permeability-Limited Physiologically Based Pharmacokinetic (PBPK) Model for Perfluorooctanoic acid (PFOA) in Male Rats. *Environmental Science & Technology*, 51(17), 9930–9939.
- Chiu, W.A., Barton, H.A., DeWoskin, R.S., Schlosser, P., Thompson, C.M., Sonawane, B., Lipscomb, J.C., and Krishnan, K. 2007. Evaluation of physiologically based pharmacokinetic models for use in risk assessment. *Journal of Applied Toxicology* 27, 218-237.
- Clark, E.R., and Harman, J.P. 1985. Production of metabolic and waste products by intensively farmed rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish Biol.* 27, 381–393.
- Clewell, R.A., and Clewell, H.J. 2008. Development and specification of physiologically based pharmacokinetic models for use in risk assessment. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 50, 129-143.
- Collier, T. K., Thomas, L. C., & Malins, D. C. 1978. Influence of environmental temperature on disposition of dietary naphthalene in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*): isolation and identification of individual metabolites. *Comp. Biochem. Physiol.* 61, 23–28.
- Consoer, D. M., Hoffman, A. D., Fitzsimmons, P. N., Kosian, P. A., & Nichols, J. W. 2014. Toxicokinetics of perfluorooctanoate (PFOA) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*, 156, 65–73.
- Consoer, D.M., Hoffman, A.D., Fitzsimmons, P.N., Kosian, P.A., Nichols, J.W., 2016. Toxicokinetics of Perfluorooctane Sulfonate in Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*). *Environ. Toxicol. Chem.* 35, 717–727.
- Cousins, I. T.; Kong, D.; Vestergren, R. 2011. Reconciling measurement and modelling studies of the sources and fate of perfluorinated carboxylates. *Environmental Chemistry*, 8, 339–354.
- Crockett, E., Hazel, J., 1995. Cholesterol levels explain inverse compensation of membrane order in brush border but not homeoviscous adaptation in basolateral membranes from the intestinal epithelia of rainbow trout. *Journal of Experimental Biology.* 198, 1105-13.
- Cui, L., Liao, C., Zhou, Q., Xia, T., Yun, Z., & Jiang, G., 2009. Excretion of PFOA and PFOS in Male Rats During a Subchronic Exposure. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology.* 58, 205–213. doi:10.1007/s00244-009-9336-5
- Curtis L. R., 1983. Glucuronidation and biliary excretion of phenolphthalein in temperature acclimated steelhead trout (*Salmo gairdneri*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology.* 76, 107-111.
- Curtis, L. R., Kemp, C. J., Svec, A. V., 1986. Biliary excretion of [¹⁴C]taurocholate by rainbow trout (*Salmo gairdneri*) is stimulated at warmer acclimation temperature. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology.* 84, 87-90.

- D'Eon, J. C.; Simpson, A.; Kumar, R.; Baer, A.; Mabury, S. Determining the molecular interactions of perfluorinated carboxylic acids with human sera and isolated human serum albumin using nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Environ. Toxicol. Chem.* 2010, 29, 1678–1688.
- Davidson, W.S., Birt, V.L., Birt, T.P. and Green, J.M. 1988. Palmitate-binding, serum albumin-like proteins in salmonids. *FEBS Lett.* 233, 299–302.
- De Smet, H., Blust, R., & Moens, L. 1998. *Fish Physiology and Biochemistry*, 19, 71–81.
- Di Pietro, S.M., Dell'Angelica, E.C., Veerkamp, J.H., Sterin-Speziale, N., Santomé, J.A. 1997. Amino acid sequence, binding properties and evolutionary relationships of the basic liver fatty-acid-binding protein from the catfish *Rhamdia sapo*. *Eur. J. Biochem.*, 249, 510–517.
- Du, G., Hu, J., Huang, H., Qin, Y., Han, X., Wu, D., ... Wang, X. 2013. Perfluorooctane sulfonate (PFOS) affects hormone receptor activity, steroidogenesis, and expression of endocrine-related genes in vitro and in vivo. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 32, 353–360.
- Du, G., Hu, J., Huang, H., Qin, Y., Han, X., Wu, D., Song, L., Xia, Y., Wang, X. 2012. Perfluorooctane sulfonate (PFOS) affects hormone receptor activity, steroidogenesis, and expression of endocrine-related genes in vitro and in vivo. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 32, 353–360.
- Du, Y., Shi, X., Liu, C., Yu, K., & Zhou, B. 2009. Chemosphere Chronic effects of water-borne PFOS exposure on growth, survival and hepatotoxicity in zebrafish: A partial life-cycle test. *Chemosphere*, 74(5), 723–729.
- Duis, K., Inglis, V., Beveridge, M.C.M., Hammer, C., 1995 Leaching of four different antibacterials from oil- and alginate-coated fish-feed pellets. *Aquacult Res.* 26, 549–556.
- Edginton, A.N. & Willmann S. 2008. Physiology-Based Simulations of a Pathological Condition Prediction of Pharmacokinetics in Patients with Liver Cirrhosi. *Clinical Pharmacokinetics*, 47, 743-752
- Elliott, J. W., 1969. The Oxygen Requirements of Chinook Salmon. *The Progressive Fish-Culturist*. 31, 67-73.
- Emmett, E.A., Zhang, H., Shofer, F.S., Freeman, D., Rodway, N.V., Desai, C. and Shaw, L.M. 2006. Community Exposure to Perfluorooctanoate: Relationships Between Serum Levels and Certain Health Parameters. *Journal of Occupational and Environmental Medicine* 48, 771-779.
- Erickson R., Nichols J., Cook P. et Ankley G., 2008. Bioavailability of Chemical Contaminants in Aquatic Systems. In: Hinton D. et Di Giulio R., editors, *The Toxicology of Fishes*, pp. 9-54.
- Erickson, R. J., McKim, J. M., 1990. A model for exchange of organic chemicals at fish gills: flow and diffusion limitations. *Aquatic Toxicology*. 18, 175-197.
- European Union. 2006. Directive 2006/122/EC of the European Parliament and of the Council of 12 December 2006 amending for the 30th time Council Directive 76/769/EEC on the approximation of the laws, regulations and administrative provisions of the Member States relating to restrictions on marketing and use of certain dangerous substances and preparations (perfluorooctane sulfonates). *Off J Eur Union* L372:32–34.
- Falk, S., Failing, K., Georgii, S., Brunn, H., Stahl, T., 2015. Tissue specific uptake and elimination of perfluoroalkyl acids (PFAAs) in adult rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after dietary exposure. *Chemosphere* 129, 150–156. doi:10.1016/j.chemosphere.2014.06.061
- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. ©FAO, 2019. <http://www.fao.org/fishery/affris/species-profiles/rainbow-trout/growth/en/>

Références bibliographiques

- Fauconneau B., Choubert G., Blanc D., Breque J. et Luquet P., 1983. Influence of environmental temperature on flow rate of foodstuffs through the gastrointestinal tract of rainbow trout. *Aquaculture*. 34, 27-39.
- Fisher, C., Siméon, S., Jamei, M., Gardner, I., & Bois, Y. (2018). VIVD: Virtual in vitro distribution model for the mechanistic prediction of intracellular concentrations of chemicals in in vitro toxicity assays. *Toxicology in Vitro*, 58, 42–50.
- Fricker, G., Wossner, R., Drewe, J., Fricker, R., Boyer, J.L. 1997. Enterohepatic circulation of scymnol sulfate in an elasmobranch, the little skate (*Raja erinacea*). *Am. J. Physiol.* 273, G1023-30.
- Fry F.E.J., 1971. The effects of environmental factors on the physiology of fishes. In *Fish Physiology* (Edited by Hoar W. S. and Randall D. J.). Academic Press. New York. 6, 1-98.
- Fulton. 1902. Rate of growth of seas fishes. *Sci. Invest. Fish. Div. Scot. Rept.*, 20: 1035–1039.
- Gaillard, J., Veyrand, B., Thomas, M., Dauchy, X., Boiteux, V., Marchand, P., Bizec, B. Le, Banas, D., Feidt, C., 2017. Tissue Uptake, Distribution, and Elimination of Perfluoroalkyl Substances in Juvenile Perch through Perfluorooctane Sulfonamidoethanol Based Phosphate Diester Dietary Exposure. *Environ Sci Technol.* 51, 7658–7666. doi:10.1021/acs.est.6b05598
- Gannon, S., Johnson, T., Nabb, D., Serex, T., Buck, R., Loveless, S., 2011. Absorption, distribution, metabolism, and excretion of [¹⁴C]-perfluorohexanoate ([¹⁴C]-PFHx) in rats and mice. *Toxicology*. 283, 55–62.
- Gellrich, V.; Stahl, T.; Knepper, T. P. 2012. Behavior of perfluorinated compounds in soils during leaching experiments. *Chemosphere*, 87, 1052–1056.
- Gelman, A. and Rubin, D. 1992. Inference from iterative simulation using multiple sequences. *Statistical science*, 7, 457–511.
- Gelman, A., Bois, F.Y., & Jiang, J. 1996. Physiological pharmacokinetic analysis using population modeling and informative prior distributions, *Journal of the American Statistical Association*, 91,1400-1412
- Giesy, J. P., Naile, J. E., Khim, J. S., Jones, P. D., & Newsted, J. L. 2010. Aquatic Toxicology of Perfluorinated Chemicals. <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1157-5>
- Giesy, J. P.; Kannan, K. Global distribution of perfluorooctane sulfonate in wildlife. 2001. *Environ. Sci. Technol.* 35: 1339–42.
- Gingerich, W.H., Pityer, R.A., Rach, J.J. 1990. Whole body and tissue blood volumes of two strains of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. Biochem. Physiol.* 97, 615–620.
- Girard P., 1998. Le poisson sentinelle des milieux aquatiques : pertinence et optimisation des indicateurs sanitaires. *Bull. Fr. Pêche Piscic.*, 350–351, 429–443.
- Goeritz, I., Falk, S., Stahl, T., Schäfers, C., Schlechtriem, C., 2013. Biomagnification and tissue distribution of perfluoroalkyl substances (PFASs) in market-size rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ. Toxicol. Chem.* 32, 2078–2088. doi:10.1002/etc.2279
- Goeritz, I., Atorf, C., Whalley, P., Seymour, P., Klein, M., & Schlechtriem, C. 2014. Investigation into feed preparation for regulatory fish metabolism studies. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94, 438–444.
- Gomis, M.I., Wang, Z., Scheringer, M., & Cousins, I.T. 2015. A modeling assessment of the physicochemical properties and environmental fate of emerging and novel per- and polyfluoroalkyl substances. *Science of the Total Environment*, 505, 981–991. doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.10.062

- Goss, K.-U., 2007. The pKa Values of PFOA and Other Highly Fluorinated Carboxylic Acids. *Environmental Science & Technology* 42, 456-458.
- Goussen, B., Péry, A. R. R., Bonzom, J., & Beaudouin, R. 2015. Allocation in Populations of Nematodes. *Environmental Science & Technology*, 49, 12500–12508.
- Grech, A. 2018. Développement et application de modèles toxicocinétiques génériques chez le poisson : étude des facteurs de variabilité.
- Grech, A., Brochot, C., Dorne, J.L., Quignot, N., Bois, F., Beaudouin, R. 2017. Toxicokinetic models and related tools in environmental risk assessment of chemicals. *Science of the Total Environment* 578: 1-15. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2016.10.146
- Grech, A., Tebby, C., Brochot, C., Bois, F., Bado-Nilles, A., Dorne, J.L., Quignot, N., Beaudouin, R. 2019. “Generic physiologically-based toxicokinetic modelling for fish: integration of environmental factors and species variability.” *Science of the Total Environment* 651: 516-531. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.09.163
- Hack, C.E. 2006. Bayesian analysis of physiologically based toxicokinetic and oxicodynamic models, *Toxicology*, 221, 241-248.
- Hägerdal, M., Harp, J., Nilsson, L., & Siesjö, B. K. 1975. The effect of induced hypothermia upon oxygen consumption in the rat brain. *Journal of Neurochemistry*, 24, 311–316.
- Han, X., Yang, C.H., Snajdr, S.I., Nabb, D.L., Mingoia, R.T. 2008. Uptake of perfluorooctanoate in freshly isolated hepatocytes from male and female rats. *Toxicol. Lett.* 181, 81-6.
- Haywood, C. & Clapp, M.J. 1942. A note on the freezing-points of the urines of two fresh- water fishes: the catfish (*Ameiurus nebulosus*) and the sucker (*Catostomus commersonff*). *Biol. Bull., Woods Hole*, 363-366.
- Hilton, J.W., Slinger, S.J. 1981. Nutrition and feeding of rainbow trout. *Can. Spec. Publ. Fish. Aquat. Sci.*, 55, p. 14.
- Hofer, R., Forstner, H., Rettenwander, R., 1982. Duration of gut passage and its dependence on temperature and food consumption in roach, *Rutilus rutilus* L: laboratory and field experiments. *Journal of Fish Biology*. 20, 289-299.
- Hoff, P.T., Van Dongen, W., Esmans, E.L., Blust, R., De Coen, W.M. 2003. Evaluation of the toxicological effects of perfluorooctane sulfonic acid in the common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquat. Toxicol.* 62, 349-359.
- Honda, M., Muta, A., Shimazaki, A., Akasaka, T., Yoshikuni, M., Shimasaki, Y., & Oshima, Y. 2017. High concentrations of perfluorooctane sulfonate in mucus of tiger puffer fish *Takifugu rubripes*: a laboratory exposure study. *Environmental Science and Pollution Research*, 25, 1551–1558.
- Honda, M., Muta, A., Shimazaki, A., Akasaka, T., Yoshikuni, M., Shimasaki, Y., & Oshima, Y. 2017. High concentrations of perfluorooctane sulfonate in mucus of tiger puffer fish *Takifugu rubripes*: a laboratory exposure study. *Environmental Science and Pollution Research*, 25, 1551–1558.
- Houde, M., De Silva, A.O., Muir, D.C.G., Letcher, R.J., 2011. Monitoring of perfluorinated compounds in aquatic biota: An updated review. *Environ. Sci. Technol* 45: 7962–7973.
- Houde, M., Martin, J.W., Letcher, R.J., Solomon, K.R., Muir, D.C., 2006. Biological monitoring of polyfluoroalkyl substances: A review. *Environ Sci Technol.* 40, 3463–3473.
- Hovel, R.A., Beauchamp, D.A., Hansen, A.G., & Sorel, M.H. 2015. Development of a bioenergetics model for the three spine stickleback. *Transactions of the American Fisheries Society*, 144, 1311–1321.

Références bibliographiques

- Hrádková, P., Poustka, J., Hloušková, V., Pulkrabová, J., Tomaniová, M., & Hajšlová, J. 2010. PetraHradkova, 28, 333–342.
- Huang, H., Huang, C., Wang, L., Ye, X., Bai, C., Simonich, M.T., Tanguay, R.L., Dong, Q., 2010. Toxicity, uptake kinetics and behavior assessment in zebrafish embryos following exposure to perfluorooctanesulphonic acid (PFOS). *Aquat. Toxicol.* 98, 139–147.
- Hurley, M.D., Sulbaek Andersen, M.P., Wallington, T.J., Ellis, D. A., Martin, J.W., & Mabury, S.A. 2004. Atmospheric Chemistry of Perfluorinated Carboxylic Acids: Reaction with OH Radicals and Atmospheric Lifetimes. *J. Phys. Chem.* 108, 615–620. <https://doi.org/10.1021/jp036343b>
- Inoue, Y.; Hashizume, N.; Yakata, N.; Murakami, H.; Suzuki, Y.; Kikushima, E.; Otsuka, M. Unique physicochemical properties of perfluorinated compounds and their bioconcentration in common carp *Cyprinus carpio* L. *Arch. Environ. Con. Tox.* 2012, 62, 672–680.
- IPCC, 2013. Climate change 2013: the physical science basis. In: Stocker, T. F., Qin, D., Plattner, G.-K., Tignor, M., Allen, S.K., Boschung, J., Nauels, A., Xia, Y., Bex, V., Midgley, P.M. (Eds.)
- Jalabert, B., Fostier, A. 2010. La truite arc-en-ciel – De la biologie à l'élevage. Editions Quae, 320 p., 2010, Synthèses, 978-2-7592-0875-3.
- James, M.O. 1987. Conjugation of organic pollutants in aquatic species. *Environ. Health Perspect.* 71, 97-103.
- James, M.O., & Kleinow, K.M. 2014. Seasonal influences on PCB retention and biotransformation in fish. *Environmental Science and Pollution Research*, 21, 6324–6333.
- Jeon, J., Kannan, K., Lim, H.K., Moon, H.B., Kim, S.D., 2010. Bioconcentration of perfluorinated compounds in blackrock fish, *Sebastes schlegeli*, at different salinity levels. *Environmental Toxicology and Chemistry* 29, 2529-2535.
- Ji, K., Kim, Y., Oh, S., Ahn, B., Jo, H., & Choi, K. 2008. Toxicity of perfluorooctane sulfonic acid and perfluorooctanoic acid on freshwater macroinvertebrates (*Daphnia magna* and *Moina macrocopa*) and fish (*Oryzias latipes*). *Environmental Toxicology & Chemistry*, 27, 2159–2168.
- Jimenez, B.D., Cirimo, C.P., McCarthy, J.F., 1987. Effects of feeding and temperature on uptake, elimination and metabolism of benzo(a)pyrene in the bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*). *Environmental Sciences*. 10, 41-57.
- Jones, H.M., & Rowland-Yeo, K. 2013. Basic Concepts in Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling in Drug Discovery and Development. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol.* 2, e63.
- Jones, P.; Hu, W.; De, C., W; Newsted, J.; Giesy, J. 2003. Binding of perfluorinated fatty acids to serum proteins. *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 2639–2649.
- Jordal, A.-E.O.; Hordvik, I.; Pelsers, M.; Bernlohr, D.A.; Torstensen, B.E. 2006. FABP3 and FABP10 in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)-General effects of dietary fatty acid composition and life cycle variations. *Comp. Biochem. Phys. B*, 145, 147–158.
- Kannan, K., Corsolini, S., Falandysz, J., Fillmann, G., Kumar, K. S., Loganathan, B. G., Mohd, M. A., Olivero, J., Van Wouwe, N., Yang, J.H., Aldoust, K.M. 2004. Perfluorooctanesulfonate and related fluorochemicals in human blood from several countries. *Environ. Sci. Technol.* 38: 4489–95.
- Kannan, K., Koistinen, J., Beckman, K., Evans, T., Gorzelany, J.F., Hansen, K.J., Jones, P.D., Helle, E., Nyman, M., Giesy, J.P. 2001. Accumulation of perfluorooctane sulfonate in marine mammals. *EnvironSci Technol* 35, 1593–1598.

- Kannan, K., Newsted, J., Halbrook, R. S., & Giesy, J. P. (2002). Perfluorooctanesulfonate and Related Fluorinated Hydrocarbons in Mink and River Otters from the United States. *Environmental Science & Technology*, 36, 2566–2571.
- Kapoor, B.G., Smit, H., Verighina, I.A. 1976. The Alimentary Canal and Digestion in Teleosts. *Advances in Marine Biology*. 13, 109-239.
- Karara, A.H., and Hayton, W.L. 1989. A pharmacokinetic analysis of the effect of temperature on the accumulation of di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) in sheepshead minnow. *Aquat. Toxicol.*, 15, 27-36.
- Kemp, C. J., Curtis, L. R., 1987. Thermally Modulated Biliary Excretion of [14C]Taurocholate in Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*) and the Na⁺,K⁺-ATPase. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 44, 846-851.
- Khazaee, M. and Ng, C.A., 2018. Evaluating parameter availability for physiologically based pharmacokinetic (PBPK) modeling of perfluorooctanoic acid (PFOA) in zebrafish. *Environmental Science: Processes & Impacts*. 20, 105-119.
- Kim, S.J., Shin, H., Lee, Y.B., & Cho, H.Y. 2017. Sex-specific risk assessment of PFHxS using a physiologically based pharmacokinetic model. *Archives of Toxicology*, 92(3), 1113–1131. doi:10.1007/s00204-017-2116-5
- Kim, S.-K. and Kannan, K. 2007. Perfluorinated Acids in Air, Rain, Snow, Surface Runoff, and Lakes: Relative Importance of Pathways to Contamination of Urban Lakes. *Environmental Science & Technology* 41, 8328-8334.
- Kissa, E., 2001. Fluorinated surfactants and repellents (2nd edition revised and expanded), Surfactant science series, Marcel Dekker ed, New York, p. 640.
- Kleinow, K. M., Nichols, J. W., Hayton, W. L., McKim, J. M., Barron, M. G., 2008. Toxicokinetics in fishes. In: Hinton D., DiGiulio R., editors, *The Toxicology of Fishes*.
- Kooijman, S. A., 2010. Notation of Dynamic Energy Budget theory for metabolic organisation. Cambridge University Press.
- Krafft, M.P., Riess, J.G., 2015. Per- and polyfluorinated substances (PFASs): Environmental challenges. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 20, 192–212. doi:10.1016/j.cocis.2015.07.004
- Krishnan K. and White P., 2013. Pharmacokinetics and Toxicokinetics. In: Haschek W. M., Rousseaux C. G. et Wallig M. A., editors, *Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology*, pp. 39-59.
- Krishnan K. et Peyret T., 2009. Physiologically Based Toxicokinetic (PBTK) Modeling in Ecotoxicology. In: Devillers J., editor, *Ecotoxicology Modeling*, pp. 145-175.
- Land, M., De Wit, C. A., Bignert, A., Cousins, I. T., Herzke, D., Johansson, J. H., & Martin, J. W. 2018. What is the effect of phasing out long-chain per- and polyfluoroalkyl substances on the concentrations of perfluoroalkyl acids and their precursors in the environment? A systematic review. *Environmental Evidence* (Vol. 7). BioMed Central.
- Lee, J.J., Schultz, I.R. 2010. Sex differences in the uptake and disposition of perfluorooctanoic acid in fathead minnows after oral dosing. *Environ Sci Technol* 44, 491–496.
- Lefébure, R., Larsson, S., & Byström, P. (2011). A temperature-dependent growth model for the three-spined stickleback *Gasterosteus aculeatus*. *Journal of Fish Biology*, 79, 1815–1827.
- Lehmler H-J, Xie W, Bothun GD, Bummer PM, Knutson BL. 2006. Mixing of perfluorooctanesulfonic acid (PFOS) potassium salt with dipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC). *Colloid Surface B* 51: 25–29.

Références bibliographiques

- Lehmler, H.J. 2005. Synthesis of environmentally relevant fluorinated surfactants - A review. *Chemosphere* 58, 1471-1496.
- Leloutre, C., Péry, A. R. R., Porcher, J. M., & Beaudouin, R. 2016. A bioenergetics model of the entire life cycle of the spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus*. *Ecology of Freshwater Fish*, 27, 116–127.
- Li, Y., Han, Z., Zheng, X., Ma, Z., Liu, H., Giesy, J. P., ... Yu, H. 2015. Comparison of waterborne and in ovo nanoinjection exposures to assess effects of PFOS on zebrafish embryos. *Environmental Science and Pollution Research*, 22, 2303–2310. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3527-y>.
- Lien, G. J., McKim, J. M., 1993. Predicting branchial and cutaneous uptake of 2,2',5,5'-tetrachlorobiphenyl in fathead minnows (*Pimephales promelas*) and Japanese medaka (*Oryzias latipes*): Rate limiting factors. *Aquatic Toxicology*. 27, 15-32.
- Lien, G.J., McKim, J.M. Hoffman, A.D. and Jenson, C.T. 2001. A physiologically based toxicokinetic model for lake trout (*Salvelinus namaycush*). *Aquatic Toxicology*. 51,335-350.
- Lindstrom, A. B., Strynar, M. J., & Libelo, E. L. 2011. Polyfluorinated Compounds: Past, Present, and Future. *Environmental Science & Technology* 45, 7954-7961.
- Liu, R., Denovan-Wright, E.M., Wright, J.M. 2003. Structure, linkage mapping and expression of the heart-type fatty acid-binding protein gene (*fabp3*) from zebrafish (*Danio rerio*). *Eur. J. Biochem.* 270, 3223–3234.
- Loccisano, A.E., Campbell, J.L., Butenhoff, J.L., Andersen, M.E., & Clewell, H.J., 2012. Comparison and evaluation of pharmacokinetics of PFOA and PFOS in the adult rat using a physiologically based pharmacokinetic model, 33, 452–467. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2011.04.006>
- Loccisano, A.E., Jr, J.L.C., Andersen, M.E., Iii, H.J.C., 2011. Evaluation and prediction of pharmacokinetics of PFOA and PFOS in the monkey and human using a PBPK model. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 59, 157–175. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2010.12.004>
- Londrville, R. L.; Sidell, B. D. 1996. Cold acclimation increases fatty acid-binding protein concentration in aerobic muscle of striped bass, *Morone saxatilis*. *J. Exp. Zool.* 275, 36–44.
- Luebker, D.J., Hansen, K.J., Bass, N.M., Butenhoff, J.L., Seacat, A.M., 2002. Interactions of fluorochemicals with rat liver fatty acid-binding protein. *Toxicology* 176, 175–185. doi:10.1016/S0300-483X(02)00081-1
- Lupton, S.J., Huwe, J.K., Smith, D.J., Dearfield, K.L., & Johnston, J.J., 2014. Distribution and Excretion of Perfluorooctane Sulfonate (PFOS) in Beef Cattle (*Bos taurus*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 1167–1173. doi:10.1021/jf404355b
- MacCrimmon, H.R. 1971. World distribution of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Journal of Fisheries and Research Board of Canada* 28: 663-704.
- Mackay, D., 1982. Correlation of bioconcentration factors. *Environ. Sci. Technol.*, 16: 274-278.
- Mackay, W. C. 1974. Effect of Temperature on Osmotic and Ionic Regulation in Goldfish, *Carassius auratus* L. *J. Comp. Physiol.*, 88, 1–19.
- Manera, M., Britti, D. 2006. Assessment of blood chemistry normal ranges in rainbow trout. *J. Fish Biol.*, 69, 1427–1434.
- Martin, J. W., Muir, D. C. G., Moody, C. A., Ellis, D. A., Kwan, W. C., Solomon, K. R., & Mabury, S. A. 2002. Collection of Airborne Fluorinated Organics and Analysis by Gas Chromatography / Chemical Ionization Mass Spectrometry. *Anal. Chem.*, 74, 584–590.

- Martin, J.W., Mabury, S.A., Solomon, K.R., & Muir, D.C.G., 2003b. Bioconcentration and tissue distribution of perfluorinated acids in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22, 196–204. doi.org/10.1002/etc.5620220126
- Martin, J.W., Mabury, S.A., Solomon, K.R., Muir, D.C.G., 2003. Dietary accumulation of perfluorinated acids in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Environmental Toxicology and Chemistry*. 22, 189-195
- Martin, J.W., Whittle, D.M., Muir, D.C.G., Mabury, S.A., 2004. Perfluoroalkyl contaminants in a food web from Lake Ontario. *Environ Sci Technol* 38, 5379–5385.
- McKim J. M. et Goeden H. M., 1982. A direct measure of the uptake efficiency of a xenobiotic chemical across the gills of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) under normoxic and hypoxic conditions. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*. 72, 65-74.
- McKim, J.M., J.W. Nichols, G.J. Lien, A.D. Hoffman, C.A. Gallinat, and G.N. Stokes, 1996. Dermal absorption of three waterborne chloroethanes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Fundamental and Applied Toxicology*. 31,218-228.
- McKim, J.M., Kolanczyk, R.C., Lien, G.J., Hoffman, A.D. 1999. Dynamics of renal excretion of phenol and major metabolites in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* 45, 265-277.
- Meier-Abt, F., Hammann-Hänni, A., Stieger, B., Ballatori, N., Boyer, J. 2007. The organic anion transport polypeptide 1d1 (Oatp1d1) mediates hepatocellular uptake of phalloidin and microcystin into skate liver. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 218, 274–279.
- Miller, D.S., 1987. Aquatic models for the study of renal transport function and pollutant toxicity. *Environ Health Perspect.* 71, 59-68.
- Mittal, V. K., Ng, C. A., 2018. Formation of PFAAs in fish through biotransformation: A PBPK approach. *Chemosphere*. 202, 218-227.
- Neely, W.B. 1979. Estimating rate constants for the uptake and clearance of chemicals by fish. *Environ. Sci. Technol.* 13, 1506-1510.
- Neely, W.B., D.R. Branson and G.E. Blau, 1974. Partition coefficient to measure bioconcentration potential of organic chemicals in fish. *Environ. Sci. Technol.* 8, 1113-1115.
- Ng, C. A., & Hungerbuehler, K. 2015. Exploring the Use of Molecular Docking to Identify Bioaccumulative Perfluorinated Alkyl Acids (PFAAs). *Environmental Science & Technology*, 49, 12306–12314.
- Ng, C.A., Hungerbühler, K., 2013. Bioconcentration of Perfluorinated Alkyl Acids: How Important Is Specific Binding? *Environ. Sci. Technol.* 47, 7214–7223.
- Nichols, J. W., Fitzsimmons, P. N., Whiteman, F. W., Dawson, T. D., Babeu, L., Juenemann, J., 2004. A physiologically based toxicokinetic model for dietary uptake of hydrophobic organic compounds by fish: I. Feeding studies with 2,2',5,5'-tetrachlorobiphenyl. *Toxicological Sciences*. 77, 206-18.
- Nichols, J. W., McKim, J. M., Lien, G. J., Hoffman, A. D., Bertelsen, S. L., Gallinat, C. A., 1993. Physiologically based toxicokinetic modeling of three waterborne chloroethanes in Channel catfish, *Ictalurus-punctatus*. *Aquatic Toxicology*. 27, 83-112.
- Nichols, J. W., McKim, J. M., Lien, G. J., Hoffman, A. D., Bertelsen, S. L., Elonen, C. M., 1996. A physiologically based toxicokinetic model for dermal absorption of organic chemicals by fish. *Fundamental and Applied Toxicology*. 31, 229-242.

Références bibliographiques

- Nichols, J.W., McKim, J.M., Andersen, M.E., Gargas, M.L., Clewell, H.J. et Erickson, R.J., 1990. A physiologically based toxicokinetic model for the uptake and disposition of waterborne organic chemicals in fish. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 106, 433-447.
- Niimi, A. J., Oliver, B. G., 1983. Biological Half-lives of Polychlorinated Biphenyl (PCB) Congeners in Whole Fish and Muscle of Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 40, 1388-1394.
- OECD, 2007. Report Of An OECD Workshop On Perfluorocarboxylic Acids (PFCAs) And Precursors, Stockholm, Sweden, 20-22 November 2006. ENV/JM/MONO(2007)11, 1-82.
- OECD. 2002. Hazard Assessment of Perflurooctane Sulphonate (PFOS) and its Salts. Organisation for Economic Co-operation and Development.
- OECD. 2012. Bioaccumulation in Fish: Aqueous and dietary exposure. (OECD guidelines for testing of chemicals, TG 305.) Organisation for Economic Co-operation and Development.
- Paterson, G., Drouillard, K.G., Haffner, G.D., 2007. PCB elimination by yellow perch (*Perca flavescens*) during an annual temperature cycle. *Environ. Sci. Technol.* 41, 824–829. doi :10.1021/es060266r
- Paul, A.G., Jones, K.C., Sweetman, A.J. 2009. A first global production, emission, and environmental inventory for perfluorooctane sulfonate. *Environ Sci Technol* 43, 386–392.
- Perrier, H., Perrier, C., Peres, G., Gras, J., 1977. The perchlorosoluble proteins of the serum of the rainbow trout (*Salmo gairdnerii Richardson*): Albumin like and hemoglobin binding fraction. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*. 57, 325-327.
- Pery, A. R. R., J. Devillers, C. Brochot, E. Mombelli, O. Palluel, B. Piccini, F. Brion, and R. Beaudouin, 2014. A Physiologically Based Toxicokinetic Model for the Zebrafish *Danio rerio*. *Environmental Science & Technology*. 48,781-790.
- Phillips, M.M., Dinglasan-Panlilio, M.J.A., Mabury, S.A., Solomon, K.R., Sibley, P.K. 2010. Chronic toxicity of fluorotelomer acids to *Daphnia magna* and *Chironomus dilutus*. *Environ Toxicol Chem* 29, 1123–1131.
- Pierce, M., Wang, Y., Denovan-Wright, E.M., Wright, J.M. 2000. Nucleotide sequence of a cDNA clone coding for an intestinal-type fatty acid binding protein and its tissue-specific expression in zebrafish (*Danio rerio*). *Biochim Biophys Acta* 1490, 175–183.
- Popovic, M., Zaja, R., Fent, K., Smital, T., 2014. Interaction of environmental contaminants with zebrafish organic anion transporting polypeptide, Oatp1d1 (Slco1d1). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 280, 149-158.
- Popovic, M., Zaja, R., Smital, T. 2010. Organic anion transporting polypeptides (OATP) in zebrafish (*Danio rerio*): Phylogenetic analysis and tissue distribution. *Comp. Biochem. Phys. A*, 155, 327–335.
- Pora, E.A. et Precup, O., 1960. Etude de l'excrétion des poissons d'eau douce. II. Influence de la température externe sur les processus d'excrétion chez les carpes et les carassins. *Vopr. Ikhtiol.*, 15, 138-147
- Prevedouros, K., Cousins, I.T., Buck, R.C., Korzeniowski, S.H. 2006. Sources, fate and transport of perfluorocarboxylates. *Environ Sci Technol* 40: 32–44
- Pritchard JB, Renfro JL. 1984. Interactions of xenobiotics with teleost renal function. in Weber LJ, ed, *Aquatic Toxicology*, volume 2. Raven Press, NY, NY, USA. pp 51-106
- Pritchard, J.B., Bend JR. 1984. Mechanism controlling the renal excretion of xenobiotics in fish: effects of chemical structure. *Drug Metab. Rev.* 15, 655-71.

- Rajasilta M., 1980. Food consumption of the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.). *Annales Zoologici Fennici*. 17, 123-126.
- Raleigh R. F., Hickman T., Solomon R. C. et Nelson P. C. Habitat Suitability Index Models: Rainbow trout. FWS/OBS, 1984.
- Ramsey, J.C., Andersen, M.E., 1984. A physiologically based description of the inhalation pharmacokinetics of styrene in rats and humans. *Toxicology & Applied Pharmacology* 73, 159-175.
- Ren, X.M., Qin, W.P., Cao, L.Y., Zhang, J., Yang, Y., Wan, B., Guo, L.H. 2016. Binding interactions of perfluoroalkyl substances with thyroid hormone transport proteins and potential toxicological implications. *Toxicology*. 366–367, 32–42.
- Renner, R. 2006. The long and the short of perfluorinated replacements. *Environmental Science & Technology* 40, 12-13.
- Salmina, E. S., Wondrousch, D., Kühne, R., Potemkin, V. A., & Schüürmann, G. 2016. Science of the Total Environment Variation in predicted internal concentrations in relation to PBPK model complexity for rainbow trout. *Science of the Total Environment*, 550, 586–597.
- Scheringer, M., Trier, X., Cousins, I.T., de Voogt, P., Fletcher, T., Wang, Z., Webster, T.F., 2014. Helsingør Statement on poly- and perfluorinated alkyl substances (PFASs). *Chemosphere*. 114, 337–339. doi:10.1016/j.chemosphere.2014.05.044
- Scott, W.B. & Crossman, E.J. 1974. *Poissons d'eau douce du Canada*. Office des recherches sur les pêcheries du Canada, Ottawa. Bulletin 184: 1026 p.
- Shi, G., Cui, Q., Pan, Y., Sheng, N., Sun, S., Guo, Y., & Dai, J. 2017. 6: 2 Chlorinated polyfluorinated ether sulfonate, a PFOS alternative, induces embryotoxicity and disrupts cardiac development in zebrafish embryos. *Aquatic Toxicology*, 185, 67–75.
- Shi, X., Du, Y., Lam, P.K.S., Wu, R.S.S., Zhou, B., 2008. Developmental toxicity and alteration of gene expression in zebrafish embryos exposed to PFOS. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 230, 23–32.
- Shi, Y., Vestergren, R., Nost, T.H., Zhou, Z., Cai, Y., 2018. Probing the Differential Tissue Distribution and Bioaccumulation Behavior of Per- and Polyfluoroalkyl Substances of Varying Chain-Lengths, Isomeric Structures and Functional Groups in Crucian Carp. *Environ. Sci. Technol.* 52, 4592–4600. doi:10.1021/acs.est.7b06128
- Shi, Y., Vestergren, R., Zhou, Z., Song, X., Xu, L., Liang, Y., & Cai, Y. 2015. Tissue Distribution and Whole Body Burden of the Chlorinated Poly fluoroalkyl Ether Sulfonic Acid F 53B in Crucian Carp (*Carassius carassius*): Evidence for a Highly Bioaccumulative Contaminant of Emerging Concern. *Environmental Science and Technology*, 49, 14156–14165.
- Shi, Y., Wang, J., Pan, Y., Cai, Y., 2012. Tissue distribution of perfluorinated compounds in farmed freshwater fish and human exposure by consumption. *Environ. Toxicol. Chem.* 31, 717–723.
- Shoeib, M., Harner, T., Vlahos, P. 2006. Perfluorinated chemicals in the Arctic atmosphere. *Environ Sci Technol* 40, 7577–7583.
- Shrable J. B., Tiemeier O. W. et Deyoe C. W., 1969. Effects of Temperature on Rate of Digestion by Channel Catfish. *The Progressive Fish-Culturist*. 31, 131-138.

Références bibliographiques

- Siegemund, G.; Schwertfeger, W.; Feiring, A.; Smart, B.; Behr, F.; Vogel, H.; McKusick, B. Chapter: Fluorine compounds, organic, in Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, Germany, 2000.
- Sijm, D.T.H.M., Seinen, W., Opperhuizen, A. 1992. Life-cycle biomagnification study in fish. *Environ. Sci. Technol.* 26, 2162-2174.
- Skutlarek, D., Exner, M. and Färber, H. 2006. Perfluorinated surfactants in surface and drinking waters. *Environmental Science and Pollution Research* 13, 299-307.
- Smart, B.E. 1994. Characteristics of C-F systems. In: Banks RE, Smart BE, Tatlow JC, editors. *Organofluorine chemistry: Principles and commercial applications*. New York (NY): Plenum. p 57–88.
- Smith, L. S., and Bell, G. R. 1975. *A Practical Guide to the Anatomy and Physiology of Pacific Salmon*. Fisheries and Marine Service Special Publication 27, Department of the Environment, Ottawa, Canada
- Smith, R.R. 1989. Nutritional energetics. In: *Fish Nutrition* (ed. J.E. Halver), Academic Press, San Diego, CA, pp. 2–29.
- Srikanth, K., Pereira, E., Duarte, a. C., & Ahmad, I. (2013). Glutathione and its dependent enzymes' modulatory responses to toxic metals and metalloids in fish-a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(4), 2133–2149.
- SSEHRI (Social Science Environmental Health Research Institute), 2018. Per- and polyfluoroalkyl substances – the social discovery of a class of emerging contaminants. Available at: <https://pfasproject.com/>, Accessed date: 6 May 2018.
- Stadnicka, J., K. Schirmer, and R. Ashauer, 2012. Predicting Concentrations of Organic Chemicals in Fish by Using Toxicokinetic Models. *Environmental Science & Technology*. 46,3273-3280.
- Statham, C.N., M.J. Melancon, Jr., and J.J. Lech. 1976. Bioconcentration of xenobiotics in trout bile: A proposed monitoring aid for some waterborne chemicals. *Science* 193:680.
- Steiner, K., Hagenbuch, B., Dietrich, D.R. 2014. Molecular cloning and functional characterization of a rainbow trout liver Oatp. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 280:534-42.
- Stevens, E.D. 1968. The effect of exercise on the distribution of blood to various organs in rainbow trout. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 25, 615–625.
- Steward J.M.; Driedzic, W.R. 1988. Fatty acid binding proteins in 190–203;1995. teleost fish. *Can. J. Zool.* 66, 2671–2675.
- Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants. Technical paper on the identification and assessment of alternatives to the use of perfluorooctane sulfonic acid in open applications. UNEP/POPS/POPRC.8/INF/17; 2012.
- Talbot, C., and Higgins, P. J., 1982. Observations on the gall bladder of juvenile Atlantic salmon *Salmo salar* L., in relation to feeding. *Journal of Fish Biology*. 21, 663-669.
- Taves, D. Evidence that there are two forms of fluoride in human serum. 1968. *Nature*, 217: 1050–1051.
- Taves, D. R., Grey, W.S., Brey, W.S. Organic fluoride in human-plasma - its distribution and partial identification. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1976, 37, 120–120.

- Teorell, T., 1937. Kinetics of distribution of substances administered to the body. I. The extravascular modes of administration. *Arch. Int. Pharmacodyn.* 57, 205-225.
- Thorarensen, H., Mclean, E., Donaldson, E. M., & Farrell, A. P. 1991. The blood vasculature of the gastrointestinal tract in chinook, (Walbaum), salmon. *Journal of Fish Biology*, 38, 525–531.
- Tornero-Velez, R., Davis, J., Scollon, E.J., Starr, J.M., Setzer, R.W., Goldsmith, M.R., Chang, D.T., Xue, J., Zartarian, V., DeVito, M.J., Hughes, M.F. 2012. A Pharmacokinetic Model of cis- and trans-Permethrin Disposition in Rats and Humans with Aggregate Exposure Application, *Toxicological Sciences*, 130, 33-47
- Torstensen, B., Nanton, D., Olsvik, P., Sundvold, H., Stubhaug, I. 2009. Gene expression of fatty acid-binding proteins, fatty acid transport proteins (cd36 and FATP) and β -oxidation-related genes in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed fish oil or vegetable oil. *Aquacult. Nutr.* 15, 440–451.
- Ulhaq M, Sundström M, Larsson P, Gabrielsson J, Bergman Å, Norrgren L, et al. 2015. Tissue uptake, distribution and elimination of 14C-PFOA in zebrafish (*Danio rerio*). *AquatToxicol.* 163, 148–57.
- Vanden Heuvel, J.P., Kuslikis, B.I., Van Rafelghem, M.J., and Peterson, R.E. 1991. Tissue distribution, metabolism, and elimination of perfluorooctanoic acid in male and female rats. *J. Biochem. Toxicol.* 6, 83–92.
- Vedagiri, U. K., Anderson, R. H., Loso, H. M., & Schwach, C. M. (2018). Ambient levels of PFOS and PFOA in multiple environmental media. *Remediation*, 28, 9–51. <https://doi.org/10.1002/rem.21548>
- Von Bertalanffy, L., 1938. A quantitative theory of organic growth (inquiries on growth laws II). *Human Biol.* 10, 181-213.
- Wang, M., Chen, J., Lin, K., Chen, Y., Hu, W., Tanguay, R. L., ... Dong, Q. 2011. Chronic zebrafish PFOS exposure alters sex ratio and maternal related effects in F1 offspring. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 30, 2073–2080. doi:10.1002/etc.594
- Wang, T., Wang, P., Meng, J., Liu, S., Lu, Y., Khim, J.S., Giesy, J.P., 2015. A review of sources, multimedia distribution and health risks of perfluoroalkyl acids (PFAAs) in China. *Chemosphere* 129, 87–99.
- Wang, Z., Boucher, J. M., Scheringer, M., Cousins, I. T., & Hungerbühler, K. 2017. Toward a Comprehensive Global Emission Inventory of C4-C10Perfluoroalkanesulfonic Acids (PFSAs) and Related Precursors: Focus on the Life Cycle of C8-Based Products and Ongoing Industrial Transition. *Environmental Science and Technology*, 51, 4482–4493. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b06191>
- Wang, Z., Cousins, I. T., Scheringer, M., & Hungerbühler, K. 2013. Fluorinated alternatives to long-chain perfluoroalkyl carboxylic acids (PFCAs), perfluoroalkane sulfonic acids (PFSAs) and their potential precursors. *Environment International*, 60, 242–248. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.08.021>
- Wang, Z., Cousins, I. T., Scheringer, M., Buck, R. C., & Hungerbühler, K. 2014. Global emission inventories for C4-C14perfluoroalkyl carboxylic acid (PFCA) homologues from 1951 to 2030, Part I: Production and emissions from quantifiable sources. *Environment International*, 70, 62–75. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.04.013>
- Wania, F. 2007. A global mass balance analysis of the source of perfluorocarboxylic acids in the Arctic Ocean. *Environ Sci Technol* 41, 4529–4535.
- Wei, Y., Shi, X., Zhang, H., Wang, J., Zhou, B., Dai, J. 2009. Combined effects of polyfluorinated and perfluorinated compounds on primary cultured hepatocytes from rare minnow (*Gobiocypris rarus*) using toxicogenomic analysis. *Aquat Toxicol.* 95, 27–36.

Références bibliographiques

- Wen, W., Xia, X., Hu, D., Zhou, D., Wang, H., Zhai, Y., & Lin, H. 2017. Long-chain perfluoroalkyl acids (PFAAs) affect the bioconcentration and tissue distribution of short-chain PFAAs in zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Science & Technology*, 51, 12358–12368.
- Wikgren, B. 1953. Osmotic regulation in some aquatic animals with special reference to the influence of temperature. *Acta Zool. Fenn.* 71, 1-102.
- Wilhelm, M., Bergmann, S. and Dieter, H.H. 2010. Occurrence of perfluorinated compounds (PFCs) in drinking water of North Rhine-Westphalia, Germany and new approach to assess drinking water contamination by shorter-chained C4-C7 PFCs. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 213, 224-232.
- Willemin, M.-E. 2014. Modélisation de la toxicocinétique des isomères cis et trans de la perméthrine et de ses métabolites chez le rat et de leur métabolisme sur hépatocytes humains.
- Williams, J. E.; Isaak, D. J.; Imhof, J.; Hendrickson, D. A.; McMillan, J. R. 2015. Cold-water fishes and climate change in North America. Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences. doi: 10.1016/B978-0-12-409548-9.09505-1.
- Wood C. M. et Shelton G., 1980. Cardiovascular dynamics and adrenergic responses of the rainbow trout in vivo. *Journal of Experimental Biology*. 87, 247-70.
- World Health Organization (WHO), Characterization and Application of Physiologically Based Pharmacokinetic Models in Risk Assessment, World Health Organization, International Programme on Chemical Safety, Geneva, Switzerland, 2010.
- Worley, R. R., & Fisher, J. 2015. Application of physiologically-based pharmacokinetic modeling to explore the role of kidney transporters in renal reabsorption of per fluorooctanoic acid in the rat. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 289, 428–441.
- Xia, J., & Niu, C. 2016. Acute toxicity effects of perfluorooctane sulfonate on sperm vitality, kinematics and fertilization success in zebrafish. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 35, 723–728.!
- Xie W, Bothun GD, Lehmler H-J. 2010. Partitioning of perfluorooctanoate into phosphatidylcholine bilayers is chain length-independent. *Chem Phys Lipids* 163:300–308.
- Yang, C.H., Glover, K.P., Han, X. 2010. Characterization of cellular uptake of perfluorooctanoate via organic anion-transporting polypeptide 1A2, organic anion transporter 4, and urate transporter 1 for their potential roles in mediating human renal reabsorption of perfluorocarboxylates. *Toxicol Sci* 117, 294–302.
- Zaharko, D.S., Dedrick. R.L., And Oliverio, V.T. 1972. Prediction of the distribution of methotrexate in the sting rays *Dasyatidae sabina* and *sayi* by use of a model developed in mice. *Comp. Biochem. Physiol. A* 42, 183-194.
- Zhang, L.; Ren, X. M.; Guo, L. H. 2013. Structure-based investigation on the interaction of perfluorinated compounds with human liver fatty acid binding protein. *Environ. Sci. Technol.* 47, 11293–11301.
- Zhong, W., Zhang, L., Cui, Y., Chen., M., Zhu, L. 2019. Probing mechanisms for bioaccumulation of perfluoroalkyl acids in carp (*Cyprinus carpio*): Impacts of protein binding affinities and elimination pathways. *Sci. Tot. Environ.* 647, 992-999. doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.099

Annexes

Annexes du chapitre 3

Annexe 1

Tableau A.1. Sexe, masse (g de poids frais), longueur (cm) moyenne des masses et des longueurs (\pm écart-types) des individus contaminés et des individus témoins de l'expérience à 7°C. *n.d.* signifie non déterminé.

Echantillons	Sexe	Individus contaminés				Individus témoins				
		Masse (g)	Moyenne \pm sd	Longueur (mm)	Moyenne \pm sd	Sexe	Masse (g)	Moyenne \pm sd	Longueur (mm)	Moyenne \pm sd
04/01/17_T0_1	F	239.27		280		<i>n.d.</i>	270.10		290	
04/01/17_T0_2	F	292.01		300		<i>n.d.</i>	263.00		287	
04/01/17_T0_3	F	319.33	288.80 \pm 35.40	310	297 \pm 14	<i>n.d.</i>	269.82	304.55 \pm 55.55	291	301 \pm 20
04/01/17_T0_4	F	269.38		285		<i>n.d.</i>	392.25		335	
04/01/17_T0_5	M	324.01		312		<i>n.d.</i>	327.60		305	
11/01/17_T1_1	F	253.80		275						
11/01/17_T1_2	F	276.53		293						
11/01/17_T1_3	F	348.18	294.44 \pm 37.77	305	296 \pm 20					
11/01/17_T1_4	F	317.25		326						
11/01/17_T1_5	F	276.43		281						
18/01/17_T2_1	F	368.00		320						
18/01/17_T2_2	F	334.96		300						
18/01/17_T2_3	F	314.50	344.89 \pm 20.68	300	312 \pm 11			Pas d'échantillon		
18/01/17_T2_4	F	351.70		318						
18/01/17_T2_5	F	355.30		323						
01/02/17_T3_1	F	304.70		285						
01/02/17_T3_2	F	359.44		319						
01/02/17_T3_3	F	378.60	377.30 \pm 49.17	328	321 \pm 22					
01/02/17_T3_4	F	429.20		332						
01/02/17_T3_5	F	414.55		342						
15/02/17_T4_1	F	370.12		318		<i>n.d.</i>	499.70		340	
15/02/17_T4_2	F	603.50		380		<i>n.d.</i>	377.30		320	
15/02/17_T4_3	F	415.57	404.48 \pm 118.38	325	324 \pm 33	<i>n.d.</i>	399.80	423.82 \pm 48.77	318	330 \pm 11
15/02/17_T4_4	F	362.60		316		<i>n.d.</i>	398.80		338	
15/02/17_T4_5	F	385.40		319		<i>n.d.</i>	443.50		336	
22/02/17_T5_1	F	409.10		320						
22/02/17_T5_2	F	497.92		343						
22/02/17_T5_3	M	321.70	408.38 \pm 73.91	308	322 \pm 19					
22/02/17_T5_4	F	350.40		300						
22/02/17_T5_5	F	462.78		340						
01/03/17_T6_1	F	477.06		340						
01/03/17_T6_2	M	429.00		320						
01/03/17_T6_3	M	338.72	413.03 \pm 83.48	306	321 \pm 24			Pas d'échantillon		
01/03/17_T6_4	F	315.37		290						
01/03/17_T6_5	F	505.00		350						
08/03/17_T7_1	M	462.97		339						
08/03/17_T7_2	F	470.03		347						
08/03/17_T7_3	F	624.01	518.10 \pm 81.85	365	347 \pm 12					
08/03/17_T7_4	M	588.26		352						
08/03/17_T7_5	M	445.24		335						
22/03/17_T8_1	F	404.45		319		F	534.2		364	
22/03/17_T8_2	F	464.90		349		F	522.57		357	
22/03/17_T8_3	F	603.17	488.25 \pm 111.53	371	340 \pm 29	F	366.18	474.64 \pm 67	312	345 \pm 20
22/03/17_T8_4	F	604.68		361		F	460.75		349	
22/03/17_T8_5	M	364.04		301		F	489.48		345	

Tableau A.2. Sexe, masse (g de poids frais), longueur (cm) moyenne des masses et des longueurs (\pm écart-types) des individus contaminés et des individus témoins de l'expérience à 11°C. *n.d.* signifie non déterminé.

Echantillons	Sexe	Individus contaminés				Individus témoins			
		Masse (g)	Moyenne \pm sd	Longueur (mm)	Moyenne \pm sd	Masse (g)	Moyenne \pm sd	Longueur (mm)	Moyenne \pm sd
10/05/16_T0_1	F	357.8		312		361.2		275	
10/05/16_T0_2	M	271.2		275		275.1		250	
10/05/16_T0_3	F	279.5	287.5 \pm 40.6	278	284 \pm 15	328.9	328.8 \pm 34.7	300	273 \pm 19
10/05/16_T0_4	F	276.6		280		357.6		280	
10/05/16_T0_5	F	252.4		279		321.3		260	
17/05/16_T1_1	M	349.0		303		321.0		278	
17/05/16_T1_2	M	395.0		310		392.0		320	
17/05/16_T1_3	F	288.0	330.4 \pm 42.9	285	296 \pm 11	307.0	329.6 \pm 40.8	292	296 \pm 16
17/05/16_T1_4	F	321.0		298		343.0		300	
17/05/16_T1_5	F	299.0		284		285.0		288	
24/05/16_T2_1	F	388.7		316		387.0		318	
24/05/16_T2_2	F	301.2		293		322.0		290	
24/05/16_T2_3	F	407.5	368.4 \pm 42.1	320	309 \pm 11	347.0	342.2 \pm 36.7	300	299 \pm 14
24/05/16_T2_4	F	355.1		304		292.0		280	
24/05/16_T2_5	F	389.9		315		363.0		305	
31/05/16_T3_1	F	453.0		316		422.7		312	
31/05/16_T3_2	F	332.0		295		273.8		285	
31/05/16_T3_3	M	480.6	388.4 \pm 77.5	335	306 \pm 20	379.8	338.3 \pm 61.2	308	299 \pm 13
31/05/16_T3_4	F	298.5		284		314.1		305	
31/05/16_T3_5	F	378.0		304		301.2		284	
07/06/16_T4_1	F	361.6		298		445.0		324	
07/06/16_T4_2	F	343.1		295		388.6		300	
07/06/16_T4_3	F	402.5	376.4 \pm 46.5	308	298 \pm 15	359.5	416.2 \pm 54.9	306	313 \pm 12
07/06/16_T4_4	F	444.1		314		497.4		329	
07/06/16_T4_5	M	331.0		275		390.9		308	
14/06/16_T5_1	F	320.8		295		374.6		295	
14/06/16_T5_2	F	479.5		320		416.0		320	
14/06/16_T5_3	F	535.0	453.8 \pm 87.1	337	323 \pm 20	440.3	429.7 \pm 36.8	324	320 \pm 15
14/06/16_T5_4	M	416.3		315		445.0		328	
14/06/16_T5_5	F	517.5		348		472.7		336	
21/06/16_T6_1	M	307.7		277		327.0		285	
21/06/16_T6_2	F	312.8		289		395.7		308	
21/06/16_T6_3	F	462.4	378.2 \pm 67.6	315	304 \pm 21	417.6	398.1 \pm 45.5	308	307 \pm 14
21/06/16_T6_4	F	386.6		314		399.0		312	
21/06/16_T6_5	F	421.5		328		451.2		325	
28/06/16_T7_1	M	563.7		348		529.0		348	
28/06/16_T7_2	F	443.6		324		588.0		372	
28/06/16_T7_3	F	376.4	425.1 \pm 88.2	306	321 \pm 17	591.9	583.3 \pm 33.9	350	358 \pm 10
28/06/16_T7_4	F	330.0		309		622.8		355	
28/06/16_T7_5	F	411.9		318		585.0		364	
05/07/16_T8_1	F	403.1		312		570.0		362	
05/07/16_T8_2	F	346.3		304		658.2		370	
05/07/16_T8_3	F	578.3	497.6 \pm 115.4	359	339 \pm 29	514.1	617.0 \pm 75.8	334	360 \pm 16
05/07/16_T8_4	F	606.5		368		707.0		375	
05/07/16_T8_5	F	553.8		353		636.1		360	

Tableau A.3. Sexe, masse (g de poids frais), longueur (cm) moyenne des masses et des longueurs (\pm écart-types) des individus contaminés et des individus témoins de l'expérience à 19°C. *n.d.* signifie non déterminé.

Echantillons	Individus contaminés					Individus témoins				
	Sexe	Masse (g)	Moyenne \pm sd	Longueur (mm)	Moyenne \pm sd	Sexe	Masse (g)	Moyenne \pm sd	Longueur (mm)	Moyenne \pm sd
12/04/17_T0_1	F	249.20		280			275.17		287	
12/04/17_T0_2	F	357.02		328			300.12		310	
12/04/17_T0_3	F	393.00	322.53 \pm 64.03	328	308 \pm 26		295.72	299.19 \pm 24.40	300	303 \pm 10
12/04/17_T0_4	F	353.42		328			285.64		305	
12/04/17_T0_5	M	260.00		280			339.30		313	
19/04/17_T1_1	F	242.39		288			354.30		328	
19/04/17_T1_2	n.d.	417.60		399			263.20		280	
19/04/17_T1_3	F	323.52	359.07 \pm 86.22	315	334 \pm 44		320.25	397.424 \pm 143.09	310	324 \pm 36
19/04/17_T1_4	F	465.25		355			415.87		324	
19/04/17_T1_5	M	346.58		313			633.50		380	
26/04/17_T2_1	F	518.00		371			470.00		349	
26/04/17_T2_2	F	346.00		330			222.00		280	
26/04/17_T2_3	F	303.00	396.52 \pm 85.71	288	330 \pm 31		419.00	352.40 \pm 110.73	330	311 \pm 29
26/04/17_T2_4	F	368.62		318			404.00		310	
26/04/17_T2_5	F	447.00		343			247.00		285	
10/05/17_T3_1	F	331.80		350		F	437.65		340	
10/05/17_T3_2	M	352.88		316		F	468.20		347	
10/05/17_T3_3	n.d.	384.38	372.61 \pm 71.24	325	329 \pm 19	F	502.87	485.81 \pm 36.99	349	351 \pm 11
10/05/17_T3_4	n.d.	305.01		308		M	536.31		370	
10/05/17_T3_5	F	488.97		348		F	484.00		348	
24/05/17_T4_1	M	382.36		330			349.40		315	
24/05/17_T4_2	F	603.36		365			476.80		335	
24/05/17_T4_3	F	406.29	484.79 \pm 111.55	330	344 \pm 29		503.00	472.84 \pm 70.99	355	339 \pm 15
24/05/17_T4_4	M	423.47		315			519.00		345	
24/05/17_T4_5	F	608.48		384			516.00		345	
31/05/17_T5_1	F	538.04		359			720.00		390	
31/05/17_T5_2	M	469.34		333			336.00		305	
31/05/17_T5_3	F	491.90	547.29 \pm 106.02	345	355 \pm 27		461.00	511.20 \pm 138.83	340	347 \pm 31
31/05/17_T5_4	F	505.54		338			511.00		349	
31/05/17_T5_5	F	731.64		400			528.00		352	
07/06/17_T6_1	F	322.00		290			450.00		335	
07/06/17_T6_2	F	355.00		350			553.00		358	
07/06/17_T6_3	F	477.00	481.60 \pm 146.50	350	339 \pm 31		501.00	523.60 \pm 48.99	340	351 \pm 13
07/06/17_T6_4	M	659.00		374			540.00		360	
07/06/17_T6_5	M	595.00		335			574.00		362	
14/06/17_T7_1	M	492.00		325			586.00		360	
14/06/17_T7_2	M	381.00		326			446.00		324	
14/06/17_T7_3	F	570.00	505.60 \pm 145.07	360	334 \pm 45		447.81	527.67 \pm 120.25	339	349 \pm 22
14/06/17_T7_4	F	718.00		390			713.56		381	
14/06/17_T7_5	F	367.00		270			445.00		342	
21/06/17_T8_1	M	645.53		375			486.16		338	
21/06/17_T8_2	F	629.38		372			681.18		386	
21/06/17_T8_3	F	383.31	537.49 \pm 156.05	310	350 \pm 38		524.84	573.07 \pm 86.21	354	362 \pm 21
21/06/17_T8_4	F	352.63		309			600.08		369	
21/06/17_T8_5	F	676.59		387						
28/06/17_T9_1	F	458.46		343		F	791.78		400	
28/06/17_T9_2	M	733.91		375		M	663.01		368	
28/06/17_T9_3	F	740.37	686.44 \pm 172.16	393	376 \pm 34	F	820.74	676.80 \pm 128.29	400	372 \pm 29
28/06/17_T9_4	n.d.	586.32		348		F	583.02		365	
28/06/17_T9_5	F	913.14		425		n.d.	525.43		330	

Tableau A.4. Masse du muscle, du foie, des viscères, du cerveau et des reins (g de poids frais) des individus des expériences 19°C, 7°C et 11°C.

Expérience 19°C						Expérience 7°C						Expérience 11°C				
Muscle (g p.f.)	Foie (g p.f.)	Viscères (g p.f.)	Cerveau (g p.f.)	Reins (g p.f.)		Muscle (g p.f.)	Foie (g p.f.)	Viscères (g p.f.)	Cerveau (g p.f.)	Reins (g p.f.)		Muscle (g p.f.)	Foie (g p.f.)	Viscères (g p.f.)	Cerveau (g p.f.)	
T0_1	123.80	2.02	9.83	0.35	1.29	T0_1	138.20	3.34	15.25	0.33	3.36	T0_1	198.78	4.88	29.19	0.28
T0_2	209.60	4.27	17.65	0.46	2.56	T0_2	132.00	5.56	23.36	0.39	3.36	T0_2	150.67	3.71	25.58	0.21
T0_3	209.00	4.27	22.75	0.45	2.83	T0_3	150.00	7.64	30.46	0.32	3.26	T0_3	155.28	3.44	22.10	0.23
T0_4	211.20	3.46	18.71	0.29	2.30	T0_4	146.05	4.99	22.08	0.32	1.90	T0_4	153.67	4.06	26.21	0.31
T0_5	131.26	4.11	19.50	0.44	2.06	T0_5	176.00	3.70	13.72	0.36	2.39	T0_5	140.22	3.13	24.04	0.23
T1_1	133.08	2.14	8.953	0.32	1.32	T1_1	105.00	5.06	18.45	0.33	1.50	T1_1	193.89	6.25	32.90	0.3
T1_2	227.60	4.01	19.11	0.43	2.26	T1_2	126.04	5.09	24.59	0.40	1.65	T1_2	219.44	6.42	32.81	0.21
T1_3	185.96	2.62	15.14	0.32	1.85	T1_3	160.00	4.97	32.52	0.48	1.53	T1_3	160.00	3.17	20.06	0.3
T1_4	243.98	5.49	36.53	0.52	2.65	T1_4	156.84	6.40	31.07	0.41	2.45	T1_4	178.33	3.76	21.55	0.3
T1_5	201.78	3.46	19.63	0.44	2.45	T1_5	125.00	3.74	23.47	0.29	1.45	T1_5	166.11	4.16	22.56	0.32
T2_1	289.00	4.71	26.36	0.41	3.82	T2_1	200.00	4.50	25.55	0.31	2.79	T2_1	215.94	7.08	37.19	0.23
T2_2	193.08	2.64	15.16	0.41	1.80	T2_2	176.00	6.89	23.97	0.30	2.45	T2_2	167.33	3.68	23.40	0.2
T2_3	158.10	3.98	17.89	0.47	1.85	T2_3	190.00	5.34	23.32	0.35	2.39	T2_3	226.39	7.01	36.67	0.39
T2_4	208.82	5.73	25.26	0.39	3.14	T2_4	195.00	5.25	24.51	0.33	3.20	T2_4	197.28	6.95	38.17	0.27
T2_5	245.80	3.77	18.87	0.47	2.29	T2_5	210.00	4.11	24.25	0.32	2.75	T2_5	216.61	8.29	38.47	0.34
T3_1	173.90	4.02	13.87	0.37	3.50	T3_1	168.00	4.83	21.48	0.35	2.04	T3_1	251.67	6.87	40.44	0.26
T3_2	188.80	5.25	24.78	0.32	3.46	T3_2	180.00	5.07	25.57	0.31	2.82	T3_2	184.44	5.30	24.54	0.32
T3_3	215.88	5.74	17.72	0.51	3.30	T3_3	220.00	5.09	24.79	0.32	2.64	T3_3	267.00	7.81	43.76	0.29
T3_4	165.00	4.51	13.25	0.33	3.05	T3_4	252.00	5.40	30.08	0.38	3.97	T3_4	165.83	3.86	18.84	0.33
T3_5	264.32	6.90	22.26	0.45	3.93	T3_5	205.00	5.98	29.31	0.19	2.07	T3_5	210.00	5.15	30.86	0.32
T4_1	197.80	4.40	13.37	0.40	2.87	T4_1	213.40	5.01	20.05	0.37	3.23	T4_1	200.89	4.33	31.30	0.33
T4_2	311.04	6.59	31.23	0.58	3.60	T4_2	333.98	8.86	38.77	0.31	5.98	T4_2	190.61	6.08	23.68	0.32
T4_3	241.00	5.04	17.27	0.43	4.04	T4_3	241.00	5.56	29.71	0.51	2.73	T4_3	223.61	5.72	28.66	0.31
T4_4	218.82	5.63	27.46	0.38	3.90	T4_4	208.40	4.55	24.57	0.39	2.37	T4_4	246.72	6.78	41.86	0.24
T4_5	334.20	8.12	28.86	0.52	4.47	T4_5	235.80	4.03	22.46	0.39	3.20	T4_5	183.89	5.54	21.40	0.45
T5_1	284.40	6.68	23.51	0.43	3.64	T5_1	242.00	4.48	22.45	0.32	2.59	T5_1	178.22	3.70	21.44	0.36
T5_2	246.50	7.98	26.90	0.30	3.80	T5_2	268.74	6.22	42.14	0.40	4.15	T5_2	266.39	8.92	32.52	0.4
T5_3	273.20	4.97	36.61	0.39	2.83	T5_3	178.26	3.69	17.78	0.45	2.90	T5_3	297.22	8.30	40.74	0.32
T5_4	290.20	7.66	27.34	0.29	2.94	T5_4	185.20	5.59	25.09	0.28	4.62	T5_4	231.28	5.94	28.70	0.18
T5_5	430.18	8.08	43.79	0.49	4.51	T5_5	245.60	6.56	26.48	0.51	3.78	T5_5	287.50	9.28	35.31	0.37
T6_1	176.40	5.14	19.69	0.45	2.95	T6_1	268.98	4.71	31.06	0.38	3.74	T6_1	170.94	5.22	38.32	0.27
T6_2	272.00	10.31	37.46	0.46	2.91	T6_2	203.10	5.83	46.52	0.55	3.77	T6_2	173.78	3.88	26.03	0.33
T6_3	281.76	6.04	24.93	0.48	2.81	T6_3	189.60	4.08	18.92	0.32	2.74	T6_3	256.89	7.17	33.35	0.3
T6_4	338.00	8.09	42.50	0.43	4.31	T6_4	181.00	4.02	22.05	0.28	2.98	T6_4	214.78	5.45	24.39	0.3
T6_5	323.00	7.66	39.27	0.44	4.35	T6_5	296.26	4.69	31.15	0.52	3.39	T6_5	234.17	7.32	30.33	0.23
T7_1	250.64	7.54	28.15	0.41	4.36	T7_1	262.20	5.88	31.19	0.55	4.06	T7_1	313.17	9.25	42.86	0.32
T7_2	193.68	5.92	15.12	0.46	4.63	T7_2	266.36	5.94	28.05	0.37	3.57	T7_2	246.44	7.28	34.89	0.29
T7_3	299.80	6.42	27.83	0.47	4.17	T7_3	345.60	9.26	54.08	0.43	4.62	T7_3	209.11	8.09	26.84	0.26
T7_4	418.80	9.92	36.20	0.51	4.16	T7_4	327.80	6.92	40.37	0.55	3.93	T7_4	183.33	5.77	29.19	0.29
T7_5	200.88	6.18	17.16	0.34	3.64	T7_5	231.80	6.11	33.31	0.36	3.13	T7_5	228.83	8.37	34.98	0.21
T8_1	389.52	4.35	25.08	0.51	2.99	T8_1	229.74	4.93	19.95	0.31	1.90	T8_1	223.94	7.50	34.69	0.29
T8_2	338.96	5.48	38.76	0.04	4.49	T8_2	298.70	4.63	26.49	0.36	3.29	T8_2	192.39	3.46	20.88	0.31
T8_3	197.36	5.32	19.43	0.36	2.78	T8_3	367.80	6.43	25.88	0.45	3.82	T8_3	321.28	9.71	37.18	0.53
T8_4	170.72	4.95	15.91	0.43	3.07	T8_4	365.60	6.50	37.46	0.32	3.33	T8_4	336.94	11.08	44.59	0.31
T8_5	405.36	8.43	38.21	0.39	4.97	T8_5	201.40	4.74	18.24	0.46	4.05	T8_5	307.67	8.15	40.69	0.29
T9_1	253.48	3.62	15.98	0.42	3.02							198.78	4.88	29.19	0.28	
T9_2	416.16	7.08	43.71	0.46	4.31							150.67	3.71	25.58	0.21	
T9_3	392.30	11.36	48.32	0.40	3.85							155.28	3.44	22.10	0.23	
T9_4	299.32	7.57	36.13	0.68	4.46							153.67	4.06	26.21	0.31	
T9_5	507.00	10.04	66.89	0.49	7.49							140.22	3.13	24.04	0.23	

Annexe 2

SUPPLEMENTARY INFORMATION

Elucidating the fate of perfluorooctanoate sulfonate using a rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)
physiologically-based toxicokinetic model

Alice Vidal^a, Rémy Beaudouin^{b*}, Jeanne Garric^a, Marc Babut^a

¹ Irstea, UR RIVERLY, 5 Avenue de la Doua, CS20244, 69625 Villeurbanne Cedex, France.

^b UMR-I 02 SEBIO, Unit of Models for Ecotoxicology and Toxicology (METO), INERIS, 60550 Verneuil en Halatte, France.

*Corresponding author: remy.beaudouin@ineris.fr

Section A.1. Spiked food protocol

A stock solution with a nominal concentration of 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$ dry weight of PFOS (>98% purity) was prepared in methanol and gently poured onto two different 25-kg batches with a 3-mm pellet diameter in a cement mixer for 10 min. The pellets were then placed on a polypropylene sheet overnight at room temperature, under an extractor hood, to ensure the total evaporation of methanol. Then the spiked pellets were coated with calcium alginate (Duis *et al.* 1995): a 2% sodium alginate solution was first prepared in distilled water and added to the dried spiked pellets in the cement mixer. Next, calcium chloride powder was added to obtain a 98- $\mu\text{g kg}^{-1}$ concentration of calcium alginate. The amount used for coating the pellets was not toxic and did not alter the experiment (Goeritz *et al.* 2013). Since alginate coating slightly increases the water content in the pellets, coated pellets were prepared weekly during the experiment to prevent spoilage of the experimental diet (Goeritz *et al.* 2013). Contaminated pellets were then stored at 4°C to minimize chemical and biological alterations.

Table A.1. –Fish length and wet weight of fish and each organ of rainbow trout in the exposure experiment.

Length is expressed in mm and all weights are in g. Each line corresponds to one organism.

Samples	Fish length (mm)	Body weight (g)	Muscle weight (g)	Liver weight (g)	Viscera weight (g)	Brain weight (g)	Kidney weight (g)
T0	280	249.20	123.80	2.02	9.83	0.35	1.29
T0	328	357.02	209.60	4.27	17.65	0.46	2.56
T0	328	393.00	209.00	4.27	22.75	0.45	2.83
T0	328	353.42	211.20	3.46	18.71	0.29	2.30
T0	280	260.00	131.26	4.11	19.50	0.44	2.06
T1	288	242.39	133.08	2.14	8.953	0.32	1.32
T1	399	417.60	227.60	4.01	19.11	0.43	2.26
T1	315	323.52	185.96	2.62	15.14	0.32	1.85
T1	355	465.25	243.98	5.49	36.53	0.52	2.65
T1	313	346.58	201.78	3.46	19.63	0.44	2.45
T2	371	518.00	289.00	4.71	26.36	0.41	3.82
T2	330	346.00	193.08	2.64	15.16	0.41	1.80
T2	288	303.00	158.10	3.98	17.89	0.47	1.85
T2	318	368.62	208.82	5.73	25.26	0.39	3.14
T2	343	447.00	245.80	3.77	18.87	0.47	2.29
T3	350	331.8	173.90	4.02	13.87	0.37	3.50
T3	316	352.88	188.80	5.25	24.78	0.32	3.46
T3	325	384.38	215.88	5.74	17.72	0.51	3.30
T3	308	305.01	165.00	4.51	13.25	0.33	3.05
T3	348	488.97	264.32	6.90	22.26	0.45	3.93
T4	330	382.36	197.80	4.40	13.37	0.40	2.87
T4	365	603.36	311.04	6.59	31.23	0.58	3.60
T4	330	406.29	241.00	5.04	17.27	0.43	4.04
T4	315	423.47	218.82	5.63	27.46	0.38	3.90
T4	384	608.48	334.20	8.12	28.86	0.52	4.47

T5	359	538.04	284.40	6.68	23.51	0.43	3.64
T5	333	469.34	246.50	7.98	26.90	0.30	3.80
T5	345	491.9	273.20	4.97	36.61	0.39	2.83
T5	338	505.54	290.20	7.66	27.34	0.29	2.94
T5	400	731.64	430.18	8.08	43.79	0.49	4.51
T6	290	322.00	176.40	5.14	19.69	0.45	2.95
T6	350	355.00	272.00	10.31	37.46	0.46	2.91
T6	350	477.00	281.76	6.04	24.93	0.48	2.81
T6	374	659.00	338.00	8.09	42.50	0.43	4.31
T6	335	595.00	323.00	7.66	39.27	0.44	4.35
T7	325	492.00	250.64	7.54	28.15	0.41	4.36
T7	326	381.00	193.68	5.92	15.12	0.46	4.63
T7	360	570.00	299.80	6.42	27.83	0.47	4.17
T7	390	718.00	418.80	9.92	36.20	0.51	4.16
T7	270	367.00	200.88	6.18	17.16	0.34	3.64
T8	375	645.53	389.52	4.35	25.08	0.51	2.99
T8	372	629.38	338.96	5.48	38.76	0.04	4.49
T8	310	383.31	197.36	5.32	19.43	0.36	2.78
T8	309	352.63	170.72	4.95	15.91	0.43	3.07
T8	387	676.59	405.36	8.43	38.21	0.39	4.97
T9	343	458.46	253.48	3.62	15.98	0.42	3.02
T9	375	733.91	416.16	7.08	43.71	0.46	4.31
T9	393	740.37	392.30	11.36	48.32	0.40	3.85
T9	348	586.32	299.32	7.57	36.13	0.68	4.46
T9	425	913.14	507.00	10.04	66.89	0.49	7.49

Table A.2. – Fulton index (K-factor), hepatosomatic (HSI, %) indices of control and exposed rainbow trout at the start and end of experiments.

	Start of the experiment		End of the experiment	
	Control	Exposed	Control	Exposed
K-factor (1)	1.08±0.06	1.09±0.07	1.30±0.08	1.27±0.10
HSI (%) (2)	1.22±0.19	1.13±0.21	1.08±0.21	1.14±0.22

(1) $Kfactor = 100 \times \frac{FW}{L^3}$, with fish considered in good condition when K-factor > 1

(2) $HSI (\%) = 100 \times \frac{liver\ mass}{FW}$

Section A.2. Model equations

Distribution in blood

Arterial blood

$$\frac{dQ_{art}}{dt} = Free \times Qc \times C_{venous} - F_{liver} \times C_{art} - F_{muscle} \times C_{art} - F_{brain} \times C_{art} - F_{visctissue} \times C_{art} - F_{kidney} \times C_{art} - F_{skin} \times C_{art} - F_{gill} \times C_{art} - F_{carcass} \times C_{art}$$

Venous blood

$$\begin{aligned} \frac{dQ_{venous}}{dt} = & \frac{dQ_{adminwater}}{dt} - \frac{dQ_{excretwater}}{dt} - Free \times Qc \times C_{venous} + (F_{liver} + F_{visc_tissue}) \times \frac{C_{liver}}{PC_{liver}} \\ & + (1 - a) \times F_{muscle} \times \left(\frac{C_{muscle}}{PC_{muscle}} \right) + F_{brain} \times \frac{C_{brain}}{PC_{brain}} \\ & + (a \times F_{muscle} + b \times F_{skin} + F_{kidney} \times \frac{C_{kidney}}{PC_{kidney}} + F_{gill} \times \frac{C_{gill}}{PC_{gill}} \\ & + (1 - b) \times F_{skin} \times \frac{C_{skin}}{PC_{skin}} + F_{carcass} \times \frac{C_{carcass}}{PC_{carcass}} \end{aligned}$$

In model 0, branchial absorption ($Q_{adminwater}$) and branchial elimination ($Q_{excretwater}$) were not considered. Therefore, the terms $\frac{dQ_{adminwater}}{dt}$ and $\frac{dQ_{excretwater}}{dt}$ were equal to 0.

Distribution in organs with no input, no elimination

Brain

$$\frac{dQ_{brain}}{dt} = F_{brain} \times Free \times \left(C_{art} - \frac{C_{brain}}{PC_{brain}} \right)$$

Carcass

$$\frac{dQ_{carcass}}{dt} = F_{carcass} \times Free \times \left(C_{art} - \frac{C_{carcass}}{PC_{carcass}} \right)$$

Gill

$$\frac{dQ_{gill}}{dt} = F_{gill} \times Free \times \left(C_{art} - \frac{C_{gill}}{PC_{gill}} \right)$$

Muscle

$$\frac{dQ_{muscle}}{dt} = F_{muscle} \times Free \times \left(C_{art} - \frac{C_{muscle}}{PC_{muscle}} \right)$$

Skin

$$\frac{dQ_{skin}}{dt} = F_{skin} \times Free \times \left(C_{art} - \frac{C_{skin}}{PC_{skin}} \right)$$

Distribution in organs with input or elimination

Kidney

$$\frac{dQ_{kidney}}{dt} = F_{kidney} \times Free \times C_{art} + a \times F_{muscle} \times \frac{C_{muscle}}{PC_{muscle}} + b \times F_{skin} \times \frac{C_{skin}}{PC_{skin}} - (a \times F_{muscle} + b \times F_{skin} + F_{kidney}) \times \frac{C_{kidney}}{PC_{kidney}} - \frac{dQ_{excreturine}}{dt}$$

Part of the venous blood draining the skin and muscle is assumed to flow to the kidney (Nichols *et al.* 1990, Nichols *et al.* 1996).

Liver

$$\frac{dQ_{liver}}{dt} = F_{liver} \times Free \times C_{art} + F_{visc_tissue} \times \frac{C_{visc_tissue}}{PC_{visc_tissue}} - (F_{liver} + F_{visc_tissue}) \times \frac{C_{liver}}{PC_{liver}} - \frac{dQ_{excretbile}}{dt}$$

Biliary excretion occurs in the liver according to first-order kinetics.

Viscera – Lumen 1

$$\frac{dQ_{lumen1}}{dt} = Q_{adminfood} - K_u \times Q_{lumen1} - Cl_{feces} \times C_{lumen1} + (f_{reab} \times \frac{dQ_{excretbile}}{dt})$$

Viscera – Lumen 2

$$\frac{dQ_{lumen2}}{dt} = (1 - f_{reab}) \times \frac{dQ_{excretbile}}{dt} - Cl_{feces} \times C_{lumen2}$$

Viscera – Tissue

$$\frac{dQ_{visc_tissue}}{dt} = F_{visc_tissue} \times \left(C_{art} - \frac{C_{visc_tissue}}{PC_{visc_tissue}} \right) + K_u \times Q_{lumen1}$$

Section A.3. Justification of the choice of prior values for all parameters

Fixed parameters

The plasma fraction (70%) was determined using the hematocrit fraction in rainbow trout (Barron *et al.* 1987; Stevens 1968; Brill *et al.* 1998; Gingerich and Pityer 1989), applying the formula: $1 - \text{hematocrit fraction}$.

The fractions of arterial blood flow to liver, kidney, muscle, gills and viscera ($frac_i$) were calculated from the 18°C data set of the study reported by Barron *et al.* (1987), as:

$$frac_i = \frac{F_i}{Q_c \times BW \times 60} \times mass_i$$

with F_i the blood flow to tissue ($\text{mL h}^{-1} \text{g}_{\text{tissue}}^{-1}$), Q_c the cardiac output ($\text{mL min}^{-1} \text{kg}^{-1}$), BW the body weight (kg) and $mass_i$ the mass of each organ, calculated multiplying the percent body weight of tissue by the total body weight). Viscera blood flow was calculated as the sum of stomach/esophagus, intestine, spleen and caecum pyloric flows. In their work, Barron *et al.* (1987) mentioned that gill blood flows were underestimates. Moreover, brain blood flow was not measured in this study, so we adopted the value used in Pery *et al.* (2014).

Organ volume fractions were obtained from either this study (muscle, liver, kidney, brain, viscera) or from Goeritz *et al.* (2013) (gill and skin). The fraction of gut lumen volume was reported as the sum of the upper and lower intestine fraction volumes of adult rainbow trout (Nichols *et al.* 2004). Blood volume was extracted from Gingerich *et al.* (1990). The fraction volume of carcass (sc_{carcass}) corresponded to: $sc_{\text{carcass}} = 1 - \sum sc_i$, with sc_i corresponding to fraction volumes of organs and blood.

Calibrated parameters

While these physiological parameters were fixed for the PBTK model developed, others were calibrated using a Bayesian approach. This method involves several steps: specification of prior distributions, estimation of the posterior distributions by MCMC computations and evaluation of the convergence and consistency of estimated parameters. The free plasmatic fraction of PFOS, partition coefficients between blood and liver, muscle, skin, gills and kidneys, the absorption rate constant and biliary, fecal and urinary clearances were assumed to follow a normal distribution with a variation coefficient set at 30%.

Physiological parameters

Since data on PFOS affinity with plasma proteins is still unknown in fish, the value of the free fraction of PFOS in plasma came from the value in mammals (Loccizano *et al.* 2012).

Partition coefficients

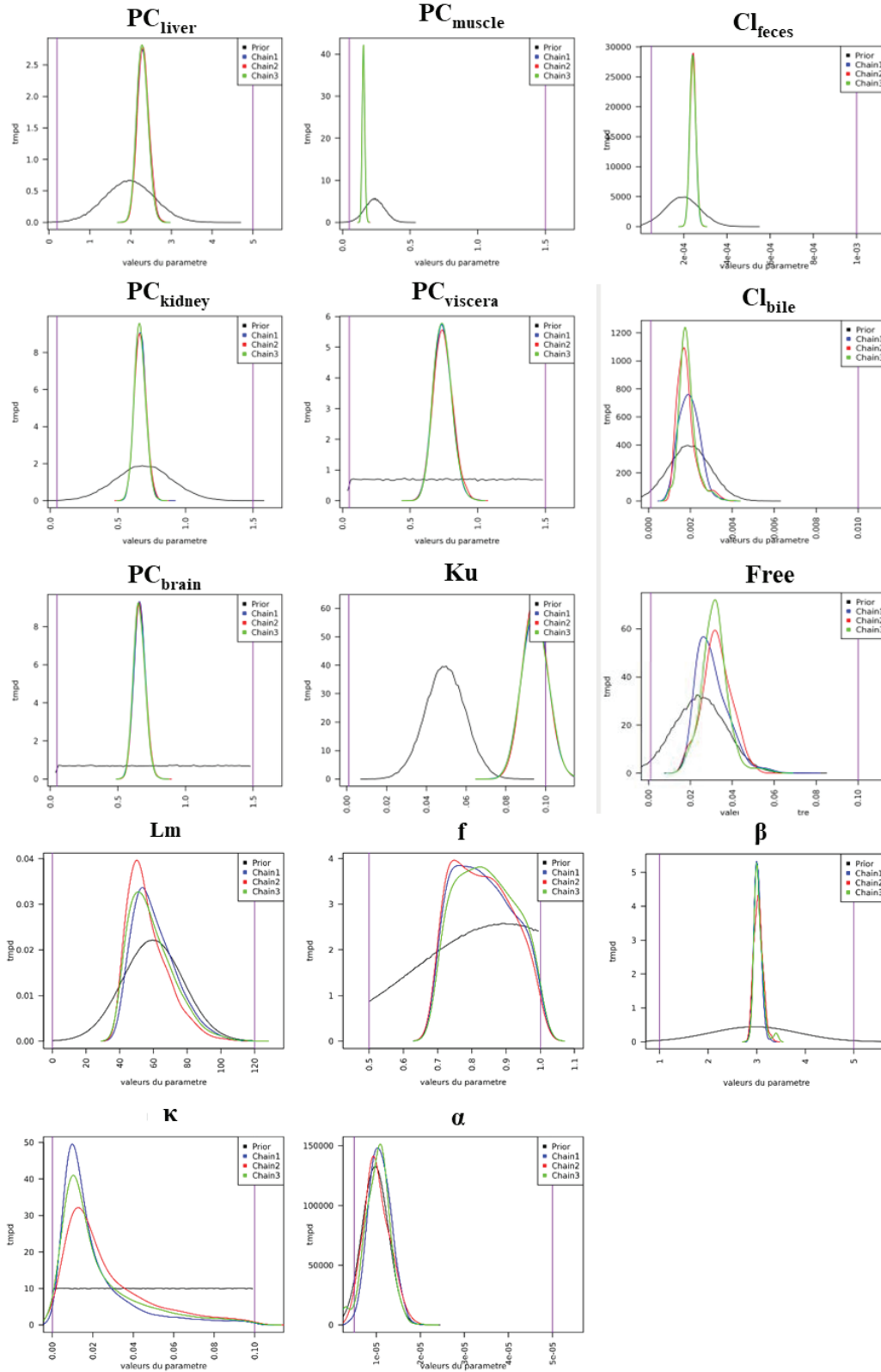
Because of the extremely limited availability of experimental data for partition coefficients in fish, partition coefficients between blood and several organs (liver, muscle, skin, gills and kidneys) corresponded to the apparent partition coefficients obtained from Goeritz *et al.* 2013. They were calculated as the mean ratio of PFOS concentrations of the last day of the exposure period in these organs and mean ratio of PFOS concentration of blood ($n=4$). The partition coefficient between blood and viscera and the partition coefficient between blood and brain were estimated following a uniform distribution, from 0.01 to 5.0. Since we did not find a prior value for estimation of the blood:water partition coefficient, we used a uniform distribution between 0.1 and 10,000. QSAR models, often used for partition coefficient estimations, are not relevant for PFOS because they are based on the octanol:water partition coefficient.

Kinetic parameters

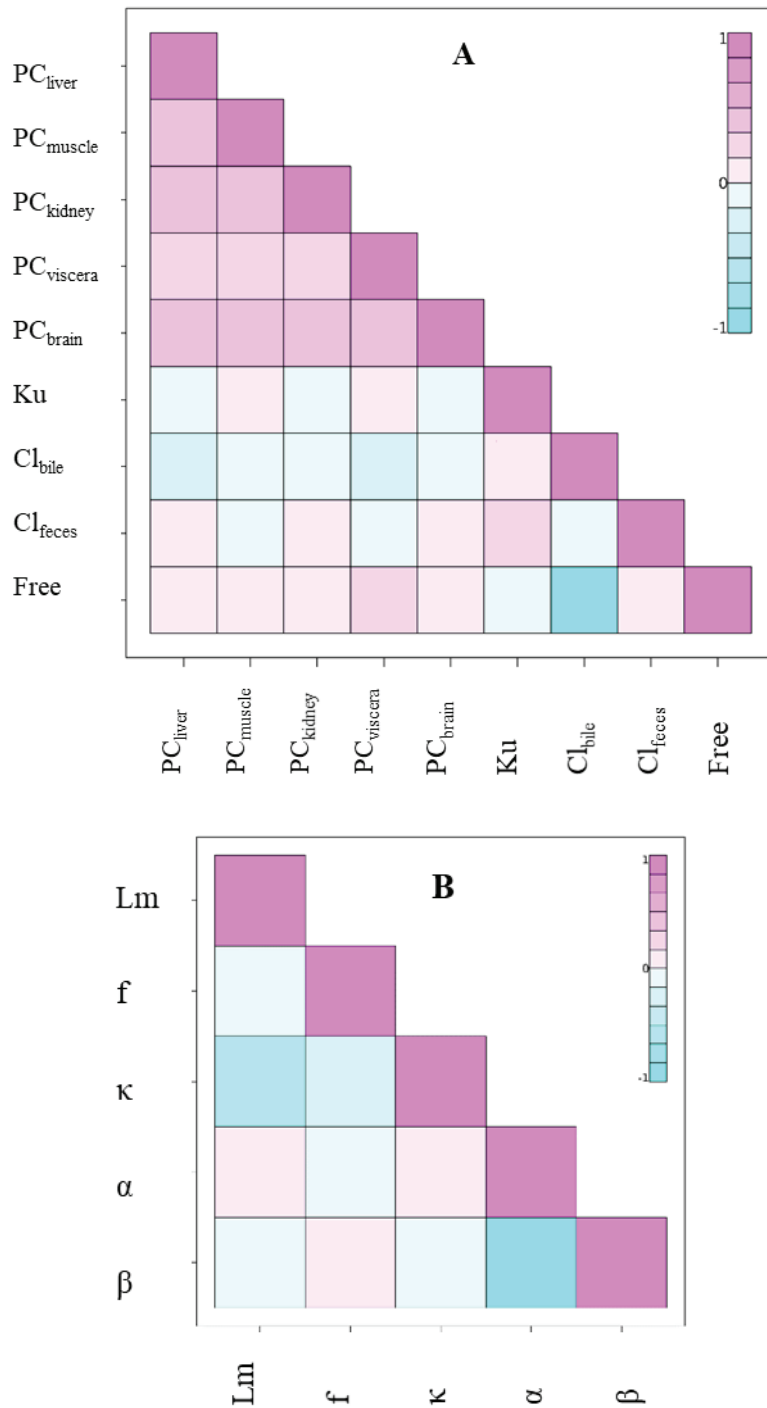
Based on the rapid PFOS absorption in mammals with a rate constant estimated at 25.1 h^{-1} for the PFOS (Loccizano *et al.* 2012), we suggested that PFOS was also rapidly absorbed in fish. For the clearance prior values, they all came from rainbow trout studies. Clearance refers to the volume of plasma cleared of PFOS per unit of time via excretion processes. Biliary clearance was based on the volumetric flow rate of bile, 2.8 mL in 72 h (Consoer *et al.* 2014) and on the PFOS coefficient partition, 0.016 (Consoer *et al.* 2016). Urinary clearance ($0.43 \text{ mL d}^{-1} \text{ kg}^{-1}$) provided from Consoer *et al.* (2016), who studied PFOS toxicokinetics in adult rainbow trout. Feces clearance was estimated from the egestion rates of feces in rainbow trout found by Clark (1985).

Figure A.1. Diagnosis of chain convergence for model 0.

For all parameters, the density of the prior is represented by the black line and the density of the posterior by the colored line, with that of chain 1, chain 2 and chain 3 in blue, red and green, respectively.



Correlations between calibrated toxicokinetic parameters (A) and calibrated biometric parameters (B) for model 0.



In graph A, a strong negative correlation is shown between biliary clearance and the free plasmatic fraction of PFOS, because the more biliary clearance increases, the less PFOS is available for accumulation in organs. This result did not prevent the identifiability of parameters.

Figure A.2. Predicted PFOS concentrations in skin, gill and carcass.

In all graphs, the black line is the simulated concentrations of PFOS in skin, gill and carcass (ng g^{-1}) and the gray area is the 95% confidence interval.

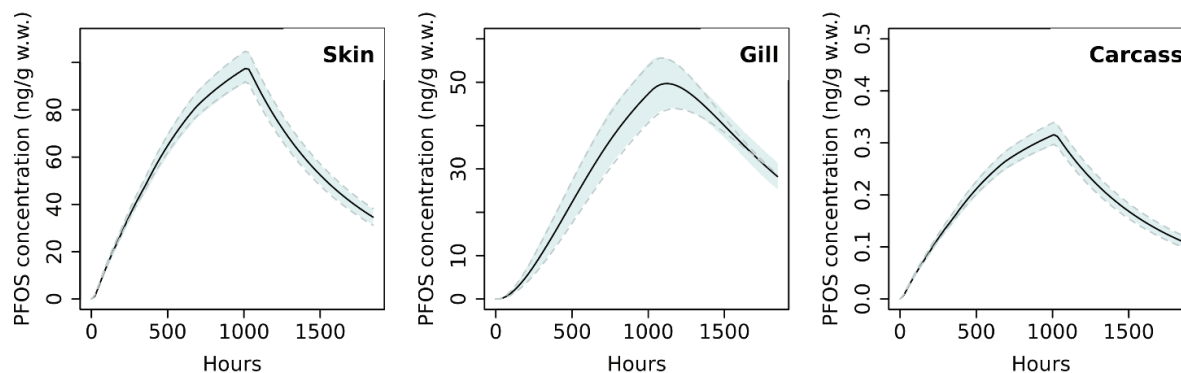


Table A.3. – Estimation of mean, standard deviation (SD) and 95% credibility intervals (95%CI) for calibrated parameters in model 1 for the four reabsorbed fractions (25%, 50%, 75% and 100%) compared to model 0 (0%).

Parameters	$f_{reab} = 0.0$ (Model 0)		$f_{reab} = 0.25$		$f_{reab} = 0.50$		$f_{reab} = 0.75$		$f_{reab} = 1.0$	
	Mean \pm SD	95% CI	Mean \pm SD	95% CI	Mean \pm SD	95% CI	Mean \pm SD	95% CI	Mean \pm SD	95% CI
PC _j										
Liver	2.09 \pm 0.13	[1.89;2.41]	2.16 \pm 0.14	[1.89;2.44]	2.13 \pm 0.13	[1.91;2.45]	2.24 \pm 0.14	[2.03;2.58]	2.34 \pm 0.14	[2.13;2.58]
Muscle	0.15 \pm 0.01	[0.13;0.17]	0.15 \pm 0.01	[0.14;0.17]	0.15 \pm 0.01	[0.13;0.17]	0.15 \pm 0.01	[0.14;0.17]	0.15 \pm 0.01	[0.13;0.17]
Kidney	0.60 \pm 0.04	[0.53;0.69]	0.61 \pm 0.04	[0.54;0.70]	0.60 \pm 0.04	[0.54;0.69]	0.62 \pm 0.04	[0.56;0.70]	0.62 \pm 0.04	[0.55;0.70]
Viscera	0.75 \pm 0.07	[0.67;0.95]	0.76 \pm 0.07	[0.64;0.90]	0.75 \pm 0.07	[0.65;0.90]	0.71 \pm 0.06	[0.63;0.84]	0.66 \pm 0.06	[0.56;0.78]
Brain	0.64 \pm 0.04	[0.57;0.74]	0.65 \pm 0.04	[0.58;0.75]	0.65 \pm 0.04	[0.58;0.74]	0.66 \pm 0.04	[0.60;0.76]	0.66 \pm 0.04	[0.60;0.76]
Cl _{bile} (10^{-3})	2.16 \pm 0.37	[1.52;2.53]	2.88 \pm 0.16	[2.63;2.89]	3.57 \pm 0.19	[3.16;3.95]	4.55 \pm 0.29	[4.03;5.19]	5.47 \pm 0.36	[4.70;6.02]
Cl _{feces} (10^{-4})	2.62 \pm 0.14	[2.28;2.87]	2.61 \pm 0.14	[2.34;2.89]	2.61 \pm 0.14	[2.37;2.90]	2.65 \pm 0.14	[2.40;2.94]	2.73 \pm 0.15	[2.51;3.05]
K _u (10^{-1})	1.29 \pm 0.13	[1.1; 1.6]	1.27 \pm 0.12	[1.09;1.55]	1.29 \pm 0.12	[1.07;1.56]	1.21 \pm 0.10	[1.04;1.47]	0.98 \pm 0.08	[0.9;1.13]

Table A.4. – Prior distributions, estimation of mean, standard deviation (SD) and 95% credibility intervals (95% CI) for calibrated parameters in model 2 compared to the results of model 0

Symbol	Distribution of prior	Model 2		Model 0	
		Mean \pm SD	95% CI	Mean \pm SD	95% CI
PC _{blood:water}	U(0.1, 10000)	4239.85 \pm 382.66	[3733.22;5095.51]		
PC _j					
Liver	N(2.0, 30)	2.05 \pm 0.13	[1.79;2.28]	2.09 \pm 0.13	[1.89;2.41]
Muscle	N(0.24, 30)	0.15 \pm 0.01	[0.14;0.18]	0.15 \pm 0.01	[0.13;0.17]
Kidney	N(0.70, 30)	0.58 \pm 0.04	[0.53;0.66]	0.60 \pm 0.04	[0.53;0.69]
Viscera	U(0.0, 5.0)	0.87 \pm 0.09	[0.75;1.09]	0.75 \pm 0.07	[0.67;0.95]
Brain	U(0.0, 5.0)	0.63 \pm 0.04	[0.56;0.70]	0.64 \pm 0.04	[0.57;0.74]
K _u	N(0.05, 50)	0.071 \pm 0.009	[0.059;0.098]	0.13 \pm 0.01	[0.11;0.16]
Cl _{bile} (10^{-3})	N(0.0023, 30)	0.83 \pm 0.17	[0.62;1.29]	2.16 \pm 0.37	[1.52;2.53]
Cl _{feces} (10^{-4})	N(0.0002, 30)	1.90 \pm 0.24	[1.50;2.42]	2.62 \pm 0.14	[2.28;2.87]

Annexe 3

Code du modèle PBTK (MCSim)

```

=====
# Rainbow trout exposed to PFOS by diet (& water)
# Fixed temperature
=====

# Units
=====
# Volume      : L
# Time        : hours
# Flow        : L/h
# Concentration : ng/kg
# Masses      : kg
# Temperature  : °C
# Ventilation rate : L/h
# VO2         : mg(O2)/h
# Cox         : mg(O2)/L
# Length      : cm
# Clearance   : L/h

# Distribution in plasma (correction by hematocrit)
# Free fraction of chemical in plasma (no partition into red blood cells)
=====

# States
=====
States = {
  Q_art,      # Quantity of chemical in arterial blood (ng)
  Q_ven,      # Quantity of chemical in venous blood (ng)
  Q_liver,    # Quantity of chemical in liver (ng)
  Q_muscle,   # Quantity of chemical in muscle (ng)
  Q_brain,    # Quantity of chemical in brain (ng)
  Q viscera,  # Quantity of chemical in viscera (ng)
  Q_lumen_1,  # Quantity of chemical in lumen (ng)
  Q_lumen_2,
  Q_kidney,   # Quantity of chemical in kidney (ng)
  Q_skin,     # Quantity of chemical in skin (ng)
  Q_gill,     # Quantity of chemical in gill (ng)
  Q_carcass,  # Quantity of chemical in carcass (ng)
  Qadmin_food, # Quantity of chemical ingested by food (ng)
  Qadmin_water, # Quantity of chemical ingested by water (ng)
  Qexcret_gill, # Quantity of chemical excreted by gill (ng)
  Qexcret_bile, # Quantity of chemical excreted by bile (ng)
  Qexcret_urine, # Quantity of chemical excreted by urine (ng)
  Qexcret_feces, # Quantity of chemical excreted by feces (ng)
  L          # Length of fish (cm)
};

# Outputs
=====
Outputs = {
  BW,          # Body weight of fish (kg)
  Qc,          # Cardiac output (L/h)
  Qw,          # Ventilation rate (L/h)
  Kx,          # Exchange coefficient (L/h)
  VO2_arr,
  VO2,
  C_art,      # Concentration of PFOS in arterial blood (ng/g)
  C_ven,      # Concentration of PFOS in venous blood (ng/g)
  C_liver,    # Concentration of PFOS in liver (ng/g)
  C_muscle,   # Concentration of PFOS in muscle (ng/g)
  C_brain,    # Concentration of PFOS in brain (ng/g)

```



```

C viscera,          # Concentration of PFOS in viscera (ng/g)
C kidney,          # Concentration of PFOS in kidney (ng/g)
C skin,           # Concentration of PFOS in skin (ng/g)
C gill,           # Concentration of PFOS in gill (ng/g)
C carcass,        # Concentration of PFOS in carcass (ng/g)
C_lumen_1,
C_lumen_2,
C_lumen viscera,
Qexcret,
Qadmin,
QBody,
masse_balance,
V_art,
V_ven,
V_liver,
V_muscle,
V_brain,
V viscera,
V kidney,
V gill,
V skin,
V carcass,
V_lumen,
};

#####
#      Inputs
#####
Inputs = { Feeding2,
           Feeding,          # Scenario of exposition : quantity of PFOS given each day
           Concentration_water # PFOS concentration in water (ng/L)
};

#####
# Parameters
#####

# Plasma fraction
#-----
plasma = 0.7 ; # Plasmatic fraction = 1 - Haematocrit

# Free fraction in plasma
#-----
Free = 0.0315 ;

# Reabsorbed fraction - entero-hepatic cycle
#-----
f_reab = 0.0 ;          # 0 when no entero-hepatic circulation

# Branchial absorption
#-----
C_permeab = 1.0 ;

# Biometric data
#-----
L0=30.88      ;          # Initial length
f= 0.942741   ;          # Food quantity
Lm = 59.9072  ;          # Maximal length
kappa = 0.00833077 ; # Growth
u = 9.57767e-06 ;
v = 3.05088   ;

# Volume scaling factor : fraction of BW
# sc_organ have been calculated for the 7°C experiment fish : mean mass of fish and organ at the start of experiment
#-----
sc_blood = 0.0449 ;
sc_liver = 0.01155 ;
sc_muscle = 0.566 ;
sc_skin = 0.0638 ;
sc_gill = 0.0196 ;
sc_kidney = 0.01643 ;

```

```

sc viscera = 0.0514 ;
sc brain = 0.001 ;
sc lumen = 0.012 ; # Nichols et al. 2004

# Fraction of arterial blood flow
# frac_organ = %blood_flow_rate * Qc / organ_weight
#-----
frac_liver = 0.0035 ; #Barron et al., 1987, 18°C
frac_muscle = 0.655 ; #Barron et al., 1987, 18°C
frac_skin = 0.0728 ; #Nichols et al., 1996
frac_gill = 0.00021 ; #Barron et al., 1987, 18°C
frac_kidney = 0.0712 ; #Barron et al., 1987, 18°C
frac viscera = 0.069 ; #Barron et al., 1987, 18°C
frac_brain = 0.055 ; #Pery et al., 2014

#-----
a = 0.6 ; # Muscle fraction of flow to the kidney (Nichols et al., 1990)
b = 0.9 ; # Skin fraction of flow to the kidney (Nichols et al., 1996)

# Partition coefficient
# Based on apparent coefficient from Goeritz et al. 2013
#-----
PC_liver = 2.13742 ;
PC_muscle = 0.196706 ;
PC_skin = 0.40 ;
PC_gill = 0.25 ;
PC_kidney = 0.626612 ;
PC viscera = 0.8857 ;
PC_brain = 0.590785 ;
PC_carcass = 0.00129 ;
PC_blood_water = 7043.75 ;

# Rate constants (absorption and elimination)
#-----
Ku = 0.13 ;
Cl_urine = 0.0000179;
Cl_feces = 0.0002 ;
Cl_bile = 0.002 ;

# Physico-chemical parameters
#-----
Temperature = 18.6 ; # Mean of temperature during the whole experiment (°C)
Cox = 8.05 ; # Mean of oxygen concentration during the whole experiment (mgO2/L)
TA = 6930 ; # Grech et al. 2017
T = Temperature + 273.15 ;
VO2_ref = 135.8 ; # Elliott 1969
BW_VO2_ref = 1.0 ;
TR = 283.15 ;
BW_Qc_ref = 0.2701 ; # Barron et al. 1987
T_ref_Qc = 279.15 ;
Qc_ref = 1.19 ;

#-----
# Scale
#-----
Initialize {

# Body weight
L = L0;
Q_lumen_1 = 0; # value at time zero
Q_lumen_2 = 0;
Q_art= 0; # Quantity of chemical in arterial blood (ng)
Q_ven= 0; # Quantity of chemical in venous blood (ng)
Q_liver= 0; # Quantity of chemical in liver (ng)
Q_muscle= 0; # Quantity of chemical in muscle (ng)
Q_brain= 0; # Quantity of chemical in brain (ng)
Q viscera= 0; # Quantity of chemical in viscera (ng)
Q_kidney= 0; # Quantity of chemical in kidney (ng)
Q_skin= 0; # Quantity of chemical in skin (ng)
Q_gill= 0; # Quantity of chemical in gill (ng)
Q_carcass= 0; # Quantity of chemical in carcass (ng)
Qexcret_gill= 0; # Quantity of chemical excreted by gill (ng)

```

```

        Qexcret_bile= 0;      # Quantity of chemical excreted by bile (ng)
        Qexcret_urine= 0;   # Quantity of chemical excreted by urine (ng)
    } # End of initialize

#####
# Dynamics
#####
Dynamics {

    # Body weight
    BW = u * pow(L, v);      # Kg

    #Volumes (L or Kg) of the organs changing with the time
    #Organ density considered equal to 1 (Kg/L)
    #-----
    V_art   = sc_blood * BW * 1/3.0 * plasma ;
    V_ven   = sc_blood * BW * 2/3.0 * plasma ;

    V_liver = sc_liver * BW ;
    V_muscle = sc_muscle * BW ;
    V_brain  = sc_brain * BW ;
    V viscera = sc viscera * BW ;
    V_skin   = sc_skin * BW ;
    V_gill   = sc_gill * BW ;
    V_kidney = sc_kidney * BW ;
    V_lumen  = sc_lumen * BW ;
    V_carcass = (1 - sc_blood - sc_liver - sc_muscle - sc_brain - sc viscera - sc_kidney - sc_skin - sc_gill - sc_lumen) * BW ;

    # Calculation of cardiac output and flow - correction for plasma
    #-----
    Qc = Qc_ref * exp((TA/T_ref_Qc) - (TA/T)) * pow((BW/BW_Qc_ref),-0.1) * BW * plasma ;
    # Flows to tissues
    F_liver  = frac_liver * Qc * Free ;
    F_muscle = frac_muscle * Qc * Free ;
    F_brain  = frac_brain * Qc * Free ;
    F viscera = frac viscera * Qc * Free ;
    F_kidney = frac_kidney * Qc * Free ;
    F_skin   = frac_skin * Qc * Free ;
    F_gill   = frac_gill * Qc * Free ;
    F_carcass = (1 - frac_liver - frac_muscle - frac_brain - frac viscera - frac_kidney - frac_skin - frac_gill) * Qc * Free;

    #Ventilation rate
    #-----
    VO2_arr = VO2_ref * exp((TA/TR)-(TA/T)) * pow((BW/BW_VO2_ref),-0.1); # Grech et al. 2019
    VO2      = VO2_arr * BW;
    Qw       = VO2/(Cox-0.2*Cox); # Effective respiratory volume (L/h)

    # Chemical flux at fish gills
    #-----
    #tmp = Qc* PC_blood_water ;
    #Kx = (tmp < Qw ? tmp : Qw); # Kx equals the flow term that is limiting (L/d)
    Kx = 0 ;                    # Kx equals Qw when branchial absorption is active

    # Concentrations in tissues (ng/kg)
    #-----
    C_liver  = Q_liver / V_liver ;
    C_muscle = Q_muscle / V_muscle ;
    C_brain  = Q_brain / V_brain ;
    C viscera = Q viscera / V viscera ;
    C_kidney = Q_kidney / V_kidney ;
    C_skin   = Q_skin / V_skin ;
    C_gill   = Q_gill / V_gill ;
    C_carcass = Q_carcass / V_carcass ;
    C_lumen_1 = Q_lumen_1 / V_lumen ;
    C_lumen_2 = Q_lumen_2 / V_lumen ;
    C_lumen viscera = (Q_lumen_1 + Q_lumen_2) / V_lumen ;

    # because equal to 1 (PC_ven and PC_art)
    C_art   = Q_art / V_art ;
    C_ven   = Q_ven / V_ven ;

```

```

# Differentials
#-----

# Growth
#-----
dt(L) = kappa * (f - (L/Lm));

# Absorption
#-----
dt(Qadmin_food) = 0 ; # ng
dt(Qadmin_water) = C_permeab * Kx * Concentration_water;
# Branchial abs = Kx * (C - C_ven / PC_blood_water) : Nichols et al. 1990
# AdminWater = Kx * C and ExcretWater = Kx * C_ven / PC_blood_water

# Excretion
#-----
dt(Qexcret_gill) = Kx * (Free * C_ven/PC_blood_water) ;
dt(Qexcret_bile) = Free * Cl_bile * C_liver ;
dt(Qexcret_urine) = Cl_urine * (Free * C_kidney / PC_kidney) ;
dt(Qexcret_feces) = Cl_feces * (C_lumen_2 + C_lumen_1);

# Distribution
#-----
dt(Q_carcass) = F_carcass * (C_art - (C_carcass/PC_carcass));
dt(Q_gill) = F_gill * (C_art - C_gill/PC_gill) ;
dt(Q_muscle) = F_muscle * (C_art - C_muscle/PC_muscle) ;
# F_muscle = a * F_muscle + (1-a) * F_muscle
dt(Q_skin) = F_skin * (C_art - C_skin/PC_skin) ;
# F_skin = b * F_skin + (1-b) * F_skin
dt(Q_brain) = F_brain * (C_art - C_brain/PC_brain) ;
dt(Q_kidney) = F_kidney * C_art + a * F_muscle * C_muscle/PC_muscle + b * F_skin * C_skin/PC_skin - (a * F_muscle +
b * F_skin + F_kidney) * C_kidney/PC_kidney - dt(Qexcret_urine);
dt(Q_lumen_1) = (- Ku * Q_lumen_1) - (Cl_feces * C_lumen_1) + (f_reab * dt(Qexcret_bile));
dt(Q_lumen_2) = (1 - f_reab) * dt(Qexcret_bile) - (Cl_feces * C_lumen_2);
dt(Q_viscera) = F_viscera * (C_art - C_viscera/PC_viscera)
+ Ku * Q_lumen_1 ;
dt(Q_liver) = F_liver * C_art + F_viscera * (C_viscera/PC_viscera) - (F_liver + F_viscera) * (C_liver/PC_liver) -
dt(Qexcret_bile);

dt(Q_art) = Qc * C_ven * Free
- F_liver * C_art
- F_muscle * C_art
- F_brain * C_art
- F_viscera * C_art
- F_kidney * C_art
- F_skin * C_art
- F_gill * C_art
- F_carcass * C_art ;

dt(Q_ven) = dt(Qadmin_water)
- dt(Qexcret_gill)
- Qc * C_ven * Free
+ (F_liver + F_viscera) * C_liver/PC_liver
+ (1-a) * F_muscle * C_muscle/PC_muscle
+ F_brain * C_brain/PC_brain
+ (a * F_muscle + b * F_skin + F_kidney) * C_kidney/PC_kidney
+ F_gill * C_gill/PC_gill
+ (1-b) * F_skin * C_skin/PC_skin
+ F_carcass * C_carcass/PC_carcass ;

} # End of Dynamics

#=====  

# Calcul output  

#=====  

CalcOutputs {

# Mass balance check  

#-----
Qexcret = Qexcret_urine + Qexcret_gill + Qexcret_feces;
Qadmin = Qadmin_water + Qadmin_food;
QBody = (Q_art + Q_ven + Q_liver + Q_muscle + Q_brain + Q_viscera + Q_kidney + Q_skin + Q_gill + Q_carcass + Q_lumen_1 + Q_lumen_2);

```

Annexes

```
masse_balance = (Qadmin - Qexcret - QBody);

C_art = (Q_art > 0.00000001 ? Q_art / (V_art*1000) : 1E-12);
C_ven = (Q_ven > 0.00000001 ? Q_ven / (V_ven*1000) : 1E-12);
C_liver = (Q_liver > 0.00000001 ? Q_liver / (V_liver*1000) : 1E-12);
C_muscle = (Q_muscle > 0.00000001 ? Q_muscle / (V_muscle*1000) : 1E-12);
C_brain = (Q_brain > 0.00000001 ? Q_brain / (V_brain*1000) : 1E-12);
C viscera = (Q viscera > 0.00000001 ? Q viscera / (V viscera *1000): 1E-12);
C_kidney = (Q_kidney > 0.00000001 ? Q_kidney / (V_kidney *1000) : 1E-12);
C_skin = (Q_skin > 0.00000001 ? Q_skin / (V_skin*1000) : 1E-12);
C_gill = (Q_gill > 0.00000001 ? Q_gill / (V_gill*1000) : 1E-12);
C_carcass = (Q_carcass > 0.00000001 ? Q_carcass / (V_carcass*1000) : 1E-12);
C_lumen_1 = (Q_lumen_1 > 0.00000001 ? Q_lumen_1 / (V_lumen*1000) : 1E-12);
C_lumen_2 = (Q_lumen_2 > 0.00000001 ? Q_lumen_2 / (V_lumen *1000) : 1E-12);
C_lumen viscera = ( ( Q_lumen_1 + Q_lumen_2) > 0.00000001 ? ( Q_lumen_1 + Q_lumen_2)/(V_lumen*1000) : 1E-12);

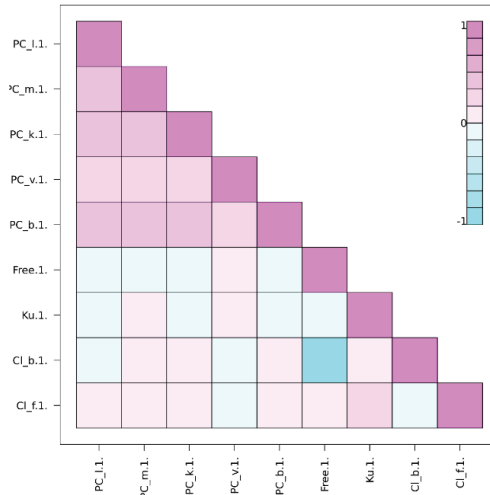
}# End of CalcOutputs

End.
```

Annexes du chapitre 4

Figure A.1. Graphiques de diagnostic des convergences des chaînes (n=3, 100 000 itérations) pour le modèle PFHxS.

Diagramme de corrélations entre les paramètres calibrés.



Comparaison des distributions a priori et a posteriori

Pour tous les paramètres, la densité *a priori* est représenté par la courbe noire, les densités *a posteriori* de chaque chaîne sont représentées par les courbes bleues, rouges et vertes.

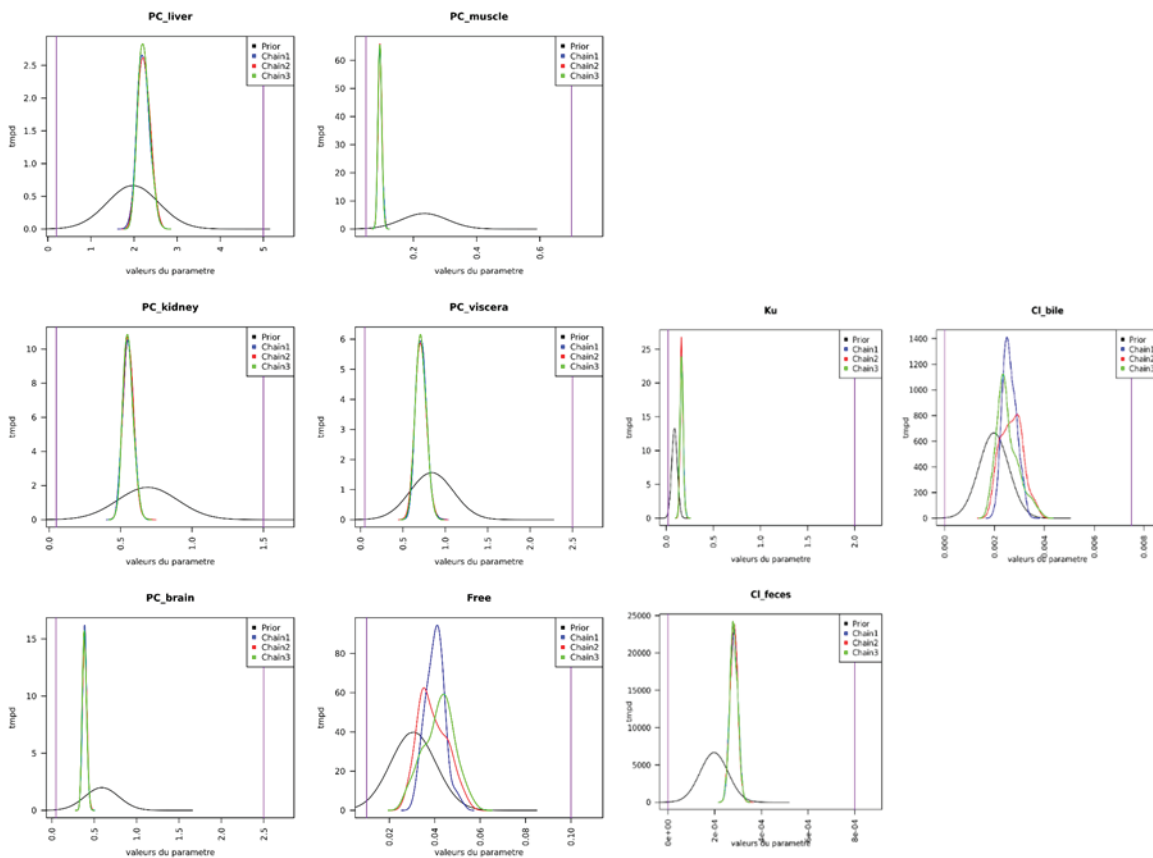
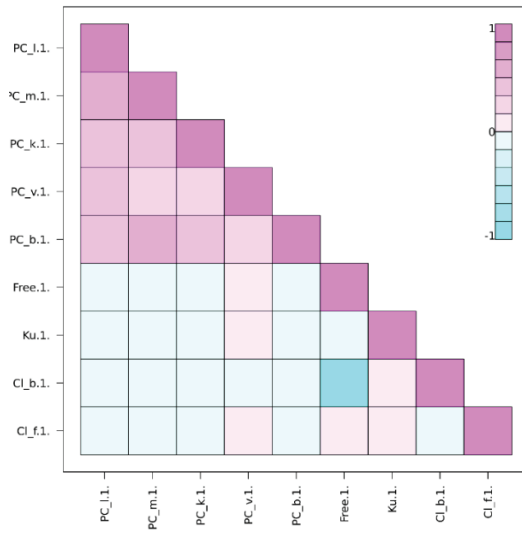


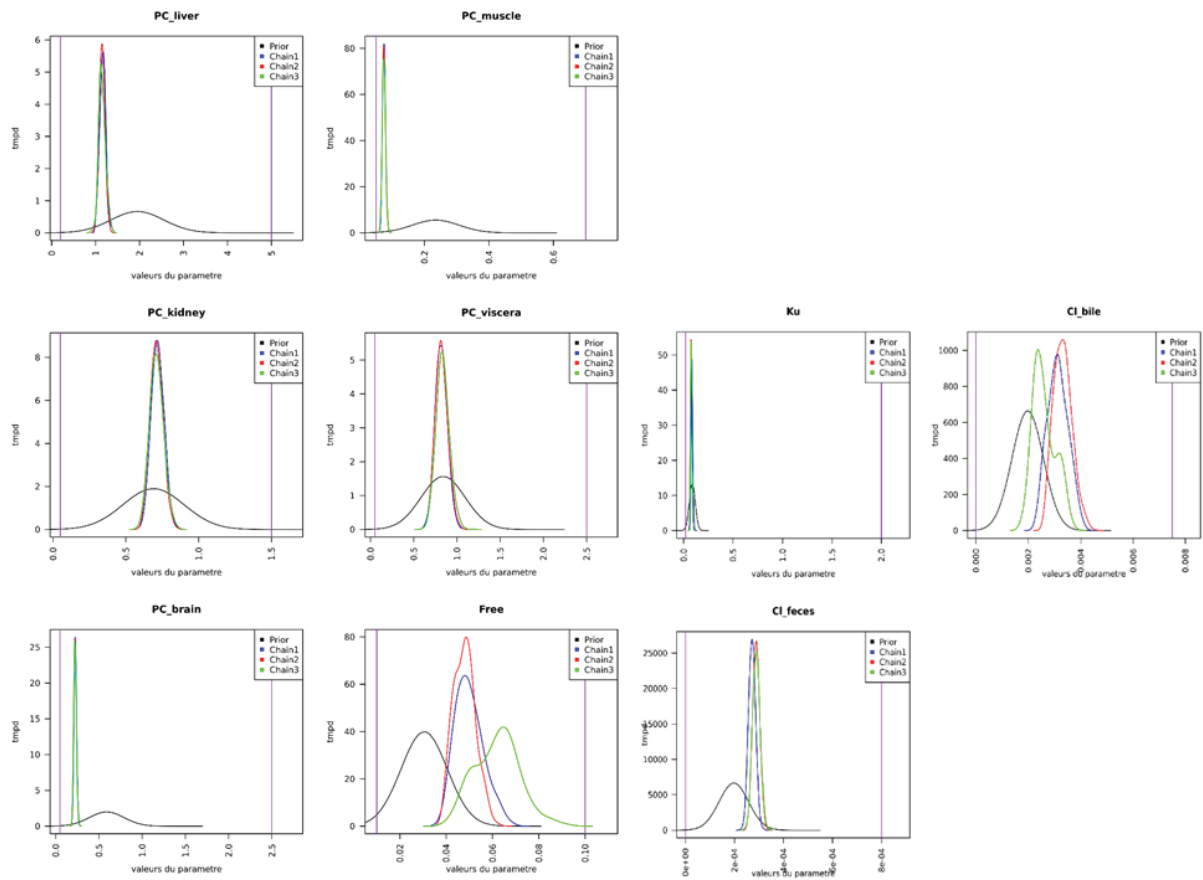
Figure A.2. Graphiques de diagnostic des convergences des chaînes (n=3, 100 000 itérations) pour le modèle PFNA.

Diagramme de corrélations entre les paramètres calibrés.



Comparaison des distributions a priori et a posteriori

Pour tous les paramètres, la densité *a priori* est représenté par la courbe noire, les densités *a posteriori* de chaque chaîne sont représentées par les courbes bleues, rouges et vertes



Annexes du chapitre 5

Supporting information

Does water temperature influence the distribution and elimination of perfluorinated substances in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)?

Environmental Science and Pollution Research

Authors: Alice Vidal^a, Florent Lafay^b, Gaëlle Daniele^b, Emmanuelle Vulliet^b, Eric Rochard^c, Jeanne Garric^a and Marc Babut^{a*}

^a Irstea, RIVERLY Research Unit, 5 rue de la Doua CS 20244, 69625 Villeurbanne Cedex, France

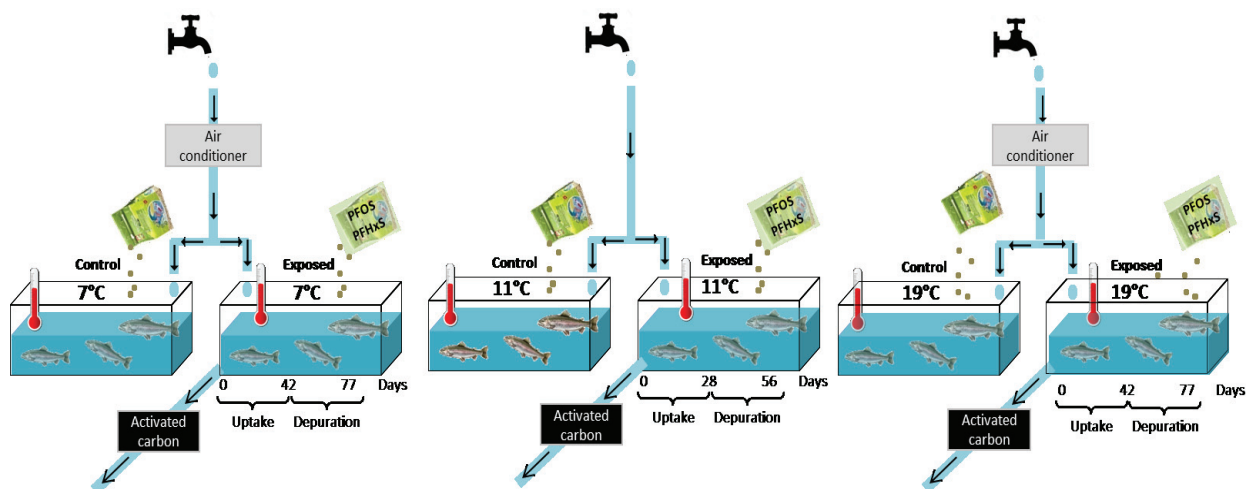
^b Univ Lyon, CNRS, Université Claude Bernard Lyon 1, Ens de Lyon, Institut des Sciences Analytiques, UMR 5280, 5 rue de la Doua, F-69100 Villeurbanne, France

^c Irstea, EABX Research Unit, 33612 Cestas, France.

*Corresponding author: MARC BABUT (marc.babut@irstea.fr ; RIVERLY Research Unit, 5 rue de la Doua, CS 20244, 69625 Villeurbanne, France.

Experimental

Figure S1. Experimental design



Food preparation details

A stock solution with a nominal concentration of $500 \mu\text{g kg}^{-1}$ dry weight of each compound was prepared in methanol and gently poured onto two different 25-kg batches with a 3-mm pellet diameter in a cement mixer for 10 min. The pellets were then placed on a polypropylene sheet overnight at room temperature, under an extractor hood, to ensure the total evaporation of methanol. Then the spiked pellets were coated with calcium alginate (Duis *et al.* 1995): a 2% sodium alginate solution was first prepared in distilled water and added to the dried spiked pellets in the cement mixer. Next, calcium chloride powder was added to obtain a $98 \mu\text{g kg}^{-1}$ concentration of calcium alginate. The amount used for coating the pellets was not toxic and did not alter the experiment (Goeritz *et al.* 2013). As alginate coating slightly increases the water content in the pellets, coated pellets were prepared weekly during the experiment to prevent spoilage of the experimental diet (Goeritz *et al.* 2013). Contaminated pellets were then stored at 4°C to minimize chemical and biological alterations.

PFAS analysis

The selectivity and identification of the analytes were ensured by both their chromatographic characteristics and their MRM-specific fragmentations. Namely, each analyte was characterized by its retention time (with a deviation $\pm 5\%$ compared to the analytical standard extracted and analyzed in the same conditions), its two specific MRM transitions and the ratios between both transition areas (deviation $\pm 20\%$ with the analytical standard). Matrix-matched calibration was used for quantification. Moreover, the compound perfluoro-[1,2,3,4- $^{13}\text{C}_4$]octanesulfonic acid (M-PFOS) was used as internal standard to control the extraction efficiency and ^{13}C -phenacetin was added to check the injection quality. Control quality samples were regularly injected. The data processing was achieved using

Masslynx 4.1 software from Waters. The method's performance (Table S1) was determined, for each compound in each matrix, by spiking blank samples (*i.e.*, free of target compounds) of muscle, liver and blood collected from rainbow trout bought in a supermarket. The previous analysis of these samples showed no contamination with our targeted analytes. Linearity was evaluated by extracting and analyzing samples of the corresponding blank matrix spiked at seven levels of concentration ranging from the method's limit of quantification (MLQ) to 40 ng/g for muscles, 100 ng/g for liver and 250 ng/mL for blood. The linearity of the calibration curves, obtained by plotting the peak area against the concentration of the corresponding standard, was checked by the square correlation coefficient (r^2), which was greater than 0.95. The method's limit of detection (MLD) corresponded to the analyte concentration that produces a peak-signal three times the background noise for the MRM2 transition. The MLQ corresponded to an analyte concentration that produced a peak-signal ten times the background noise for the MRM1 transition. To determine whole process extraction recoveries, blank samples were spiked at a concentration level corresponding to the middle of the linearity range: muscle (10 ng/g), liver (50 ng/g) and blood (60 ng/mL). Five replicates were performed for each matrix. The extraction was performed as described and the signals of the spiked samples ($S_{\text{spiked before extraction}}$) were compared to those of samples spiked after extraction ($S_{\text{spiked after extraction}}$) at the same concentration with the following equation:

$$\text{Recovery (\%)} = \frac{S_{\text{spiked before extraction}}}{S_{\text{spiked after extraction}}} \times 100 \text{ (Eq.1)}$$

Results

Table S1. Analytical results: compound identification parameters

Retention time (t_r), transitions used for quantification (MRM1) and confirmation (MRM2), ratios between both transitions and method performance for each matrix including recoveries (%), the method's limits of detection (MLD) and quantification (MLQ).

		PFOS	PFHxS
CAS number		355-46-4	1763-23-1
t_r (min)		4.00	3.31
MRM1		499 → 99	399 → 80
MRM2		499 → 80	399 → 99
MRM1/MRM2		1.4	1.1
Recoveries (mean±SD, %)	<i>Liver</i>	94±8.8	86±4.0
	<i>Blood</i>	104±2.7	107±4.8
	<i>Muscle</i>	86±8.0	89±6.1
	<i>Brain</i>	89±2.9	88±0.45
MLD (ng g ⁻¹)	<i>Liver</i>	17.0	16.0
	<i>Muscle</i>	0.09	0.05
	<i>Brain</i>	6.46	1.84
	<i>Kidney</i>	0.18	0.17
MLD (ng mL ⁻¹)	<i>Food</i>	5.4	3.6
	<i>Blood</i>	9.0	13.0
	<i>Water</i>	0.06	0.02
MLQ (ng g ⁻¹)	<i>Liver</i>	22.2	30.59
	<i>Muscle</i>	0.15	0.07
	<i>Brain</i>	8.50	2.52
	<i>Kidney</i>	0.61	0.57
MLQ (ng mL ⁻¹)	<i>Food</i>	18	12.1
	<i>Blood</i>	11.3	20.16
	<i>Water</i>	0.19	0.08

Table S2. Physicochemical parameters in tank waters.

Parameters	7°C	11°C	19°C
Cond (μS.cm ⁻¹)	380	498	380
pH	7.6	7.6	7.6
Dissolved O ₂ (%)	>75	>75	>75
Cl ⁻ (mg L ⁻¹)	15.6	20.0	15.6
SO ₄ ²⁻ (mg L ⁻¹)	10.3	33.7	10.3
Na ⁺ (mg L ⁻¹)	10.9	11.1	10.9
K ⁺ (mg L ⁻¹)	2.4	2.2	2.4
Mg ²⁺ (mg L ⁻¹)	5.4	13.8	5.4
Ca ²⁺ (mg L ⁻¹)	58.0	76.4	58.0
NO ₂ ⁻ (mg L ⁻¹)	0.07	0.002	0.07
NO ₃ ⁻ (mg L ⁻¹)	9.9	2.7	9.9

The water quality parameters of the three experiments were similar except hardness (SO_4^{2-} , Ca^{2+} and Mg^{2+}) and nitrate (NO_3^-). Nevertheless, (i) trout well-being was not compromised, as they were acclimated to these concentrations, which laid typically in the range of water composition where rainbow trouts live, and (ii) these differences did not affect PFOS and PFHxS bioavailability, because the compounds were added to food.

Table S3. Mean length (mm), mean body weight (g), Fulton index (K-factor), hepato-somatic (HSI, %) indices of control and exposed rainbow trout at the start and end of experiments.

	Start of the experiment					
	7°C		11°C		19°C	
	Control	Exposed	Control	Exposed	Control	Exposed
Length (L) in mm	301.6±14.7	297.4±11.9	276.6±14.4	284.3±39.7	303±7.6	308.8±23.0
Body weight (FW) in g	304.6±44.3	288.8±27.6	323.4±22.2	281.6±15.8	299.2±16.4	322.5±54.3
K-factor (1)	1.10±0.04	1.09±0.04	1.55±0.27	1.21±0.07	1.08±0.06	1.09±0.07
HSI (%) (2)	1.56±0.29	1.74±0.48	1.41±0.18	1.32±0.15	1.22±0.19	1.13±0.21
	End of the experiment					
	7°C		11°C		19°C	
	Control	Exposed	Control	Exposed	Control	Exposed
Length (L) in mm	354.8±13.5	340.2±24.2	351.7±17.2	343.9±20.5	372.6±21.9	376.8±25.8
Body weight (FW) in g	531.4±48.9	488.2±92.5	569.5±83.8	518.6±90.4	676.8±103.6	686.4±131.2
K-factor	1.15±0.05	1.23±0.09	1.30±0.07	1.26±0.07	1.30±0.08	1.27±0.10
HSI (%)	1.31±0.18	1.13±0.12	2.18±0.65	1.60±0.31	1.08±0.21	1.14±0.22

$$(1) Kfactor = 100 \times \frac{FW}{L^3}$$

With fish considered in good condition when K-factor > 1

$$(2) HSI (\%) = 100 \times \frac{liver\ mass}{FW}$$

Table S4. Results of Dunn test p-values on organ-to-blood ratios.

Ratios	Temperature (°C)	PFOS	PFHxS
Liver:Blood	7 – 11	>0.05	>0.05
	7 – 15	<0.0001	<0.0001
	7 – 19	<0.0001	<0.0001
	11 – 15	<0.0001	<0.0001
	11 – 19	<0.0001	<0.0001
	15 – 19	>0.05	>0.05
Muscle:Blood	7 – 11	<0.0001	<0.0001
	7 – 15	<0.0001	<0.0001
	7 – 19	<0.0001	<0.0001
	11 – 15	>0.05	<0.05
	11 – 19	>0.05	>0.05
	15 – 19	>0.05	<0.05
Brain:Blood	7 – 11	>0.05	<0.05
	7 – 19	<0.0001	>0.05
	11 – 19	>0.05	<0.05
Kidney:Blood	7 – 15	>0.05	<0.0001
	7 – 19	>0.05	>0.05
	15 – 19	>0.05	<0.0001

Figure S2. Depuration kinetics of PFOS in blood, liver, muscle, brain and kidney of adult rainbow trout.

The open dots correspond to the 7°C experiment, the grey dots to the 11°C experiment and the black dots to the 19°C experiment. Dotted, grey and black lines are the exponential decay curves fitting concentrations measured during exposure to 7°C, 11°C and 19°C, respectively.

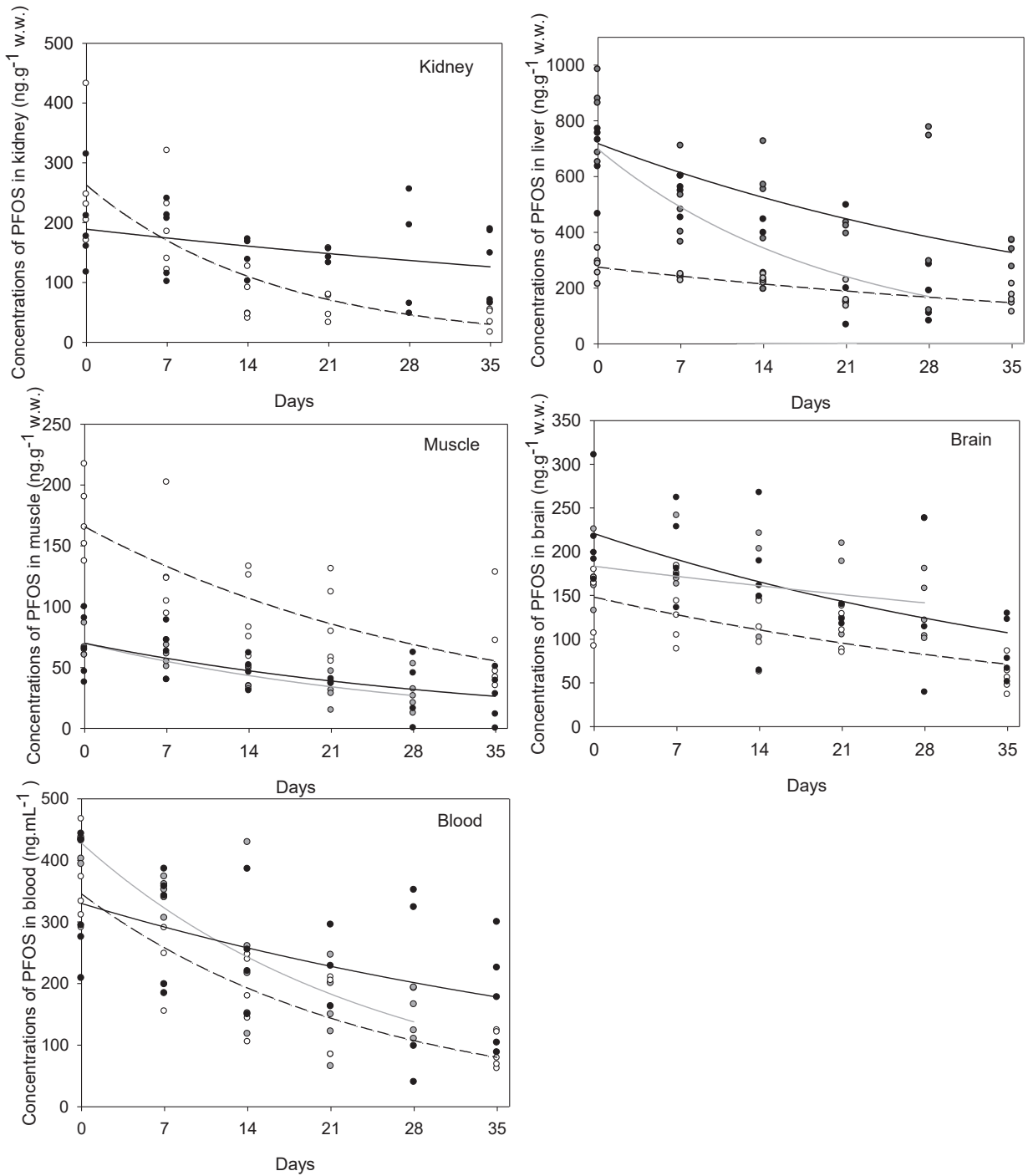
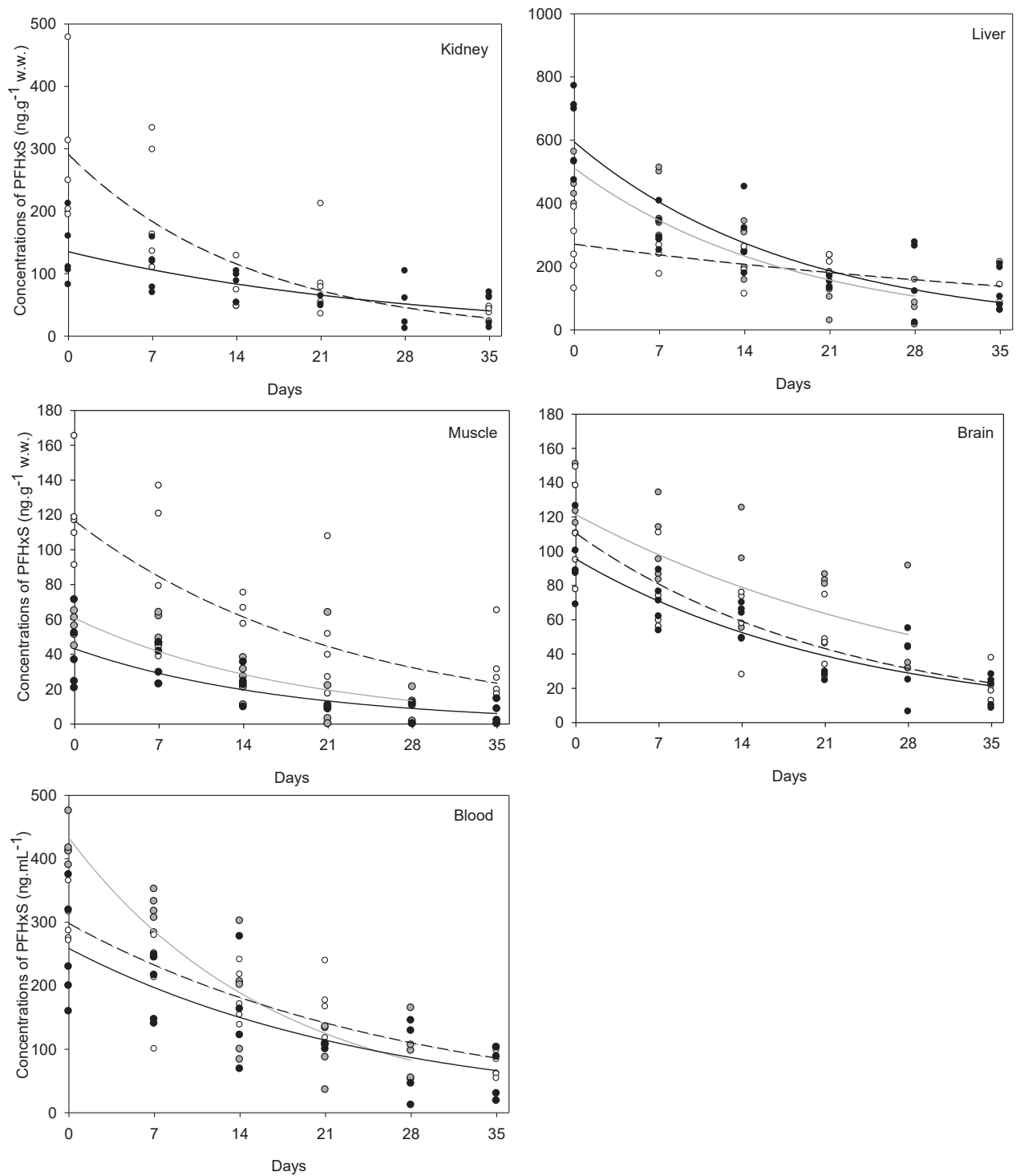


Figure S3. Depuration kinetics of PFHxS in blood, liver, muscle, brain and kidney of adult rainbow trout.

The open dots correspond to the 7°C experiment, the grey dots to the 11°C experiment and the black dots to the 19°C experiment. Dotted, grey and black lines are the exponential decay curves fitting concentrations measured during exposure to 7°C, 11°C and 19°C, respectively.



Annexes du chapitre 6

Annexe 1

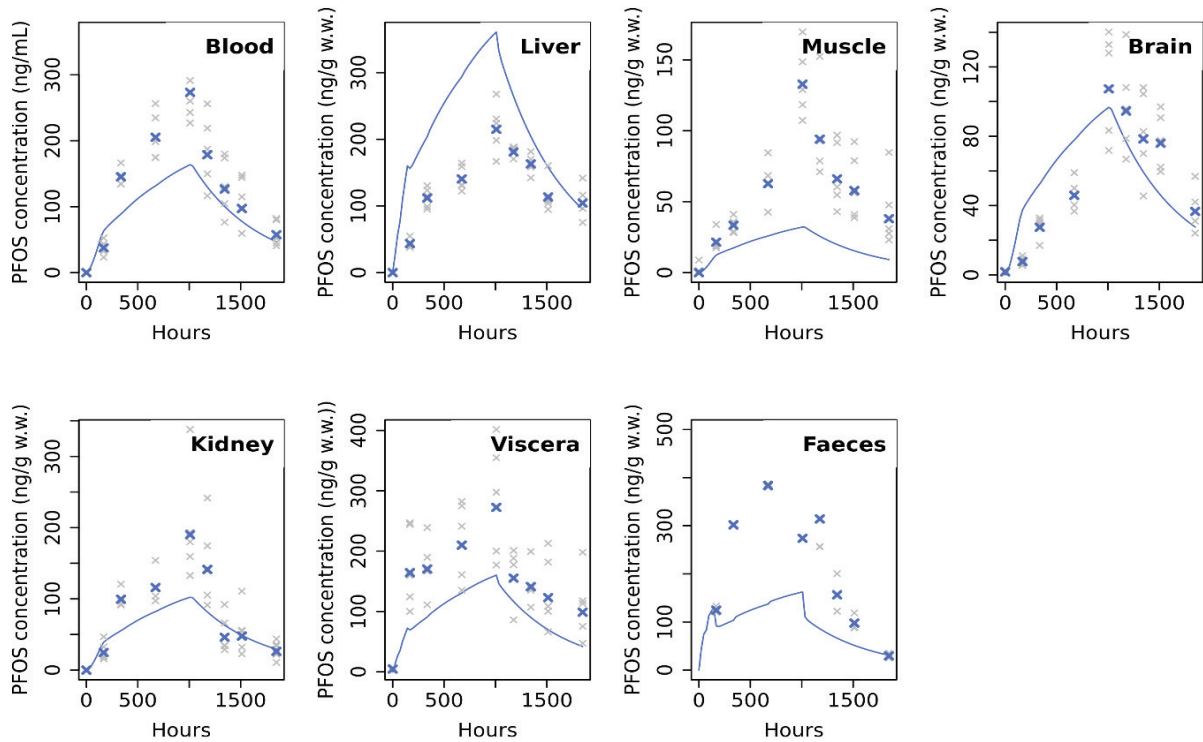


Figure A.1. Prédiction du modèle des concentrations en PFOS dans les organes et les fèces (lignes bleues), sans appliquer de correction par la température aux processus physiologiques.

Les croix bleues sont les moyennes géométriques des concentrations en PFOS mesurées à 7°C ($n=5$) et les croix grises sont les données observées pour chaque individu à 7°C.

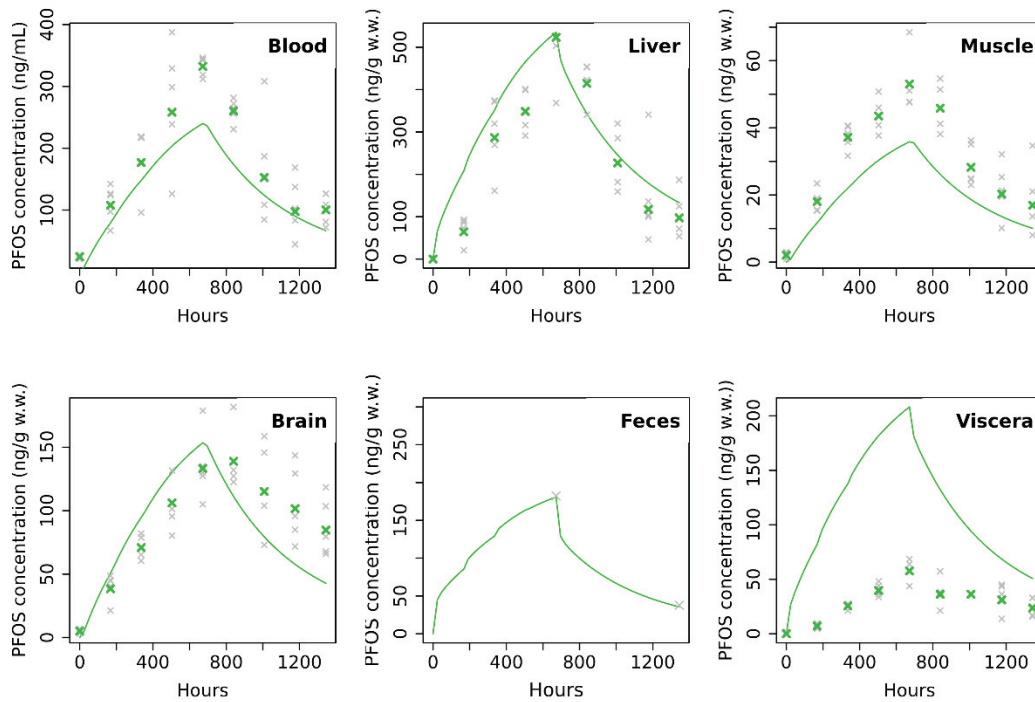


Figure A.2. Prédictions du modèle des concentrations en PFOS dans les organes et les fèces (lignes vertes), sans appliquer de correction par la température aux processus physiologiques.

Les croix vertes sont les moyennes géométriques des concentrations en PFOS mesurées à 11°C ($n=5$) et les croix grises sont les données observées pour chaque individu à 11°C.

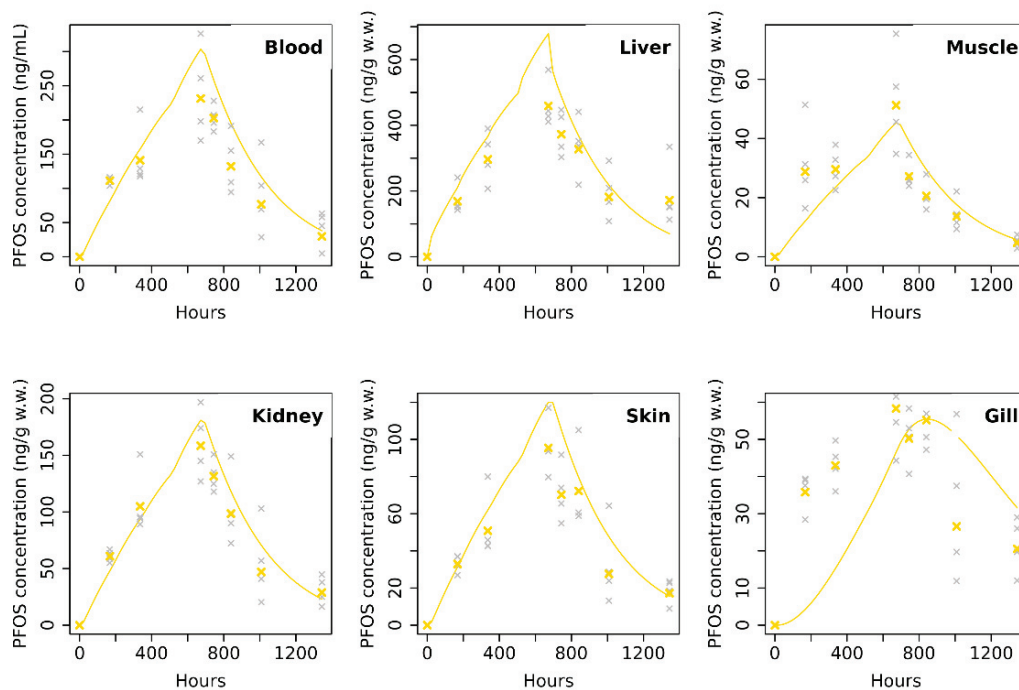


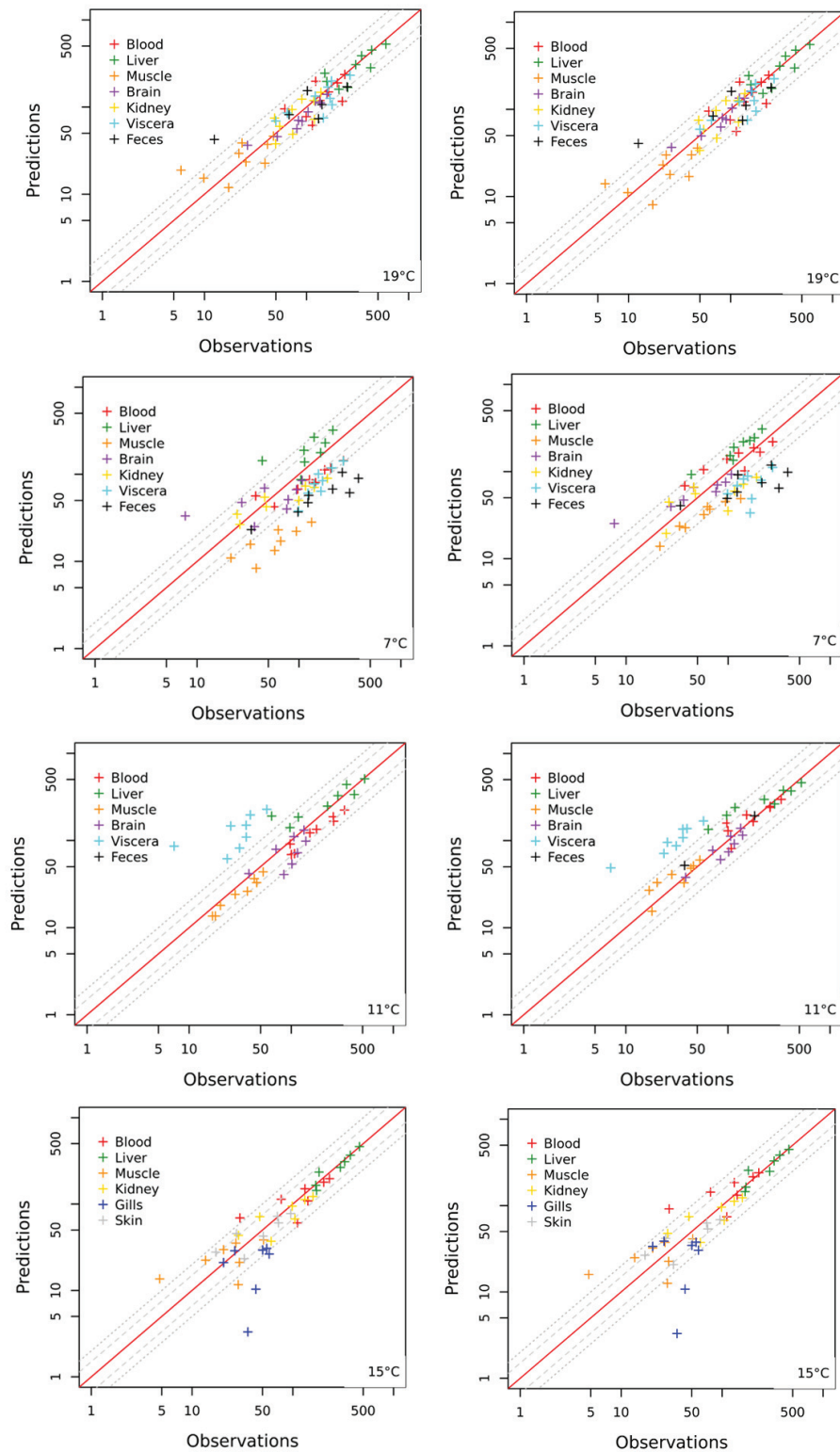
Figure A.3. Prédictions du modèle des concentrations en PFOS dans les organes et les fèces (lignes jaunes), sans appliquer de correction par la température aux processus physiologiques.

Les croix jaunes sont les moyennes géométriques des concentrations en PFOS mesurées à 15°C ($n=4$) et les croix grises sont les données observées pour chaque individu à 15°C.

Annexe 2

Figure A.1. Comparaison des prédictions du modèle PBTK *hypothèse 5*, avec les données observées des divers organes et des fèces, pour chacune des expériences (19°C, 7°C, 11°C & 15°C).

Les croix de couleur représentent les concentrations dans les différents organes, la ligne rouge est la ligne d'équation $x = y$ et les lignes grises représentent 50% et 100% d'erreur.



Annexe 3

Figure A.1. Comparaison des distributions *a priori* et *a posteriori* des paramètres calibrés pour l'hypothèse 2 du modèle *température*.

Pour tous les paramètres, la densité *a priori* est représenté par la courbe noire, les densités *a posteriori* de chaque chaîne (n=3, 20 000 itérations) sont représentées par les courbes bleues, rouges et vertes.

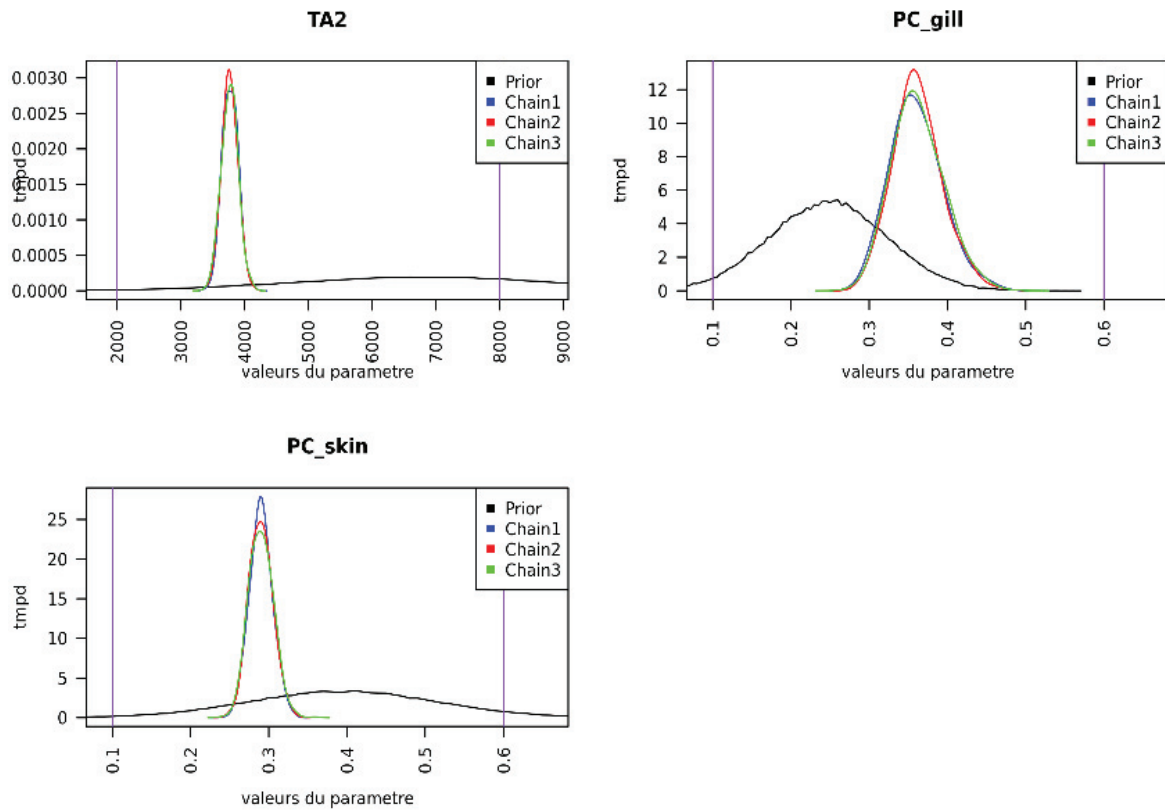


Figure A.2. Comparaison des distributions *a priori* et *a posteriori* des paramètres calibrés pour l'hypothèse 3 du modèle *température*.

Pour tous les paramètres, la densité *a priori* est représenté par la courbe noire, les densités *a posteriori* de chaque chaîne (n=3, 20 000 itérations) sont représentées par les courbes bleues, rouges et vertes.

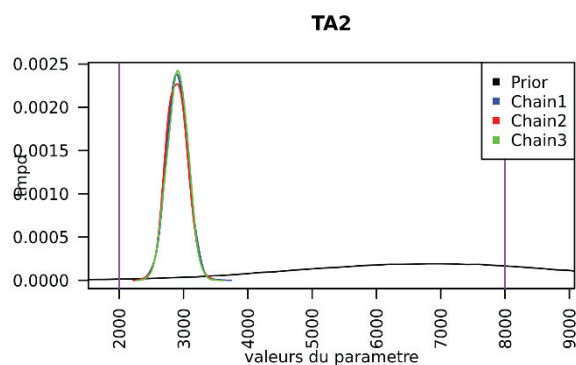


Figure A.3. Comparaison des distributions *a priori* et *a posteriori* des paramètres calibrés pour l'hypothèse 4 du modèle température.

Pour tous les paramètres, la densité *a priori* est représenté par la courbe noire, les densités *a posteriori* de chaque chaîne (n=3, 20 000 itérations) sont représentées par les courbes bleues, rouges et vertes.

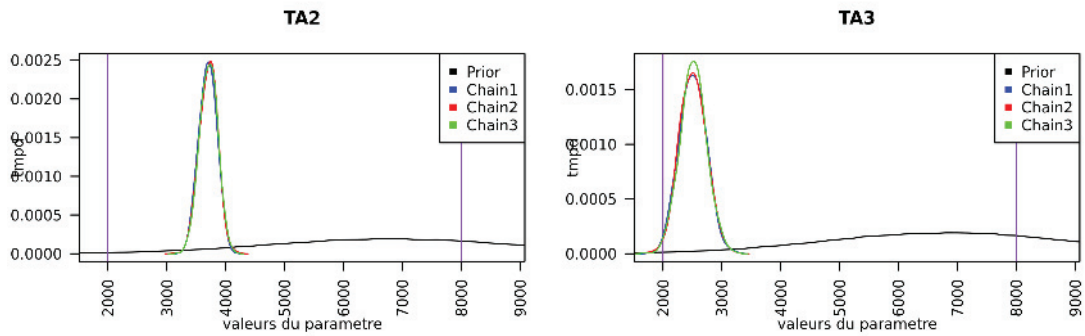
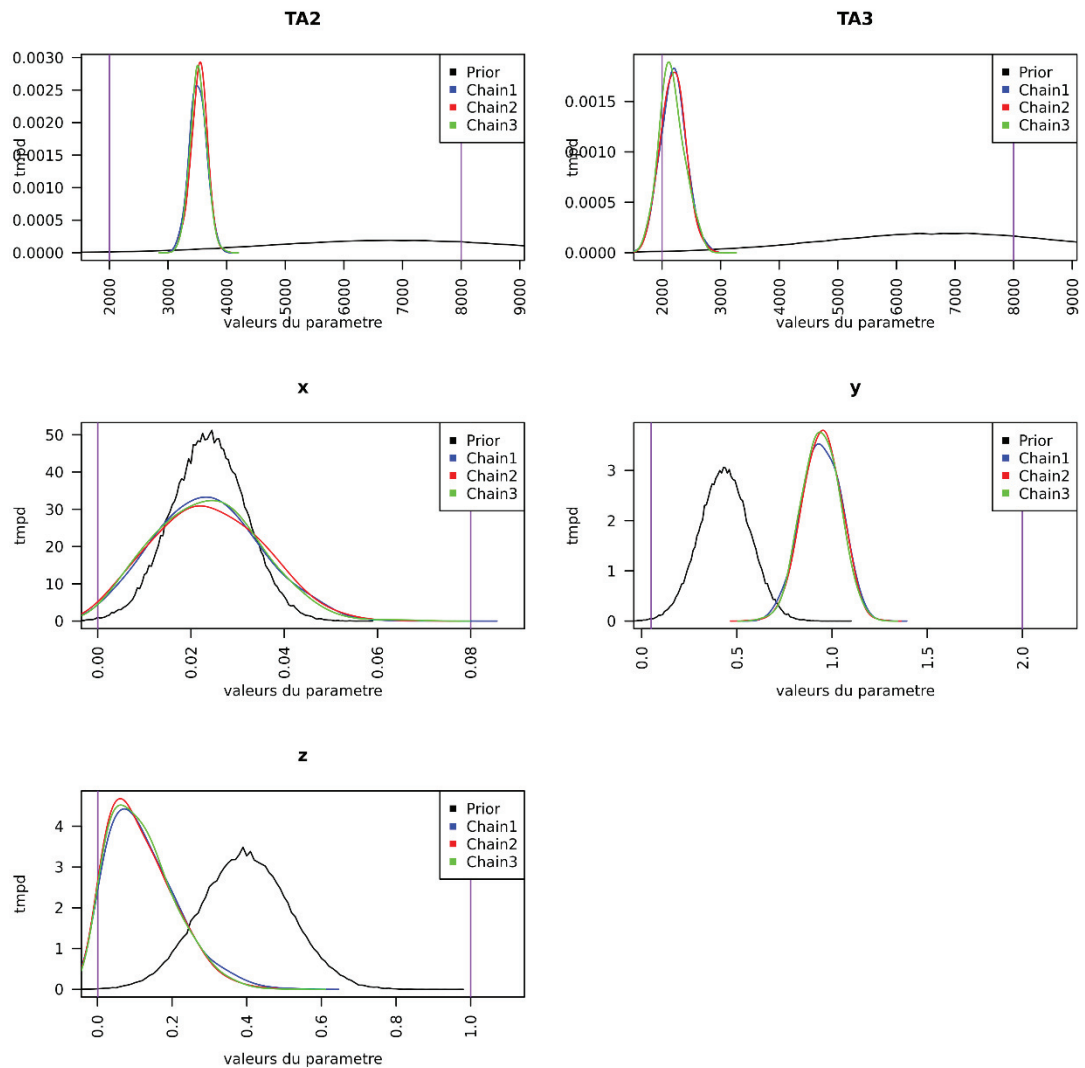


Figure A.4. Comparaison des distributions *a priori* et *a posteriori* des paramètres calibrés pour l'hypothèse 5 du modèle température.

Pour tous les paramètres, la densité *a priori* est représenté par la courbe noire, les densités *a posteriori* de chaque chaîne (n=3, 20 000 itérations) sont représentées par les courbes bleues, rouges et vertes.



Annexe 4

Tableau A.1. RMSE des concentrations en PFOS, calculés pour chaque hypothèse dans tous les organes et pour chacune des températures.

Somme représente la somme des RMSE de tous les organes pour une hypothèse à une température donnée.

Total représente la somme des 4 *somme* pour connaître quelle hypothèse est la meilleure dans sa globalité.

	Référence	Hypothèse 1	Hypothèse 2	Hypothèse 3	Hypothèse 4	Hypothèse 5
7°C						
Sang	67.21	64.2	45.88	39.39	44.93	39.82
Foie	76.11	86.3	73.9	138.8	66.48	65.17
Muscle	54.05	57.76	36.5	52.78	38.28	38.51
Cerveau	25.16	23.4	13.37	26.29	14.34	15.37
Reins	49.4	49.69	55.86	37.85	57.13	54.59
Viscères	84.74	83.97	94.29	74.18	96.49	104.5
Fèces	162.5	161.1	149.4	131.9	153.8	155
Somme	519.17	526.42	469.2	501.19	471.45	472.96
11°C						
Sang	62.27	54.92	42.84	34.35	42.2	33.95
Foie	69.6	81.28	77.98	111.4	74.25	71.81
Muscle	7.758	13.09	10.46	9.249	9.067	8.22
Cerveau	31.27	28.75	14.95	23.78	17.48	17.79
Viscères	109.8	108.6	92.52	113.8	89.1	77.97
Somme	280.70	286.64	238.75	292.58	232.10	209.74
15°C						
Sang	35.13	34.66	48.47	41.46	46.5	44.66
Foie	26.33	28.49	36.14	49.95	33.01	40.6
Muscle	10.88	11.99	12.7	12.14	12.58	11.97
Reins	25.31	24.5	27.82	24.53	28.8	26.2
Peau	12.25	11.92	16.6	14.44	16.41	15.89
Branchies	24.42	25.88	23.99	22.98	25.32	24.7
Somme	134.32	137.44	165.72	165.5	162.62	164.02
TOTAL	934.18	950.50	873.67	959.27	866.17	846.72