



**COMITE SCIENTIFIQUE
DE L'AGENCE FEDERALE POUR LA SECURITE
DE LA CHAINE ALIMENTAIRE**

AVIS 28-2008

Concerne: Comparaison des résultats d'analyses des dioxines (PCDD/F) et des PCB de type dioxine obtenus par les méthodes CALUX et GC-HRMS (dossier Sci Com N°2007/30 : auto-saisine).

Avis approuvé par le Comité scientifique le 10 octobre 2008.

Résumé

Le Comité scientifique s'est saisi d'un dossier pour évaluer si les résultats fournis par la méthode CALUX (Chemical Activated Luciferase gene eXpression) peuvent être utilisés en évaluation quantitative du risque dans les conditions d'utilisation de la méthode en Belgique. Le test biologique CALUX est une méthode de screening qui évalue le niveau de composés à activité dioxine présents dans un échantillon. Les échantillons suspects après ce premier screening sont confirmés par une méthode quantitative (GC-HRMS, Gas Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry).

Les résultats d'analyses du programme de contrôle de l'AFSCA 2005, 2006 et 2007 pour les produits laitiers, les œufs, le poisson, la graisse animale et l'huile végétale obtenus par la méthode CALUX et par la méthode GC-HRMS ont été comparés. Différentes hypothèses ont été formulées et investiguées pour expliquer les résultats divergents entre les deux méthodes.

Pour les matrices alimentaires analysées, les résultats du test biologique CALUX conduisent généralement à une surestimation par rapport aux résultats de l'analyse GC-HRMS, surtout aux faibles teneurs en contaminants. Le test CALUX présente, en revanche, des caractéristiques d'une bonne méthode de screening (faible taux de faux négatifs). Cependant, il ressort de cette étude que les résultats fournis par la méthode CALUX dans les conditions d'utilisation de la méthode en Belgique ne peuvent être utilisés en évaluation quantitative du risque lié à l'exposition alimentaire aux polychloro-dibenzo-p-dioxines, polychloro-dibenzofurannes (PCDD/F) et biphényles polychlorés de type dioxine (PCB DL). Ainsi, une estimation de l'exposition du consommateur aux dioxines et PCB DL ne peut être réalisée avec des données de tests de screening tel que le test CALUX. Cette méthode ne mesure pas spécifiquement les 17 congénères dioxines et 12 PCB DL.

En outre, le Comité scientifique recommande, lorsqu'une différence importante est détectée entre les méthodes CALUX et GC-HRMS, de réaliser des analyses chimiques plus poussées en vue de pouvoir identifier la nature d'éventuelles substances co-éluées avec l'activité dioxine.

Summary

Advice 28-2008 of the Scientific Committee of the FASFC on the comparison of analyses results of dioxins (PCDD/F) and dioxin-like PCBs obtained by the CALUX and GC-HRMS methods.

The Scientific Committee started a self tasking study to assess whether the results obtained by the CALUX method (Chemical Activated LUciferase gene eXpression), in terms of use of this method in Belgium, are appropriate to be used in quantitative risk assessment.

The CALUX biological test is a screening method that assesses the level of compounds with a dioxin activity present in a sample. Samples that are suspected after the first screening are subjected to a confirmation analysis by a quantitative method (GC-HRMS, Gas Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry).

The analytical results from the FASFC control program 2005, 2006 and 2007 for dairy products, eggs, fish, animal fat and vegetable oil, obtained by the CALUX and the GC-HRMS method, have been compared. Different assumptions were formulated and investigated in order to explain the divergent results between the two methods.

It was shown in general, that for the investigated foods, the biological CALUX-test results in an overestimation in comparison with the GC-HRMS analysis, especially for the low contamination levels. The CALUX test has on the other hand the characteristics of a good screening method (low percentage of false negatives). However, this study indicates that the results provided by the CALUX method under the Belgian conditions of use of the method are not appropriate to be used in a quantitative risk assessment of dietary exposure to polychloro-dibenzo-p-dioxines, polychloro-dibenzofuranes (PCDD/F) and dioxin-like polychlorinated biphenyls (DL PCB). The exposure of the consumer to dioxins and DL PCB's can not be estimated with the data of a screening method such as the CALUX method. This method does not measure specifically the 17 dioxins and 12 DL PCB congeners.

In addition, the Scientific Committee recommends, when a significant difference is detected between results obtained by the CALUX and the GC-HRMS method, to carry out further chemical analyses in order to identify the nature of any co-eluting substance with a dioxin activity.

Mots clés

Dioxines, PCB de type dioxine, CALUX, GC-HRMS, denrées alimentaires

1. Termes de référence

1.1. Objectif

L'objectif de ce dossier auto-saisine est d'évaluer si les résultats fournis par la méthode CALUX peuvent être utilisés en évaluation quantitative du risque dans les conditions d'utilisation de la méthode en Belgique.

1.2. Contexte législatif

REGLEMENT (CE) N° 1881/2006 de la Commission du 19 décembre 2006 portant fixation de teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires.

REGLEMENT (CE) N° 1883/2006 de la Commission du 19 décembre 2006 portant fixation des méthodes de prélèvement et d'analyse d'échantillons utilisées pour le contrôle officiel des teneurs en dioxines et en PCB de type dioxine de certaines denrées alimentaires.

RECOMMANDATION DE LA COMMISSION (2006/88/CE) du 6 février 2006 sur la réduction de la présence de dioxines, de furannes et de PCB dans les aliments pour animaux et les denrées alimentaires

DIRECTIVE 2002/70/CE de la Commission du 26 juillet 2002 établissant des prescriptions pour la détermination des teneurs en dioxines et en PCB de type dioxine des aliments des animaux.

ARRETE MINISTERIEL du 16 JANVIER 2006 portant fixation des critères pour les méthodes d'analyse pour le contrôle officiel des teneurs maximales en plomb, cadmium, mercure, 3-MCPD, dioxines et pour le dosage des PCB de type dioxine dans les denrées alimentaires.

ARRETE MINISTERIEL du 26 JANVIER 2006 portant fixation du mode de préparation des échantillons et des critères pour les méthodes d'analyse pour la détermination des teneurs en dioxines et en PCB de type dioxine dans les aliments des animaux.

Vu les discussions durant les réunions de groupe de travail du 10 décembre 2007, 19 février 2008, 21 mars 2008, 23 avril 2008, 4 juillet 2008, 26 septembre 2008 et la séance plénière du 10 octobre 2008.

le Comité scientifique émet l'avis suivant :

2. Introduction

Les polychloro-dibenzo-p-dioxines (PCDD) et les polychloro-dibenzofurannes (PCDF), communément appelés «dioxines» sont deux familles d'hydrocarbures aromatiques halogénés. Ces composés sont largement distribués et leurs propriétés lipophiles facilitent leur accumulation dans la chaîne alimentaire (Van Wouwe *et al.*, 2004). Dix-sept des 210 congénères appartenant au groupe des PCDD et PCDF sont connus pour être toxiques et contribuent à l'équivalence toxique (TEQ).

Il existe 209 congénères biphényles polychlorés (polychlorinated biphenyls, PCB) possibles dont 12 se caractérisent par des propriétés toxiques similaires aux dioxines (EFSA, 2005). Ces composés sont désignés par le terme «PCB de type dioxine» (dioxin-like PCB, DL-PCB ou PCB DL).

3. Description de la méthode CALUX

Il existe plusieurs méthodes de dosage des dioxines et des PCB de type dioxine (Scippo *et al.*, 2008). On distingue la méthode dite 'de référence' des méthodes alternatives ou de dépistage. La chromatographie gazeuse (GC) couplée à la spectrométrie de masse haute résolution (HRMS) est la méthode de référence pour identifier et quantifier les PCDD/F et les PCB DL à l'état de traces dans les matrices complexes. L'application de cette méthode et des facteurs d'équivalence toxique (TEF) est considérée comme la méthode la plus valide pour la détermination de la quantité d'équivalents toxiques de composés à activité dioxine. Parmi les méthodes de dépistage, on distingue les tests biologiques des méthodes physico-chimiques.

La biotechnologie a également été appliquée pour l'estimation de la quantité d'équivalents toxiques de dioxines. Cette estimation est alors réalisée par la mesure d'une réponse biologique comme l'activité enzymatique, l'expression de gène rapporteurs, la liaison ligand-récepteur ou la réaction antigène-anticorps. Ces méthodes de détection biocatalytique comme le test CALUX (Chemically activated luciferase gene expression), le test immunochimique Aryl hydrocarbon (Ah), EROD (7-ethoxyresorufin-O-deethylase) et enzymo-immuno-essais ont été proposés pour un dépistage de ces composés dans plusieurs matrices comme les denrées alimentaires, les sédiments, le sol et les cendres (JECFA, 2002).

Le test biologique le plus répandu est le test CALUX. Ce test fournit une réponse toxicologique globale exprimée en équivalence toxique (TEQ). Pour ne pas confondre avec les TEQ calculés dans le cas des analyses physico-chimiques (GC-MS), certains auteurs parlent de BEQ pour Bioanalytical Equivalents (Denison *et al.*, 2007). Les méthodes physico-chimiques alternatives à la HRMS sont la spectrométrie de masse basse résolution en tandem (MS/MS) et le couplage entre la chromatographie bidimensionnelle dite exhaustive, ou à deux dimensions (GCxGC), au *Time Of Flight Mass Spectrometry* (TOFMS). Ces méthodes sont peu utilisées pour les matrices alimentaires (Epe *et al.*, 2006).

Le test biologique Ah-CALUX (Aryl hydrocarbon -"Chemically activated luciferase gene expression") permet d'apprécier le degré d'activation du récepteur Ah. Ce test CALUX est basé sur une lignée cellulaire d'hépatocytes de souris dans le génome duquel a été introduit le gène de la luciférase de luciole (gène rapporteur) sous le contrôle d'une région promotrice contenant un élément de réponse aux dioxines (DRE). Un autre test, le DR-CALUX®, fonctionne sur le même principe mais la lignée cellulaire est différente (lignée cellulaire de rats). L'exposition de ces cellules à des composés de type dioxine entraîne la synthèse, conséquemment à l'activation de la transcription du gène rapporteur, d'une protéine, l'enzyme luciférase, qui en présence de ses substrats (ATP et luciférine), catalyse une émission de lumière par chemiluminescence. La quantité de lumière produite est proportionnelle au niveau de liaison du complexe ligand-récepteur Ah sur le DRE et donc à la quantité équivalente toxique en dioxines (TEQ) présente dans le milieu, et ce dans une certaine gamme de concentrations. La réponse (quantité de lumière) observée pour un échantillon inconnu est comparée aux réponses obtenues pour des concentrations connues en 2,3,7,8-TCDD, le composé de référence (courbe de calibration). L'intérêt de ce test est de réaliser un premier dépistage des échantillons (screening) en évaluant directement le niveau de TEQ présent dans un milieu. Seuls les échantillons suspects après ce premier screening seront confirmés par une analyse physico-chimique beaucoup plus coûteuse.

Certaines substances présentes dans l'environnement et dans l'organisme peuvent agir comme agonistes (HAPs, composés polybromés, certains polyphénols) ou antagonistes (PCB-OH, autres polyphénols) du récepteur Ah. Par conséquent, et si ces composés sont co-extraits lors de l'étape d'extraction - purification de l'échantillon, un résultat d'analyse obtenu par méthode CALUX peut être plus élevé (en présence d'agonistes additionnels) ou moins élevé (en présence d'antagonistes) qu'un résultat obtenu par méthode de confirmation GC-HRMS. Cette dernière méthode d'analyse ne mesurant spécifiquement que les 29 composés prévus dans la législation (7 dioxines, 10 furanes et 12 DL-PCBs, Règlement 1881/2006/CE).

En outre la signification biologique des dosages CALUX est limitée par le fait qu'en présence d'une concentration importante en composés de type dioxine, la réponse du test atteint la

saturation. Les résultats CALUX pour des échantillons avec des concentrations élevées dans l'extrait d'échantillon analysé ne doivent pas être considérés comme quantitatifs mais indicatifs d'une contamination importante.

Les "résultats CALUX" ne peuvent donc être comparés à ceux de la méthode de référence. Le test CALUX peut seulement servir de test de dépistage (screening) lors d'un contrôle rapide portant sur un grand nombre d'échantillons contaminés ou non. Si, le résultat du test CALUX montre que l'échantillon est suspecté de dépasser la concentration maximale tolérée, le résultat doit impérativement être confirmé par GC-HRMS (Règlement 1883/2006/CE et directive 2002/70/CE).

Par définition, une méthode de screening ne permet ni l'identification, ni la quantification précise des composés responsables de la réponse éventuellement observée. Une réponse anormalement élevée (comparativement à un seuil de décision propre à la méthode biologique) conduira à déclarer l'échantillon suspect d'être non conforme.

Seule la méthode de confirmation permettra d'identifier et de quantifier la présence de congénères appartenant au groupe des 29 molécules cibles de la législation.

La législation prévoit deux types de stratégies pour le screening à l'aide d'un bioassay:

- la méthode quantitative, qui compare le résultat d'un échantillon inconnu aux valeurs de référence d'une courbe de calibration réalisée avec de la 2,3,7,8-TCDD. Le résultat est donc une valeur chiffrée (appliqué en Belgique).
- la méthode qualitative, qui compare le résultat d'un échantillon inconnu avec celui d'un échantillon contrôle de référence, contaminé à la limite maximale autorisée. Le résultat sera alors «conforme» ou «suspect» (appliqué aux Pays-Bas).

Dans les deux cas, une limite de décision doit être établie pour déclarer un échantillon suspect.

De plus, plusieurs possibilités existent au niveau de la purification des échantillons.

Certains réalisent uniquement une colonne de silice acide qui permet de récupérer les 29 congénères ensemble (PCDD/PCDF et DL-PCBs), et une seule fraction est analysée sur les cellules. D'autres réalisent une purification plus poussée avec une colonne de silice acide et une colonne de charbon actif. Ils obtiennent alors deux fractions à analyser sur cellules: une fraction PCDD+PCDF et une fraction DL-PCBs.

Les résultats CALUX présentés dans l'avis ont été obtenus avec la lignée cellulaire de souris, en utilisant la méthode quantitative et en fractionnant les dioxines-furanes et les DL-PCBs.

Les tests biologiques fournissent des informations sur les effets toxicologiques et sont potentiellement plus efficaces et économiques dans l'évaluation des risques que les méthodes chimiques (Huie *et al.*, 2007).

La détermination des équivalents toxiques des dioxines est basée sur l'hypothèse que tous les composés à activité dioxine agissent par une voie de transduction du signal par le récepteur Ah. Il a été montré que la force de liaison des congénères au récepteur Ah est directement proportionnelle à la toxicité (Huie *et al.*, 2007).

Cependant, les résultats chiffrés des tests biologiques ne permettent pas de rencontrer directement la législation qui spécifie des limites maximales pour des valeurs d'équivalents toxiques correspondant à 29 molécules cibles, sans tenir compte d'autres contaminants dioxin-like potentiels tels que les composés polybromés par exemple.

4. Comparaison des résultats d'analyse CALUX et GC-HRMS

Le Comité scientifique a comparé les résultats d'analyse obtenus par la méthode de screening CALUX avec les résultats d'analyse obtenus par la méthode GC-HRMS pour les dioxines, les PCB DL et la somme des dioxines et des PCB de type dioxine pour les matrices alimentaires suivantes: produits laitiers, œufs, poisson, graisse animale et huile végétale. La matrice «produits laitiers» comprend le lait de vache, le lait de chèvre, le lait de jument, le beurre, le fromage et le yaourt. La matrice «graisse animale» comprend la graisse et la viande de bœuf, de veau, de porc, de volaille, de mouton et de cheval. Cette comparaison a

été effectuée sur base des données de 2005, 2006 et 2007 provenant du programme de contrôles de l'AFSCA.

La méthode GC-HRMS donne un résultat par congénère. La concentration exprimée en équivalents toxiques (TEQ) est calculée en faisant la somme, pour tous les congénères à activité de type dioxine, du produit de la concentration du congénère (mesurée par GC-HRMS) par le facteur d'équivalence toxique (TEF) correspondant.

Pour les congénères indétectables, les valeurs assignées au calcul de la TEQ peuvent être fixées à 0 (lower bound), à la moitié de la limite de quantification (LOQ)¹ (middle bound) ou à la valeur de la LOQ (upper bound). Les valeurs inférieures à la limite de quantification ont été fixées à la moitié de la LOQ (approche middle bound) pour les analyses statistiques effectuées dans le cadre de cet avis.

Les résultats d'analyse obtenus par la méthode CALUX, qui sont supérieurs à la limite d'action (c'est à dire supérieurs à 70% de la limite maximale), doivent être confirmés par une méthode quantitative GC-HRMS. Il est remarqué que la plupart des résultats GC-HRMS sont des confirmations des résultats d'analyse CALUX. Il y a donc, dans la base de données utilisée, une proportion relativement importante d'échantillons caractérisés par des teneurs plutôt élevées en dioxines. Le nombre d'échantillons analysés pour différentes matrices, le pourcentage d'échantillons inférieurs à la limite d'action, le pourcentage d'échantillons supérieurs à la limite maximale autorisée et les pourcentages de faux positifs et négatifs sont présentés au tableau 1 pour les dioxines et les furannes (PCDD/F) 1 et au tableau 2 pour la somme des dioxines et des PCB DL (PCDD/F + PCB DL). Excepté pour le poisson, on constate qu'il y a relativement peu d'échantillons dont la teneur est inférieure à la limite d'action dans le tableau 1. Les tableaux 1 et 2 montrent aussi que le nombre de faux négatifs est bas et le nombre de faux positifs est relativement élevé. Le fait que le nombre de faux négatifs est bas démontre qu'on peut avoir confiance en la méthode. D'autre part, le grand nombre de faux positifs n'est pas un problème, puisqu'il y a encore une confirmation par GC-HRMS. La méthode CALUX remplit donc les conditions d'une méthode de screening.

Tableau 1: Caractéristiques des échantillons analysés pour le paramètre **dioxine (PCDD/F)** par les méthodes GC-HRMS et CALUX

	Dairy product	Egg	Fish	Animal fat	Vegetable oil
Number of samples	53	25	28	127	38
% < action level	32	48	86	34	37
% > maximal level	3	0	4	13*	0
% false positive	28	28	7	39	45
% false negative	2	0	0	0	0

* Maximal level for mixtures of animal fats

La matrice «graisse animale» comprend la graisse et la viande de bœuf, de veau, de porc, de volaille, de mouton et de cheval. La limite maximale étant différente pour les aliments qui composent cette matrice, c'est la limite maximale de la graisse animale mélangée qui a été prise.

¹ Limite de quantification (LOQ) est la plus faible quantité mesurée d'un analyte au dessus de laquelle un analyte peut être quantifié avec un certain degré de certitude et de précision.

Tableau 2: Caractéristiques des échantillons analysés pour le paramètre **dioxine (PCDD/F)+ PCB DL** par les méthodes GC-HRMS et CALUX

	Dairy product	Egg	Fish	Animal fat	Vegetable oil
Number of samples	45	22	21	96	27
% < reporting level ¹	7	36	62	23	15
% > maximal level	29	0	14	26*	0
% false positive	16	0	5	28	56
% false negative	2	0	0	0	0

* Maximal level for mixtures of animal fats

¹ The reporting level is comparable with the quantification limit, but it is higher.

Les concentrations moyennes et médianes en dioxines obtenues par la méthode CALUX sont de manière générale plus élevées que celles mesurées par la méthode GC-HRMS (tableau 3). Les résultats des échantillons analysés par les deux méthodes ont été comparés statistiquement avec le "Wilcoxon matched-pairs signed-rank test" (test de Wilcoxon pour des observations appariées). Pour ce test non-paramétrique, les résultats sont plus fiables pour un plus grand nombre d'échantillons. La comparaison statistique montre que les résultats obtenus par les 2 méthodes sont significativement différents ($p < 0,05$) à l'exception de la somme des dioxines et PCB DL dans le poisson (tableau 4). Mais pour les deux matrices, le nombre d'échantillons est plus faible.

Tableau 3: Moyennes et médianes des concentrations en dioxines et de la somme des dioxines et PCB DL (en pg TEQ/g fat) obtenues par les méthodes CALUX et GC-HRMS pour différentes matrices alimentaires (données programmation AFSCA 2005, 2006 et 2007)

	Dioxins		Dioxins + DL PCB	
	CALUX ¹	GC-HRMS ²	CALUX ³	GC-HRMS ⁴
	Mean (median)	Mean (median)	Mean (median)	Mean (median)
Dairy product	3,41 (2,79)	1,43 (0,98)	31,36 (4,84)	31,58 (3,18)
Egg	1,97 (2,10)	0,95 (0,63)	3,62 (4,15)	1,54 (0,83)
Fish⁵	1,69 (0,50)	0,59 (0,36)	4,19 (1,52)	2,87 (0,76)
Animal fat	2,30 (2,04)	0,95 (0,51)	3,79 (3,35)	2,62 (1,28)
Vegetable oil	0,77 (0,57)	0,17 (0,13)	1,84 (1,93)	0,31 (0,26)

¹ PCDD/PCDF measured with bio-assay (TEQ values)

² PCDD/PCDF measured with GC-HRMS (TEQ values)

³ PCDD/PCDF measured with bio-assay (TEQ values) + dioxin-like PCB's measured with bio-assay (TEQ value)

⁴ PCDD/PCDF measured with GC-HRMS + dioxin-like PCB's measured with GC-HRMS

⁵ Values expressed in pg TEQ/g fish

Tableau 4: Comparaison statistique des résultats des analyses des dioxines et de la somme des dioxines et PCB DL obtenus par les méthodes CALUX et GC-HRMS (données programmation AFSCA 2005, 2006 et 2007)

	p value dioxins analyse	p value dioxins + DL PCB analyse
Dairy product	<0,01	<0,01
Eggs	<0,01	<0,01
Fish	<0,01	0,08
Animal fat	<0,01	<0,01
Vegetable oil	<0,01	<0,01

The comparison does not take the measurement uncertainty into account.

5. Investigation d'hypothèses concernant des résultats divergents entre les méthodes CALUX et GC-HRMS

Différentes hypothèses sont émises pour expliquer les différences entre les résultats obtenus par les méthodes CALUX et GC-HRMS. Une première hypothèse serait que *in vitro*, on ne peut pas utiliser les facteurs d'équivalences toxiques (TEF) mais les valeurs de puissance relative (relative potency, REP).

Les valeurs REP CALUX sont des facteurs d'équivalence toxique des congénères mesurées dans le test biologique CALUX. Elles représentent le potentiel des congénères spécifiques pour activer le récepteur Ah, par rapport au potentiel de la 2,3,7,8-TCDD.

Pour l'analyse biologique, les valeurs REP peuvent être considérées comme équivalentes aux TEF. Mais à l'opposé des TEF qui sont dérivés d'une méta-analyse d'études de toxicité réalisées à la fois *in vitro* et *in vivo* (Van den Berg *et al.*, 1998, 2006), les valeurs REP sont calculées directement avec le test CALUX en divisant l'EC50 (medium effective concentration) de la courbe dose-réponse de la 2,3,7,8 TCDD par l'EC50 de la courbe du composé testé. Les valeurs REP sont spécifiques de la lignée cellulaire et diffèrent légèrement des valeurs TEF (Van Wouwe *et al.*, 2004, Scippo *et al.*, 2004).

La valeur CALUX-TEQ attendue est déterminée en multipliant les concentrations de chaque congénère, mesurées par GC-HRMS, avec la valeur REP correspondante. La valeur OMS 1998-TEQ est obtenue en multipliant les concentrations de chaque congénère, mesurées par GC-HRMS, avec la valeur TEF correspondante. Vu que Van Wouwe *et al.* (2004) ont montré que les résultats CALUX-TEQ expérimentaux sont plus proches des concentrations CALUX-TEQ attendues que des concentrations OMS-TEQ dans le sang humain, la valeur CALUX-TEQ attendue a été introduite comme un autre outil de comparaison avec les valeurs OMS-TEQ et CALUX expérimental.

Une autre piste concerne le fait que la méthode CALUX peut mesurer quelque chose de différent que la GC-HRMS et ainsi donner des discordances voire des résultats totalement différents (outliers).

Ces 2 hypothèses ont été vérifiées par les tests de comparaison présentés ci-dessous.

5.1 Comparaison statistique des moyennes des résultats obtenus par les méthodes CALUX et GC-HRMS (CALUX attendu, CALUX expérimental, OMS 1998-TEQ)

Le Comité scientifique a comparé les concentrations OMS 1998-TEQ, les concentrations CALUX-TEQ expérimentales et les concentrations CALUX-TEQ attendues pour les dioxines (tableau 5), les PCB de type dioxine (tableau 6) et la somme des dioxines et des PCB de type dioxine (tableau 7) dans différentes matrices alimentaires analysées dans le cadre du programme de contrôle de l'AFSCA en 2005, 2006 et 2007. Les valeurs REP utilisées sont celles correspondant à la lignée cellulaire de souris.

La comparaison statistique a été effectuée avec le "Wilcoxon matched-pairs signed-ranks test" (test de Wilcoxon pour des observations appariées).

La comparaison statistique montre une différence significative entre la méthode CALUX et la méthode GC-HRMS pour la plupart des matrices (tableau 4). Pour les dioxines (tableau 5), les valeurs CALUX-TEQ attendues sont cependant beaucoup plus proches des valeurs OMS-TEQ que des valeurs CALUX-TEQ expérimentales. La comparaison statistique (tableau 8) montre cependant les valeurs CALUX attendues et GC-HRMS restent toutes significativement différentes ($p < 0,05$).

Pour les dioxines, la moyenne (ou médiane) des concentrations CALUX-TEQ attendues est souvent légèrement plus élevée que la moyenne (ou médiane) des concentrations OMS-TEQ. Ceci peut s'expliquer partiellement par des valeurs REP plus élevées que les valeurs OMS-TEF (annexe 1). Les mêmes observations ont été faites par Carboneille *et al.* (2004).

Les écarts entre la moyenne (ou médiane) des concentrations CALUX-TEQ attendues et la moyenne (ou médiane) des concentrations OMS-TEQ sont plus importants pour les PCB DL que pour les dioxines. Il ressort du tableau 6 que les concentrations CALUX-TEQ attendues sont plus basses que les concentrations OMS-TEQ. Ceci peut être dû au fait que certaines valeurs REP pour les PCB DL sont plus basses que les valeurs OMS-TEF (annexe 1). Les concentrations CALUX-TEQ expérimentales sont systématiquement plus élevées que les concentrations CALUX-TEQ attendues. Carboneille *et al.* (2004) ont observé que les concentrations CALUX expérimentales ainsi que les concentrations CALUX attendues sont significativement plus basses que les concentrations OMS-TEQ, ce qui indique une sous estimation de la réponse CALUX par rapport aux résultats de l'analyse chimique. La comparaison statistique (tableau 8) montre une différence significative ($p < 0,05$) entre les résultats CALUX attendus et CALUX expérimentaux pour les dioxines, les PCB DL et la somme des dioxines et PCB DL. La comparaison statistique entre les résultats CALUX attendus et GC-HRMS montre également une différence significative pour les PCB DL.

Tableau 5: Moyennes et médianes des dioxines (TEQ) obtenus par les méthodes CALUX et GC-HRMS. (données du programme de contrôle de l'AFSCA 2005, 2006 et 2007)

	Mean (median) of expected CALUX-TEQ ¹	Mean (median) of experimental CALUX-TEQ ²	Mean (median) of WHO 1998-TEQ ³
Dairy product	1,60 (1,09)	3,41 (2,79)	1,43 (0,98)
Egg	1,11 (0,69)	1,97 (2,10)	0,95 (0,63)
Fish	0,61 (0,35)	1,69 (0,50)	0,59 (0,36)
Animal fat	1,04 (0,55)	2,30 (2,04)	0,95 (0,51)
Vegetable oil	0,21 (0,16)	0,77 (0,57)	0,17 (0,13)

¹ Expected CALUX TEQ (pg/g fat or pg/g fish) = $\sum \text{conc}_i \times \text{REP}_i$

² Experimental CALUX TEQ (bio-assay TEQ-value) (pg/g fat or pg/g fish)

³ WHO-TEQ (pg/g fat or pg/g fish) = $\sum \text{conc}_i \times \text{TEF}_i$

Tableau 6: Moyennes et médianes des PCB de type dioxine (TEQ) obtenus par la méthode CALUX et GC-HRMS (données du programme de contrôle de l'AFSCA 2005, 2006 et 2007)

	Mean (median) of expected CALUX-TEQ ¹	Mean (median) of experimental CALUX-TEQ ²	Mean (median) of WHO 1998-TEQ ³
Dairy product	8,55 (0,74)	28,08 (1,98)	30,14 (1,71)
Egg	0,24 (0,19)	1,58 (1,50)	0,58 (0,38)
Fish	0,61 (0,16)	2,34 (1,00)	2,19 (0,38)
Animal fat	0,61 (0,24)	1,57 (1,24)	1,67 (0,64)
Vegetable oil	0,07 (0,07)	1,03 (0,63)	0,12 (0,09)

¹ Expected CALUX TEQ (pg/g fat or pg/g fish) = $\sum \text{conc}_i \times \text{REP}_i$

² Experimental CALUX TEQ (bio-assay TEQ-value) (pg/g fat or pg/g fish)

³ WHO-TEQ (pg/g fat or pg/g fish) = $\sum \text{conc}_i \times \text{TEF}_i$

Tableau 7: Moyennes et médianes des dioxines et des PCB de type dioxine (TEQ) obtenus par les méthodes CALUX et GC-HRMS (données du programme de contrôle de l'AFSCA 2005, 2006 et 2007)

	Mean (median) of expected CALUX-TEQ ¹	Mean (median) of experimental CALUX-TEQ ²	Mean (median) of WHO 1998-TEQ ³
Dairy product	10,18 (2,01)	31,36 (4,84)	31,58 (3,18)
Egg	1,36 (0,82)	3,62 (4,15)	1,54 (0,83)
Fish	1,31 (0,47)	4,19 (1,52)	2,87 (0,76)
Animal fat	1,66 (1,00)	3,79 (3,35)	2,62 (1,28)
Vegetable oil	0,29 (0,25)	1,84 (1,93)	0,31 (0,26)

¹ Expected CALUX TEQ (pg/g fat or pg/g fish)= $\sum \text{conc}_i \times \text{REP}_i$

² Experimental CALUX TEQ (bio-assay TEQ-value) (pg/g fat or pg/g fish)

³ WHO-TEQ (pg/g fat or pg/g fish)= $\sum \text{conc}_i \times \text{TEF}_i$

Tableau 8: Comparaison statistique des résultats dioxines, PCB DL et de la somme des dioxines et PCB DL obtenus par les méthodes CALUX et GC-HRMS. (données du programme de contrôle de l'AFSCA 2005, 2006 et 2007)

	Comparison expected CALUX and experimental CALUX ¹	Comparison expected CALUX and WHO 1998-TEQ ¹	Comparison expected CALUX and experimental CALUX ¹	Comparison expected CALUX and WHO 1998-TEQ ¹	Comparison expected CALUX and experimental CALUX ¹	Comparison expected CALUX and WHO 1998-TEQ ¹
	p value Dioxines		p value PCB DL		p value Dioxines+ DL PCB	
Dairy product	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Egg	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Fish	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Animal fat	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Vegetable oil	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01

¹Wilcoxon matched-pairs sign-rank test

De cette comparaison il ressort que les valeurs CALUX expérimentales montrent, dans le cas des dioxines, une meilleure concordance avec les données expérimentales GC-HRMS lorsque celles-ci sont traitées en utilisant les facteurs REP plutôt que TEF. Cependant, une tendance inverse est observée dans le cas des PCB DL. En outre, l'analyse statistique indique que les données obtenues par les deux méthodes restent significativement différentes.

5.2. Analyse de la concordance ou divergence entre les méthodes CALUX et GC-HRMS (CALUX attendu, CALUX expérimental, OMS 1998-TEQ) suivant la méthode de Petrie & Watson (2006)

La concordance entre les méthodes CALUX et GC-HRMS a été quantifiée suivant l'approche recommandée par Petrie & Watson (2006). La différence *d* relative entre 2 mesures a été calculée. Les valeurs s'écartant de plus de 3 écarts type par rapport à la différence moyenne ont été analysées en détail. Ces échantillons sont identifiés par des croix dans les figures ci-dessous. Les profils des dioxines et des PCB DL dans ces échantillons sont présentés à l'annexe 2.

Produits laitiers

Pour l'analyse des dioxines et la somme dioxines et PCB DL, la différence relative entre les deux méthodes se trouve dans respectivement deux et un échantillons de lait de jument, hors de la limite moyenne ± 3 fois l'écart type.

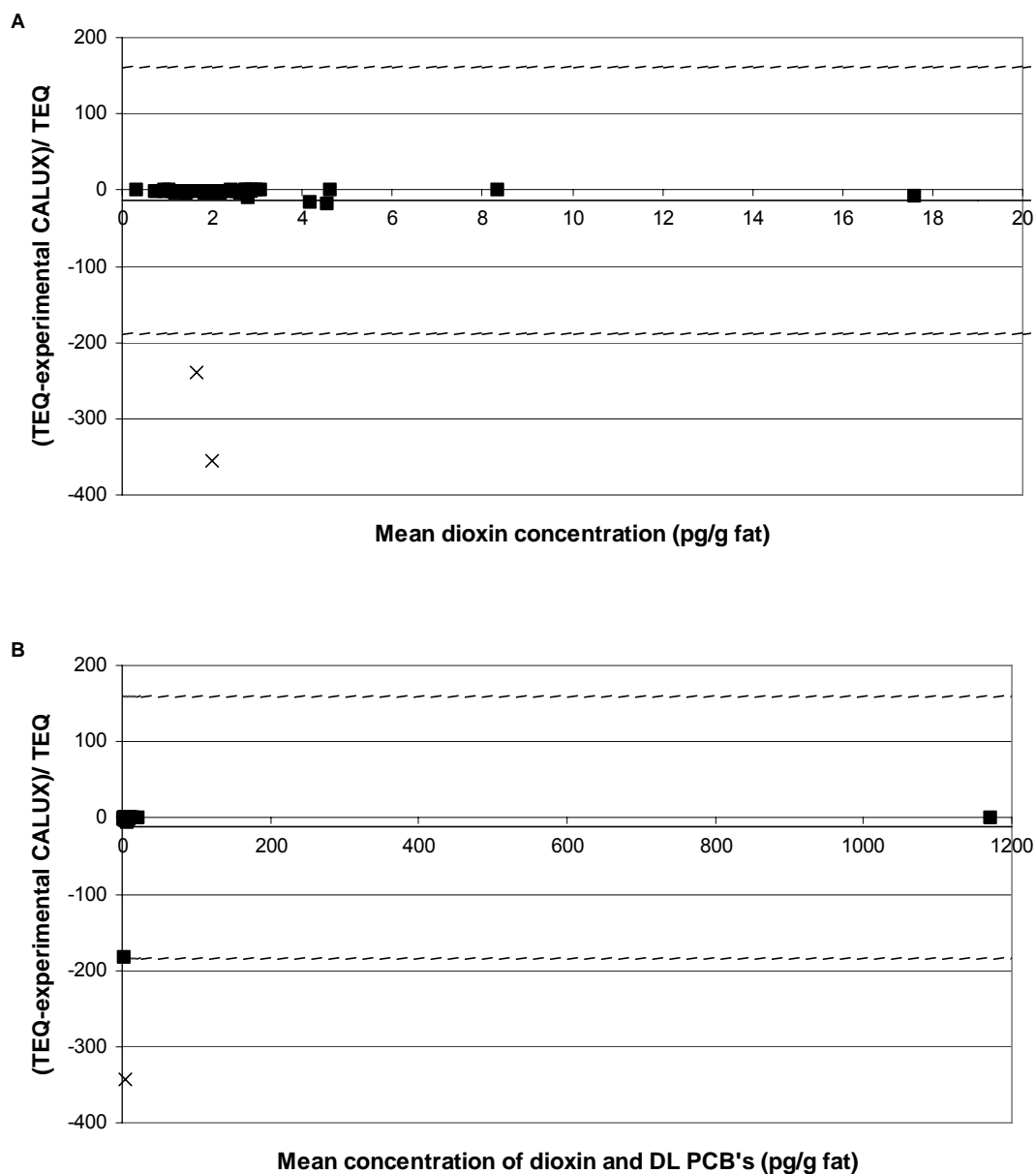


Figure 1 : Différence relative entre la concentration OMS-TEQ déterminée par la méthode GC-HRMS et la concentration CALUX -TEQ expérimentale (axe des ordonnées) pour les produits laitiers en fonction de la moyenne des concentrations obtenues par les deux méthodes (axe des abscisses) pour les dioxines (A) et pour la somme dioxines et PCB DL (B) (■ différence relative, x valeur extrême de d, —moyenne de d, ---- moyenne de d ± 3 fois l'écart type)

Poisson

Pour l'analyse des dioxines et des PCB DL dans un échantillon de crustacé, la différence relative entre les deux méthodes se trouve hors de la limite moyenne ± 3 fois l'écart type.

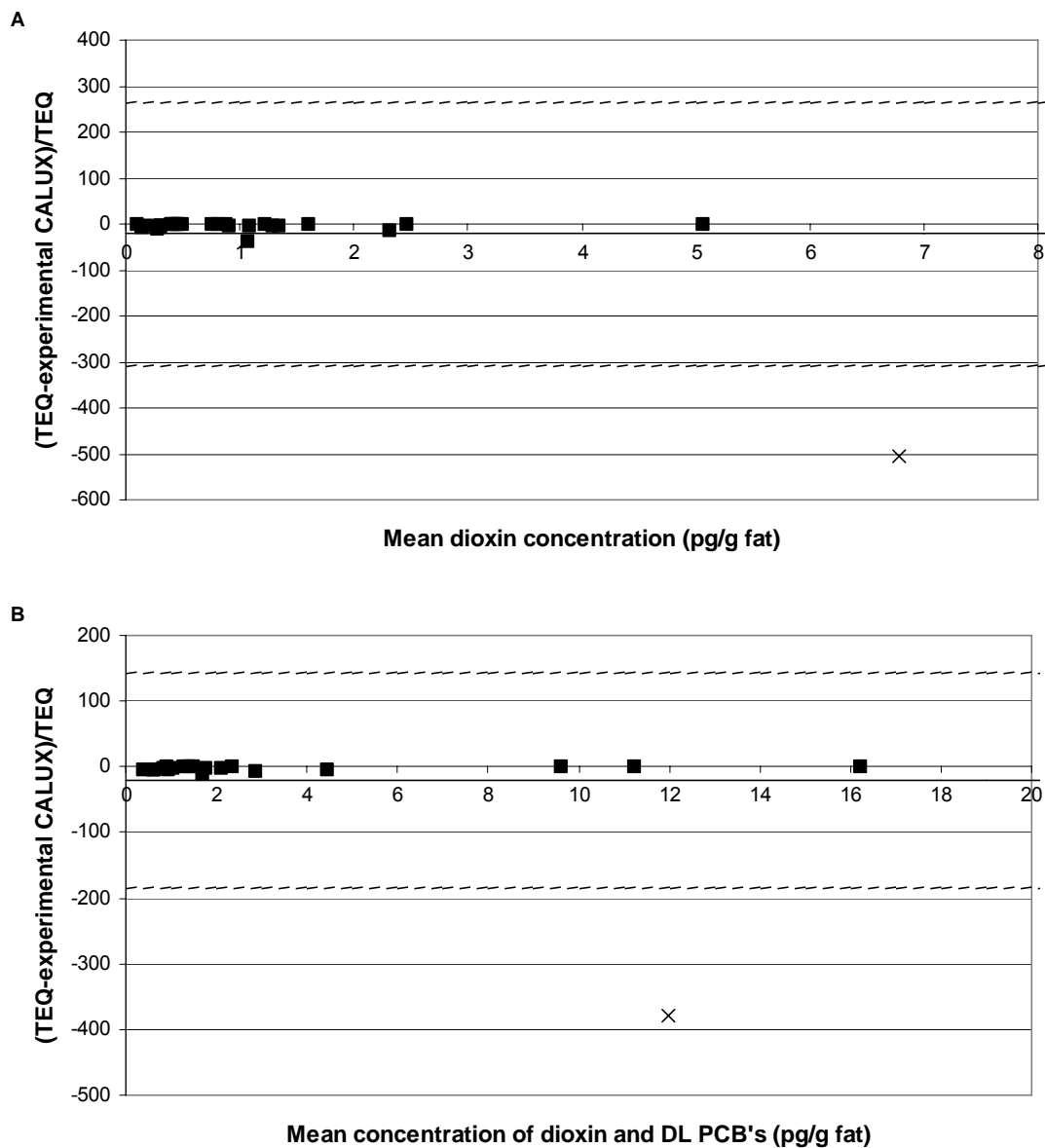


Figure 2 : Différence relative entre la concentration OMS-TEQ déterminée par la méthode GC-HRMS et la concentration CALUX -TEQ expérimentale (axe des ordonnées) pour le poisson en fonction de la moyenne des concentrations obtenues par les deux méthodes (axe des abscisses) pour les dioxines (A) et pour la somme dioxines et PCB DL (B) (■ différence relative, x valeur extrême de d, — moyenne de d, ---- moyenne de d ± 3 fois l'écart type)

Graisse animale

Pour l'analyse des dioxines dans un échantillon de graisse animale, la différence relative entre les deux méthodes se trouve hors de la limite moyenne ± 3 fois l'écart type. Pour l'analyse des PCB DL dans un échantillon de viande de mouton, de graisse de bœuf, de volaille et de graisse de volaille la différence relative entre les deux méthodes se trouve hors de la limite moyenne ± 3 fois l'écart type. Pour la somme des dioxines et des PCB DL, la différence relative entre les deux méthodes se trouve hors de la limite moyenne ± 3 fois l'écart type dans un échantillon de volaille et un échantillon de graisse animale.

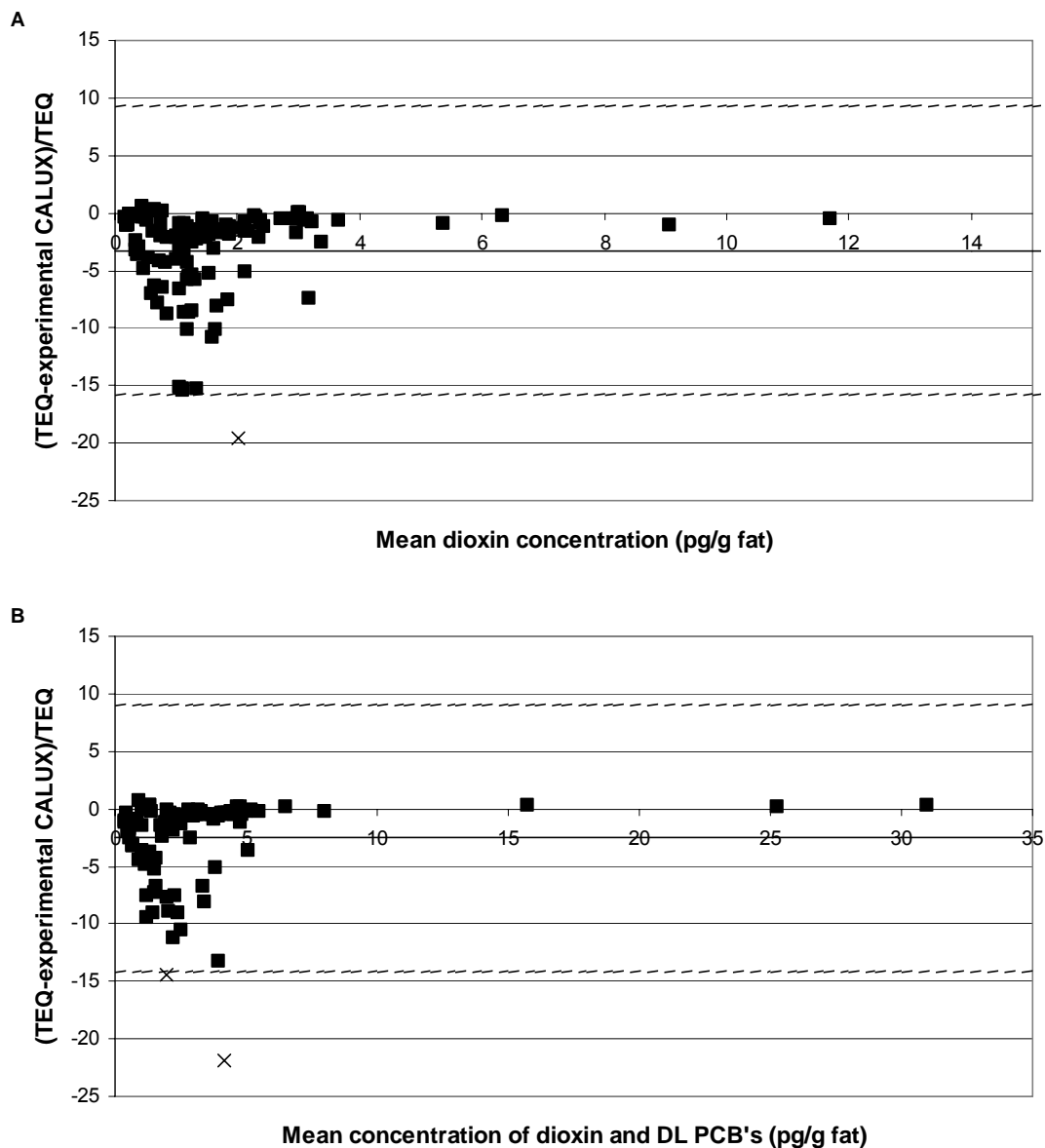


Figure 3 : Différence relative entre la concentration OMS-TEQ déterminée par la méthode GC-HRMS et la concentration CALUX -TEQ expérimentale (axe des ordonnées) pour la graisse animale en fonction de la moyenne des concentrations obtenues par les deux méthodes (axe des abscisses) pour les dioxines (A) et pour la somme dioxines et PCB DL (B) (■ différence relative, x valeur extrême de d, — moyenne de d, ---- moyenne de d ± 3 fois l'écart type)

Huile végétale

Pour l'analyse des dioxines dans un échantillon d'huile végétale, la différence relative entre les deux méthodes se trouve hors de la limite moyenne ± 3 fois l'écart type.

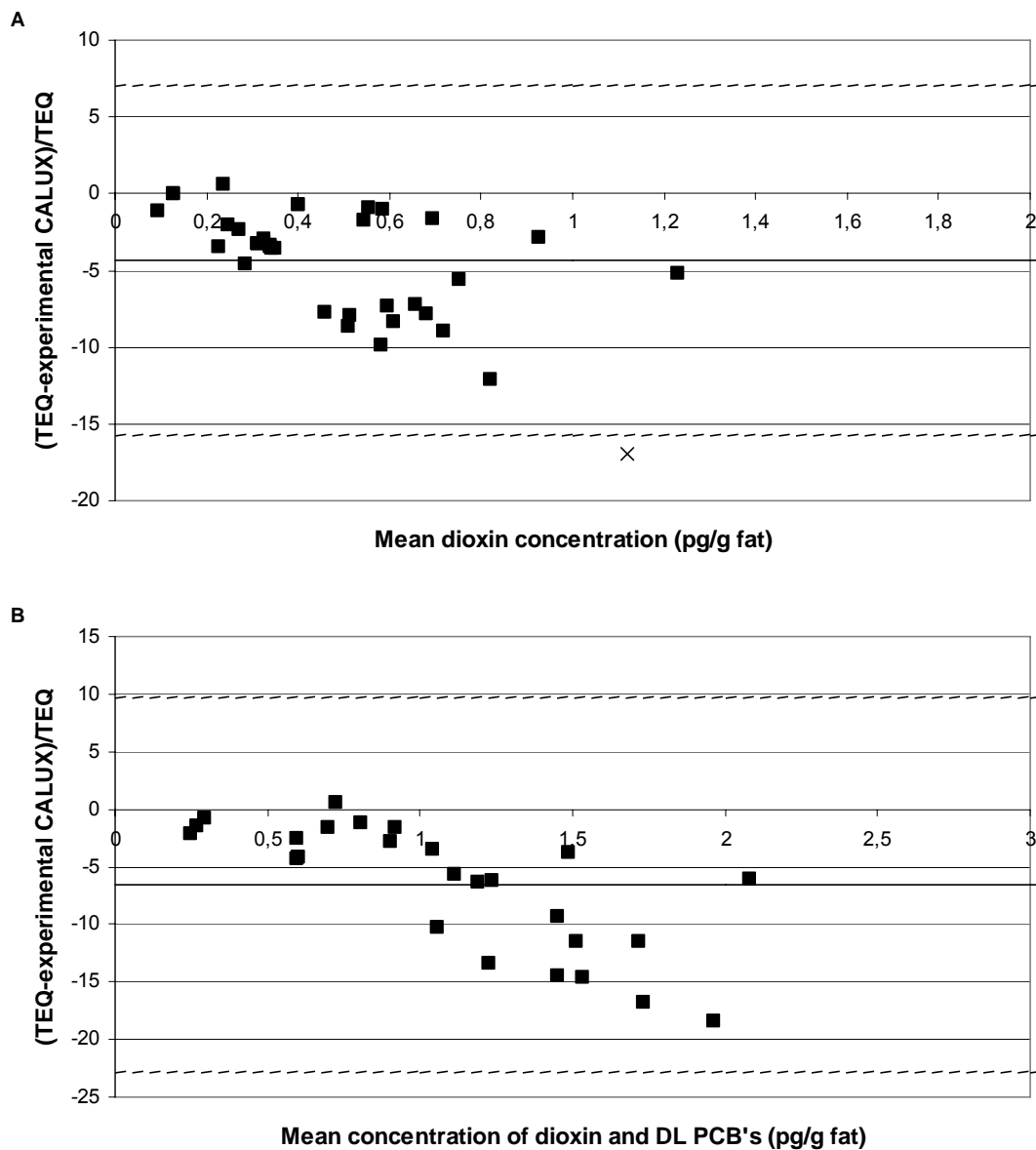


Figure 4 : Différence relative entre la concentration OMS-TEQ déterminée par la méthode GC-HRMS et la concentration CALUX -TEQ expérimentale (axe des ordonnées) pour l'huile végétale en fonction de la moyenne des concentrations obtenues par les deux méthodes (axe des abscisses) pour les dioxines (A) et pour la somme dioxines et PCB DL (B) (■ différence relative, x valeur extrême de d, — moyenne de d, ---- moyenne de d ± 3 fois l'écart type)

La comparaison des résultats GC-HRMS et CALUX pour les matrices alimentaires suivant la méthode de Petrie & Watson est présentée au tableau 9. La différence *d* relative entre les valeurs OMS-TEQ et CALUX-TEQ expérimentales est déterminée par la formule suivante: (résultat GC-HRMS (OMS TEQ) – résultat CALUX expérimental)/ résultat GC-HRMS (OMS-TEQ). La différence *d* relative entre les valeurs CALUX attendues et expérimentales est déterminée par la formule suivante: (résultat CALUX attendu – résultat CALUX expérimental)/ résultat CALUX attendu. La comparaison des résultats CALUX et GC-HRMS a également été effectuée en retirant les échantillons extrêmes (représentés par une croix dans les figures 1 à 4) . Cette comparaison est présentée au tableau 10.

Pour les dioxines, l'écart entre le résultat OMS-TEQ et CALUX-TEQ expérimental est plus important que l'écart entre le résultat CALUX-TEQ attendu et CALUX-TEQ expérimental (tableau 9). Pour les PCB DL, l'écart entre le résultat OMS-TEQ et CALUX-TEQ expérimental est moins important que l'écart entre le résultat CALUX-TEQ attendu et CALUX-TEQ expérimental (tableau 9).

Le retrait des valeurs extrêmes (représentées par une croix dans les figures 1 à 4) diminue l'écart entre les résultats CALUX et GC-HRMS (tableau 10).

Tableau 9: Différence *d* relative moyenne entre les valeurs OMS-TEQ et CALUX-TEQ expérimentales et entre les valeurs CALUX-TEQ attendues et expérimentales pour les dioxines, les PCB DL et la somme des dioxines et PCB DL dans les produits laitiers, les œufs, le poisson, la graisse animale et l'huile végétale

	Dioxins		DL PCB		Dioxins + DL PCB	
	d relative (WHO TEQ – experimental CALUX)	d relative (Expected CALUX - experimental CALUX)	d relative (WHO TEQ – experimental CALUX)	d relative (Expected CALUX - experimental CALUX)	d relative (WHO TEQ – experimental CALUX)	d relative (Expected CALUX - experimental CALUX)
Dairy product	-13,27	-12,31	-10,64	-28,47	-12,28	-18,06
Eggs	-1,58	-0,86	-6,20	-12,55	-2,49	-2,64
Fish	-21,83	-16,01	-15,74	-40,92	-20,11	-25,36
Animal fat	-3,38	-2,79	-3,46	-9,13	-2,56	-3,17
Vegetable oil	-4,33	-3,51	-10,02	-17,73	-6,55	-7,20

Tableau 10: Différence *d* relative moyenne entre les valeurs OMS-TEQ et CALUX-TEQ expérimentales et entre les valeurs CALUX –TEQ attendues et expérimentales pour les dioxines, les PCB DL et la somme des dioxines et PCB DL dans les produits laitiers, les œufs, le poisson, la graisse animale et l'huile végétale (sans les valeurs extrêmes))

	Dioxins		DL PCB		Dioxins + PCB DL	
	d relative (WHO TEQ – experimental CALUX)	d relative (Expected CALUX - experimental CALUX)	d relative (WHO TEQ – experimental CALUX)	d relative (Expected CALUX - experimental CALUX)	d relative (WHO TEQ – experimental CALUX)	d relative (Expected CALUX - experimental CALUX)
Dairy product	-2,10	-1,76	-0,28	-2,27	-0,60	-1,59
Eggs	-1,58	-0,86	-6,20	-12,55	-2,49	-2,64
Fish	-3,93	-3,75	-2,33	-8,00	-2,22	-4,42
Animal fat	-3,16	-2,60	-1,97	-5,72	-2,09	-2,66
Vegetable oil	-3,99	-3,28	-9,76	-17,96	-6,16	-7,02

On constate que si on enlève les (quelques) valeurs extrêmes, la convergence entre les deux méthodes (CALUX expérimental et GC-HRMS) s'améliore énormément pour les matrices 'produits laitiers' et 'poisson'. L'amélioration est nettement moins marquée (voire insignifiante) pour les matrices 'graisse animale' et 'huile végétale'. Pour la matrice 'œufs', il n'y a pas de valeurs extrêmes (et donc pas d'amélioration de convergence à mettre en évidence).

Pour les dioxines, la convergence entre les méthodes CALUX expérimental et GC-HRMS a tendance à être meilleure dans la matrice 'œufs' et moins bonne dans les matrices 'poisson' et 'huile végétale'. Pour les PCB DL, la convergence est très bonne pour les produits laitiers et nettement moins satisfaisante pour les œufs et l'huile végétale.

Lorsque les valeurs extrêmes sont écartées, on constate que la convergence entre les résultats s'améliore pour l'approche de type 'expected Calux' basée sur l'utilisation des REP plutôt que des TEF pour les dioxines. En revanche, une plus grande différence est constatée pour les PCB DL.

La différence entre les deux méthodes reste cependant élevée. Ainsi, elle est de 86% pour les dioxines dans les œufs et est nettement plus élevée encore pour les dioxines dans les autres matrices (176 à 375%) ainsi que pour les PCB DL, quelle que soit la matrice (de 227 à 1793%).

5.4. Différence entre détermination par CALUX et GC-HRMS en fonction de la concentration

Pour souligner la différence proportionnelle impliquée dans la détermination des tests CALUX, le rapport CALUX expérimental/GC-HRMS (OMS-TEQ) a été porté en graphique en fonction de la concentration en dioxines ou en PCB DL mesurées par GC-HRMS (figures 5 à 14) pour les matrices alimentaires étudiées.

Les produits laitiers

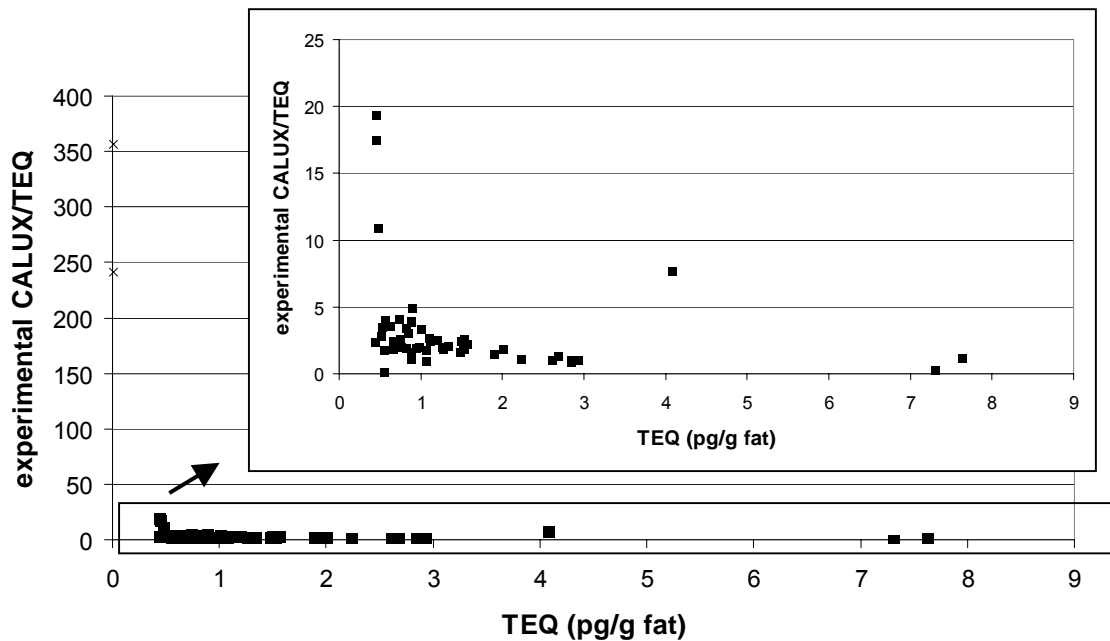


Figure 5: Rapport CALUX expérimental/ GC-HRMS (OMS-TEQ) en fonction de la concentration en dioxines dans les produits laitiers (■ rapport, x rapport extrême)

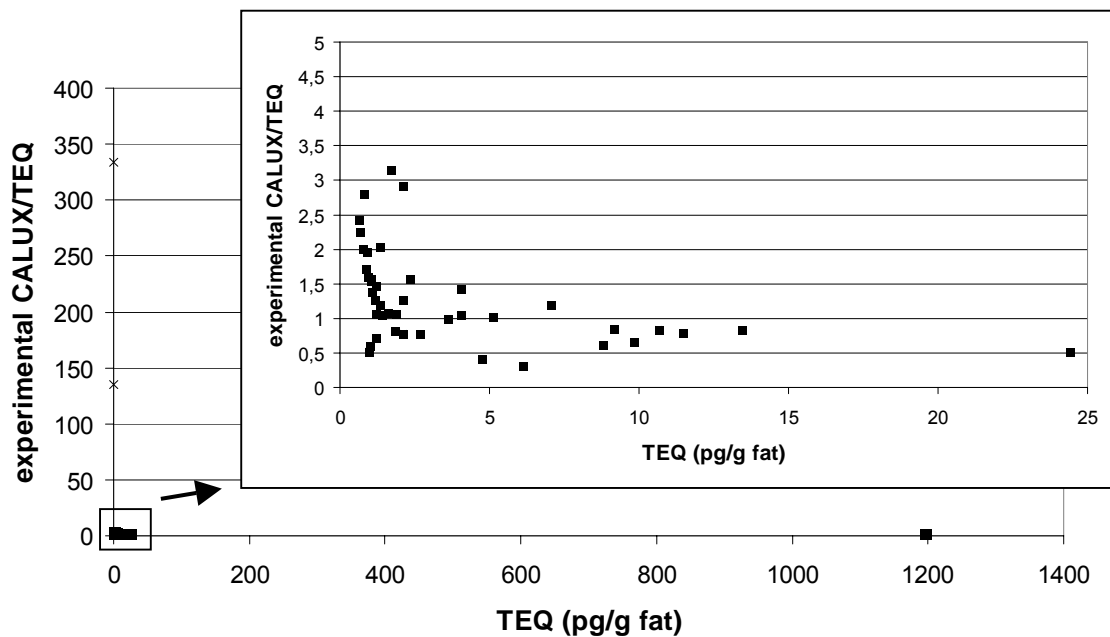


Figure 6: Rapport CALUX expérimental/ GC-HRMS (OMS-TEQ) en fonction de la concentration en PCB DL dans les produits laitiers (■ rapport, x rapport extrême)

Oeufs

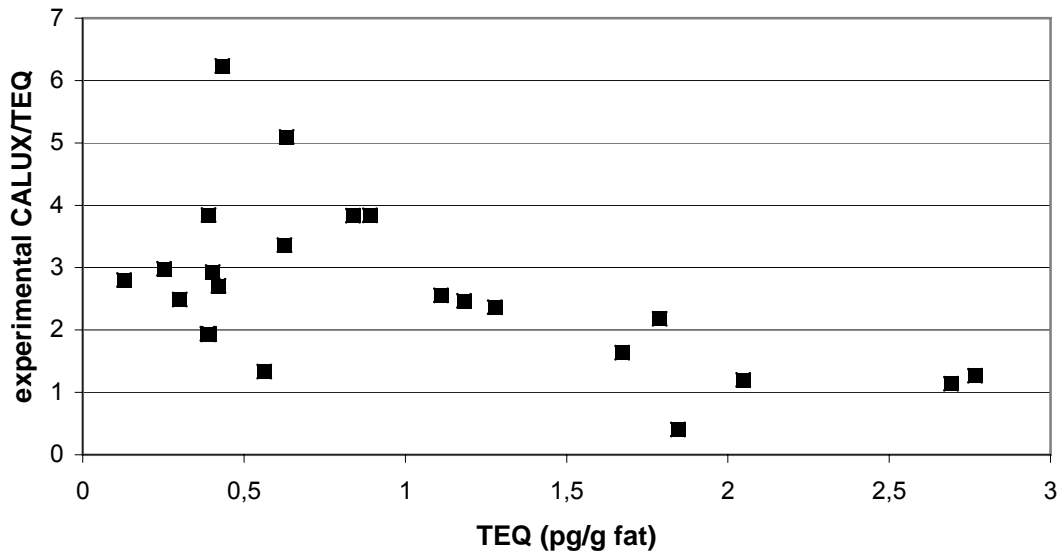


Figure 7: Rapport CALUX expérimental/ GC-HRMS (OMS-TEQ) en fonction de la concentration en dioxines dans les œufs.

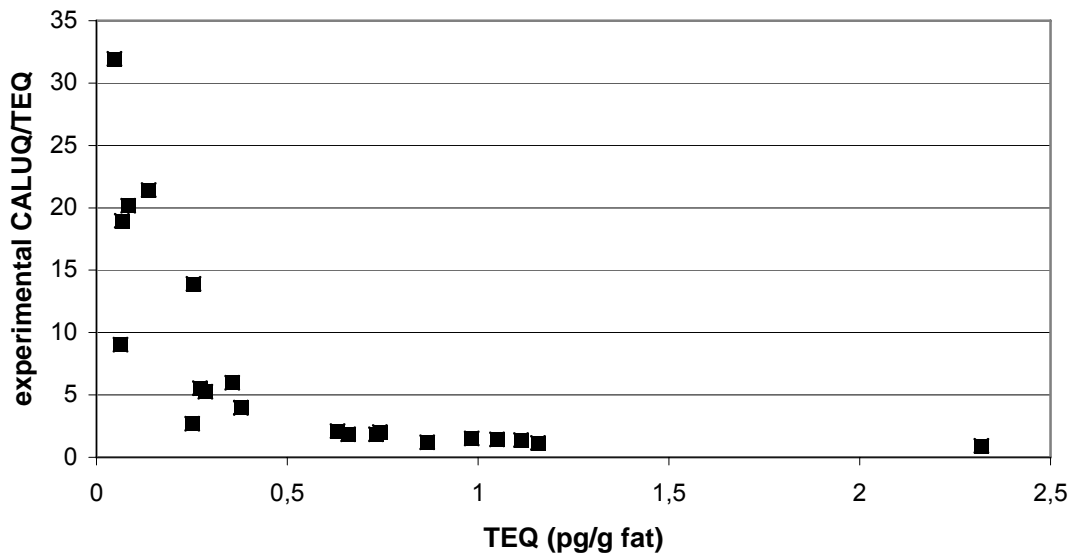


Figure 8: Rapport CALUX expérimental/ GC-HRMS (OMS-TEQ) en fonction de la concentration en PB DL dans les œufs

Poisson

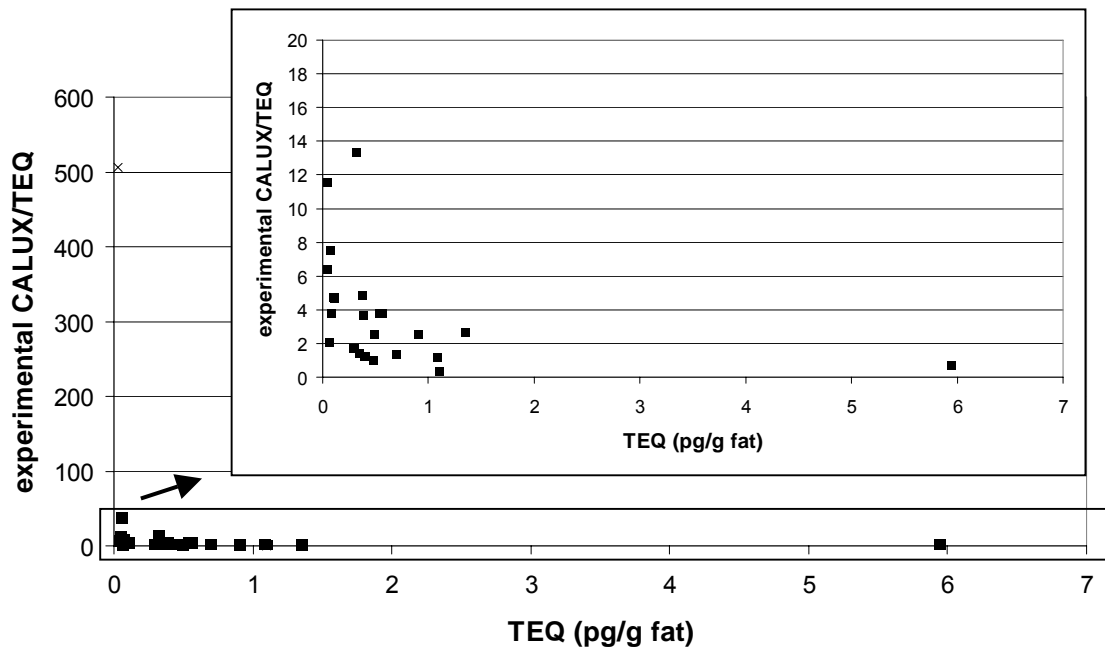


Figure 9: Rapport CALUX expérimental/ GC-HRMS (OMS-TEQ) en fonction de la concentration en dioxines dans le poisson (■ rapport, x rapport extrême)

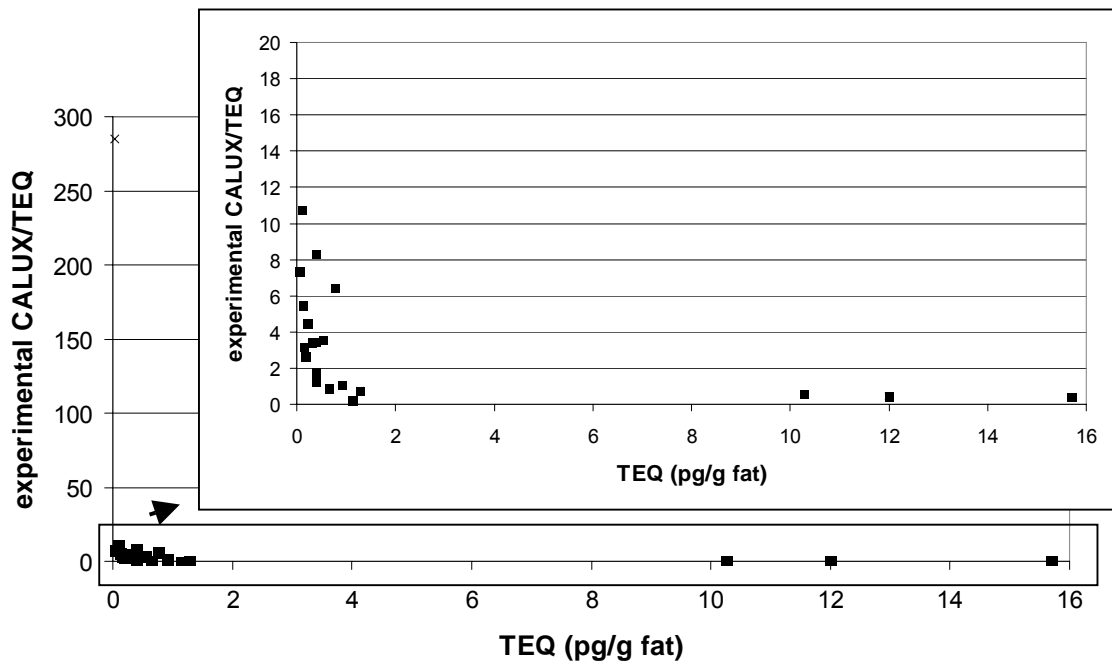


Figure 10: Rapport CALUX expérimental/ GC-HRMS (OMS-TEQ) en fonction de la concentration en PB DL dans le poisson (■ rapport, x rapport extrême)

Graisse animale

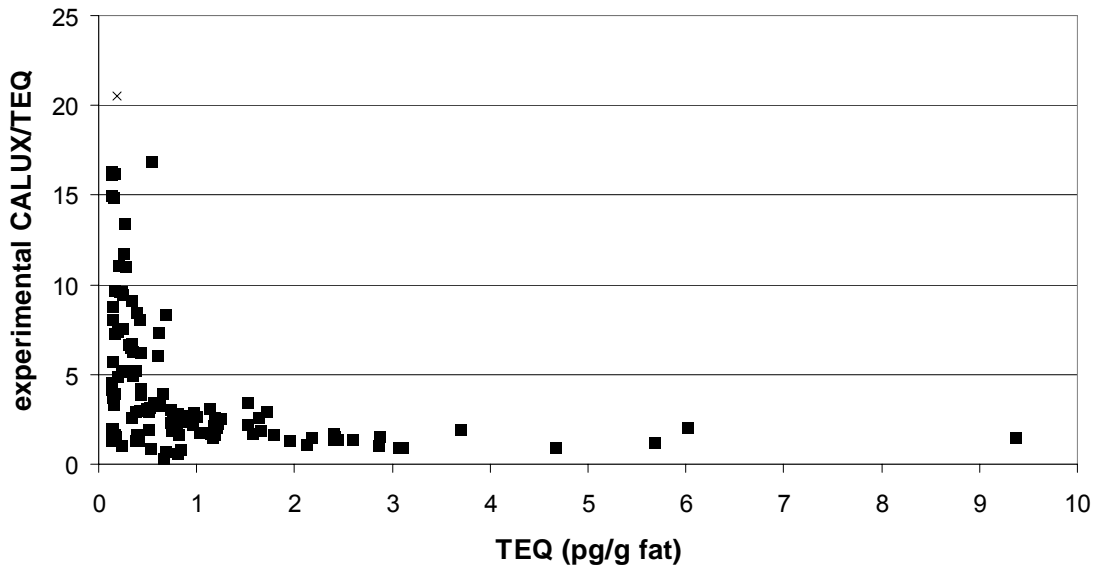


Figure 11: Rapport CALUX expérimental/ GC-HRMS (OMS-TEQ) en fonction de la concentration en dioxines dans la graisse animale (■ rapport, x rapport extrême)

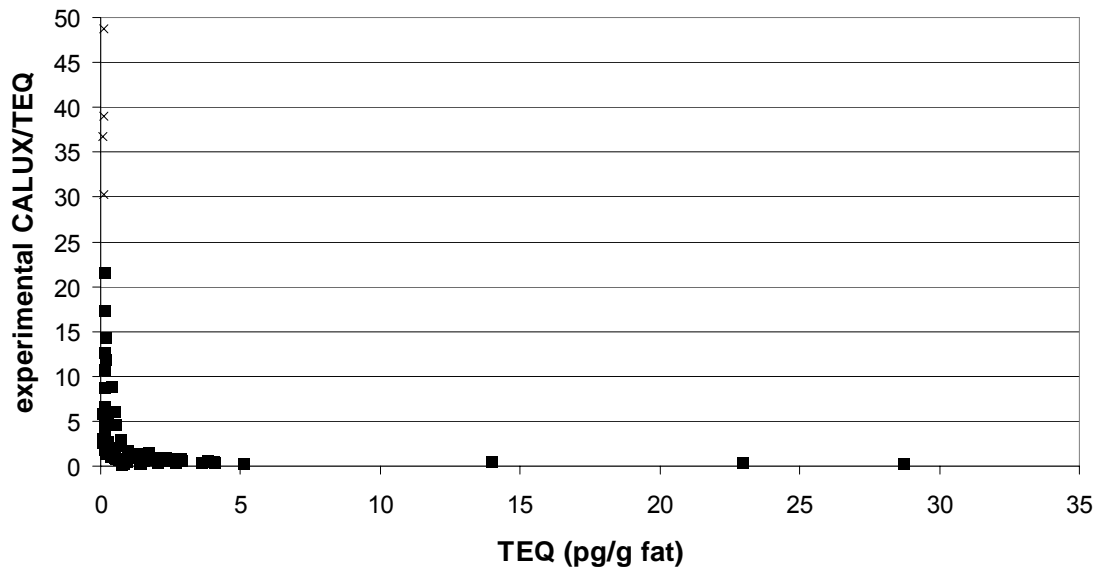


Figure 12: Rapport CALUX expérimental/ GC-HRMS (OMS-TEQ) en fonction de la concentration en PB DL dans la graisse animale (■ rapport, x rapport extrême)

Huile végétale

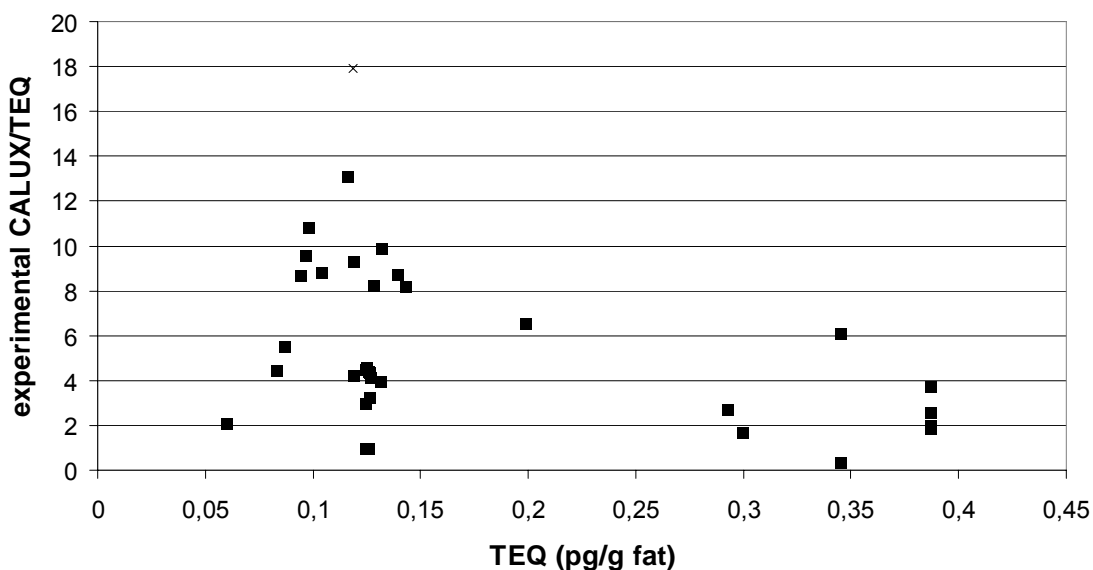


Figure 13: Rapport CALUX expérimental/ GC-HRMS (OMS-TEQ) en fonction de la concentration en dioxines dans l'huile végétale (■ rapport, x rapport extrême)

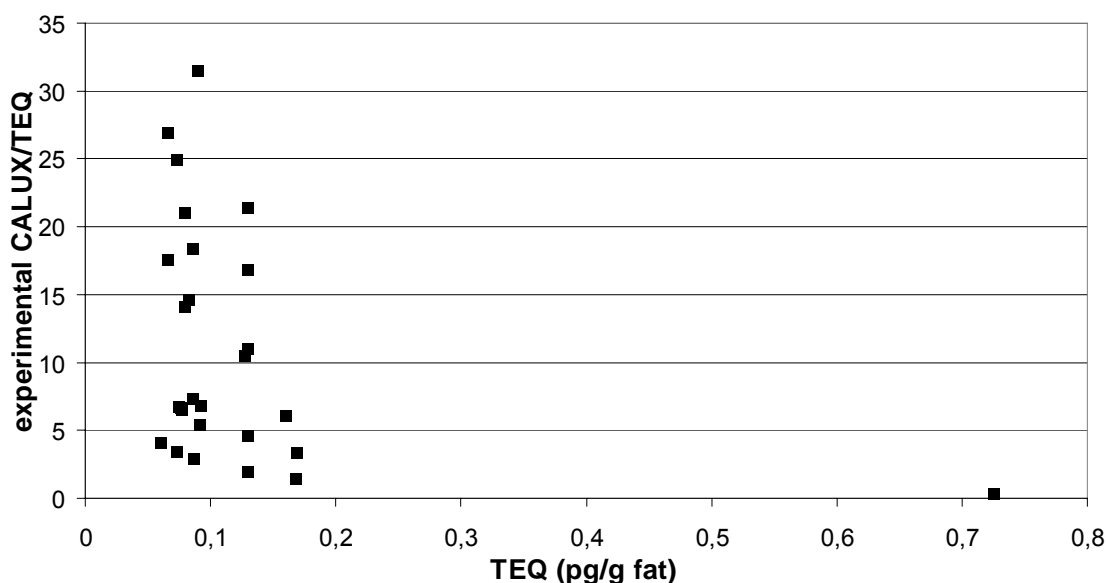


Figure 14: Rapport CALUX expérimental/ GC-HRMS (OMS-TEQ) en fonction de la concentration en PB DL dans l'huile végétale

Pour les concentrations en dioxines supérieures à la limite maximale autorisée, le rapport entre la concentration CALUX expérimental/ GC-HRMS tend vers 1. Pour les plus faibles concentrations, ce rapport peut être beaucoup plus élevé. Il est à remarquer que 1) la courbe de calibration pour la méthode CALUX est centrée sur des valeurs proches de la limite maximale autorisée; 2) un rapport élevé aux faibles concentrations peut révéler la présence de composés agonistes qui seraient co-extraits lors de l'étape d'extraction, purification de l'échantillon.

6. Discussion

Le test biologique CALUX est une méthode de screening dont les mesures sont basées sur une courbe de calibration sigmoïdale réalisée à partir de la 2,3,7,8-TCDD. Les mesures ne sont pas réalisables dans tout le domaine des concentrations de la courbe de calibration mais seulement sur la partie linéaire de la courbe. Le test CALUX est développé et validé pour des concentrations proches de la limite maximale autorisée. La méthode peut être adaptée aux concentrations plus basses mais perdra dans ce cas de sa précision aux valeurs proches de la limite maximale autorisée.

L'analyse GC-HRMS mesure les concentrations des composés dioxines et PCB de type dioxine sélectionnés tandis que le test biologique CALUX détecte tous les composés agissant comme agonistes du récepteur Ah. Ainsi, des valeurs CALUX plus élevées sont plausibles.

Les différences (résultats CALUX plus élevés) peuvent être le résultat de la présence de composés autres que les dioxines et PCB de type dioxine telles que les dioxines bromées ayant une affinité pour le récepteur Ah (Scippo *et al.*, 2008). L'effet de ces composés sera relativement plus important aux faibles concentrations. L'incertitude sur le résultat CALUX en tant que paramètre reflétant la présence spécifique des PCDD/F et PCB DL sera donc plus élevée aux faibles concentrations.

Van Wouwe *et al.* (2004) mentionne que la différence proportionnelle peut être expliquée par plusieurs facteurs:

- Le premier facteur réfère à la limite de quantification des analyses GC-HRMS. Pour des échantillons avec des faibles niveaux des congénères de type dioxine, la plupart de ceux-ci sont inférieurs à la limite de quantification. Pour ces congénères indétectables, les valeurs assignées au calcul de la TEQ peuvent être fixées à 0 (lower bound), à la moitié de la LOQ (middle bound) ou à la valeur de la LOQ (upper bound). Quand les concentrations de ces congénères sont fixées à 0, ils ne contribuent pas à la valeur TEQ GC-HRMS. Ceci conduit à une sous-estimation des valeurs TEQ pour l'analyse chimique aux faibles concentrations. Le test CALUX donne une réponse globale pour tous les congénères. La différence entre les résultats CALUX et GC-HRMS augmente quand le nombre de congénères non détectés augmente. A l'opposé, l'emploi des valeurs upper bound va probablement diminuer la discordance entre les résultats CALUX et GC-HRMS, bien qu'on puisse avoir une surestimation. Soulignons que dans cette étude, ce sont les valeurs « middle bound » qui ont été utilisées.
- La différence entre les valeurs TEF et REP.
- Le potentiel des tests biologiques à mesurer tous les composés avec une affinité pour le récepteur Ah peut expliquer la plus grande part de discordance entre les 2 méthodes. Les contaminants environnementaux comme les dioxines bromées, les polychlorterphényls (PCT), les polychloronaphtalènes (PCN), etc. peuvent contribuer à la réponse CALUX. Des analyses plus poussées sont nécessaires pour déterminer si d'autres composés sont présents dans la fraction dioxine et PCB DL en proportion et à des niveaux contribuant à la valeur TEQ CALUX. L'amélioration des méthodes de détection est nécessaire (Van Wouwe *et al.*, 2004).

Théoriquement, le résultat CALUX pourrait être utilisé en lieu et place du résultat GC-HRMS lorsque le rapport entre la méthode CALUX et GC-HRMS est de 1. Ce rapport, au vu de l'analyse réalisée ci-dessus, devrait être +/- respecté pour des valeurs proches de la limite maximale autorisée (valeurs pour lesquelles le test CALUX a été validé). Dans les autres cas, le résultat CALUX présenterait une surestimation de la teneur des 29 congénères ciblés par la réglementation mais pourrait, en revanche, mieux prendre en compte d'autres composés à activité dioxine non ciblés par la réglementation.

Le profil des échantillons extrêmes écarts type présenté à l'annexe 2 semble en concordance avec le profil d'autres échantillons pour lesquels une bonne corrélation a été mise en évidence entre les 2 méthodes. Ceci laisse supposer que d'autres substances présentes dans l'échantillon sont responsables de la différence entre les deux méthodes.

Non seulement des contaminants comme les dioxines, les PCB et les HAP se lient au récepteur Ah, mais aussi un grand nombre de composés d'origine naturelle peuvent se lier et activer ce récepteur (De Waard *et al.*, 2008). Des extraits de pommes de terre (frites), de crucifères, de pain, de hamburgers et de jus d'agrumes montrent de l'activité agoniste pour le récepteur Ah la plus importante (De Waard *et al.*, 2008). Notons cependant que les substances naturelles présentes dans ces extraits ne sont pas co-éluées dans la méthode d'analyse des dioxines. De plus, elles sont très probablement métabolisées au niveau intestinal avant d'atteindre les cellules riches en récepteurs Ah.

7. Conclusions et recommandations

Le test CALUX est relativement peu coûteux, reproductible et sensible. De plus, il permet de détecter la présence de ligands du récepteur Ah autres que les dioxines (Windal *et al.*, 2005). Des validations de la méthode CALUX sur des matrices biologiques marines et sur du plasma humain réalisées par Windal *et al.* (2005) et par Van Wouwe *et al.* (2004) ont montré une bonne corrélation entre la fraction dioxines mesurée par CALUX et par GC-HRMS même s'il apparaît clairement qu'un écart important entre les deux méthodes puisse exister pour les plus faibles teneurs en contaminants.

Les résultats du test biologique CALUX montrent une corrélation satisfaisante avec l'analyse GC-HRMS pour les matrices alimentaires analysées même si elle conduit généralement à une surestimation surtout aux faibles teneurs en contaminants. Le test CALUX est également une bonne méthode de screening (Hoogenboom *et al.* 2006). En tant que méthode de screening, la méthode CALUX, telle que pratiquée en Belgique dans le cadre du programme de contrôle de l'AFSCA, présente des performances analytiques satisfaisantes dans la mesure où le taux de faux négatifs est très faible (2% pour les produits laitiers et 0% pour les autres matrices).

Le Comité scientifique estime qu'il est important d'émettre des recommandations pour l'emploi des résultats obtenus par la méthode CALUX.

Les résultats fournis par la méthode CALUX dans les conditions d'utilisation de la méthode en Belgique ne peuvent pas être utilisés en évaluation quantitative du risque lié à l'exposition alimentaire aux congénères de PCDD/F et PCB DL visés par la réglementation en vigueur (Règlement 1881/2006). Ainsi, une estimation de l'exposition du consommateur aux dioxines et PCB DL ne peut être réalisée avec des données de tests de screening tel que le test CALUX. Cette méthode ne mesure pas spécifiquement les 17 congénères dioxines et 12 PCB DL.

Le Comité scientifique recommande vivement, lorsqu'une différence importante est détectée entre les méthodes CALUX et GC-HRMS, de réaliser des analyses chimiques plus poussées en vue de pouvoir identifier la nature d'éventuelles substances co-éluées avec l'activité dioxine.

Pour le Comité scientifique,

Prof. Dr. Ir. André Huyghebaert.
Président

Bruxelles, le 10 octobre 2008

Références

Carbonnelle S, Van Loco J, Van Overmeire I, Windal I, Van Wouwe N, Van Leeuwen S, Goeyens L. Importance of REP values when comparing the CALUX bioassay results with chemoanalyses results Example with spiked vegetable oils. *Talanta* 63 1255–1259, 2004.

Denison, MS, Baston DS, Sorrentino C, He G, Hayashi A, Zhao B. Bioanalytical approaches for the detection and relative quantiation of halogenated dibenzo-p-dioxins and related chemicals. *Organohalogen Compounds*, Vol 69, 2007, pg 14-19. Dioxin 2007, 27th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants, Tokyo (Japan), 2-7 September 2007

De Waard W.J., Aarts J.M.M.J.G., Peijnenburg A.C.M., De Kok T.M.C.M., Van Schooten F.-J., Hoogenboom L.A.P. Ah receptor agonist activity in frequently consumed food items. *Food additives and Contaminants*, 25 (6), 779-787, 2008.

EFSA. 2005. Avis du groupe scientifique sur les contaminants de la chaîne alimentaire à la demande de la Commission relative à la présence de polychlorobiphényles (PCB) autres que ceux de types dioxine dans l'alimentation humaine et les aliments pour animaux.

Eppe G., Focant J.-F., Pirard C., Xhrouet C., Maghuin-Rogister G., De Pauw E. 2006. Analyse des dioxines par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-HRMS, GC/MS/MS et GCxGC-TOFMS): Principes, applications et perspectives. *Chimie nouvelle* N°92 juin 2006.

Hui L.L., Hedley A.J., Nelson E.A.S., Malisch R., Wong T.W., Cowling B.J.; Agreement between breast milk dioxin levels by CALUX bioassay and chemical analysis in population survey in Hong Kong. *Chemosphere* 69, 1287-1294, 2007.

Hoogenboom R., Bovee T., Traag W., Hoogerbrugge R., Baumann B., Portier L., van de Weg G., de Vries J. The use of the DR CALUX bioassay and indicator polychlorinated biphenyls for screening of elevated levels of dioxins and dioxin-like polychlorinated biphenyls in eel. *Mol. Nutr. Food Res.* 50, 945-957, 2006.

JECFA, 2002. WHO Food Additive Series: 48 Safety Evaluation of Certain Food Additive and Contaminants. WHO, Geneva.

Petrie A., Watson P. *Statistics for veterinary and animal science*. Volume 14, 2nd edition. Science B. (Ed) Blackwell Science, Edinburgh, 2006.

Scippo, Eppe G, Saegerman C, Scholl G, De Pauw E, Maghuin-Rogister G, Focant J-F. Chapter XIV. Persistent organochlorine pollutants, dioxins and polychlorinated biphenyls. IN : *Comprehensive Analytical Chemistry*, Vol. 51, 457-506, 2008. Food Contaminants and Residue Analysis,. Yolanda Picó (Ed.), Elsevier, Amsterdam.

Scippo M-L, Eppe G, De Pauw E, Maghuin-Rogister G. DR-CALUX® screening of food samples: evaluation of the quantitative approach to measure dioxin, furans and dioxin-like PCBs. *Talanta*, 63, 1193-1202, 2004.

Van den Berg M, Birnbaum LS, Denison M, De Vito M, Farland W, Feeley M, Fiedler H, Hakansson H, Hanberg A, Hauws L, Rose M, Safe S, Schrenk D, Tohyama C, Tritscher A, Tuomisto J, Tysklind M, Walker N, Peterson RE. The 2005 world health organization re-evaluation of human and mammalian toxic equivalency factors for dioxins and dioxin-like compounds. *Toxicol. Sci.*, 93 (2), 223-41, 2006.

Van den Berg M, Birnbaum L, Bosveld A T, Brunström B, Cook P, Feeley M, Giesy J P, Hanberg A, Hasegawa R, Kennedy S W, Kubiak T, Larsen J C, van Leeuwen F X, Liem A K, Nolt C, Peterson R E, Poellinger L, Safe S, Schrenk D, Tillitt D, Tysklind M, Younes M, Waern

F, Zacharewski T. Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife. *Environ Health Perspect.* 106 (12): 775–792, 1998.

Van Wouwe N, Windal I, Vanderperren H, Eppe G., Xhrouet C, Massart A-C, Debacker N, Sasse A, Baeyens W, De Pauw E, Sartor F, Van Oyen H, Goeyens L. Validation of the CALUX bioassay for PCDD/F analyses in human blood plasma and comparison with GC-HRMS. *Talanta* 63, 1157–1167, 2004.

Windal I, Van Wouwe N, Eppe G, Xhrouet C, Debacker V, Baeyens W, De Pauw E, Goeyens L. Validation and Interpretation of CALUX as a Tool for the Estimation of Dioxin-Like Activity in Marine Biological Matrixes. *Environ. Sci. Technol.* 39, 1741-1748, 2005.

Membres du Comité scientifique

Le Comité scientifique est composé des membres suivants:

V. Baeten, D. Berkvens, C. Bragard, J-P. Buts, P. Daenens, G. Daube, J. Debevere, P. Delahaut, K. Dewettinck, K. Dierick, R. Ducatelle, L. Herman, A. Huyghebaert, H. Imberechts, J. Lammertijn, G. Maghuin-Rogister, L. Pussemier, C. Saegerman, B. Schiffers, E. Thiry, J. Van Hoof, C. Van Peteghem

Remerciements

Le Comité scientifique remercie le secrétariat scientifique et les membres du groupe de travail pour la préparation du projet d'avis. Le groupe de travail était composé de:

Membres du Comité scientifique	L. Pussemier (rapporteur), P. Daenens, A. Huyghebaert, G. Maghuin-Rogister, C. Saegerman
Experts externes	L. Goeyens (VUB), Marie-Louise Scippo (ULg), H. Vanderperren (Labo Tervuren)

Cadre juridique de l'avis

Loi du 4 février 2000 relative à la création de l'Agence fédérale pour la Sécurité de la Chaîne alimentaire, notamment l'article 8 ;

Arrêté royal du 19 mai 2000 relatif à la composition et au fonctionnement du Comité scientifique institué auprès de l'Agence fédérale pour la Sécurité de la Chaîne alimentaire;

Règlement d'ordre intérieur visé à l'article 3 de l'arrêté royal du 19 mai 2000 relatif à la composition et au fonctionnement du Comité scientifique institué auprès de l'Agence fédérale pour la Sécurité de la Chaîne alimentaire, approuvé par le Comité scientifique le 13 janvier 2006.

Disclaimer

Le Comité scientifique conserve à tout moment le droit de modifier cet avis si de nouvelles informations et données arrivent à sa disposition après la publication de cette version.

Annexe 1: Aperçu des facteurs d'équivalence toxique de l'OMS et des valeurs REP¹ utilisées pour les calculs des concentrations en équivalents toxiques (TEQ) (Carbonelle *et al.*, 2004)

Congénères	Valeur OMS 1998-TEF	Valeur REP
2,3,7,8-TCDF	0.10	0.067
1,2,3,7,8-PeCDF	0.05	0.14
2,3,4,7,8-PeCDF	0.50	0.58
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0.10	0.13
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0.10	0.14
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0.10	0.11
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0.10	0.31
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0.01	0.024
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0.01	0.04
OCDF	0.0001	0.0016
2,3,7,8-TCDD	1.00	1.00
1,2,3,7,8-PeCDD	1.00	0.73
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0.10	0.075
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0.10	0.098
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0.10	0.061
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0.01	0.031
OCDD	0.0001	0.00034
PCB 81	0.0001	0.0045
PCB 77	0.0001	0.0014
PCB 126	0.10	0.04
PCB 169	0.01	0.0011
PCB 123	0.0001	3×10^{-7}
PCB 118	0.0001	1×10^{-6}
PCB 114	0.0005	0.00014
PCB 105	0.0001	1×10^{-6}
PCB 167	0.00001	3×10^{-7}
PCB 156	0.0005	0.00014
PCB 157	0.0005	3×10^{-6}
PCB 189	0.0001	2×10^{-7}

¹ Valeurs REP pour cellules : hépatome HL6.1 de souris (Xenobiotic Detection System, Durham, US)

Annexe 2: Profil des dioxines et des PCB DL dans les échantillons présentant des différences extrêmes entre les deux méthodes d'analyse (CALUX et GC-HRMS)

Produits laitiers

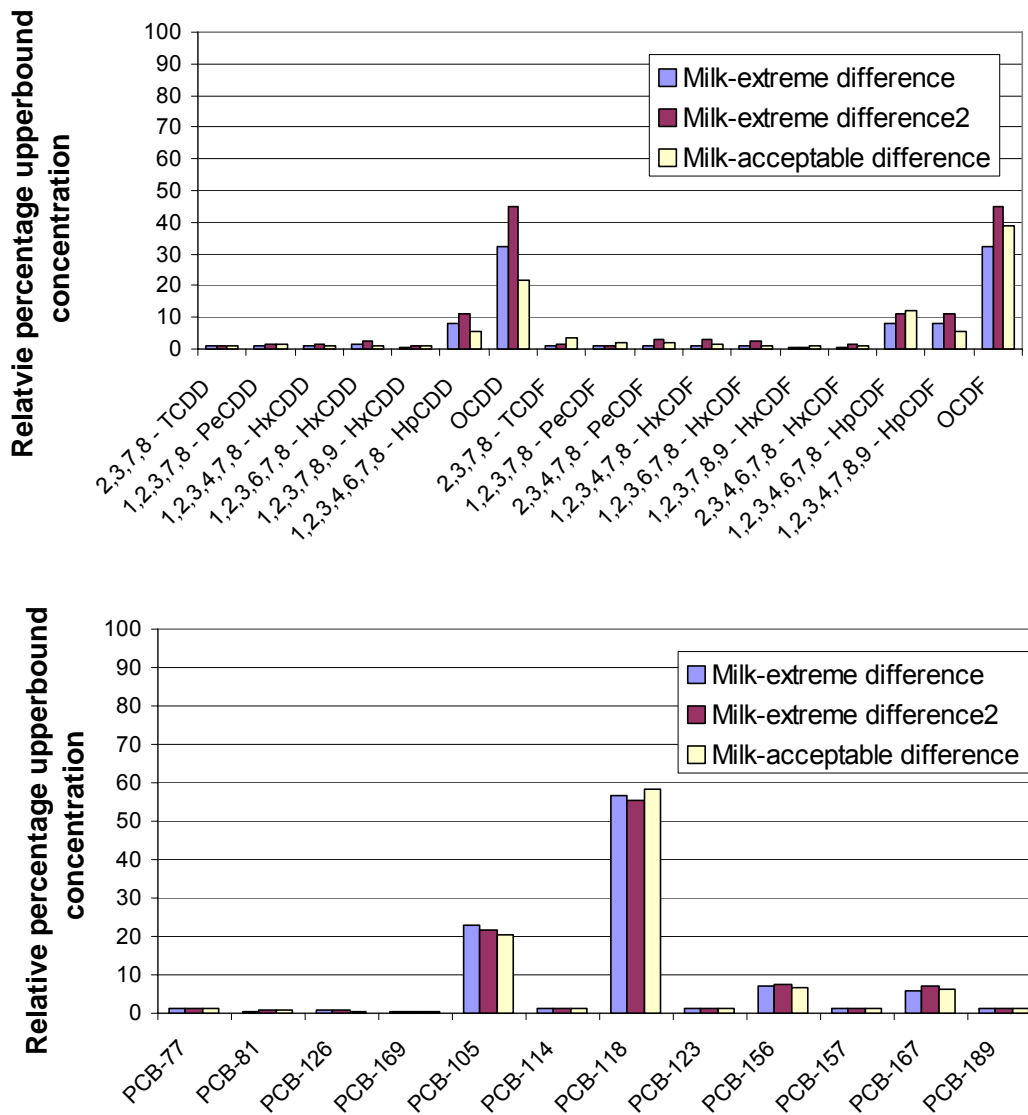


Figure 1: Profil des dioxines et des PCB DL dans deux échantillons de lait de jument identifiés comme extrêmes ainsi que dans un échantillon de lait de jument standard

L'échantillon standard est un échantillon de lait de jument pour lequel le rapport entre le résultat CALUX et le résultat GC-HRMS est proche de 1 (=1,08).

Poisson

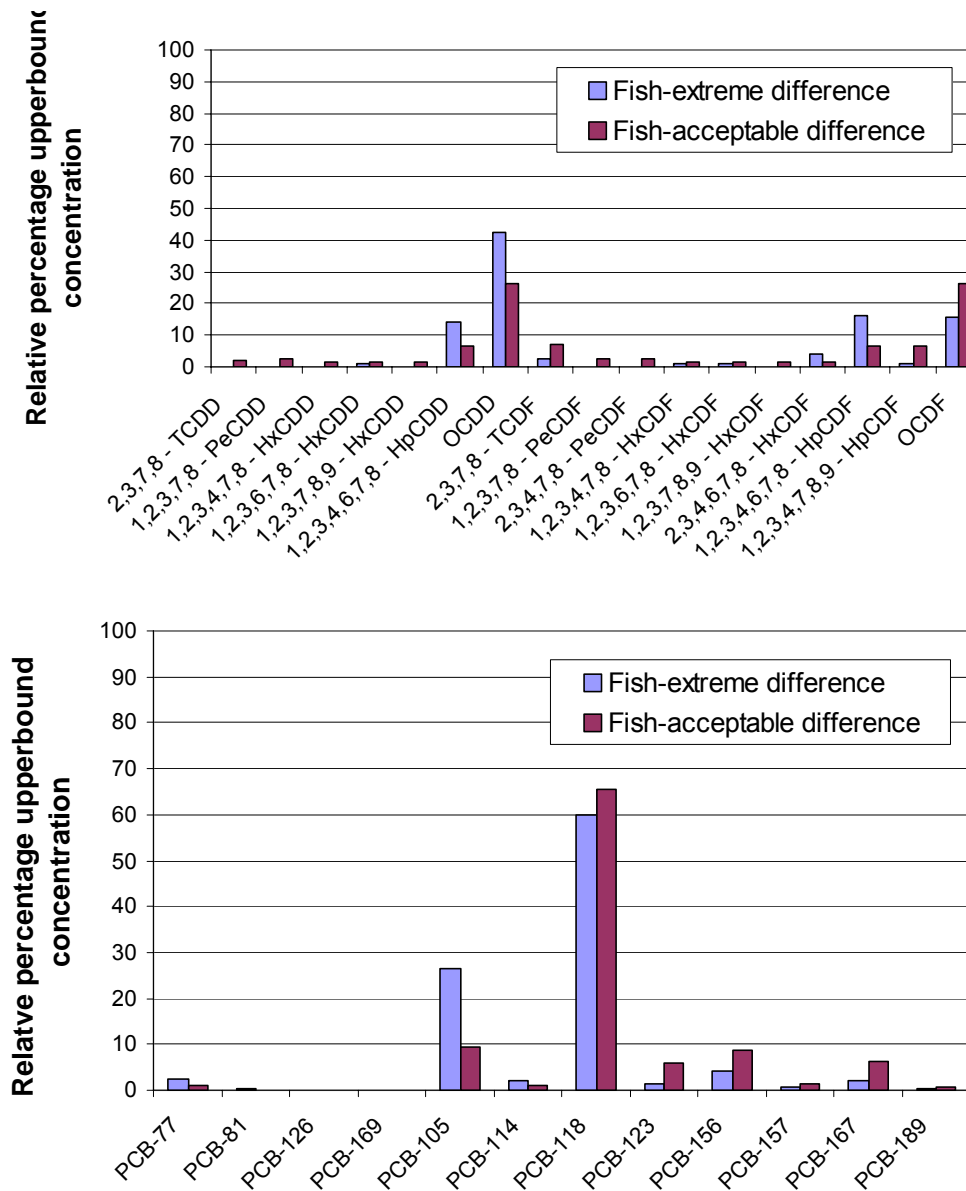


Figure 2: Profil des dioxines et des PCB DL dans un échantillon de crustacé identifié comme extrême ainsi que dans un échantillon de poisson standard

L'échantillon standard est un échantillon de poisson pour lequel le rapport entre le résultat CALUX et le résultat GC-HRMS est proche de 1 (=1,05).

Graisse animale

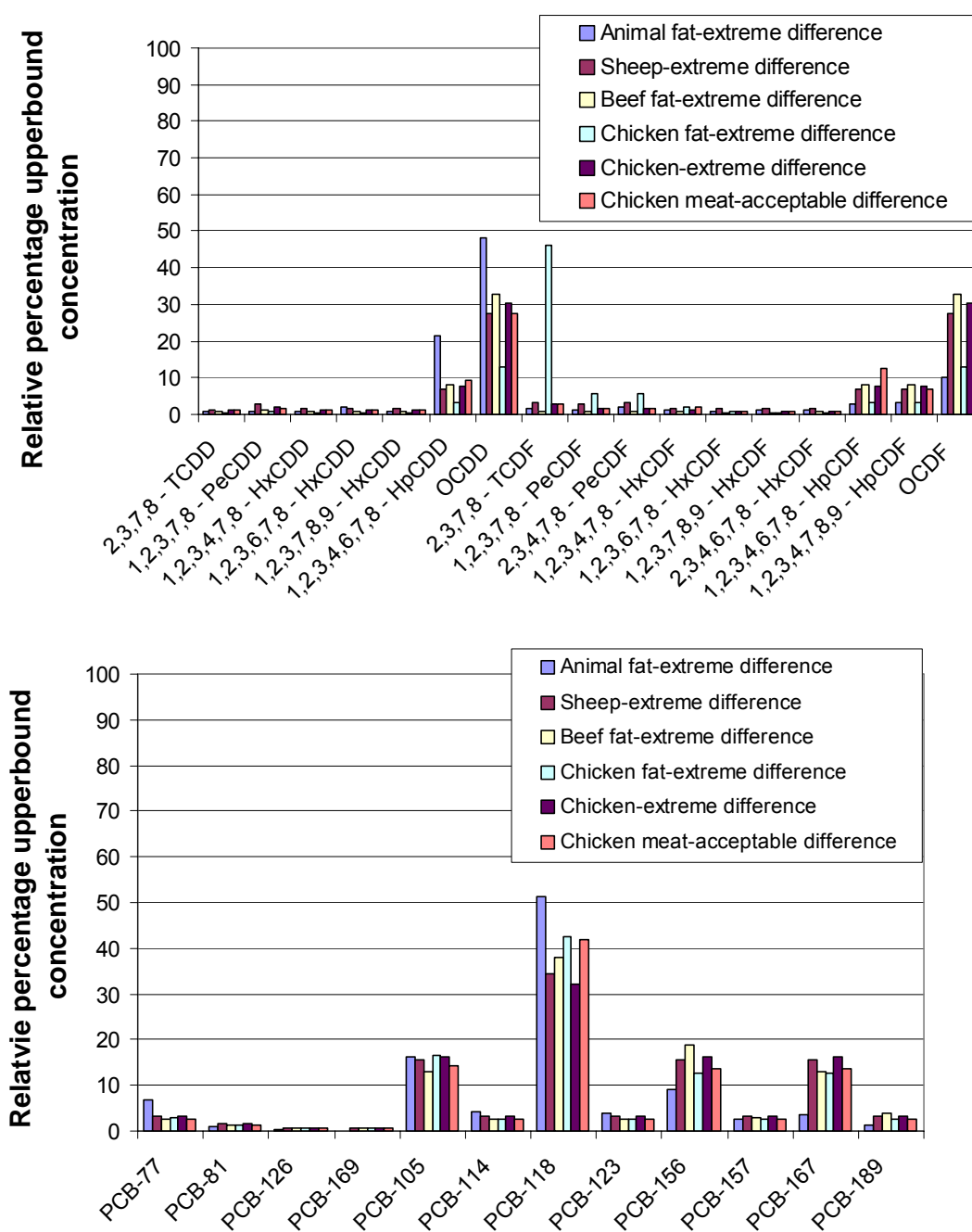


Figure 3: Profil des dioxines et des PCB DL dans les échantillons de graisse animale identifiés comme extrêmes ainsi que dans un échantillon standard

L'échantillon standard est un échantillon de viande de poulet pour lequel le rapport entre le résultat CALUX et le résultat GC-HRMS est proche de 1 (=1,09).

Huile végétale

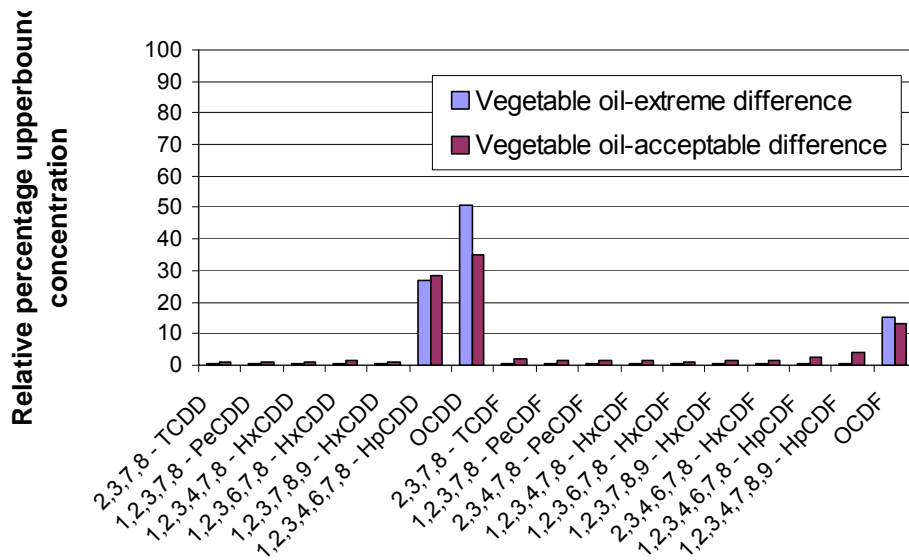


Figure 4: Profil des dioxines dans un échantillon d'huile végétale identifié extrême ainsi que dans un échantillon standard

L'échantillon standard est un échantillon d'huile végétale pour lequel le rapport entre le résultat CALUX et le résultat GC-HRMS est proche de 1 (=1,004).

Le profil des dioxines dans les échantillons identifiés comme extrêmes est caractérisé par la présence de HpCDD, OCDD et OCDF. Le profil des PCB DL des échantillons extrêmes est caractérisé par la dominance des congénères PCB 105 et 118 et par la présence des PCB 156 et 167. Le profil des échantillons standards est similaire.