



Expertise collective

Dioxines

dan s l'environnement

Quels risques
pour la santé?

Inserm

Institut national
de la santé et de la recherche médicale

Dioxines dans l'environnement.

Quels risques pour la santé? ISBN 2-85598-784-9
ISSN 1264-1782

© Les éditions Inserm, 2000 101 rue de Tolbiac, 75013 Paris

- Dans la même collection**
- La Grippe. Stratégies de vaccination. 1994
 - Artériopathie des membres inférieurs. Dépistage et risques cardiovasculaires. 1994
 - Rachialgies en milieu professionnel. Quelles voies de prévention? 1995
 - Sida, maladies associées. Pistes pour de nouveaux médicaments. 1996
 - Ostéoporose. Stratégies de prévention et de traitement. 1996
 - Méningites bactériennes. Stratégies de traitement et de prévention. 1996
 - Imagerie médicale en France dans les hôpitaux publics. 1996
 - Hépatites virales. Dépistage, prévention, traitement. 1997
 - Grande prématurité. Dépistage et prévention du risque. 1997
 - Effets sur la santé des principaux risques d'exposition à l'amiante. 1997
 - Ecstasy. Des données biologiques et cliniques aux contextes d'usage. 1998
 - Insuffisance rénale chronique. Etiologies, moyens de diagnostic précoce, prévention. 1998
 - La migraine. Connaissances descriptives, traitements et prévention. 1998
 - Risques héréditaires de cancers du sein et de l'ovaire. Quelle prise en charge? 1998
 - Effets sur la santé des fibres de substitution à l'amiante. 1999
 - Maladie parodontales. Thérapeutiques et prévention. 1999
 - Plomb dans l'environnement. Quels risques pour la santé? 1999
 - Carences nutritionnelles. Etiologies et dépistage. 1999
 - Vaccinations. Actualités et perspectives. 1999
 - Éthers de glycol. Quels risques pour la santé? 1999
 - Obésité. Dépistage et prévention chez l'enfant. 2000
 - Asthme et rhinite d'origine professionnelle. 2000
 - Lombalgies en milieu professionnel. Quels facteurs de risques et quelle prévention? 2000



Ce logo rappelle que le code de la propriété intellectuelle du 1^{er} juillet 1992 interdit la photocopie à usage collectif sans autorisation des ayants-droits.
Le non-respect de cette disposition met en danger l'édition, notamment scientifique.

Toute reproduction, partielle ou totale, du présent ouvrage est interdite sans autorisation de l'éditeur ou du Centre français d'exploitation du droit de copie (CFC, 20 rue des Grands-Augustins, 75006 Paris).

Groupe d'experts et auteurs

Sophie ALEXANDER, épidémiologie et médecine sociale, École de santé publique, Université libre de Bruxelles, Belgique

Denis BARD, épidémiologie et santé publique, École nationale de santé publique, Rennes

Robert BAROUKI, toxicologie moléculaire, INSERM U 490, Paris

Frédéric Yves BOIS, méthodologie de l'évaluation des risques, Institut national de l'environnement industriel et des risques (INERIS), Verneuil-en-Halatte

Jacques DESCOTES, immunotoxicité, Centre antipoison, hôpital Edouard-Herriot, Lyon

Marco DUJARDIN, épidémiologie et médecine sociale, École de santé publique, Université libre de Bruxelles, Belgique

André GUILLOUZO, détoxification cellulaire des xénobiotiques, directeur de l'unité INSERM U 456, Rennes

Cédric HERMANS, toxicologie et médecine du travail, université catholique de Louvain, Bruxelles, Belgique

Gérard KECK, toxicologie, département des sciences biologiques fondamentales et appliquées, École nationale vétérinaire, Lyon

Manolis KOGEVINAS, épidémiologie, unité de recherche sur l'environnement, Institut municipal de recherche et de médecine, Barcelone, Espagne

Jean-François NARBONNE, toxicologie alimentaire, CNRS UMR 5472, Université de Bordeaux-I, Talence

François PERIN, génotoxicité et cancérogenèse, Institut Curie, Orsay

André PICOT, chimie des substances naturelles, CNRS, Gif-sur-Yvette

Thierry PINEAU, pharmacologie et toxicologie, INRA, Toulouse

Jean-François SAVOURET, physiologie et pathologie du récepteur de la dioxine, INSERM U 135, hôpital de Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre

Ont présenté une communication

Hélène BUDZINSKI, physico-toxicochimie des systèmes naturels, CNRS UMR 5472, Université de Bordeaux-I, Talence

Daniel FRAISSE, Laboratoires CARSO, Lyon

Laurentius AP HOOGENBOOM, department of food safety and health state institute for quality control of agricultural products (RIKILT), Wageningen, Pays-Bas

Coordination scientifique et éditoriale

Emmanuelle CHOLLET-PRZEDNOWED, attaché scientifique, Centre d'expertise collective

Jeanne ETIEMBLE, directeur du Centre d'expertise collective de l'INSERM

Michel GARBARZ, chargé d'expertise, Centre d'expertise collective

Patrice TESTUT, attaché scientifique, Centre d'expertise collective

Assistance bibliographique et technique

Chantal GRELLIER et Florence LESECQ, Centre d'expertise collective

Iconographie

Service commun n°6 de l'INSERM

Sommaire

Avant-propos	VII
Dioxines et environnement	1
1 Physicochimie des PCDD et PCDF	3
2 Mécanismes de formation, sources de production	17
3 Sources d'émission	29
4 Contamination des différents compartiments de l'environnement ..	47
5 Chaînes alimentaires	65
Effets toxiques chez l'animal	89
6 Toxicité aiguë	91
7 Immunotoxicité	97
8 Effets sur la reproduction et le développement	113
9 Activité cancérogène	131
Effets toxiques chez l'homme	143
10 Évaluation de l'imprégnation humaine	145
11 Imprégnation de la population française	177
12 Cancérogénicité	183
13 Effets autres que le cancer	197
14 Effets sur la reproduction et le développement	209
Mécanismes d'action	227
15 Cascade moléculaire impliquant le récepteur Ah	229
16 Induction des cytochromes P450	247
17 Perturbations endocriniennes : nouveaux gènes cibles	259
Évaluation des risques	281
18 Toxicocinétique/toxicodynamie	283
19 Évaluation des risques : principes et démarches	299
Synthèse et recommandations	319
Communications	369

Avant-Propos

Les « dioxines », qui rassemblent deux familles : les polychlorodibenzo-*para*-dioxines (PCDD) et les polychlorodibenzofuranes (PCDF), sont libérées dans l'environnement au cours de processus naturels et, principalement aujourd'hui, au cours de procédés thermiques en rapport avec les activités industrielles d'incinération de déchets domestiques, de métallurgie et de sidérurgie. La réduction des émissions de dioxines au cours des dix dernières années a entraîné une baisse importante de l'exposition humaine. Cependant, la présence de dioxines dans plusieurs compartiments de l'écosystème (sols, sédiments...), résultant des activités industrielles antérieures, maintient un certain niveau de contamination de la chaîne alimentaire. Les aliments (lait et produits laitiers, viande, poissons) constituent la source principale d'exposition pour les populations.

La direction générale de la Santé et la direction générale de l'Administration et du Développement au ministère de l'Aménagement du Territoire et de l'Environnement ont souhaité interroger l'INSERM à travers la procédure d'Expertise Collective, sur l'impact des dioxines sur l'environnement et la santé. Ces deux partenaires souhaitaient disposer, en particulier, d'une expertise critique sur la mesure des taux de dioxines dans différents milieux et la meilleure façon d'estimer l'imprégnation des populations, l'inventaire des sources d'émissions et les modalités de transfert dans différents compartiments notamment les sols et enfin sur les modèles les mieux adaptés pour traiter les surexpositions de durée brève.

Pour répondre à cette demande, l'INSERM a constitué un groupe pluridisciplinaire d'experts rassemblant des compétences dans les domaines de l'épidémiologie, l'épidémiologie environnementale, l'évaluation de risque, la toxicologie alimentaire, clinique et moléculaire, la chimie, la biochimie, la cancérologie, l'endocrinologie, l'immunologie, la pharmacologie. Trois intervenants, extérieurs au groupe, ont présenté une communication ayant trait aux différents types de dosage.

L'analyse scientifique du groupe s'est structurée à partir de la grille de questions suivante :

- Quelle est la physicochimie des dioxines ? Comment les dioxines se forment-elles ?
- Quelles sont les différents réservoirs et sources de dioxines ? Quelles sont les conséquences sur l'environnement ? Quelles sont les voies de contamination de la chaîne alimentaire ?
- Quels sont les méthodes de dosage et les différents modes d'expression des résultats ?

- Comment les dioxines se distribuent-elles dans les différents tissus et selon les différentes espèces ? Quels sont les biomarqueurs sensibles et spécifiques d'exposition aux dioxines ?
- Quels sont les effets biologiques et toxiques observés dans les différentes espèces animales ? Quels sont les effets observés chez l'homme à fortes et faibles doses d'exposition ? Quelles sont les conséquences de la contamination mère-enfant ?
- Quels sont les différents mécanismes d'action des dioxines ? Quel est l'importance du mécanisme impliquant le récepteur *arylhydrocarbon* AhR ? Comment expliquer la variabilité des actions des dioxines dans différentes espèces et parfois au sein d'une même espèce ?
- Quels sont les paramètres toxicocinétiques qui doivent être pris en considération pour la toxicité chez l'animal et chez l'homme ? Quels sont les modèles qui peuvent être utilisés pour une évaluation de risque ?

L'interrogation des bases bibliographiques généralistes et spécialisées a permis de sélectionner plus de 1 600 articles scientifiques. Le fonds documentaire a également été enrichi par un certain nombre de documents récents, français et internationaux, dont la liste suit.

Au cours de neuf séances de travail organisées entre les mois de septembre 1999 et de juin 2000, les experts ont présenté une analyse critique et une synthèse des travaux publiés sur les différents aspects du thème traité. Les trois dernières séances ont été consacrées à l'élaboration des principales conclusions et des recommandations.

DOCUMENTS

Agence française de sécurité sanitaire des aliments (AFSSA). Dioxine : données de contamination et d'exposition de la population française. Rapport rédigé dans le cadre du groupe de travail : « Contaminants et phytosanitaires » du Conseil supérieur d'hygiène publique de France, section « Alimentation et Nutrition ». Juin 2000

Comité de la prévention et de la précaution : rapport d'activité 1996-1998.

Compilation of EU dioxin exposure and health data. Report produced for European commission DG environment. UK Department of the environment, transport and the regions (DETR), octobre 1999

Dioxin and furan inventories, national and regional emissions of PCDD/PCDF. United Nation Environment Programme (UNEP). Prepared by UNEP Chemicals, Geneva, Switzerland, mai 1999

Emissions de dioxines par les incinérateurs de déchets ménagers. Exploitation des mesures réalisées au titre de l'année 1997 à l'émission des installations de capacité supérieure à 6 t/h. Hervé Pernin, ADEME, octobre 1998

Étude sur les dioxines et les furanes dans le lait maternel en France. In VS/CAREPS, 2000

Exposure and human health reassessment of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) and related compounds. US Environmental Protection Agency (US EPA), juin 2000

Health assessment of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) and related compounds. US Environmental protection agency (US EPA), août 1992, juin 1993, janvier 1997

La dioxine et ses analogues, Rapport commun N°4, Académie des sciences, Comité des applications de l'Académie des sciences, Institut de France, septembre 1994

L'incinération des déchets et la santé publique : bilan des connaissances récentes et évaluation du risque. Collection Santé et Société, Édition de la Société française de santé publique, n°7, 1999

Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Polychlorinated Dibenzo-*para*-dioxins and polychlorinated dibenzofurans. IARC Lyon France 1997, 69

Synopsis on dioxins and PCBs. Compiled by Jouko Tuomisto, Terttu Vartainen and Jouni T. Tuomisto. Kuopio, Finland, 1999. Julkaisija – Publisher : Kansanterveyslaitos (KTL) Helsinki ; KTL Division of environmental health, Kuopio, Finland. Accès internet : <http://www.ktl.fi/dioxin>

WHO European centre for environment and health (WHO-ECEH). International programme on chemical safety (IPCS). Assessment of the health risk of dioxins ; re-evaluation of the tolerable daily intake (TDI), 25-29 may 1998, Geneva, Switzerland. WHO 1999

I

Dioxines et environnement

1

Physicochimie des PCDD et PCDF

Les dioxines rassemblent deux familles de composés très proches par leur structure moléculaire et leurs propriétés physicochimiques, les polychlorodibenzo-*para*-dioxines (PCDD) et les polychlorodibenzofuranes (PCDF). Ce sont des composés aromatiques polycycliques oxygénés qui dérivent du benzène, représentant caractéristique des hydrocarbures aromatiques (figure 1.1).

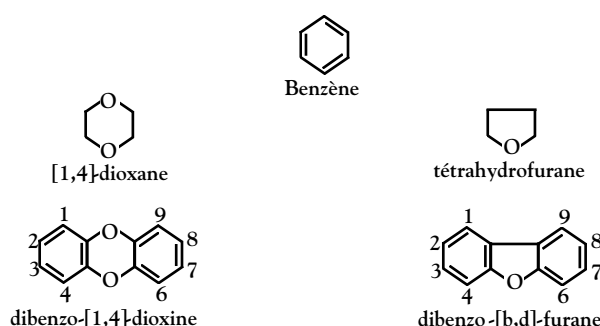


Figure 1.1 : Structures chimiques et numérotation des dioxines

Les PCDD appartiennent au groupe de la dibenzo[1,4]dioxine ou dibenzo-*para*-dioxine (dibenzo-*p*-dioxine) dont la structure renferme deux atomes d'oxygène formant un hétérocycle de type 1,4-dioxane. Les PCDF sont eux rattachés au dibenzo[*b-d*]furane, dont la structure présente un enchaînement hétérocyclique ne comportant qu'un seul atome d'oxygène de type tétrahydrofurane.

Les positions numérotées sur les structures peuvent être occupées par des atomes d'hydrogène ou des halogènes et plus particulièrement des atomes de chlore qui, au nombre maximum de huit, définissent par leur position le nombre d'isomères de chaque groupe.

Il existe ainsi 75 congénères de PCDD et 135 congénères de PCDF, le nombre de congénères pour les PCDF étant plus important du fait de la dissymétrie du noyau furanique (tableau 1.I).

Tableau 1.1 : Nomenclature des PCDD et des PCDF

Nombre de chlores	1	2	3	4	5	6	7	8
	M1	D2	T3	T4	P5	H6	H7	O8
Préfixe	mono	di	tri	tétra	penta	hexa	hepta	octa
	M	D	Tr	T	Pe	Hx	Hp	O
Nombre d'isomères PCDD	2	10	14	22 75 congénères	14	10	2	1
Nombre d'isomères PCDF	4	16	28	38 135 congénères	28	16	4	1

Les PCDD et les PCDF sont, sans aucun doute, parmi les composés aromatiques, ceux qui actuellement suscitent le plus de débats en tant que polluants de l'environnement. En effet, se retrouve dans ce groupe une molécule tristement célèbre depuis l'accident de l'usine ICMESA à Seveso en 1976, la 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-*p*-dioxine (2,3,7,8-TCDD), dite dioxine de Seveso.

Des dérivés polybromés (2,3,7,8-TBDD et 2,3,7,8-TBDF) et polychlorobromés sont également retrouvés en très faible quantité dans les fumées d'incinération (Heinbuch et Stieglitz, 1993). Ils peuvent se former à partir de la combustion de dérivés bromés utilisés par exemple comme ignifugeants (Weber et Greim, 1997). Ces dérivés ont fait l'objet d'une monographie récente de l'Organisation mondiale de la Santé (IPCS, 1998). Peu d'informations sont aujourd'hui disponibles quant au mécanisme toxique et au niveau de l'exposition humaine à ces composés, qui sont possiblement dotés d'un potentiel toxique et cumulatif similaire à celui de leurs homologues chlorés.

Des dérivés polyfluorés et polychlorofluorés sont signalés à l'état de traces dans les fumées de la métallurgie de l'aluminium (Weber et Greim, 1997). Des dibenzothiophènes, composés de type PCDF dans lesquels l'atome d'oxygène est remplacé par un atome de soufre, sont également retrouvés dans les processus de combustion (Buser et coll., 1991).

Certains hydrocarbures aromatiques polycycliques halogénés de type polychlorobiphényles (PCB) adoptent une structure plane proche de celle des dioxines : il s'agit des PCB portant un ou plusieurs atomes de chlore en position non-ortho, ainsi que des PCB portant un atome de chlore en position ortho (mono ortho). Ces PCB coplanaires présentent une activité semblable à celle des dioxines, et sont donc appelés PCB « *dioxin-like* ».

Caractéristiques physicochimiques

Du fait de leur toxicité, les PCDD et les PCDF sont des molécules généralement synthétisées en quantité si faible qu'il est difficile d'obtenir des données sur leurs caractéristiques. Les données expérimentales sur les propriétés physicochimiques des dioxines sont donc rares (tableau 1.II), ce qui donne un grand intérêt aux valeurs obtenues à l'aide de méthodes prédictives basées sur la modélisation assistée par ordinateur. Les caractéristiques physicochimiques des PCDD et des PCDF sont étroitement liées au degré de chloration des structures aromatiques.

Tableau 1.II : Caractéristiques physicochimiques des dioxines polychlorées

Produits	CAS RN*	PM**	Point de fusion (°C)	Pression de vapeur (Pa, à 25 °C)	Solubilité dans l'eau (mg/l, à 25 °C)	Constante de Henry (Pa × m ³ /mol)	log P***
Dibenzo- <i>p</i> -dioxine	262-23-4	184,2	122-123	$5,5 \times 10^{-2}$	0,87	11,70	4,30
2,7-DCDD	33857-26-0	253,0	209-210	$1,2 \times 10^{-4}$	$3,75 \times 10^{-3}$	8,10	5,75
2,3,7,8-TCDD	1746-01-6	321,98	305-306	$2,0 \times 10^{-7}$	$1,93 \times 10^{-5}$	3,34	6,80
1,2,3,7,8-PeCDD	40321-76-4	356,42	240-241	$5,8 \times 10^{-8}$	-	-	6,64
1,2,3,4,7,8-HxCDD	39227-28-6	390,87	273-275	$5,1 \times 10^{-9}$	$4,42 \times 10^{-6}$	1,08	7,80
1,2,3,6,7,8-HxCDD	57653-85-7	390,87	285-286	$4,8 \times 10^{-9}$	-	-	-
1,2,3,7,8,9-HxCDD	19408-74-3	390,87	243-244	$6,5 \times 10^{-9}$	-	-	-
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	35822-46-9	425,31	264-265	$7,5 \times 10^{-10}$	$2,40 \times 10^{-6}$	1,27	8,00
OCDD	3268-87-9	460,76	325-326	$1,1 \times 10^{-10}$	$0,74 \times 10^{-7}$	0,68	8,20

* CAS RN : Numéro *chemical abstract* ; ** PM : Poids moléculaire ; *** log P : logarithme du coefficient de partage octanol/eau

Parmi les PCDD et les PCDF qui attirent le plus l'attention, se trouvent les congénères chlorés en position latérale (2,3,7,8) car ce sont les plus toxiques. La potentialité toxique de ces 17 congénères peut être exprimée en référence au composé ayant la plus grande toxicité, par l'intermédiaire du concept d'équivalent toxique (TEF, *toxic equivalent factor*). Celui-ci a été développé à partir de 1977 pour donner une valeur toxicologique à un mélange de composés chimiquement proches et ayant le même mécanisme d'action, c'est-à-dire actifs sur le même récepteur. Défini à partir de résultats *in vitro* modulés par les données *in vivo*, le TEF est réévalué fréquemment par l'Organisation mondiale de la santé en fonction de l'évolution des connaissances. Ce concept a d'abord été appliqué aux PCDD/PCDF puis étendu à d'autres membres de la famille des hydrocarbures aromatiques polycycliques halogénés (HAPH), dont les 12 PCB *dioxin-like* (tableau 1.III, réévaluation de 1997).

Tableau 1.III : Facteurs d'équivalence de toxicité (TEF) des PCDD, PCDF et PCB *dioxin-like* (Van den Berg et coll., 1998)

Congénères	TEF
PCDD	
2,3,7,8-TCDD	1
1,2,3,7,8-PeCDD	1
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0,1
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0,1
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0,1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0,01
OCDD	0,0001
PCDF	
2,3,7,8-TCDF	0,1
1,2,3,7,8-PeCDF	0,05
2,3,4,7,8,-PeCDF	0,5
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0,1
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0,1
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0,1
2,3,4,6,7,8,-HxCDF	0,1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0,01
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0,0001
OCDF	
PCB	
<i>Non ortho</i>	
3,3',4,4'-TCB	0,0001
3,3',4',5'-TCB	0,0001
3,3',4,4',5-PeCB	0,1
3,3',4,4',5,5'-HxCB	0,01
<i>Mono ortho</i>	
2,3,3',4,4'-PeCB	0,0001
2,3,4,4',5-PeCB	0,0005
2,3',4,4',5-PeCB	0,0001
2',3,4,4',5-PeCB	0,0001
2,3,3',4,4',5-HxCB	0,0005
2,3,3',4,4',5'-HxCB	0,0005
2,3',4,4',5,5'-HxCB	0,00001
2,3,3',4,4',5,5'-HpCB	0,0001

Températures de fusion

Les températures de fusion augmentent avec le nombre d'atomes de chlore, de 122-123 °C pour la dibenzo-*p*-dioxine, à 325-326 °C pour l'octachloro-dibenzo-*p*-dioxine (OCDD).

Adsorption particulaire

L'adsorption de molécules sur des particules est corrélée à la teneur en matières organiques ou au contenu en carbone de ces particules. Le coefficient d'adsorption par unité de carbone organique (Koc) est étroitement lié aux autres coefficients de partage qui déterminent la distribution des molécules organiques entre les composants eau/air/sol et dont dépend la répartition dans l'environnement.

Les PCDD et les PCDF s'adsorbent fortement sur les particules dans l'air, le sol et l'eau. L'adsorption est d'autant plus forte que les congénères sont plus chlorés et ainsi limite le processus de biodégradation. Comme la désorption est difficile, ces polluants sont persistants dans l'environnement. La distribution sol/air montre cependant des variations saisonnières et journalières car elle dépend de la température. Ces variations concernent essentiellement les dérivés ayant moins de 6 atomes de chlore (Cleverly et coll., 1999).

Volatilité

La capacité d'un produit chimique à se volatiliser est liée à sa pression de vapeur. Quelques valeurs expérimentales sont disponibles pour une dizaine de congénères. Les pressions de vapeur de l'ensemble des congénères peuvent néanmoins être calculées.

Les PCDD et les PCDF sont des composés peu volatils. Ils ont des valeurs de tension de vapeur d'autant plus faibles que le degré de chloration est élevé. Ceci rend négligeable leur dispersion sous forme gazeuse, mais n'exclut pas leur dispersion par voie aérienne en cas d'adsorption sur des particules.

La distribution d'un produit chimique entre l'air et l'eau est décrite par la loi de Henry. Elle permet d'évaluer le potentiel d'évaporation d'un composé à partir d'une solution aqueuse. Pour les dioxines, les valeurs sont inversement proportionnelles au degré de chloration.

Solubilité en milieu aqueux et dans les solvants

Les dioxines présentent une très faible solubilité dans l'eau. L'hydrophobie de ces molécules est proportionnelle au nombre d'atomes de chlore. Elle se traduit par des valeurs élevées du log P (logarithme des coefficients de partage octanol/eau compris entre 4,3 et 8,2). Une évaluation mathématique des coefficients de partage pour l'ensemble des congénères de PCDD et de PCDF a été publiée (Govers et coll., 1996).

La modélisation assistée par ordinateur et des programmes de calculs complexes permettent d'évaluer certaines propriétés physicochimiques de nouvelles molécules en l'absence de données expérimentales (Analisys, 1999). Ainsi la 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-*p*-dioxine peut être représentée avec son « nuage lipophile » grâce à un programme de calcul du « potentiel de lipophilie moléculaire » (PLM).

La lipophilie de ces composés organochlorés leur permet de traverser les biomembranes cellulaires et de s'accumuler dans l'organisme (tissus adipeux, foie...). Ce comportement explique aussi la forte tendance de ces molécules à se concentrer dans les matières grasses tout au long de la chaîne alimentaire.

La 2,3,7,8-TCDD est légèrement soluble dans les solvants chlorés (tableau 1.IV) (Crummett et Stehl, 1973).

Tableau 1.IV : Solubilité de la 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-*p*-dioxine dans différents solvants chlorés et non chlorés

Solvant	Solubilité à 25 °C	
	g/l	g/kg
1,2 dichlorobenzène	1,8	1,4
Chlorobenzène	0,8	0,72
Tétrachloroéthylène	0,68	0,48
Chloroforme	0,55	0,37
Benzène	0,47	0,57
Acétone	0,09	0,11
Méthanol	0,01	0,01
Eau *	2×10^{-7}	2×10^{-7}

* la valeur de la solubilité dans l'eau est aujourd'hui établie à 2×10^{-8} g/l

Stabilité thermique et chimique

Les PCDD et les PCDF sont stables jusqu'à 800 °C. De ce fait, leur destruction par incinération devra s'effectuer à des températures supérieures et avec un temps minimum de contact de 2 secondes. La destruction des dioxines n'est totale qu'à 1 300 °C, température obtenue dans les torchères à plasma utilisées pour la vitrification de différents types de déchets.

La stabilité chimique des PCDF et des PCDF est tout à fait remarquable. Quel que soit le type de réactif utilisé (acide, base, réducteur ou oxydant), leur dégradation ne peut être obtenue que dans des conditions drastiques. Ces dérivés chlorés peuvent être chimiquement dégradés en présence d'hydroxyde de potassium (potasse) en solution dans le polyéthylèneglycol (Peterson et Milicic, 1992) ou bien dans la 1,3-diméthyl-2-imidazolidinone (Oku et coll., 1995).

Dégradation et métabolisme

Les produits chimiques sont transformés de différentes façons dans l'environnement, l'hydrolyse et la photolyse étant les voies essentielles de la dégradation abiotique des xénobiotiques organiques.

Photolyse

La photolyse est une des rares voies de dégradation des PCDF et des PCDF dans l'environnement. L'absorption directe ou indirecte (par l'intermédiaire d'un sensibilisateur comme l'acide humique) d'énergie solaire (UV-B 290-330 nm) conduit à des dégradations chimiques.

La photodéchloration serait la réaction la plus importante. Elle concerne plus particulièrement les congénères les plus chlorés. Les atomes de chlore préférentiellement éliminés sont situés en position *peri* (1,4,6,9). Les positions latérales (2,3,7,8) étant épargnées, cette réaction de déchloration peut ainsi conduire à la formation de 2,3,7,8-TCDD à partir de l'OCDD (Kieaitwong et coll., 1990).

L'oxydation de la dibenzo-*p*-dioxine a également été étudiée et plusieurs produits de dégradation identifiés (Massé et Pelletier, 1987). Dans l'acétonitrile, l'hexane ou le méthanol, l'irradiation conduit à une cascade d'hydroxylations suivie d'une ouverture de cycle avec formation d'acide 2-hydroxybenzoïque. Cependant, la longueur d'onde utilisée dans cette étude est inférieure à celles qui correspondent à la lumière solaire (> 290 nm). La dégradation photochimique par hydroxylation semble être, cependant, une voie de décomposition possible dans l'atmosphère mais ne concernerait cette fois que les congénères les moins chlorés. Une estimation, non vérifiée expérimentalement, évalue la demi-vie des PCDF et des PCDF entre 0,5 et 39 jours selon leur degré de chloration (Atkinson, 1991).

Dans l'eau, la photodéchloration est beaucoup plus lente qu'en phase gazeuse et privilégie les atomes situés en positions latérales. La vitesse de réaction augmente fortement en présence de solvants polaires (hexane > benzène > méthanol > acétonitrile). Sous irradiation par la lumière du jour, la demi-vie de la 1,3,6,8-TCDD est de 3,5 jours dans l'eau, valeur dix fois plus importante que dans un mélange eau/acétonitrile (Choudhry et Webster, 1989).

Dans le sol, la photodéchloration est limitée par la faible pénétration des rayons ultraviolets. Elle concerne les atomes de chlore situés en position *peri* et semble malheureusement favoriser l'obtention de 2,3,7,8-TCDD (Miller et coll., 1989 ; Kieaitwong et coll., 1990 ; Tysklind et coll., 1992).

Du fait de la faible volatilité des PCDF et des PCDF, les études en phase gazeuse sont difficiles. De nouveau, les atomes de chlore en position *peri* sont les plus facilement éliminés. Les études sur les PCDD et les PCDF adsorbés sur

des particules en suspension (cendres d'incinération) montrent des résultats similaires.

La photodéchloration se révèle de ce fait, être bien plus une voie de synthèse qu'une voie de dégradation car elle participe à l'accumulation de 2,3,7,8-TCDD et à l'augmentation globale des coefficients de toxicité, la 2,3,7,8-TCDD étant 10 000 fois plus toxique en toxicité aiguë que l'OCDD.

Dégradation catalytique

Les émissions gazeuses d'incinérateurs qui sont retraitées dans des unités catalytiques (vanadium-tungstène) voient leurs taux (en TEQ/m³) de PCDD et de PCDF réduits de 90 % (Ide et coll., 1996). Les taux émis par les gaz d'échappement de véhicules équipés de pots catalytiques (rhodium, palladium, platine...) sont également réduits (Ballschmiter et coll., 1986 ; Marklund et coll., 1987 ; Ree et coll., 1988).

La déchloration de l'OCDD et de l'OCDF est également catalysée sur les cendres d'incinération maintenues à 350 °C pendant une heure (Ishida et coll., 1998) ou bien sur des structures inorganiques comme l'alumine (Schoonenboom et coll., 1992). Le chlorure cuivrique, puissant catalyseur des réactions d'halogénéation des composés aromatiques, catalyse également les réactions de déchloration des PCDF et des PCDF (Hagenmaier et coll., 1987).

Les recherches sur l'élimination des produits toxiques ont permis le développement de nouveaux procédés. La dégradation des PCDF et des PCDF en acides chloroacétique, acétique et formique, par γ -irradiation a été rapportée (Paur et coll., 1998).

Métabolisation par les micro-organismes

La stabilité biochimique est très importante pour les composés les plus chlorés. Néanmoins, plusieurs études menées sur la biodégradabilité des polluants environnementaux montrent que des micro-organismes sont capables de métaboliser les PCDD et les PCDF.

Ainsi, des bactéries peuvent transformer les structures dibenzo-*p*-dioxine et dibenzofurane en dérivés trihydroxybiphényles puis en 1,2-dihydroxybenzène (catéchol) (Wittich et coll., 1992).

La déchloration dans des conditions anaérobies des dérivés chlorés (1,2,3,4-TCDD, 2,3,7,8-TCDD, OCDD) est également rapportée (Beurskens et coll., 1995 ; Takada et coll., 1996). Il s'agit d'une réaction de transfert électronique qui se traduit par la libération de chlore sous forme d'ions chlorure Cl⁻ et son remplacement sur le noyau aromatique par un atome d'hydrogène (figure 1.2).

Différentes méthodes de calcul des enthalpies libres de formation des 75 congénères de PCDD en phase gazeuse ou en solution ainsi que l'évaluation de leurs potentiels redox ont été mises en œuvre. Les potentiels redox

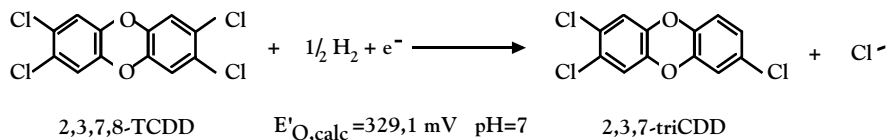


Figure 1.2: Réaction de déchloration par transfert électronique de la 2,3,7,8-TCDD

calculés ont montré que la réaction de déchloration réductrice des PCDD est une réaction exergonique.

Les micro-organismes peuvent donc en théorie utiliser les PCDD comme accepteurs d'électrons et comme source d'énergie. Une technique de bioremédiation des sites contaminés pourrait consister à utiliser la déchloration des dioxines par des micro-organismes dans des conditions anaérobies.

Des champignons dégradent naturellement la lignine en libérant du peroxyde d'hydrogène en présence de peroxydases. Cette batterie enzymatique leur permet également de métaboliser de nombreux polluants organiques (hydrocarbures aromatiques, PCB, chlorophénols). Ils catalysent aussi les réactions d'oxydation-réduction de la 2,4,7,8-TCDD et de la 2,7-DCDD (Bumpus et coll., 1985 ; Valli et coll., 1992).

Métabolisation chez les animaux supérieurs

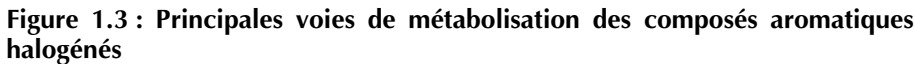
Le métabolisme des PCDF et des PCDF et les effets toxiques qui peuvent en découler sont, chez les animaux supérieurs, variables selon les espèces (Van den Berg et coll., 1994).

Le métabolisme oxydatif des structures aromatiques halogénées en présence de monooxygénases à cytochromes P450 a été décrit (figure 1.3).

La première étape de métabolisation de ces composés aromatiques (arènes) correspond à la fixation d'un atome d'oxygène (provenant du dioxygène) sur une des doubles liaisons du noyau aromatique. L'époxyde (oxyde d'arène) ainsi formé est en général un intermédiaire instable très réactif, qui peut spontanément se réarranger en phénol.

Une autre possibilité est l'ouverture du noyau époxyde par réaction avec une molécule d'eau en présence d'époxyde hydrolase. Cette ouverture conduit à la formation d'un trans-diol qui peut à son tour se déshydrogéner en 1,2-diphénol (catéchol), lui-même oxydable en 1,2-benzoquinone (ortho-quinone). Les trans-diols et les catéchols peuvent être conjugués avec l'acide glucuronique ou avec l'acide sulfurique en présence des transférases correspondantes avec formation de glucuronides ou de sulfates hydrosolubles.

L'ouverture du cycle époxyde peut également avoir lieu par réaction avec le glutathion (tripeptide soufré) en présence de glutathion-S-transférase. Cette



Toutes ces réactions sont des étapes de détoxication et les métabolites formés sont facilement éliminés soit par voie urinaire soit par la bile. Les époxydes et les quinones ont par ailleurs des propriétés électrophiles et sont susceptibles d'attaquer les sites nucléophiles des macromolécules biologiques (protéines, acides nucléiques...) conduisant à la formation d'adduits.

Chez le rat, l'étude du métabolisme de quelques congénères de dioxines parmi les moins toxiques (non substitués en 2,3,7,8) met en évidence la formation de dérivés hydroxylés. Le transfert de groupe sulfate par conjugaison avec le sulfate actif (APTS) est également rapporté mais ne concerne que les dérivés non- et monochlorés.

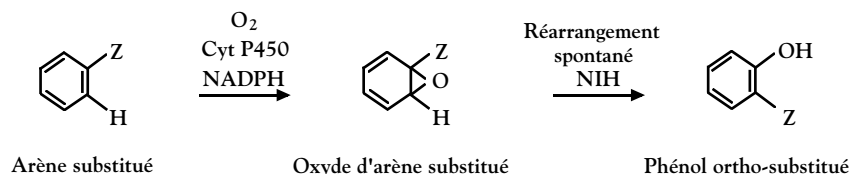


Figure 1.4 : Migration d'un substituant par réarrangement d'un oxyde d'arène (NIH-shift)

La métabolisation de la 2,3,7,8-TCDD passe par des réactions d'oxydation et de déchloration. Le principal métabolite obtenu est la 2-hydroxy-3,7,8-TrCDD. L'identification de la 2-hydroxy-1,3,7,8-TCDD montre également le déplacement d'un atome de chlore (réarrangement dit NIH shift) en position *péri*. La coupure des liaisons carbone/oxygène conduit à un dihydroxy tétra-chlorodiphényle éther puis à la formation de dichlorocatéchol. Certains métabolites glucurono-conjugués se retrouvent dans la bile et sont libérés par traitement à la β -glucuronidase. L'OCDD ne semble pas métabolisée chez le rat. Chez le chien, le métabolite principal est la 2-hydroxy-1,3,7,8-TCDD. Il est également suggéré que ce métabolite provient de la formation d'un groupe époxyde en position 3-4, suivi d'un déplacement de chlore en position 1 (figure 1.5). Chez le chien, contrairement au rat, les métabolites glucurono-conjugués ne sont pas retrouvés.

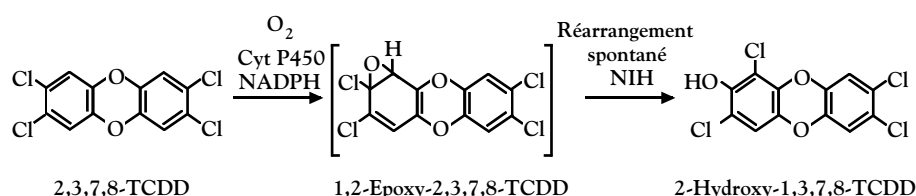


Figure 1.5 : Migration d'un substituant sur la 2,3,7,8-TCDD par réarrangement d'un oxyde d'arène (NIH-shift)

L'hydroxylation et la déchloration sont également les voies métaboliques préférentielles pour les PCDF.

Les voies métaboliques et les taux de conversion sont sensiblement équivalents pour les dérivés chlorés, fluorés et les dérivés mixtes (Weber et Hagenmaier, 1994 ; Weber et coll., 1995, 1997).

Les dérivés bromés sont principalement issus de la pyrolyse de produits ignifugeants et les produits mixtes bromés-chlorés, des procédés d'incinération (Luijk et coll., 1992). Pour les dérivés polybromés, les valeurs de coefficients de partage n-octanol/eau (log P) sont sensiblement plus élevées que celles des homologues polychlorés. Malgré leur importante lipophilie, leur persistance

dans l'environnement est cependant moindre car ils sont plus sensibles aux biotransformations. En effet, la liaison covalente d'un atome de brome sur le cycle benzénique n'est pas aussi forte que celle d'un atome de chlore et ils sont sensibles aux ultraviolets. Chez le rat, le métabolisme des dérivés bromés apparaît plus rapide que celui des dérivés chlorés. Des métabolites hydroxylés ont également été mis en évidence ainsi que le dihydroxytétrabromodiphényle éther, attestant de l'ouverture du cycle dioxane (Weber et Greim, 1997).

En conclusion, une bonne connaissance des propriétés physiques et chimiques des polluants est primordiale pour comprendre et prédire leur mobilité dans les écosystèmes, leur dégradation (abiotique et biotique) et en finale leur capacité d'accumulation dans l'environnement. Dans le sol, les sédiments, l'eau et probablement dans l'air, les PCDD et les PCDF se trouvent adsorbés sur des particules du fait de leur faible solubilité dans l'eau et de leur lipophilie. Une fois adsorbées, ces molécules ont une possibilité réduite de désorption. La biopersistance des PCDD et des PCDF dépend donc directement de la teneur en matières organiques qui complexent fortement ces composés. Leur migration ultérieure est limitée et les PCDD et les PCDF se concentrent ainsi en surface dans les sols.

BIBLIOGRAPHIE

ATKINSON R. Atmospheric lifetimes of dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans. *Sci Total Environ* 1991, **104** : 17-33

ANALYSIS. Importance of lipophilicity in molecular design. **27**, n°1, 1999. Wiley-VHC EDP Sciences

BALLSCHMITER K, BUCHERT H, NIEMCZYK R, MUNDER A, SWEREW M. Automobile exhausts versus municipal waste incineration as sources of the polychlorodibenzodioxins (PCDD) and furans (PCDF) found in the environment. *Chemosphere* 1986, **15** : 901-915

BEURSKENS JEM, TOUSSAINT M, DE WOLF J, VAN DER STEEN JMD, SLOT PC et coll. Dehalogenation of chlorinated dioxins by an anaerobic microbial consortium from sediment. *Environ Toxicol Chem* 1995, **14** : 939-943

BUMPUS JA, TIEN M, WRIGHT D, AUST SD. Oxydation of persistent environmental pollutants by a white rot fungus. *Science* 1985, **228** : 1434-1436

BUSER HR, DOLEZAR IS, WOLFENBERGER M, RAPPE C. Polychlorodibenzothiophenes, the sulfur analogues of polychlorodibenzofurans identified in incineration samples. *Environ Sci Technol* 1991, **25** : 1637-1643

CHOUDHRY GG, WEBSTER GRB. Environmental photochemistry of PCDDs. 2. Quantum yields of direct phototransformation of 1,2,3,7-tetra-, 1,3,6,8-tetra-, 1,2,3,4,6,7,8-hepta-, and octachlorodibenzo-*p*-dioxin in aqueous acetonitrile and their sunlight half-lives. *J Agric Food Chem* 1989, **37** : 254-261

CLEVERLY D, WINTERS D, SCHWEER G, MCCARTHY S, FERRARIO J et coll. A study of the diurnal and nocturnal measurement of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins (CDDs) and polychlorinated dibenzofurans (CDFs) in ambient air. *Organohalogen Compounds* 1999, **41** : 335-338

CRUMMETT WB, STEHL RH. Determination of chlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans in various materials. *Environ Health Perspect* 1973, **5** : 15-25

GOVERS HAJ, LOONEN H, PARSONS JR. Nonlinear dependence of bioconcentration factors on *n*-octanol-water partition coefficients of chlorinated dibenzofurans and dibenzo-*p*-dioxins. *SAR and QSAR in Environmental Research* 1996, **5** : 63-78

HAGENMAIER M, BRUNNER M, HAAG R, KRAFT M. Copper catalyzed dechlorination : hydrogenation of PCDD/PCDF and other chlorinated aromatic compounds. *Environ Sci Technol* 1987, **21** : 1085-1088

HAKK H, LARSEN GL, FEIL VJ. Dioxin metabolism. Novel sulfate metabolites of 1,2,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin isolated from rat urine. *Organohalogen Compounds* 1995, **25** : 265-267

HEINBUCH D, STIEGLITZ L. Formation of brominated compounds on fly ash. *Chemosphere* 1993, **27** : 317-324

IARC. Polychlorinated dibenzo-*para*-dioxins and polychlorinated dibenzofurans. *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans* 1997, **69** : 665 p

IPCS (International programme on chemical safety, WHO). Polybrominated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans. *Environmental Health Criteria* 205 1998, 303 p

IDE K, KASHIWABARA K, OKADA S, MORI T, HARA M. Catalytic decomposition of dioxin from MSW incinerator flue gas. *Chemosphere* 1996, **32** : 189-198

ISHIDA M, SHIJI R, NIE P, NAKAMURA N, SAKAI S. Full-scale plant study on low temperature thermal dechlorination of PCDDs/PCDFs in fly ash. *Chemosphere* 1998, **37** : 2299-2308

KIEAITWONG S, NGUYEN LV, HERBERT VR, HACKETT M, MILLER GC et coll. Photolysis of chlorinated dioxins in organic solvents and soils. *Environ Sci Technol* 1990, **24** : 1575-1580

LUIJK R, GOVERS HA, NEILSEN L. Formation of polybrominated dibenzofurans during extrusion of high impact polystyrene/decabromodiphenyl ether/antimony (III) oxide. *Environ Sci Technol* 1992, **26** : 2191-2198

MARKLUND S, RAPPE C, TYSKLIND M, EGEBACK KE. Identification of polychlorinated dibenzofurans and dioxins in exhausts from cars run on leaded gasoline. *Chemosphere* 1987, **16** : 29-36

MASSE R, PELLETIER B. Photochemistry of dibenzo-*p*-dioxin in organic solvents at 253.7 nm : GC/MS characterization of the phototransformation products. *Chemosphere* 1987, **16** : 7-17

MILLER GC, HEBERT VR, MILLE MJ, MITZEL R, ZEPP RG. Photolysis of octachlorodibenzo-*p*-dioxin on soils : production of 2,3,7,8-TCDD. *Chemosphere* 1989, **18** : 1265-1274

OKU A, TOMARI K, KAMADA T, YAMADA E, MIYATA H, AOZASA O. Destruction of PCDDs and PCDFs. A convenient method using alkali-metal hydroxide in 1,3-dimethyl-1-imidazolidinone (DMI). *Chemosphere* 1995, **31** : 3873-3878

- PAUR HR, BAUMANN W, MÄTZING H, JAY K. Electron beam induced decomposition of chlorinated aromatic compounds in waste incinerator offgas. *Radiat Phys Chem* 1998, **52** : 355-359
- PETERSON R, MILICIC F. Chemical treatment of dioxin residues from wastewater processing. *Chemosphere* 1992, **25** : 1565-1568
- REE KCM, EVERS EH, VAN DEN BERG M. Mechanism of formation of polychlorinated dibenzo(p)dioxins (PCDDs) and polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) from potential industrial sources. *Toxicological and Environmental Chemistry* 1988, **17** : 171-179
- SCHOONENBOOM MJ, SMIT PN, OLIE K. Alumina as a model support in the formation and dechlorination of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans. *Chemosphere* 1992, **25** : 1897-1906
- TAKADA S, NAKAMURA M, MATSUEDA T, KONDO R, SAKAI K. Metabolites of 2,3,7,8-tetrachloro- and octachlorodibenzo-*p*-dioxin, and degradation of PCDDs and PCDFs in a fly ash sample by the white rot fungus *Phanerochaete sordida* YK-624. *Organohalogen Compounds* 1996, **28** : 64-67
- TYSKLIND M, CAREY AE, RAPPE C, MILLER GC. Photolysis of OCDF and OCDD on soil. *Organohalogen Compounds* 1992, **8** : 293-296
- VALLI K, WARIISHI H, GOLD M. Degradation of 2,7-dichlorodibenzo-*p*-dioxin by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *J Bacteriol* 1992, **174** : 2131-2137
- VAN DEN BERG M, DE JONGH J, POIGER H, OLSON JR. The toxicokinetics and metabolism of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins (PCDD) and dibenzofurans (PCDF) and their relevance for toxicity. *Crit Rev Toxicol* 1994, **24** : 1-74
- VAN DEN BERG M, BIRNBAUM L, BOSVELD BTC, BRUNSTRÖM B, COOK P et coll. Toxic equivalent factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife. *Environ Health Perspectives* 1998, **106** : 775-792
- WEBER R, HAGENMAIER H. Polyfluorinated dibenzodioxins/furans - synthesis, analysis and formation. *Organohalogen Compounds* 1994, **19** : 7-11
- WEBER LWD, GREIM H. The toxicity of brominated and mixed-halogenated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans : an overview. *J Toxicol Environ Health* 1997, **50** : 195-215
- WEBER R, SCHRENK D, SCHMITZ HJ, POELLINGER L, HAGENMAIER H. Toxicokinetics, metabolism, and EROD induction effect of fluorinated dibenzodioxins and dibenzofurans. Dioxin-Informationsveranstaltung EPA Dioxin-Reassessment. *Organohalogen Compounds* 1995, **22** : 299-302
- WEBER R, SCHMITZ HJ, SCHRENK D, HAGENMAIER H. Metabolic degradation, inducing potency and metabolites of fluorinated and chlorinated-fluorinated dibenzodioxins and dibenzofurans. *Chemosphere* 1997, **34** : 29-40
- WITTICH RM, WILKES H, SINNEWELL V, FRANCKE W, FORTNAGEL P. Metabolism of dibenzo-*p*-dioxin by *Shingomonas* sp. strain RW. *Appl Environ Microbiol* 1992, **58** : 1005-1010

2

Mécanismes de formation, sources de production

Afin de mieux prévenir la production des PCDF et des PCDD, il apparaît essentiel de comprendre leurs processus de synthèse. Or, de nombreux paramètres influencent la synthèse de ces composés toxiques et peu d'entre eux ont aujourd'hui un rôle bien défini (Doute et coll., 1999). Ainsi, malgré les nombreuses études expérimentales sur ce sujet, les mécanismes réactionnels mis en jeu restent encore de nos jours peu connus.

Deux voies majeures sont néanmoins retenues : la voie dite des précurseurs qui correspond à une synthèse à partir de petites molécules organiques chlorées et la voie dite synthèse *de novo* qui correspond à une synthèse à partir de structures macromoléculaires présentes dans les cendres d'incinération (Lustenhouwer et coll., 1980).

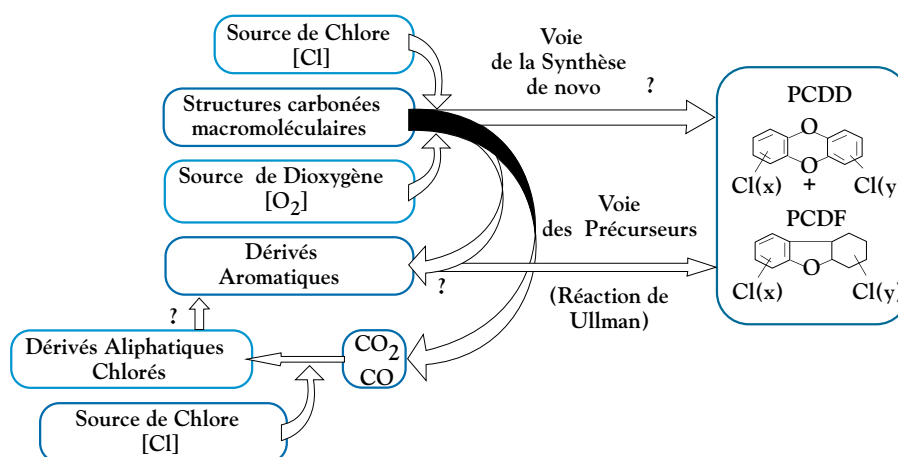


Figure 2.1 : Voies de synthèse des PCDF et des PCDD

Les PCDD et les PCDF ont une faible probabilité de se former à très hautes températures en phase gazeuse. Ces molécules sont majoritairement produites sur les cendres d'incinération lors du refroidissement des fumées dans les zones

de postcombustion (Shaub et Tsang, 1983). La température influence donc fortement la synthèse et la dégradation des PCDF et des PCDF. La synthèse se déroule entre 250 et 450 °C avec un optimum à 300-325 °C, alors que la dégradation totale se fait à partir de 1 300 °C (Shaub et Tsang, 1985 ; Mariani et coll., 1990 ; Unsworth et Dorans, 1993 ; Townsend et coll., 1995).

Cendres d'incinération : sources de précurseurs, de catalyseurs et surfaces actives

Le rôle des cendres d'incinération en tant que telles n'est pas encore précisé. Cependant, elles sont supposées intervenir à plusieurs niveaux dans la synthèse *de novo*.

Dans un premier temps, elles apportent les éléments, essentiels à la synthèse, que sont les structures carbonées (carbone résiduel et précurseurs adsorbés) ainsi que différents éléments comme les sources de chlore et les catalyseurs.

Dans un second temps, les cendres d'incinération semblent se comporter comme des surfaces actives sur lesquelles la synthèse des dioxines prendrait place. De nombreuses études ont en effet montré que la synthèse des PCDF et des PCDF se réalisait majoritairement sur les cendres volantes. Dans la phase gazeuse, le taux de dioxines n'excède jamais 10 ng/nm³, mais peut atteindre 300 ng/nm³ sur les cendres (McKee, 1970, 1981 ; Mariani et coll., 1990 ; De Graaf et coll., 1993 ; Huang et Buekens, 1995).

Il est aussi expérimentalement possible de mimer l'action physique de ces cendres en utilisant des structures minérales artificielles comme la silice, l'alumine, la laine de verre ou la magnésie (Addink et coll., 1991). L'effet de « rapprochement » des différents éléments nécessaires à la synthèse semble ici évident. De plus, la forte production qui apparaît durant la phase de refroidissement des cendres plaide aussi en faveur de cette hypothèse puisque l'abaissement de la température conduit très certainement à une « condensation » des différents précurseurs sur les cendres.

Structures carbonées : bases de la synthèse des PCDF et des PCDF

Les structures carbonées résiduelles sont des éléments essentiels à la synthèse *de novo*. Elles sont apportées par les cendres d'incinération qui peuvent en contenir jusqu'à 7 % (Milligan et Altwicker, 1993).

La synthèse de PCDD et de PCDF à partir du carbone résiduel des cendres d'incinération a été vérifiée expérimentalement (Vogg et coll., 1987).

Il apparaît que la nature même de ces structures carbonées influence fortement les rendements de synthèse. Certaines structures graphitiques déformées (suies, charbon, tourbe...) sont des sources préférentielles de PCDD et de

PCDF alors que les structures graphitiques régulières comme le graphite en produisent peu (Huang et Buekens, 1996 ; Stieglitz et coll., 1991a, 1994) (figure 2.2).

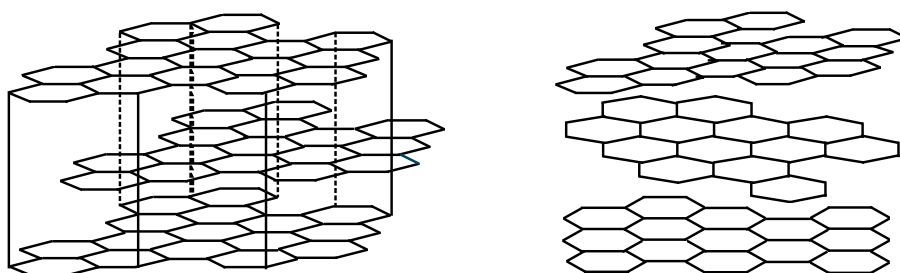


Figure 2.2 : Structures carbonées prégraphitiques régulières (gauche) et irrégulières (droite)

La synthèse de composés aromatiques a de ce fait rapidement été corrélée au processus de combustion incomplète des structures carbonées. La régularité des structures carbonées est un facteur essentiel dans la vitesse de dégradation de ces structures (vitesse de gazéification). Il existe ainsi une bonne corrélation entre la vitesse de gazéification des structures carbonées et les taux de synthèse des PCDF et des PCDF, avec en plus les températures réactionnelles optimales qui coïncident parfaitement (Milligan et Altwicker, 1993).

Le mécanisme de gazéification des structures carbonées met en jeu la formation d'un complexe métastable entre les structures carbonées et le dioxygène. Les réactions « hypothétiques » qui peuvent intervenir sont résumées dans la figure 2.3.

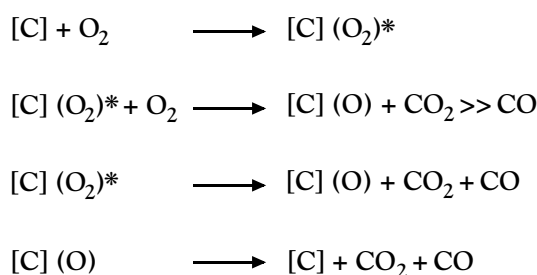


Figure 2.3 : Réactions hypothétiques de gazéification des structures carbonées

Les structures carbonées régulières sont principalement dégradées à partir de la périphérie des couches graphitiques libérant du CO_2 (65-75 %) et du CO, alors que les structures irrégulières peuvent être agressées de toutes parts, libérant ainsi des sous-unités cycliques. Néanmoins, seule une faible part des

structures prégraphitiques (1 %) conduit à la synthèse de chlorobenzènes, de chlorophénols et seulement 0,01 % à 0,04 % donne naissance à des PCDF et des PCDD (Milligan et Altwicker, 1993 ; Stieglitz et coll., 1993). D'autres structures aromatiques sont également produites en moindre quantité, par exemple les biphényles (a), les naphthalènes (b), les benzothiophènes (c) et les xanthones (d) (Stieglitz et coll., 1989a, 1991a, 1993 ; Albrecht et coll., 1992 ; Townsend et coll., 1995) (figure 2.4).

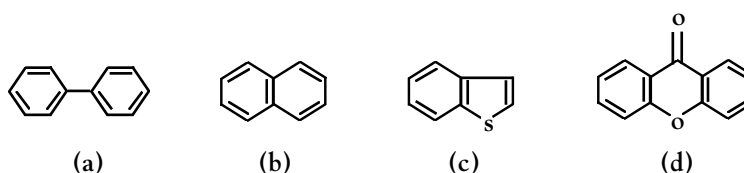


Figure 2.4 : Structures aromatiques

L'influence de la nature même des structures carbonées, ajoutée à celle des nombreux autres paramètres entrant en jeu dans la synthèse des PCDF et des PCDD, pourrait expliquer les difficultés à obtenir des mesures comparables dans les incinérateurs et dans les expériences de laboratoire.

En tant que molécules hautement chlorées, les PCDD et les PCDF ont une synthèse fortement dépendante de la présence de sources de chlore dans le milieu réactionnel.

Sources de chlore

En théorie, le remplacement d'un hydrogène sur une structure carbonée peut se faire par des halogènes sous forme de chlore, de brome ou d'iode (Puri, 1970 ; Stieglitz et coll., 1991b ; Altwicker et coll., 1994). Ce mécanisme, qui est une étape essentielle de la synthèse des dérivés polyhalogénés, a bien sûr été observé avec les PCDD et les PCDF (Lujik et coll., 1992 ; Addink et coll., 1995). Dans la synthèse *de novo*, l'origine du chlore reste néanmoins à préciser.

Réaction de Deacon

Selon Griffin, la réaction de Deacon, source de chlore très connue, serait une bonne candidate pour la synthèse de PCDD et de PCDF (Griffin, 1986). Cette réaction fait intervenir une étape de formation de dichlore à partir de l'acide chlorhydrique et du dioxygène (figure 2.5).

20 Il a cependant été montré avec un courant d'acide chlorhydrique passé sur des cendres d'incinération, que seulement 1,3 % d'acide chlorhydrique est

**Figure 2.5 : Réaction de Deacon**

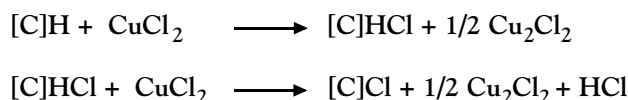
converti en dichlore, alors que le taux de chloration mesuré avec l'éthylène comme modèle de structure insaturée est 60 fois plus élevé. Cette constatation laisse supposer que d'autres sources de chlore interviennent dans les étapes de chloration.

Parmi les autres sources de chlore potentielles, les dérivés métallochlorés sont les plus souvent cités. La réaction de Deacon est par ailleurs efficacement catalysée par le CuCl_2 qui se présente alors sous des formes plus ou moins réactives comme l'oxychlorure cuivreux (Cu_2OCl_2) et le chlorure cuivreux (Cu_2Cl_2) (Tilly, 1981 ; Stieglitz et coll., 1989a).

Dérivés chlorés des métaux

Le rôle des dérivés chlorés du cuivre dans la synthèse des PCDF et des PCDF est maintenant bien établi (Addink et Altwicker, 1998). Ainsi l'addition de chlorure cuivreux (Cu_2Cl_2) et de chlorure cuivrique (CuCl_2) augmente fortement leur synthèse à partir des cendres d'incinération. L'augmentation de la concentration en Cu_2Cl_2 , et en CuCl_2 est également corrélée à une augmentation du degré de chloration des différents congénères.

Le cuivre lié au chlore est en mesure de transférer directement des atomes de chlore sur les structures carbonées des couches graphitiques (Stieglitz et coll., 1991b) (figure 2.6).

**Figure 2.6 : Transfert d'atomes de chlore**

Le mécanisme de chloration commence dès le début de la dégradation des structures carbonées et il se poursuit durant les étapes de synthèse des PCDF et des PCDF. Le CuCl_2 ayant aussi une activité catalytique dans les étapes de déchloration (Hagenmaier et coll., 1987), il est fort probable que les réactions de chloration et de déchloration sont des processus concomitants.

L'abaissement du rendement dans la synthèse est corrélé avec la diminution de la concentration en chlorure cuivrique dans le milieu réactionnel, avec de plus une absence totale de formation de dérivés polychlorés des dioxines à partir de dérivés non chlorés du cuivre, ce qui laisse penser que le cuivre au cours des étapes de chloration intervient plus comme un donneur de chlore que comme un pur catalyseur.

Catalyseurs

Le cuivre est néanmoins reconnu comme l'un des catalyseurs les plus efficaces des réactions d'halogénéation des composés aromatiques (Paquette, 1995 ; Carey et Sundberg, 1990 ; March, 1992). Son intervention sous la forme de chlorure cuivrique (CuCl_2), dans la synthèse *de novo* a été décrite pour la première fois en 1987 (Stieglitz et coll., 1994) et a été largement étudiée depuis (Lujik et coll., 1992 ; Albrecht et coll., 1992 ; Addink et Olie 1995a).

Le trichlorure de fer (FeCl_3) est également proposé comme élément catalytique dans la synthèse *de novo* mais il est environ 25 fois moins efficace dans les réactions de chloration.

Outre les effets sur la chloration des structures aromatiques, les ions Cu^{2+} catalysent fortement les réactions d'oxydation/gazéification des structures carbonées à des températures de 350-450 °C (McKee, 1970, 1981) (figure 2.7).

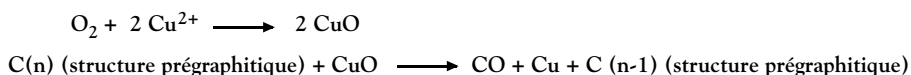


Figure 2.7 : Catalyse des réactions d'oxydation/gazéification par les ions Cu^{2+}

Dioxygène

L'oxygène est, bien entendu, un élément indispensable au processus de combustion des structures carbonées. Il est également essentiel à la synthèse des PCDF et des PCDD et plus particulièrement lors de la synthèse *de novo* (Stieglitz et Vogg, 1987 ; Vogg et coll., 1987 ; Stieglitz et coll., 1989b ; Altwicker et coll., 1994 ; Addink et Olie, 1995b).

Ainsi, sous un courant de diazote pur, peu de PCDD et de PCDF sont synthétisés alors que l'ajout de 1 % de dioxygène dans le courant gazeux augmente fortement leur production. En général, le ratio PCDD/PCDF augmente avec le taux de dioxygène mais le degré de chloration des congénères n'est pas changé. La synthèse des PCDD qui demande deux atomes d'oxygène serait logiquement plus sensible au taux de dioxygène que celle des PCDF correspondants (Tilly, 1981).

Le dioxygène libre est important pour la réaction de gazéification mais son intégration dans les PCDD et les PCDF n'est pas prouvée (Milligan et Altwicker, 1993, 1995 ; Addink et Olie, 1995a), d'autant que la synthèse de dioxines pourrait se faire directement à partir des structures carbonées qui peuvent contenir jusqu'à 20 % d'oxygène (Anderson, 1975). La synthèse à partir de précurseurs selon une étape de condensation d'intermédiaires de type chlorophénol (molécule déjà oxydée) peut également se faire même en absence de dioxygène, confortant l'hypothèse d'une seconde voie de synthèse à partir de précurseurs.

Voie des précurseurs : une voie minoritaire

Les nombreux travaux effectués en phase gazeuse montrent qu'il est possible de synthétiser des PCDF et des PCDF à partir de molécules organiques ayant des structures voisines et parfois même très éloignées (Addink et Olie, 1995a). C'est le cas des composés aromatiques halogénés et/ou hydroxylés comme le chlorobenzène et le chlorophénol (Karasek et Dickson, 1987 ; Dickson et coll., 1992 ; Gullet et coll., 1992). Ces molécules peuvent, dans une réaction de condensation/cyclisation, former des PCDF et des PCDF (Lujik et coll., 1994).

Selon la réaction dite de Ullmann, réaction également catalysée par le cuivre, un dérivé aromatique halogéné peut se coupler avec un phénol sous la forme de phénate, conduisant à un diaryléther (figure 2.8).

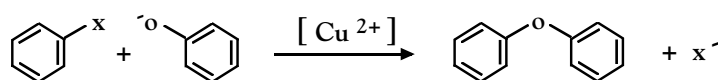


Figure 2.8 : Réaction d'Ullmann

Ainsi, le 2,4,6-trichlorophénol, par condensation/cyclisation, peut donner naissance à la 1,3,6,8-tétrachlorodibenzo-*p*-dioxine (a) et à la 1,3,7,9-tétrachlorodibenzo-*p*-dioxine (b) après un réarrangement dit de Smiles (Ree et coll., 1988 ; Lujik et coll., 1994) (figure 2.9).

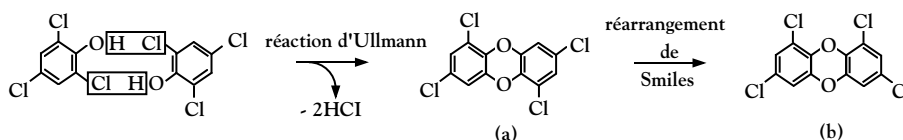


Figure 2.9 : Réarrangement d'Ullmann appliqué au 2,4,6-trichlorophénol

Selon un procédé similaire, le 2,4,5-trichlorophénol, entrant dans la synthèse de l'herbicide à base d'acide phénoxyacétique (2,4,5-T) et d'un bactéricide tristement célèbre, l'hexachlorophène, ainsi que le pentachlorophénol utilisé dans la conservation du bois à même de produire des dioxines polychlorées. Certains polychlorobiphényles (PCB) utilisés dans les transformateurs électriques sont pour leur part capables de produire principalement des PCDF.

Aujourd'hui, il est difficile de dire si la synthèse *de novo* et la voie des précurseurs passent par un intermédiaire commun du type chlorophénol.

Deux études sur ce sujet ont rapporté des résultats contradictoires. En utilisant du carbone radiomarké (^{13}C) mélangé à des cendres contenant l'isotope stable (^{12}C), une synthèse séparée de précurseurs de PCDD et de PCDF est

obtenue à partir des deux sources de carbone (Milligan et Altwicker, 1995). L'absence de mélange semble montrer que malgré la synthèse de précurseurs potentiellement volatils (chlorobenzènes) soit ils ne peuvent donner naissance à des PCDF et des PCDF, soit ils ne peuvent changer de particule. Cette observation conforte le rôle de surfaces actives des cendres d'incinération.

Au cours d'une expérience plus récente, à partir de cendres d'incinération débarrassées de toutes structures carbonées, l'ajout de carbone marqué et de carbone natif conduit à la synthèse de PCDD et de PCDF mixtes (Stieglitz et coll., 1997). Cependant, dans cette étude les deux sources de carbone sont mélangées et les fractions volatiles et résiduelles sont analysées en même temps. Seuls les PCDF ne montrent pas de double marquage, laissant supposer que la liaison C-C entre les deux cycles n'est jamais coupée et que ceux-ci proviennent de la même structure carbonée d'où la formation exclusive de PCDF à partir de polychlorobiphényles.

La synthèse de dioxines à partir de petites molécules comme les hydrocarbures aliphatiques est également réalisable au laboratoire (De Graff et coll., 1993). L'hypothèse de Stromberg (1993) permettant la réutilisation du CO₂ et du CO issus de la gazéification des structures carbonées, *via* la synthèse de dérivés aliphatiques chlorés puis de chlorobenzènes par un mécanisme réactionnel de type Fischer-Tropsch, n'est actuellement pas prouvée (Milligan et Altwicker, 1995).

En conclusion, la synthèse dite *de novo* est aujourd'hui reconnue comme la principale voie de production des PCDF et des PCDF lors du refroidissement des fumées dans les zones de post-combustion des incinérateurs. Cependant, leur synthèse ne doit pas se restreindre au seul processus d'incinération, mais doit être généralisée à tous les procédés industriels faisant intervenir une étape de combustion. Les paramètres qui influencent la synthèse *de novo*, comme la température, les catalyseurs, le dioxygène, les sources de chlore et de carbone restent à préciser. Seule une parfaite connaissance des mécanismes réactionnels mis en jeu permettra de prévenir et de lutter efficacement contre la production des PCDF et des PCDF.

BIBLIOGRAPHIE

ADDINK R, VAN BLAREEL V, VISSER R, WEVER H, SLOT P, OLIE K. Surface catalysed formation of PCDD/PCDF during municipal waste incineration. *Chemosphere* 1991, **20** : 1929-1934

ADDINK R, OLIE K. Mechanismes of formation and destruction of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans in heterogeneous systems. *Environ Sci Technol* 1995a, **29** : 1425-1435

24 ADDINK R, OLIE K. Role of oxygen in formation of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins/dibenzofurans from carbon on fly ash. *Environ Sci Technol* 1995b, **29** : 1586-1590

- ADDINK R, ANTONIOLI M, OLIE K, GOVERS HAJ. Reactions of dibenzofuran and 1,2,3,4,7,8-hexachlorodibenzo-*p*-dioxin on municipal waste incinerator fly ash. *Environ Sci Technol* 1995, **29** : 1425-1435
- ADDINK R, ALTWICKER ER. Role of copper compounds in the *de novo* synthesis of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins/dibenzofurans. *Environ Eng Sci* 1998, **15** : 19-27
- ALBRECHT ID, NAIKWADI KP, KARASEK FW. Investigation of the *de novo* synthesis process using ¹³C amorphous carbon. *Organohalogen Compounds* 1992, **8** : 217-220
- ALTWICKER ER, SCHONBERG JS, KONDURI RKY, MILLIGAN MS. PCDD/PCDF formation in incinerators hazard waste. *J Hazardous Materials* 1990, **7** : 73-87
- ALTWICKER ER, XUN Y, MILLIGAN MS. Dioxin formation over fly ash : oxygen dependence temperature dependence and phase distribution. *Organohalogen Compounds* 1994, **20** : 381-384
- ANDERSON JR. Structure of metallic catalysts. *Academic Press London*, 1975, 81-86
- CAREY FA, SUNDBERG RJ. Reactions and synthesis. *Adv Org Chem* 1990, **part B** : 601
- DE GRAAF EJ, VAN BAVEL B, RAPPE C, LOUW R. Fly ash mediated oxychlorination of 2,3 dimethyl-1 butene. Formation of PCDD/PCDF. *Organohalogen Compounds* 1993, **11** : 363-366
- DICKSON LC, LENOIR D, HUTZINGER O. Quantitative comparison of the *novo* and precursor formation of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins under simulated municipal solid waste incinerator postcombustion conditions. *Environ Sci Technol* 1992, **26** : 1822-1828
- DOUTE C, DELFEAU JL, VOVELLE C. Dioxines : de l'évaluation des impacts à la gestion du risque. CR journées techniques ADEME « Dioxines : toute la vérité sur une grande peur » Angers, 8-9 juin 1999
- GRIFFIN RD. A new theory of dioxin formation in municipal solid waste combustion. *Chemosphere* 1986, **15** : 1987-1990
- GULLET BK, BRUCE KR, BEACH LO, DRAGO M. Mechanistic steps in the production of PCDD/PCDF during waste combustion. *Chemosphere* 1992, **25** : 1387-1392
- HAGENMAIER M, BRUNNER M, HAAG R, KRAFT M. Copper catalyzed dechlorination-hydrogenation of PCDD/PCDF and other chlorinated aromatic compounds. *Environ Sci Technol* 1987, **21** : 1085-1088
- HUANG H, BUEKENS A. *De novo* synthesis of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans. Proposal of a mechanistic scheme. *Sci Total Environ* 1996, **193** : 121-141
- HUANG H, BUEKENS A. On the mechanisms of dioxin formation in combustion process. *Chemosphere* 1995, **31** : 4099-4117
- KARASEK FW, DIKSON LC. Model studies of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxin formation during municipal refuse incineration. *Science* 1987, **20** : 754-756
- LUIJK R, JANSEN J, GOVERS HAJ. Reaction of dibenzofuran and 2,3,7,8-tetrabromodibenzo-*p*-dioxin. *Organohalogen Compounds* 1992, **8** : 99-102
- LUIJK R, AKKERMANN MD, SLOT P, OLIE K, KAPTEJIN F. Mechanism of formation of PCDD and PCDF in the catalyzed combustion of carbon. *Environ Sci Technol* 1994, **28** : 312-321

- LUSTENHOUWER J WA, OLIE K, HUTZINGER O. Chlorinated dibenzo-*p*-dioxins and related compounds in incinerator effluents : a review of measurements and mechanisms of formation. *Chemosphere* 1980, **9** : 501-522
- MARCH J. Reaction mechanisms and structures. *Adv Org Chem* 1992 : 533-665
- MARIANI G, BENFENATI E, FANELLI R. Concentrations of PCDD in different points of a modern refuse incinerator. *Chemosphere* 1990, **21** : 507-517
- MC KEE DW. The copper-catalysed oxydation of graphite. *Carbon* 1970, **8** : 131-139
- MC KEE DW. The catalysed gasification reactions of carbon. *Chem Phys Carbon* 1981, **16** : 119
- MILLIGAN M, ALTWICKER E. The relationships between *de novo* synthesis of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans and low-temperature carbon gasification in fly ash. *Environ Sci Technol* 1993, **27** : 1595-1601
- MILLIGAN MS, ALTWICKER ER. Mechanistic aspects of the *de novo* synthesis of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and furans in fly ash from experiments using isotopically labeled reagents. *Environ Sci Technol* 1995, **29** : 1353-1358
- PAQUETTE LA. *Encyclopedia of reagents for organic synthesis* Wiley, New York. 1995, **2** : 1301-1326
- PURI BR. Surface complexes of carbons. *Chem Phys Carbon* 1970, **6** : 191-282
- REE KCM, EVERS EHG, VAN DEN BERG M. Mechanism of formation of polychlorinated dibenzo(p)dioxins (PCDDs) and polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) from potential industrial sources. *Toxicol Environ Chem* 1988, **17** : 171-179
- SHAUB WM, TSANG W. Dioxins formation in incinerators. *Environ Sci Technol* 1983, **17** : 721-730
- SHAUB WM, TSANG W. *Overview of dioxin formation in gas and solid phases under municipal incinerator conditions, chlorinated dioxins and dibenzofurans in the total environment II*. KEITH LW, RAPPE C, CHOUDHRY G, Eds. Butterworth publishers 1985 : 469-487
- STIEGLITZ L, EISCHBERGER M, SCHLEIHAUF G, ZWICK G, WILL R. The oxidative degradation of carbon and its role in the *de novo* synthesis of organohalogen compounds in fly ash. *Chemosphere* 1993, **27**, 343-350
- STIEGLITZ L, VOGG H. News aspects of PCDD, PCDF formation in incineration processes. *Int Workshop on municipal waste incineration* 1987, Montreal
- STIEGLITZ L, ZWICK G, BECK J, BAUTZ H, ROTH W. Carbonaceous particles in fly ash : a source for the *de novo* synthesis of organochlorocompounds. *Chemosphere* 1989a, **19** : 283-290
- STIEGLITZ L, ZWICK G, BECK J, BAUTZ H, ROTH W, VOGG H. On the *de novo* synthesis of PCDD/PCDF on fly ash of municipal waste incinerators. *Chemosphere* 1989b, **18** : 1219-1226
- STIEGLITZ L, VOGG H, ZWICK G, BECK J, BAUTZ H. On formation conditions of organohalogen compounds from particulate carbon of fly ash. *Chemosphere* 1991a, **22** : 987-995
- STIEGLITZ L, VOGG H, ZWICK G, BECK J, BAUTZ H. On formation conditions of organohalogen compounds from particulate carbon of fly ash. *Chemosphere* 1991b, **23** : 1255-1264

STIEGLITZ L, BAUTZ H, ROTH W, ZWICK G. Investigation of precursor reactions in the *de novo* synthesis of PCDD/PCDF on fly ash. *Chemosphere* 1997, **34** : 1083-1090

STIEGLITZ L, EISCHBERGER M, BAUTZ H, ROTH W, ROMER J, SCHILD D. Investigation of chloride transfer and oxidation as processes in the *de novo* synthesis of PCDD/PCDF on fly ash. *Organohalogen Compounds* 1994, **20** : 391-396

STROMBERG B. Presented at the 10th International Congress on chlorinated dioxins and related compounds. Bayreuth, Germany, *Organohalogen Compounds* 1993

TILLY J. Mechanism of catalytic action of copper chlorides in the Deacon process. *Pol J Chem* 1981, **55** : 2069-2075

TOWNSEND DI, WILSON SD, PARK CN. Mechanisms and formation and options for control of emissions of PCDDs/PCDFs from incineration. *Int Conference Proceedings*, 1995

UNSWORTH JF, DORANS H. Thermodynamic data for dioxins from molecular modelling computations : prediction of equilibrium isomer composition. *Chemosphere* 1993, **27** : 351-358

VOGG H, METZGER M, STIEGLITZ L. Recent findings on the formation and decomposition of PCDD, PCDF in municipal solid waste incineration. *Waste Manage Res* 1987, **5** : 285-294

3

Sources d'émission

Les PCDD et les PCDF sont de par leur extraordinaire biopersistance, largement disséminés dans tous les écosystèmes. De ce fait, les sources de PCDD et de PCDF doivent être considérées sous deux approches différentes :

- en tant que sources de synthèse proprement dite (synthèse *de novo*, synthèse à partir de précurseurs...) ;
- comme des sources d'extraction et de concentration de contaminants environnementaux qui proviennent de réservoirs naturels (le bois, le sol et les sédiments, les matières grasses d'origine animale...).

Pour mieux comparer les différentes sources de PCDD et de PCDF, un facteur d'émission doit être défini. Ce facteur d'émission correspond à une mesure effectuée sur les rejets, en amont ou en aval des différents systèmes utilisés pour limiter les émissions et parfois même en leur absence totale, ce qui est toujours le cas dans les situations domestiques et accidentelles.

Comme les PCDD et les PCDF sont produits sous la forme d'un mélange complexe de congénères (profil), les valeurs rapportées sont généralement exprimées en équivalent toxique (TEQ). Le TEQ est constitué de la somme des TEF (*toxic equivalent factor*) propres à l'identité et à la concentration des congénères représentés dans un mélange. Le TEF est une évaluation de la toxicité d'un congénère particulier. Un TEF est attribué à chaque congénère selon les barèmes internationaux par rapport à celui du congénère le plus toxique (2,3,7,8-TCDD) qui est arbitrairement fixé à 1. Les TEF sont mis à jour selon l'évolution des connaissances scientifiques.

Sources

Les PCDD et les PCDF sont produits dans la plupart des processus de combustion allant de la plus petite étincelle aux éruptions volcaniques et donc par les procédés industriels faisant intervenir de fortes températures (incinération, métallurgie...). Ils sont aussi involontairement produits au cours de la synthèse chimique de dérivés aromatiques chlorés.

Des études récentes montrent qu'ils peuvent également être synthétisés à partir de processus biologiques et de réactions photochimiques tout à fait naturels.

Il est difficile d'évaluer les niveaux de production de ces différentes sources tant ils dépendent des facteurs d'émission liés au type de combustible mis en œuvre, à la qualité de la combustion et au niveau réel d'activité de la source. L'importance des sources biologiques et photochimiques reste quasiment impossible à évaluer, mais il est clair, aujourd'hui, que la majorité de la production de PCDD et de PCDF résulte des activités industrielles (sources anthropogéniques) (US EPA, 1998 ; UNEP, 1999).

Incinération

La production de PCDD et de PCDF par les incinérateurs est reconnue depuis 1977 (Olie et coll., 1977). Ils ont été pendant les vingt dernières années parmi les principaux émetteurs de PCDD et de PCDF parallèlement à d'autres toxiques. Une analyse complète de fumées d'incinération a ainsi conduit à l'identification de 192 composés organiques (Jay et Stieglitz, 1995).

Aujourd'hui, de nombreuses techniques sont développées pour limiter le passage de ces toxiques dans les fumées. Aux États-Unis, l'*Environmental protection agency* (EPA) a classé les différents types d'incinérateurs en 40 groupes différents selon les technologies employées pour la combustion des déchets et le contrôle de la qualité des émissions gazeuses. Les émissions de PCDD et de PCDF peuvent être fortement réduites, grâce aux améliorations apportées aux conditions de combustion comme la quantité d'air (de 30 % à 100 % en excès), les températures de combustion élevées (en moyenne 1 100 °C), l'utilisation de charbon actif et la récupération des cendres d'incinération par des filtres électrostatiques. La neutralisation des gaz acides (HCl, dioxyde de soufre) influence directement les taux de synthèse. La simple augmentation des temps de passage dans les chambres de combustion à hautes températures de 1/4 de seconde à 2 secondes réduit les taux de synthèse de dioxines de 90 %.

Ces nouvelles technologies sont très efficaces mais restent trop coûteuses pour les petits incinérateurs et ne sont pas toujours adaptables sur les incinérateurs plus anciens. De ce fait, en France en 1998, de nombreux incinérateurs ont continué d'émettre dans l'atmosphère des taux de dioxines largement au-dessus des normes européennes fixées à 0,1 ng/m³.

Déchets

Il existe plusieurs catégories de déchets qu'il convient de traiter séparément :

- les déchets ménagers : en France, plusieurs millions de tonnes de déchets ménagers sont incinérées chaque année. Leur composition est variable et les conditions de combustion dans des unités d'incinération d'ordures ménagères (IUOM) de petite taille sont très difficiles. Dans l'ensemble des rejets d'un incinérateur, les PCDD et les PCDF se retrouvent pour 5 % dans les mâchefers, pour 10 % dans les fumées et pour 85 % dans les cendres volantes. Selon l'ADEME (1996), le total des émissions était en France pour 1996 d'environ 400 g TEQ/an ;

- les déchets industriels : ils sont en général détruits dans des incinérateurs spéciaux très contrôlés. Aux États-Unis, les taux de synthèse à partir de tels déchets sont évalués à 3,8 ng TEQ/kg, pour un total de 5 g TEQ émis en 1987 et 5,7 g TEQ en 1995 (US.EPA, 1998) ;
- les déchets médicaux : ils proviennent des hôpitaux, des laboratoires de recherche et des entreprises œuvrant dans le domaine de la santé. Ils sont particulièrement riches en éléments favorisant la synthèse de PCDD et de PCDF (précurseurs aromatiques, dérivés chlorés, déchets riches en cuivre, PVC...). Très souvent, les incinérateurs utilisés pour brûler ce type de déchets sont de petites tailles et très mal équipés. L'incinération des déchets médicaux conduit à la production de 20 µg TEQ/kg de déchet, pour une émission totale de 477 g TEQ en 1995 (2 470 g TEQ en 1987) aux États-Unis.

Production d'énergie

Les combustibles utilisés pour la production d'énergie électrique et pour la production de chaleur (chauffage et procédés industriels) sont le charbon, le fuel, le bois, le gaz et les combustibles de substitution. Le charbon, le fuel, le bois et le gaz sont utilisés pour la production d'énergie tant en milieu industriel que domestique. Selon les pays et leurs traditions, les proportions sont variables. Aux États-Unis en 1995, la consommation industrielle de bois a compté pour 72 % de la consommation totale. La quantité utilisée pour la production d'électricité était inférieure à 1 %.

Avec les combustibles de substitution, se pose le problème de la valorisation des déchets industriels. L'utilisation dans les fours de ce type de combustible est un procédé très répandu mais qui doit être interdit si l'on n'y adjoint pas un contrôle antipollution strict. La proportion des combustibles de substitution n'excède généralement pas 10 % du combustible total mais ceux-ci peuvent produire ou contenir des taux de dioxines non négligeables.

Les huiles usagées, les résidus de solvants organiques, de peintures et de raffinerie de pétrole sont des combustibles de substitution de premier choix car ils ont un fort potentiel énergétique (Greer et coll., 1992). Leur incinération aurait produit moins de 15 g TEQ en 1995 aux États-Unis. Les fours de cimenteries et équivalents qui opèrent à des températures de 1 500 °C sont des cibles préférentielles pour la destruction et la valorisation de tels toxiques.

Les usines de pâte à papier utilisent également des combustibles de substitution pour produire de l'énergie, comme par exemple des déchets de bois, des boues déshydratées issues du blanchiment de la pâte à papier (20 % des boues recyclées) et des pneumatiques. Sur un total de 500 000 tonnes de pneumatiques brûlés aux États-Unis en 1990, 11 % l'ont été comme combustible de substitution dont 45 % par les usines de pâte à papier, 23 % par les fours de cimenterie et 19 % pour produire de l'énergie électrique. Les quantités de PCDD et de PCDF produites aux États-Unis à la suite de l'incinération de pneumatiques sont évaluées entre 0,04 g et 0,45 g TEQ/an avec un taux

d'émission de 0,3 ng TEQ/kg. Pour les boues d'égouts, les émissions sont évaluées à moins de 15 g TEQ/an.

Faisant également office de combustibles de substitution, on trouve aujourd'hui des cendres d'incinération riches en PCDD et en PCDF, des huiles et des farines animales qui contiennent du kaolin et des animaux provenant de l'équarrissage de bétail.

Procédés industriels à hautes températures

Dans la majorité des procédés industriels qui font intervenir des hautes températures, les sources de chaleur sont plus ou moins isolées des produits à chauffer.

Cependant, les matériaux chauffés à très hautes températures entrent en fusion et sont donc eux-mêmes soumis à un processus de combustion. Selon la qualité des matériaux mis en œuvre, les taux de synthèse de PCDD et de PCDF sont variables.

Les fours de cimenteries et équivalents (brique, tuile, chaux, poterie, céramique, verre...) produisent des poussières récupérées par des filtres électrostatiques de façon similaire aux incinérateurs et sur lesquelles de fortes quantités de PCDD et de PCDF sont retrouvées. Un abaissement des températures des gaz de combustion permet de limiter cette synthèse dans les zones de postcombustion. Les fours qui brûlent des combustibles de substitution produisent des poussières qui contiennent 100 fois plus de dioxines.

Les raffineries de pétrole utilisent des dérivés chlorés (chlorure de méthylène, 1,1,1-trichloroéthane et 1,2-dichloroéthane) pour la régénération de leurs catalyseurs. Le procédé de recyclage fait intervenir de très hautes températures et la combustion de composés aromatiques. Les PCDD et les PCDF produits passent dans les eaux de lavage (Kirby, 1994) et sont également retrouvés dans les boues à des taux de 75 µg/kg et 125 µg/kg respectivement (Maniff et Lewis, 1988).

L'asphalte (agrégat de sable, bitume, ciment, éléments recyclés) incorpore parfois des cendres de combustion de différentes origines (incinération, fours...). L'ensemble est chauffé à des températures maximales de 300-400 °C pour être correctement mélangé. Les quantités de PCDD et de PCDF produites par ce procédé sont équivalentes à 10 g TEQ/an aux États-Unis, soit 47 ng TEQ/tonne d'asphalte (Bremmer et coll., 1994).

Métallurgie et raffinerie de métaux

Les procédés industriels utilisés en sidérurgie (agglomération de minerais, cokeries, aciéries...) ainsi que les fonderies et raffineries de métaux non ferreux (cuivre, magnésium, nickel, aluminium...) produisent de très fortes quantités de PCDD et de PCDF (Buekens et coll., 1998).

Par exemple, la production de magnésium comprend une étape de synthèse de chlorure de magnésium (MgCl_2), en chauffant à 800 °C de la magnésie anhydre (MgO) sous une atmosphère gazeuse essentiellement constituée de dichlore. Le chlorure de magnésium est ensuite électrolysé en magnésium et dichlore. Une étude norvégienne a montré que ce procédé est supposé relarguer 500 g TEQ/an dans les eaux de lavage et 6 g TEQ/an dans l'air. Pour la production de nickel, le procédé à base de NiCl_2/NiO peut maintenant se faire à faible température et ne conduit plus qu'à un taux d'émission de l'ordre de 1 g TEQ/an (Oehme et coll., 1989).

Recyclage des métaux non ferreux

Le recyclage des métaux non ferreux fait intervenir la refonte de matériaux qui sont contaminés par des polluants organiques (peintures, plastiques, solvants...).

Les dérivés à base de cuivre sont fortement producteurs de PCDD et de PCDF puisque le cuivre est le catalyseur de synthèse le plus puissant (779 ng TEQ/kg). Le recyclage de l'aluminium produit des taux de 13,1 ng TEQ/kg. Le plomb est souvent contaminé par du PVC et de l'acide chlorhydrique car il est issu du recyclage des batteries automobiles. Il est normalement recyclé à des températures de 1 200 °C. Les taux de PCDD et de PCDF émis varient selon les procédés de chauffage utilisés (0,051-8,31 ng TEQ/kg) (US EPA, 1998).

Réactivation du charbon actif

Le charbon actif est un adsorbant couramment utilisé pour éliminer les polluants organiques. Lorsqu'il est saturé, le charbon peut être réactivé par chauffage à haute température (jusqu'à 1 000 °C). Ce procédé conduit à la désorption/destruction des molécules organiques parmi lesquelles on retrouve des précurseurs de PCDD et de PCDF. Selon les échantillons, les facteurs d'émission estimés varient de 1,73 à 2,98 ng TEQ/kg.

Transports routiers

Les moteurs à explosion sont, comme tous les processus de combustion, des sources potentielles de PCDD et de PCDF. Ceux-ci sont retrouvés dans les gaz d'échappement (Marklund et coll., 1990) et dans les huiles de moteurs (Ballschmiter et coll., 1986). Les différentes études montrent que les émissions sont moindres dans les cas de véhicules utilisant de l'essence sans plomb par rapport à ceux utilisant de l'essence plombée (qui contient des additifs halogénés comme le 1,2-dichloroéthane ou le 1,2-dibromoéthane). Les taux de dioxines sont également réduits à l'échappement sur les véhicules équipés de pots catalytiques (tableau 3.I).

Tableau 3.1 : Émission de dioxines selon le type de carburant

	pg TEQ/l ¹	pg TEQ/l ²
Essence	1 083	50 à 1 184
Sans plomb (avec catalyseur)	7	15 à 26
Sans plomb (sans catalyseur)	51	57 à 177
Diesel	24	Voiture : 10 à 130 Camion : 70 à 81

¹ : d'après Hagenmaier et coll., 1990 ; ² : d'après Masklund et coll., 1990

Industrie chimique

L'industrie du chlore et de ses dérivés est la tête de liste des industries qui produisent des PCDF et des PCDD et il est indéniable que la forte expansion de cette industrie est étroitement liée à l'accroissement des émissions de dioxines.

Le dichlore a longtemps été produit par électrolyse selon un procédé utilisant des électrodes de graphite. Ces électrodes en graphite, aujourd'hui remplacées par des électrodes en titane, se retrouvaient fortement contaminées en PCDD et en PCDF qui venaient s'ajouter aux hydrocarbures polyaromatiques (HPA), dont plusieurs sont de puissants cancérogènes.

Industrie de la pâte à papier

La production de pâte à papier associée au processus de blanchiment utilisant le dichlore est un procédé qui favorise la synthèse de PCDD et de PCDF (Gillespi et Abbott, 1998 ; Luthe, 1996) mais les mécanismes qui conduisent à cette synthèse ne sont actuellement pas connus.

Certains auteurs ont proposé une chloration des noyaux aromatiques de type PCDD et PCDF préexistants dans le bois. Il a aussi été supposé une biotransformation de composés aromatiques de la lignine par action enzymatique (Wagner et coll., 1990). D'autres imaginent que les PCDD et les PCDF sont des contaminants du bois ou bien encore qu'ils se forment à partir de précurseurs de type pentachlorophénol (PCP). Dans les années quatre-vingt, des produits antimousses utilisés (huiles minérales brutes) ont été reconnus comme précurseurs potentiels (Voss et coll., 1988). L'utilisation, pour la production du dichlore, d'électrodes en graphite peut également être à l'origine de ces contaminations (Dimmel et coll., 1993 ; Jay et Stieglitz, 1995).

Le profil des congénères, majoritairement représentés par l'OCDD, pourrait s'avérer être la signature d'une synthèse à partir de PCP (Luthe, 1996). Néanmoins, des PCDF et des PCDD sont également produits lors de la production de papier à partir de paille de céréales sans que cette synthèse puisse être attribuée à des structures renfermant soit du pentachlorophénol

(PCP), soit possédant des noyaux préexistant de type PCDD et PCDF (Zheng et coll., 1997).

Entre 1988 et 1996, les taux d'émission de PCDD et de PCDF par l'industrie du papier ont diminué de 94 % (Gillespi et Abbott, 1998). Pour aboutir à ce résultat, l'étape de blanchiment est maintenant effectuée avec du dioxyde de chlore (ClO_2) en lieu et place du dichlore. Cette étape est parfois précédée d'une phase de destruction de la lignine par oxydation, procédé beaucoup plus coûteux. Avec l'utilisation de dioxyde de chlore, les congénères sont essentiellement représentés par des composés mono- et dichlorés.

La liqueur noire est issue de la délignification des fibres de cellulose par le procédé Kraft. Cette liqueur contient des éléments minéraux qui sont recyclés après combustion des matières organiques. Le facteur d'émission est alors de l'ordre de 28 pg TEQ/kg, pour une production annuelle aux États-Unis de l'ordre de 5 g TEQ/an.

Production de dérivés halogénés

La production de divers composés halogénés est susceptible de s'accompagner de la formation de dioxines.

Chlorophénols

Les chlorophénols peuvent être synthétisés de plusieurs façons :

- par chloration électrophile de phénol sous forme liquide, avec de l'acide chlorhydrique en présence de catalyseurs métalliques (chlorures...) ;
- par hydrolyse alcaline à 160 °C de chlorobenzènes avec une solution méthanolique de soude (figure 3.1) ;
- selon d'autres techniques utilisant la conversion de sels de diazonium de différentes chloroanilines, la chloration d'acide phénolsulfonique ou benzène-sulfonique suivie de l'élimination du groupement sulfonique.

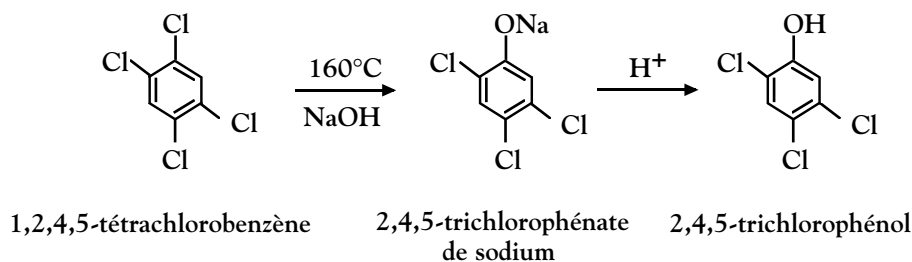


Figure 3.1 : Synthèse de chlorophénols par hydrolyse alcaline

Au cours de la synthèse des chlorophénols, des PCDF et des PCDD sont produits par condensation de tri-, tétra-, pentachlorophénols, ou bien par

condensation de chlorophénols avec l'hexachlorocyclohexadiénone qui se forme lors de la chloration excessive de phénol (figure 3.2).

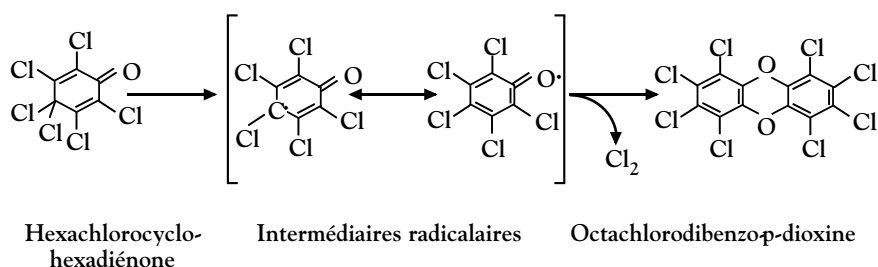


Figure 3.2 : Formation des PCDF et des PCDD

Au cours de l'hydrolyse alcaline des chlorobenzènes, des dioxines sont formées par condensation des chlorophénates (figure 3.3).

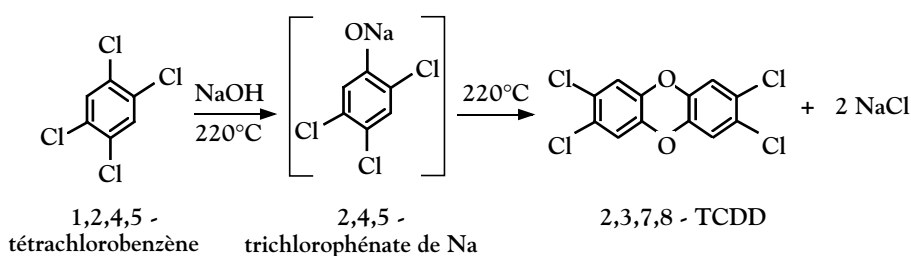


Figure 3.3 : Hydrolyse alcaline du 1,2,4,5-tétrachlorobenzène en 2,4,5-trichlorophénol avec formation secondaire de 2,3,7,8-TCDD

Chlorobenzènes

Les chlorobenzènes pour leur part sont produits selon trois procédés :

- par substitution électrophile du benzène à 80 °C en présence d'acide chlorhydrique et d'un catalyseur métallique (FeCl_3) ;
- par chloration oxydative de benzène par l'acide chlorydrique à 150-300 °C, en présence de catalyseurs ;
- par déhydrohalogénéation de l'hexachlorocyclohexane (HCH) à 200°-240 °C en présence de charbon actif pour produire des trichlorobenzènes qui peuvent ultérieurement être chlorés.

Ce sont des réactions de substitution nucléophile qui sont impliquées dans la synthèse des PCDD et des PCDF. Les paramètres favorables sont la présence d'oxygène (traces de chlorophénols) ou bien des conditions réactionnelles alcalines. Ces synthèses peuvent aussi faire appel à des mécanismes de pyrolyse qui font intervenir des températures supérieures à 150 °C (Ree et coll., 1988).

Polychlorobiphényles (PCB)

Ces composés ont des structures chimiques et des propriétés physicochimiques très proches de celles des PCDF et des PCDF. Certains de ces produits sont d'ailleurs classés « *PCB dioxin-like* ». Les PCB ont été largement disséminés dans l'environnement. Bien que leur production soit sévèrement réglementée, il en reste des quantités importantes encore en service.

Les PCB ont été majoritairement utilisés comme diélectriques dans les transformateurs (sous le nom de pyralène, en France), mais on trouve de nombreuses autres applications : pesticides, huiles, encres, plastifiants, peintures, colles... (De Voogt et Brinkman, 1989). Les PCB sont synthétisés par chloration directe de biphényles sous forme liquide en présence de catalyseurs. La production préférentielle de PCDF est caractéristique de la pyrolyse des PCB.

Pesticides halogénés

À la fin des années soixante-dix, l'attention a été portée sur la présence de PCDD et de PCDF dans les pesticides et plus particulièrement dans les dérivés de chlorophénols comme le 2,4-D et le 2,4,5-T, défoliants constituants de l'Agent orange (Gilman et coll., 1988 ; Ree et coll., 1988 ; Hutzinger et Fiedler, 1991 ; Bryant, 1993) (figure 3.4).

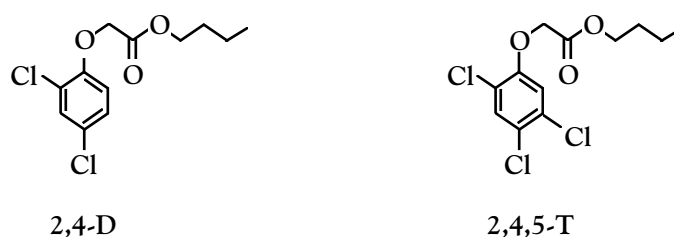


Figure 3.4 : Structures du 2,4-D (acide 2,4-dichlorophénoxyacétique) et du 2,4,5-T (acide 2,4,5-trichlorophénoxyacétique)

Les résultats des analyses des contaminants et des essais toxicologiques ont entraîné l'arrêt de la commercialisation de ces produits. Actuellement, pour obtenir une autorisation de mise sur le marché de nouveaux pesticides, les procédés de synthèse doivent être validés s'ils sont présumés conduire à la formation secondaire de PCDD et de PCDF.

L'OMS a estimé que 12 500 tonnes de pentachlorophénol ont été utilisées pour le traitement du bois en 1987 (entre 25 et 51 kg TEQ) et 8 400 tonnes en 1994 (entre 17,7 et 35,4 kg TEQ).

Composés aliphatiques chlorés

Les composés chlorés aliphatiques sont utilisés comme monomères dans la synthèse de plastiques, comme solvants et comme précurseurs de synthèse

chimique. Par exemple, l'acétylène est facilement chloré en dichloroacétylène qui peut donner naissance à l'hexachlorobenzène par réaction/cyclisation avec l'hexachlorobutadiène (figure 3.5).

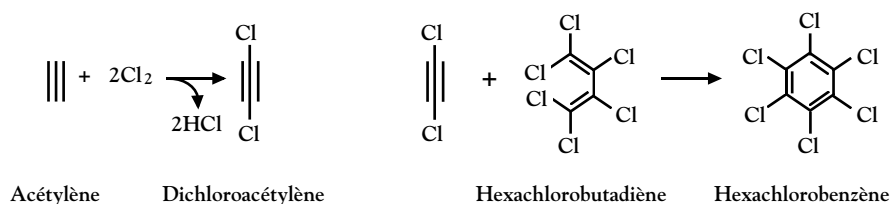


Figure 3.5 : Synthèse d'hexachlorobenzène par réaction/cyclisation avec l'hexachlorobutadiène

Chlorures de polyvinyle

Les chlorures de polyvinyle (PVC) sont tout au long de leur vie associés à la formation de dioxines. Ils sont considérés comme une source majeure de chlore. De fortes quantités de PCDD et PCDF sont produites durant la synthèse des PVC, lors de leur recyclage et lorsqu'ils sont brûlés (incinération, incendie...) (Marklund et coll., 1989). La production des PVC passe par une étape de chloration directe de l'éthène (éthylène) ou par oxychloration, pour former du 1,2-dichloroéthane (EDC). Le procédé faisant intervenir la réaction d'oxychloration est considéré comme donnant les plus forts taux de dioxines (figure 3.6).

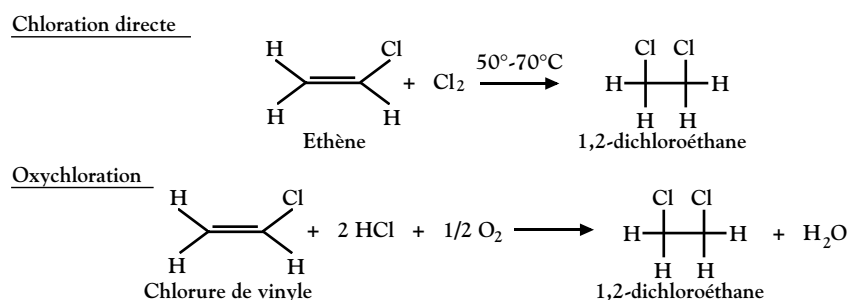
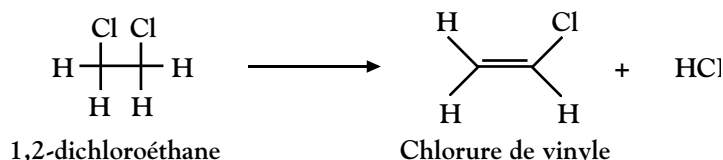


Figure 3.6 : Formation du 1,2-dichloroéthane soit par chloration directe soit par oxychloration de l'éthène

Enfin, le 1,2-dichloroéthane est transformé par déhydrochloration en chlorure de vinyle (VC), monomère par ailleurs classé par le CIRC (Centre international de recherche sur le cancer) comme cancérogène pour l'homme (catégorie 1) et responsable d'angiosarcomes hépatiques (figure 3.7).

Déshydrochloration**Figure 3.7 : Transformation du 1,2-dichloroéthane en chlorure de vinyle**

La polymérisation du chlorure de vinyle en PVC se fait selon différentes techniques avec plus ou moins incorporation d'additifs en fonction des applications.

Encres, pigments, colorants

Les pigments et colorants à base de dioxazine, dérivé du chloranil (2,3,5,6-tétrachloro-2,5-cyclohexadiène-1,4-dione) sont des produits facilement contaminés avec des dioxines. Il en est de même pour les colorants et encres à base de phthalocyanine.

Ignifugeants polybromés

Les dérivés polybromés du phénol et les éthers-oxydes polybromés du biphenyle sont utilisés comme produits ignifugeants dans les matières plastiques (électronique), dans les textiles, les peintures, le polystyrène. Ces différents produits par photolyse et pyrolyse sont précurseurs de dérivés polybromés (Lujik et coll., 1992) (figure 3.8).

Industrie textile

Les solvants utilisés dans le nettoyage à sec des tissus contiennent de fortes concentrations de PCDD et de PCDF (Fuchs et coll., 1990). Ces contaminants proviennent des tissus et environ 80 % sont retrouvés dans les solvants de lavage (Umlauf et coll., 1993). Certains lots de T-shirts teints ont montré des taux allant jusqu'à 290 µg/kg (Hortsmann et McLachlan, 1994). Encore une fois, le pentachlorophénol est soupçonné d'être à l'origine de ces contaminations car il est toujours utilisé dans certains pays pour traiter le coton avant son transport maritime (Hortsmann et McLachlan, 1995).

Traitement des eaux usées

Les stations d'épuration concentrent dans leurs boues les eaux usées et les eaux de pluie qui ramènent les traces de PCDD et de PCDF issus de nombreuses sources urbaines. La source domestique majeure pourrait provenir du lavage de certains tissus. Les savons et détergents ne semblent pas être une source de PCDD et de PCDF exceptés certains savons doux préparés avec des sous-produits de l'industrie du bois (Hagenmaier, 1986 ; Rappe et coll., 1990).

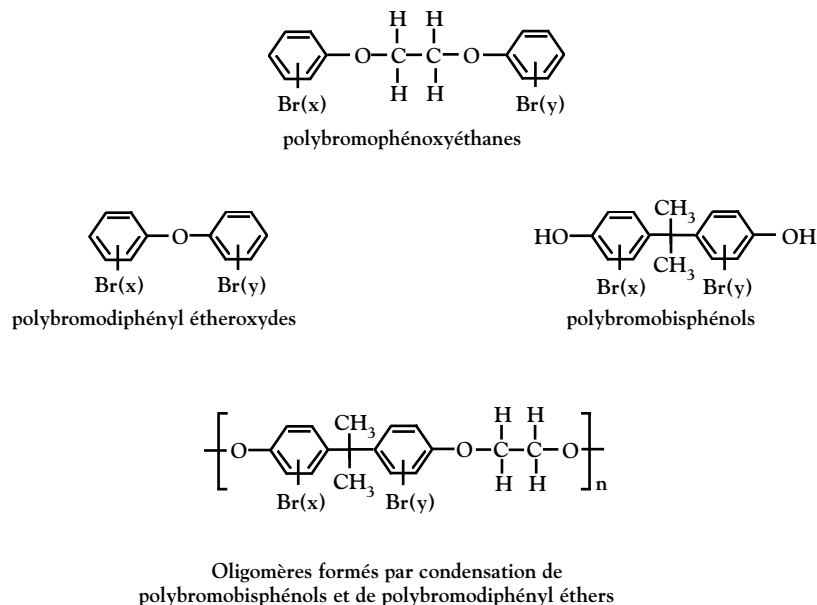


Figure 3.8 : Dérivés polybromés du phénol et éthers polybromés du biphenyle

Quelques traces de PCDD et de PCDF ont été trouvées dans l'eau potable mais elles ne sont probablement pas issues du procédé de chloration.

Cheminées

De nombreuses études rapportent la présence de dioxines dans les foyers, les fumées et les suies des cheminées résidentielles. La consommation domestique de bois aux États-Unis représentait 35 % de la consommation totale en 1987 et 25 % en 1995. Un facteur d'émission de 2 ng TEQ/kg semble être correct. Cependant, la combustion dans les cheminées, de bois traités au pentachlorophénol (PCP) qui a été utilisé de façon intensive comme antifongique (charpentes...) doit être évitée (Bremmer et coll., 1994). Il en est de même pour les déchets ménagers qui remontent fortement les taux de dioxines (3 µg TEQ/kg) et pour les mauvaises herbes traitées avec des désherbants chlorés de type 2,4-D ou 2,4,5-T et que l'on brûle. En France, seul le 2,4-D est encore en vente libre.

Tabac

Les taux de production de PCDD et de PCDF par combustion du tabac varient selon les marques de 0,1 à un peu plus de 1 ng TEQ/paquet pour les PCDD et environ 100 fois moins pour les PCDF (Matsueda et coll., 1994). Aujourd'hui, il n'est pas possible d'attribuer avec certitude l'origine de ces toxiques qui peuvent provenir soit du processus de combustion des additifs, soit d'une contamination préalable du tabac.

Sources biologiques

Jusqu'à ce jour aucune source naturelle majeure n'a été réellement mise en évidence. Dans des restes de tissus humains datés de 140-400 ans, il n'y a quasiment aucune trace de dioxines et les taux actuels sont plus élevés dans les pays industrialisés. Il est aujourd'hui clair que la majorité de la production de PCDD et de PCDF résulte des activités industrielles.

Réservoirs de dioxines

Deux grands réservoirs de dioxines sont reconnus. Le sol, à cause des énormes quantités répandues à la suite de l'utilisation intensive de PCB, de pesticides et du bois qui a été massivement traité au pentachlorophénol (WHO, 1987). Des traces de dioxines ont récemment été mises en évidence dans du kaolin en provenance d'Allemagne (plusieurs centaines de picogrammes/gramme). Le kaolin est utilisé comme additif dans l'alimentation animale pour améliorer la fluidité des farines. La provenance de cette contamination n'est actuellement pas connue, mais pourrait résulter de processus géologiques.

Biotransformation des chlorophénols

Plusieurs études en laboratoire montrent que le trichlorophénol et le pentachlorophénol en présence de peroxydase et de peroxyde d'hydrogène (eau oxygénée) sont capables de former des PCDD et des PCDF. Les peroxydases sont des enzymes très répandues dans la nature. On les retrouve dans les composts, produites par les champignons responsables de la dégradation de la lignine. L'origine exacte des dioxines est difficile à établir. Il peut s'agir d'une synthèse ou d'un apport à partir de plantes contaminées. Une biosynthèse de dioxines est également possible à partir de chlorophénols, mais les taux de conversion avancés restent faibles (moins de 1 %).

Biotransformation/dégradation des PCDD/PCDF

La biodégradation microbienne des PCDD et des PCDF (déchloration, demi-vie 1-4 ans) doit être traitée comme une source à part entière puisqu'elle peut influencer l'évaluation en TEQ d'un mélange.

En effet, l'octachlorodibenzo-*p*-dioxine (OCDD) est un des congénères les plus abondants. Elle est facilement produite par réaction de condensation du pentachlorophénol, mais aussi majoritairement produite par les incinérateurs. L'OCDD est réputée peu toxique, mais comme la déchloration est une voie de dégradation des dioxines, elle peut devenir avec les autres congénères les plus chlorés, précurseur de 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-*p*-dioxine, 1 000 fois plus toxique en toxicité aiguë.

Sources photochimiques de PCDD/PCDF

La phototransformation des chlorophénols (PCP) se fait sous rayonnement ultraviolet (254 nm) et conduit à la production d'hepta- et d'octachlorodioxines ainsi que d'hepta-chlorofuranes.

La déchloration est également photo-induite en position *peri* pour les PCDD et en 1-9 *péri* pour les PCDF. La photolyse des PCDD/PCDF se fait lentement mais elle est beaucoup plus rapide en présence de composés hydrocarbonés comme par exemple l'hexane, le benzène, le méthanol ou l'acétonitrile.

Sources accidentelles

Les sources accidentelles sont pour la plupart des incendies. Les conditions de combustion y sont médiocres et les produits brûlés contiennent de nombreux éléments précurseurs de PCDD et de PCDF. Aux États-Unis, les incendies représenteraient 15 g TEQ/an pour les résidences, 10 g TEQ/an pour les véhicules, 311 g TEQ/an pour les décharges publiques et 208 g TEQ/an pour les feux de forêt.

Parmi les sources accidentelles de PCDD et de PCDF, les usines de production de trichlorophénols et de dérivés chlorés occupent une place non négligeable (tableau 3.II).

Tableau 3.II : Historique des principaux accidents dans les usines de production de polychlorophénols

Date	Pays	Usine/ville
1949	États-Unis	Monsanto/Nitro
1953	Allemagne	BASF/Ludwigshafen
1956	France	Rhône-Poulenc/Grenoble
1963	Hollande	Phillips-Duphar/Amsterdam
1964	États-Unis	Dow Chemical/Midland
1964-69	Tchécoslovaquie	Spolana/Prague
1966	France	Rhône-Poulenc/Grenoble
1968	Grande-Bretagne	Coalite & Chemical products/Derbyshire
1976	Italie	ICMESA/Seveso

Les accidents mettant en cause la combustion de PCB (pyralènes contenus dans les transformateurs) sont également nombreux.

En conclusion, si l'on s'en tient aux données concernant les émissions dans l'air, la tendance générale est à la réduction des émissions. La majeure partie

de cette baisse provient des actions entreprises visant à réduire les émissions des incinérateurs (40 % de baisse en France depuis 1998). Cependant, une part importante des données bibliographiques concerne les émissions de dioxines au niveau de l'atmosphère. Seules quelques données sont disponibles sur l'émission de PCDD et de PCDF dans l'eau. Ces relargages ne sont pas pour autant négligeables. L'industrie du papier a produit 356 g TEQ/an en 1987 et 20 g TEQ/an en 1995 aux États-Unis. La production de magnésium, selon une étude norvégienne, est supposée relarguer 500 g TEQ/an dans les eaux de lavage pour seulement 6 g TEQ/an dans l'air. Les données concernant les épandages en agriculture et épandage de boues (200 g TEQ en 1995), de cendres (1,8 kg TEQ en 1995) et de produits chimiques divers sont également difficilement évaluables. Il est indéniable que des efforts importants restent à faire dans le domaine de l'élimination des sources de dioxines mais également dans celui de l'éducation des populations. En effet, même si les émissions de dioxines de sources industrielles peuvent être contrôlées tous ces efforts se trouvent remis en question si les comportements de la population ne sont pas adaptés. De nombreuses personnes ont l'habitude de brûler elles-mêmes leurs déchets. Aujourd'hui, cette source se situe parmi les sources majeures aux États-Unis et y représente 1 kg TEQ/an. Comme le préconise le Conseil national de l'air dans son avis du 7 avril 1999, relatif aux dioxines, l'inventaire systématique des émissions de dioxines des secteurs autres que l'incinération de déchets et la métallurgie serait bienvenu en France afin d'améliorer les statistiques nationales et de les mettre au niveau de celles fournies par la plupart des autres pays de l'Union européenne (Pays-Bas, Allemagne, Royaume-Uni, Suède...).

BIBLIOGRAPHIE

ADEME. Résumé des conférences de la journée technique : Faut-il avoir peur des dioxines ? Mars 1996

BALLSCHMITER K, BUCHERT H, NIEMCZYK R, MUNDER A, SWEREV M. Automobile exhausts versus municipal waste incineration as sources of the polychlorodibenzodioxins (PCDD) and -furans (PCDF) found in the environment. *Chemosphere* 1986, **15** : 901-915

BREMMER HJ, TROOST LM, KUIPERS G, DEKONING J, SEIN AA. Emissions of dioxins in The Netherlands. National Institute of Public Health and Environmental Protection (RIVM) and Netherlands Organization for Applied Scientific Research (TNO). 1994, Report No. 770501018

BRYANT JG. Chlorinated benzenes. In : Kirk-Othmer *Encyclopedia of Chemical Technology*. 4th ed. 1993, **6** : 87-100

BUEKENS A, STIEGLITZ L, HUANG H, CORNELIS E. Formation of dioxin in industrial combustors and pyrometallurgical plants. *Environ Eng Sci* 1998, **15** : 90-93

CAINS PW, DYKE P. Emissions of chlorinated dibenzodioxins and dibenzofurans from waste combustion plants in the UK. *Organohalogen Compounds* 1994, **20** : 271-276

DE VOOGT P, BRINKMAN UA. Production, properties and usage of polychlorinated biphenyls. In : *Halogenated biphenyls, terphenyls, naphthalenes, dibenzodioxins and related products*. KIMBROUGH R, JENSEN AA, Eds. 1989. New York, NY : Elsevier Science Publishers. 240 WHO, 1991

DIMMEL DR, RIGGS KB, PITTS G, WHITE J, LUCAS S. Formation mechanism of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans during pulp chlorination. *Environ Sci Technol* 1993, **27** : 2553-2558

FUCHS R, TOWARA J, HUTZINGER O. PCDD/F in the dry-cleaning process. *Organohalogen Compounds* 1990, **3** : 441-444

GILLESPI WJ, ABBOTT JD. Progress in reducing the TCDD/PCDF content of effluents, pulps and waste water treatment sludges from the manufacturing of bleached chemical pulp. *Chemosphere* 1998, **37** : 1973-1985

GILMAN AP, DOUGLAS VM, NEWHOOK RC, ARBUCKLE TE. Chlorophenols and their impurities : a health hazard evaluation. Health and Welfare Canada. Document No. H46-2/88-110E, 1988

GREER WL, JOHNSON MD, RAUGHT EC, STEUCH HE, TRUSTY CB. Portland cement. In : *Air pollution engineering manual, Air and Waste Management Association*. BUONICORE AJ, DAVIS WT, Eds. New York, NY : Van Nostrand Reinhold, 1992

HAGENMAIER H. Determination of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in commercial chlorophenols and related products. *Fresenius Z Anal Chem* 1986, **325** : 603-606

HAGENMAIER H, DAWIDOWSKY V, WEBER UB, HUTZINGER O, SCHWIND KH et coll. Emission of polyhalogenated dibenzodioxins and dibenzofurans from combustion-engines. *Organohalogen Compounds* 1990, **2** : 329-334

HORTSMANN M, MCLACHLAN MS. Polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans in textiles and their transfert to human skin, sewage sludge and other matrices. *Organohalogen Compounds* 1994, **20** : 251-254

HORSTMANN M, MCLACHLAN MS. Concentrations of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins (PCDD) and dibenzofurans (PCDF) in urban runoff and household wastewaters. *Chemosphere* 1995, **31** : 2887-2896

HUTZINGER O, FIEDLER H. Formation of dioxins and related compounds in industrial processes. In : *Dioxin perspectives. A pilot study on international information exchange on dioxins and related compounds*. BRETTHAUER E W, KRAUS H W, DI DOMENICO A, Eds. New York, NY : Plenum Press, 1991

HUTZINGER O, ESSERS U, HAGENMAIER H. *Untersuchungen zur Emission halogenierter dibenzodioxine und dibenzofurane aus verbrennungsmotoren beim betrieb mit handelsüblichen betriebsstoffen*. Universities of Bayreuth, Stuttgart and Tübingen, Germany. GSF-Forschungszentrum, Munich, Germany, ISSN 0937-9932, 1992

JAY K, STIEGLITZ L. Identification and quantification of volatile organic components in Emissions of waste incineration plants. *Chemosphere* 1995, **30** : 1249-1260

KIRBY R. *Petroleum refining industry - presence of dioxins and furans in wastewater generated by reforming operations*. Washington, DC : U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water, Engineering and Analysis Division. May 1994

- LUJIK R, GOVERS HA, NEILSEN L. Formation of polybrominated dibenzofurans during extrusion of high impact polystyrene/decabromodiphenyl ether/antimony (III) oxide. *Environ Sci Technol* 1992, **26** : 2191-2198
- LUTHE CE. Octachlorinated dioxin in pulps and effluents. Where does it come from ? *Chemosphere* 1996, **32** : 2409-2425
- MANIFF K, LEWIS M. MISA monitoring discovers dioxins and furans in wastewater stream of petroleum refinery. *Ministry of the Environment Communique* December 5, 1988
- MARKLUND S, RAPPE C, TYSKLIND M, EGEBACK KE. Identification of polychlorinated dibenzofurans and dioxins in exhausts from cars run on leaded gasoline. *Chemosphere* 1987, **16** : 29-36
- MARKLUND S, ANDERSSON R, TYSKLIND M, RAPPE C. Emissions of PCDDs and PCDFs from a PVC-fire in Holmsund, Sweden. *Chemosphere* 1989, **18** : 1031-1038
- MARKLUND S, ANDERSSON R, TYSKLIND M, RAPPE C, EGEBACK KE et coll. Emissions of PCDDs and PCDFs in gasoline and diesel fueled cars. *Chemosphere* 1990, **20** : 553-561
- MATSUEDA T, KUROKAWA Y, NAKAMURA M, TAKADA S, FUKAMACHI K. Concentrations of PCDDs, PCDFs and coplanar PCBs in cigarettes from various countries. *Organohalogen Compounds* 1994, **20** : 331-334
- OEHME M, MANO S, BJERKE B. Formation of polychlorinated dibenzofurans and dibenzo-*p*-dioxins by production processes for magnesium and refined nickel. *Chemosphere* 1989, **18** : 1379-1389
- OLIE K, VERMEULEN PL, HUTZINGER O. PCDD/F are trace components of fly ash and flue gas of some municipal incinerators in the Netherlands. *Chemosphere* 1977, **6** : 455-459
- RAPPE C, ANDERSSON R, LUNDSTRÖM K, WIBERG K. Levels of polychlorinated dioxins and dibenzofurans in commercial detergents and related products. *Chemosphere* 1990, **21** : 43-50
- RAPPE C, KJELLER L, KULP S, DEWIT C, HASSELSTEN I, PALM O. Levels, profile and pattern of PCDDs and PCDFs in samples related to the production and use of chlorine. *Chemosphere* 1991, **23** : 1629-1636
- REE KC, EVERS EHG, VAN DER BERG M. Mechanism of formation of polychlorinated dibenzo (p) dioxins (PCDDs) and polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) from potential industrial sources. *Toxicol Environ Chem* 1988, **17** : 171-195
- UMLAUF G, HORSTMANN M, KLEIN P, KURZ J. Mass balance of PCDD/F in a dry cleaning machine. *Organohalogen Compounds* 1993, **11** : 413-416
- UNEP. *Dioxin and furan inventories : national and regional Emissions of PCDD/PCDF*. Unep Chemicals, Geneva, Switzerland, May 1999
- US EPA. *The Inventory of Sources of dioxin in the United States, Review Draft*, EPA/600/P-98/002Aa (NTIS PB98-137037), Washington, D.C., April 1998
- VOSS H, LUTH CE, FLEMING BI, BERRY RM, ALLEN LH. Some new insights into the origins of dioxins formed during chemical pulp bleaching. *Pulp Pap Can* 1988, **89**, 151
- WAGNER HC, SCHRAMM KW, HUTZINGER O. Biogenic polychlorinated dioxin and furan from trichlorophenol. *Organohalogen Compounds* 1990, **3** : 453-456

WHO. Pentachlorophenol. World Health organisation International Programme on clinical safety, *Environmental Health Criteria* 1987, **71**

ZHENG MH, BAO ZC, WANG KO, XU XB. Levels of PCDDs and PCDFs in the bleached pulp from chinese pulp and paper industry. *Bull Environ Contam Toxicol* 1997, **59** : 90-93

4

Contamination des différents compartiments de l'environnement

Le terme générique de dioxines regroupe en réalité deux classes de composés qui sont les polychlorodibenzo-*para*-dioxines (PCDD) et les polychlorodibenzofuranes (PCDF). Ces molécules, dont la plus connue est certainement la 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-*para*-dioxine (2,3,7,8-TCDD), appartiennent à la famille des hydrocarbures aromatiques halogénés. La formation de ces composés a pour origine certaines réactions chimiques, thermiques, photochimiques ou biochimiques. Leur présence naturelle dans l'environnement est donc fortement liée aux phénomènes de combustion du bois, mais aussi par des réactions de chloration au niveau des substances humiques dans la couche superficielle du sol. Il existe de nombreuses sources anthropogéniques liées à l'industrie du chlore et des produits chlorés (pesticides, traitements du bois), aux industries métallurgiques et sidérurgiques, à la combustion du charbon ou du fuel et à l'incinération des déchets (ménagers, industriels ou hospitaliers).

Pour le milieu aquatique, le déversement d'effluents de papeteries utilisant le chlore dans les processus de blanchiment constitue une source importante de contamination par les dioxines. Une estimation du rapport entre sources naturelles et anthropogéniques peut être faite d'après des études réalisées en mer Baltique montrant que des sédiments datant de plus de cent ans contiennent 10 fois moins de PCDD et PCDF que les sédiments récents (Kjelle et Rappe, 1995).

La principale source d'exposition humaine est l'alimentation (plus de 90 %) alors que l'exposition par inhalation est négligeable à l'exception bien sûr des conditions professionnelles particulières ou des accidents. En effet, les dioxines peuvent contaminer bon nombre d'aliments tels que les viandes, abats et volailles, les végétaux (céréales, fruits, légumes...), mais aussi les poissons, les œufs et certaines matières grasses (huiles, graisses...), sans oublier bien évidemment le lait et les produits laitiers.

L'étude des voies de contamination des denrées alimentaires est l'objet d'un grand intérêt et particulièrement le transfert potentiel des dioxines depuis les compartiments de l'environnement. L'ensemble des données présentées ici

provient essentiellement de la monographie du Centre international de recherche sur le cancer (CIRC) qui a dressé une sorte d'état des lieux de la contamination des compartiments de l'environnement dans un grand nombre de pays (monographie IARC, 1997), de la compilation récente publiée par la Direction générale de l'environnement de la Commission des Communautés européennes (*European commission DG environment*, 1999) et enfin, d'un ouvrage de l'Agence suédoise de protection de l'environnement (*Persistent organic pollutants*, 1998).

Historique

Au sortir de la Seconde Guerre mondiale, l'Europe a subi une formidable transformation industrielle et agricole. Il s'agissait en effet de fournir de l'énergie, des matériaux, mais aussi des aliments, des vêtements et des médicaments après les destructions massives et les privations subies pendant plus de cinq ans. Cette transformation a été fortement basée sur l'industrie chimique, en particulier la pétrochimie et la chimie du chlore.

En effet, l'utilisation des produits chlorés a permis de relever les enjeux liés au mauvais état sanitaire et alimentaire de nombreux Européens. On peut dire que le DDT (1,1,1-trichloro-2,2-bis (4-chloro-phényl) éthane) a été un produit majeur ayant permis de surmonter cette période critique (Paul Müller qui découvrit les propriétés insecticides du DDT a reçu le prix Nobel en 1948). De même, les polychlorobiphényles (PCB) ont été associés au développement économique par leur utilisation dans de nombreuses activités industrielles (huiles diélectriques, fluides caloporteurs, huiles de coupe, matières plastiques, colles, encres d'imprimerie...). Ainsi, l'utilisation massive de ces composés a amené leur dispersion dans l'environnement sans préoccupation des impacts possibles à la fois pour l'homme et pour l'environnement.

Dès le début des années cinquante, on a vu augmenter le nombre d'oiseaux retrouvés morts, en particulier les rapaces. De plus, leur capacité de reproduction était fortement altérée. Les recherches pour identifier les agents causaux ont révélé des fortes teneurs en DDT et en mercure (lui aussi utilisé dans l'industrie et l'agriculture). Ces premières constatations ont été suivies de la recherche de ces composés dans d'autres types d'échantillons, ce qui a montré leur large distribution dans tous les compartiments de l'environnement. Ainsi, la contamination ne touchait pas seulement quelques espèces sauvages d'oiseaux ou de poissons mais atteignait même les aliments de l'homme avec des conséquences éventuelles en santé publique.

Dans plusieurs pays, les autorités se mobilisèrent pour mettre en place des plans de surveillance. C'est en effectuant des analyses de DDT que Jensen, dans les années soixante, mit en évidence la présence de pics de chromatographie non identifiés dans les chromatogrammes de DDT (figure 4.1).

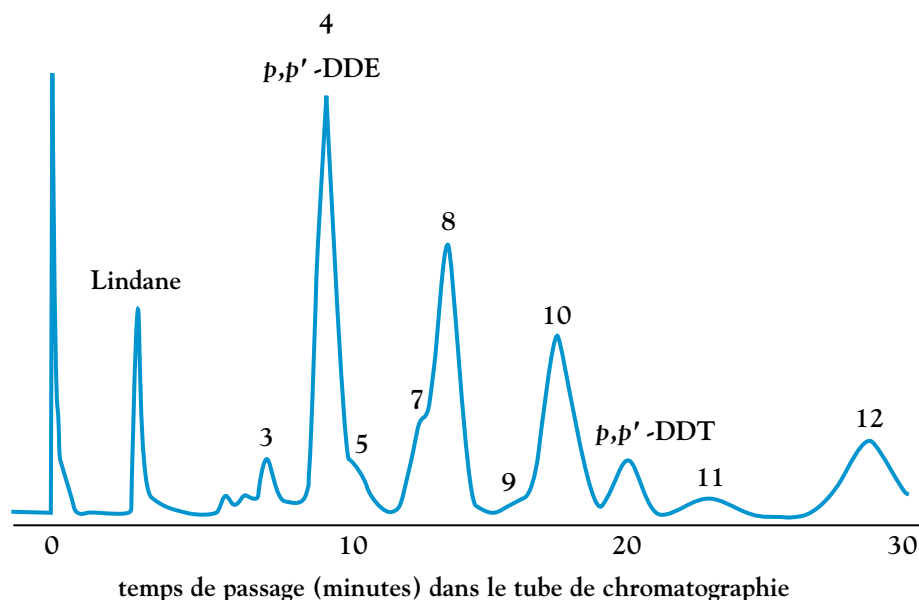


Figure 4.1 : Mise en évidence de polluants de l'environnement (ici, chez l'aigle à queue blanche) par chromatographie en phase gazeuse dans les années soixante (d'après Jensen, 1972)

Ces pics furent identifiés comme étant des PCB, ce qui fut confirmé en spectrométrie de masse par Widmark en 1967. Vers la fin des années soixante, la chromatographie sur colonnes capillaires permit une séparation de plus de 200 congénères de PCB. Dans les échantillons de l'environnement, l'utilisation de cette technique analytique montra la présence de nombreux pics inconnus (figure 4.2) et c'est l'utilisation de la spectrométrie de masse, couplée à la chromatographie en phase gazeuse puis l'utilisation d'isotopes stables (carbone 13) qui mettra en évidence la présence de PCDD et PCDF à la fin des années soixante-dix.

En effet, les PCDF et les PCDD étaient des impuretés présentes dans les produits chlorés, apparaissant au moment de la synthèse chimique. Il n'est donc pas surprenant de trouver une étroite relation entre présence de DDT, de PCB et de dioxines.

Parallèlement à ces progrès analytiques, des effets toxicologiques étaient mis en évidence. Les premières manifestations datent de 1899 où Herxheimer, un médecin allemand, rapportait des effets cutanés désignés sous le terme de chloracné chez les travailleurs exposés de l'industrie du chlore. Dans les années trente, des atteintes hépatiques étaient signalées chez les travailleurs produisant des PCB.

C'est en 1968 que la toxicité des PCB et des PCDF fut démontrée chez l'homme par l'empoisonnement accidentel de plusieurs milliers de Japonais

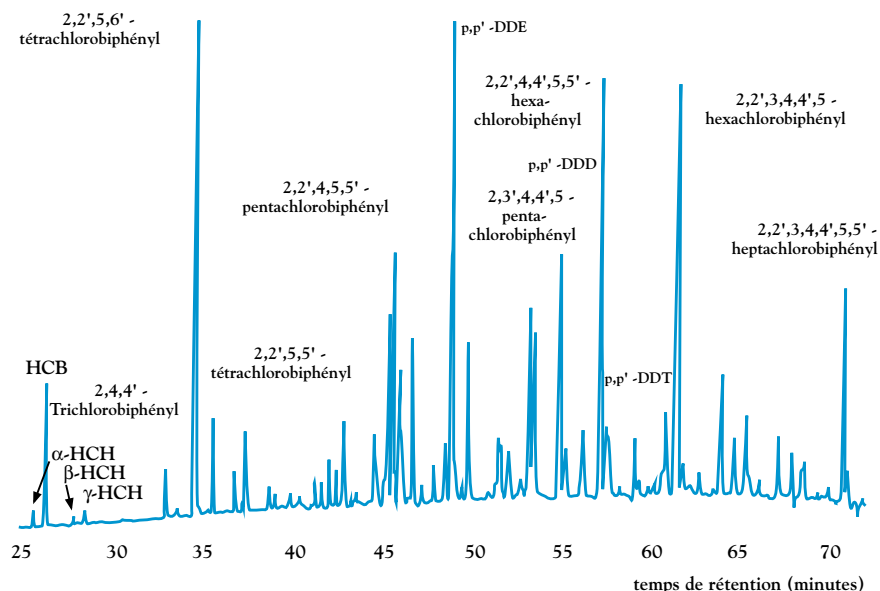


Figure 4.2 : Chromatogramme-type de l'analyse de polluants persistants (ici, dans le hareng) par chromatographie gazeuse dans les années quatre-vingt-dix

par de l'huile de riz contaminée par le fluide caloporteur des presses (maladie de Yusho). Parallèlement, les constatations d'effets toxiques sur les poissons, les oiseaux et les mammifères (phoques) se multipliaient.

À partir du début des années soixante-dix, furent prises des mesures d'interdiction ou de restriction d'emploi de certains composés devant l'ampleur des effets constatés. Suite à ces restrictions d'emploi, les niveaux de présence de ces composés dans l'environnement ont régulièrement diminué. L'évolution des composés chlorés rémanents a été suivie dans certaines espèces sentinelles d'oiseaux ou de poissons. La surveillance la plus poussée en Europe a été effectuée en Suède, en particulier à cause des problèmes posés par l'utilisation du chlore comme procédé de blanchiment de la pâte à papier. Le dosage régulier du DDT, des PCB et des dioxines dans les œufs de guillemots a permis de suivre l'histoire de la présence de contamination de l'environnement par ces substances (figure 4.3).

Ainsi la teneur en DDT a fortement diminué dès le début des années soixante-dix (environ de 10 % par an). De même, les PCB ont commencé à décroître significativement à partir de 1975 (de 5 % à 9 % par an). Pour les dioxines, on observe également une diminution dès le début des années soixante-dix mais on note une remontée des concentrations à la fin de cette décennie, le retour à la décroissance reprenant dans les années quatre-vingt. Une constatation identique a été rapportée en Grande-Bretagne par l'analyse d'herbiers (figure 4.4).

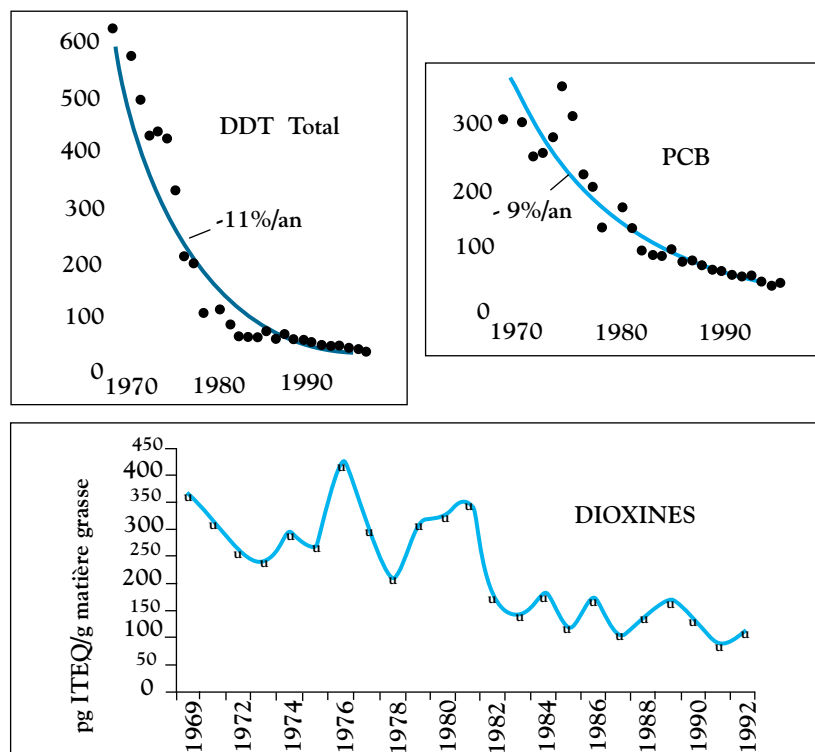


Figure 4.3 : Évolution des contaminations en DDT, PCB ($\mu\text{g/g}$) et dioxines dans les œufs de guillemots en mer Baltique (d'après *European commission DG environment*, 1999)

Cette remontée des concentrations est probablement liée à la mise en service de nombreux incinérateurs d'ordures ménagères, fortement émetteurs de dioxines. Depuis le milieu des années quatre-vingt, la maîtrise des procédés industriels d'incinération et de traitement des métaux pourrait expliquer la reprise de la diminution des teneurs dans l'environnement. Cependant, la pollution antérieure a permis la constitution de « réservoirs de pollution » en particulier dans les sols et les sédiments. Ceci est préoccupant en ce qui concerne la mer Baltique (figure 4.5), entraînant des niveaux de contamination élevés dans les écosystèmes aquatiques pendant plusieurs décennies, indépendamment de la réduction drastique des émissions.

Plus récemment, la détection de fortes concentrations en dioxines dans des argiles ou kaolins situés dans des zones géographiques ou dans des strates du sol peu accessibles à une pollution récente a focalisé les recherches sur les sources naturelles de dioxines. Ainsi, des études portant sur des échantillons collectés aux États-Unis (argile du Mississippi), en Allemagne (kaolins), en Australie et

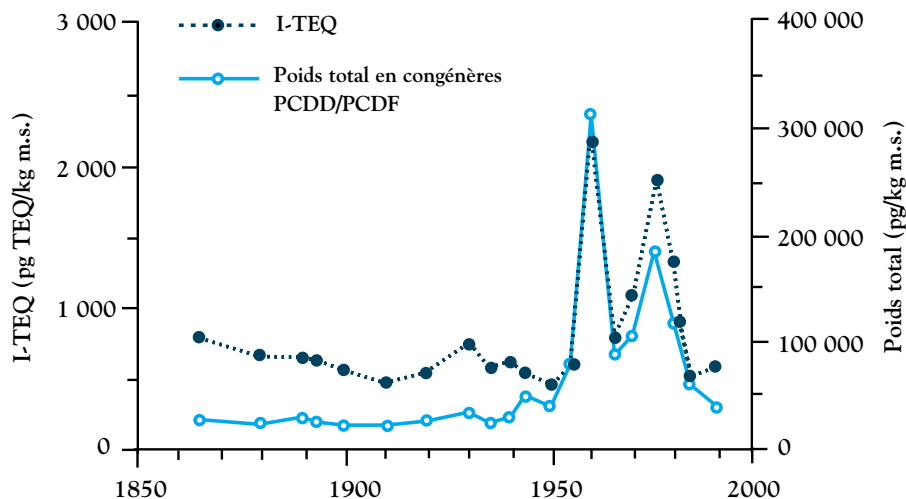


Figure 4.4 : Évolution des concentrations de PCDD et PCDF entre 1860 et 1993 dans les herbiers de la station expérimentale de Rothamsted (Grande-Bretagne) (d'après Kjeller et coll., 1996) (m.s. : matière sèche)

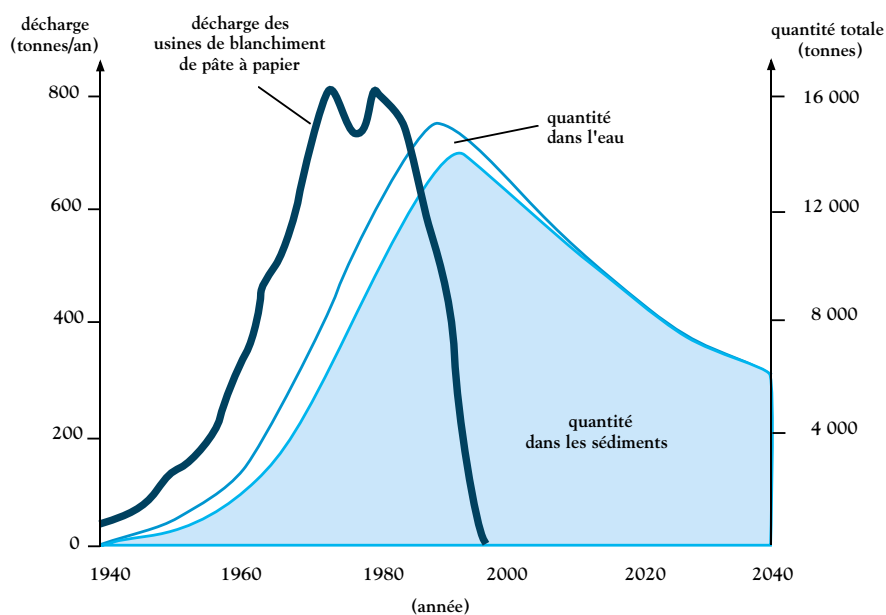


Figure 4.5 : Modèle de la persistance des polluants chlorés dans l'environnement en mer Baltique

en Asie (sédiments profonds) confirment l'existence de contaminations antérieures à 1900. Les profils analytiques montrent une forte prédominance de l'octachlorodibenzodioxine et suggèrent la possibilité de formation naturelle de dioxines dans les sédiments marins (Comptes rendus des communications du congrès « Dioxin 2000 », Monterey).

Contamination de l'air

Les niveaux de contamination des masses d'air sont fonction des activités humaines industrielles et domestiques (tableau 4.I). Sur des sites industriels ou urbains fortement contaminés, des teneurs comprises entre 350 à 1 600 fg/m³ ont été retrouvées.

Tableau 4.I : Niveaux de contamination en dioxines des masses d'air en zones rurales et urbaines pour différents pays européens (d'après *European commission DG environment*, 1999)

Niveau de contamination des masses d'air (fg/m ³)	
Zones rurales	
Angleterre (1991-1996)	1 à 24
Allemagne (1992)	25 à 70
Zones urbaines	
Angleterre (1991-1996)	0 à 810
Allemagne (1992)	70 à 350
Belgique (1993)	86 à 129
Pays-Bas (1991-1993)	4 à 99
Autriche (1996)	26 à 314

Contamination des sols

Globalement, la concentration en PCDD/PCDF dans les sols dépend de l'environnement à savoir de la présence de sources potentielles telles que des usines chimiques ou métallurgiques ou de la présence d'incinérateurs (tableau 4.II). Dans le cas des sols, la contamination se fait essentiellement par dépôt des résidus atmosphériques. Dans les zones rurales, on note des valeurs de 3 à 14 pg TEQ/g de sol en Autriche, de 2 à 9 pg TEQ/g en Belgique, de 1 à 5 pg TEQ/g en Allemagne. En Bavière, 90 % des sols ruraux mesurés se trouvaient en dessous de 1 pgTEQ/g.

En milieu urbain, les données allemandes montrent des teneurs entre 10 et 30 pg TEQ/g de sol. On peut trouver des valeurs de contamination plus élevées dans certaines forêts (de 40 à 63 pg TEQ/g en Autriche et en Allemagne). Des fortes teneurs se trouvent près des sources de pollution industrielle.

Les sols allemands dits industriels sont en général supérieurs à 100 pg TEQ/g. Des études également réalisées en Allemagne (Hagenmaier et coll., 1992 ; She et Hagenmaier, 1996) sur le devenir des composés aromatiques polychlorés à proximité du site d'une fonderie de cuivre et d'une fabrique de câbles (toutes les deux fermées en 1986) montrent que la concentration maximale en PCDD/PCDF dans un rayon de 100 m autour du site et à une profondeur maximale de 30 cm est de 29 pg TEQ/kg de sol. Ces résultats ne montrent pas de différence avec ceux obtenus sur le même site et dans les mêmes conditions en 1981, 1987 et 1989.

Des mesures effectuées près d'une usine de traitement de bois en Finlande rapportent des valeurs de l'ordre de 90 pg TEQ/g de sol. Aux Pays-Bas, à proximité d'incinérateurs municipaux, on note des valeurs supérieures à 200 pg TEQ/g. En France, une étude des sols réalisée pour la communauté urbaine de Bordeaux montre des valeurs inférieures à 0,5 pg TEQ/g dans des zones rurales et une valeur maximale de 17 pg TEQ/g en zone urbaine. Les sols situés à proximité d'un incinérateur de déchets urbains atteignent au maximum 56 pg TEQ/g au niveau de la retombée du panache.

Dans les sols, la migration verticale des PCDD et PCDF dans les zones fortement contaminées est très faible et plus de 90 % des composés se retrouvent dans les 10 cm supérieurs. D'autre part, rien n'indique une perte appréciable de ces composés par migration verticale, évaporation ou dégradation sur une période de huit ans, ce qui souligne la persistance de ces composés dans les sols.

Tableau 4.II : Concentrations en PCDD/PCDF dans les sols de différents pays européens (d'après *European commission DG environment*, 1999)

	PCDD/PCDF (pg TEQ/g de sol)
Zones rurales	
Pays-Bas (1991)	2,2 à 16
Autriche (1989 ; 1989-1993)	1,6 à 14 (pâturages) ; < 1 à 64 (forêts)
Allemagne (1992)	1 à 5
Belgique (1992)	2
France (1999)	0,02 à 1
Zones urbaines	
Allemagne (1992)	10 à 30
France (1999)	0,2 à 17
Zones industrielles	
France (1999)	20 à 60
Allemagne (1992)	50-150
Pays-Bas (1990-1991)	13-252 (incinérateurs municipaux)

Contamination des boues et des composts

La contamination des sols peut être également due à des épandages de boues de stations d'épuration utilisées en particulier en agriculture. En Allemagne, les teneurs moyennes ont fortement diminué et sont passées de 202 pg TEQ/g de matière sèche en 1987 à 60 pg TEQ/g de matière sèche en 1990. Des valeurs semblables ont été rapportées en Grande-Bretagne en 1995, où une estimation indiquait un apport total sur les sols agricoles de 25 g TEQ/an. Ceci ne représentait que 1,8 % des apports par retombées atmosphériques. Le compostage des déchets est aussi une technique utilisée pour fertiliser les sols. Les teneurs en dioxines dépendent, dans ce cas, de l'origine des déchets utilisés. Une étude allemande montre des teneurs moyennes de 38 pg TEQ/g de matière sèche pour des composts de déchets municipaux, de 14 pg TEQ/g de matière sèche pour des déchets biologiques et 11 pg TEQ/g de matière sèche pour des déchets verts. Les congénères présents dans ces deux derniers composts sont très majoritairement de l'OCDD et dans une moindre mesure de l'HpCDD.

Contamination des sédiments

Comme pour les sols, la contamination des sédiments dépend des sources de pollution, de la distance de la zone de prélèvement par rapport aux points sources, de la circulation des masses d'eau et des capacités de dilution des systèmes d'eau douce ou marins. En Allemagne, une étude sur 28 sédiments provenant de deux rivières majeures montre des teneurs comprises entre 1 et 20 pg TEQ/g de matière sèche, pouvant être considérées comme bruit de fond (tableau 4.III). Les sédiments de l'Elbe ont des teneurs comprises entre 20 et 75 pg TEQ/g de matière sèche.

Dans le Rhin, les prélèvements en Allemagne montrent des taux variant de 11 à 37 pg TEQ/g de matière sèche alors que dans le cours inférieur en Hollande, on note des valeurs comprises entre 4 et 220 pg TEQ/g de matière sèche. Dans des zones stagnantes des ports, on peut atteindre des valeurs de 4 000 pg TEQ/g de matière sèche. Dans les zones estuariennes et maritimes, les valeurs rapportées varient de 8 à 21 pg TEQ/g de matière sèche.

En Finlande, dans une rivière recevant des effluents papetiers, les valeurs de contamination sont comprises entre 6 et 80 ng TEQ/g de matière sèche dans le cours supérieur alors qu'elles se situent entre 0,5 et 3,5 ng TEQ/g de matière sèche dans le cours inférieur loin du rejet.

Tableau 4.III : Concentrations moyennes en PCDD/PCDF dans les sédiments de différents cours d'eau en Europe (d'après *European commission DG environment*, 1999)

	Années de mesure	PCDD/PCDF (pg TEQ/g de sédiment)
Rivières allemandes	1994	1 à 20
Elbe Basse-Saxe	1994	1,17-19,2
Hambourg	1995	17,5 à 76,0
Rhin (Rhénanie du Nord/Westphalie)	1989-1996	16 à 103
	1995-1996	11 à 37
Installations portuaires (Hambourg)	1993	1 500
Estuaire du Rhin (Pays-Bas)	1980-1990	8 à 21

Contamination des végétaux

En Grande-Bretagne, une étude de 1989 analysant 67 échantillons de divers végétaux rapportait des concentrations allant de 9 à 455 pg/g de matière sèche. En 1997, l'analyse d'échantillons d'herbe de différents sites montrait des valeurs inférieures à 5 pg TEQ/g de matière sèche. Dans un cas de site pollué, une teneur de 14 pg TEQ/g de matière sèche a été mesurée.

En Allemagne, les études sur l'herbe (*Ray grass*) montrent des valeurs variant de 1 à 7,7 pg TEQ/g de matière sèche, mais une étude spécifique à la Bavière montre des concentrations de 0,5 à 2 pg TEQ/g. Le chou a été choisi comme espèce sentinelle pour les retombées atmosphériques. Les valeurs pour l'Allemagne vont de 0,7 pg TEQ/g de matière sèche en Hesse à 4,78 pg TEQ/g de matière sèche à Hambourg.

En France, une étude de la Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes (DGCCRF) sur des végétaux collectés à proximité d'un incinérateur de déchets ménagers montre des valeurs comprises entre de 0,21 pg TEQ/g de matière sèche pour le chou et 1,10 pg TEQ/g de matière sèche pour la salade (tableau 4.IV).

Tableau 4.IV : Concentrations moyennes en PCDD/PCDF dans les végétaux en Europe (d'après *European commission DG environment*, 1999)

	Concentration en PCDD/PCDF (pg TEQ/g de poids sec)
Herbe (Grande-Bretagne)	3,6 à 12,0
Herbe (Allemagne)	1,3 à 7,7
Choux (Allemagne)	0,7 à 4,8
Choux ; salades (France)	0,21 ; 1,1

Étude des transferts vers les plantes : notion de biodisponibilité

Fries et Marrow (1992) définissent la biodisponibilité d'un composé comme « la fraction d'un composé qui est disponible pour le métabolisme, le stockage ou l'excrétion par l'animal ». Il apparaît cependant assez logique d'étendre cette définition à la disponibilité des composés vis-à-vis des espèces végétales. En premier lieu, le devenir des composés organiques dans les sols va dépendre de la forme dans laquelle le composé est présent, c'est-à-dire de ses propriétés physicochimiques (solubilité, pression de vapeur, coefficient de partage octanol/eau, constante de la loi de Henry...), des propriétés du sol (contenu en matières organiques), de facteurs environnementaux (température, précipitations...) et de facteurs spécifiques (type de culture : forme des feuilles, système de racines, contenu en lipide...) (Duarte-Davidson et Jones, 1996). Cependant, les premiers facteurs déterminants vont être les mécanismes fondamentaux d'adsorption/désorption qui contrôlent la distribution des contaminants dans les phases solide, aqueuse et gazeuse.

En ce qui concerne la contamination des espèces végétales, on peut distinguer différentes voies d'exposition et de pénétration des composés (Beck et coll., 1996 ; Lowett et coll., 1997). Ces voies, représentées schématiquement dans la figure 4.6 sont les suivantes :

- pénétration par les racines puis translocation dans les parties supérieures de la plante ;

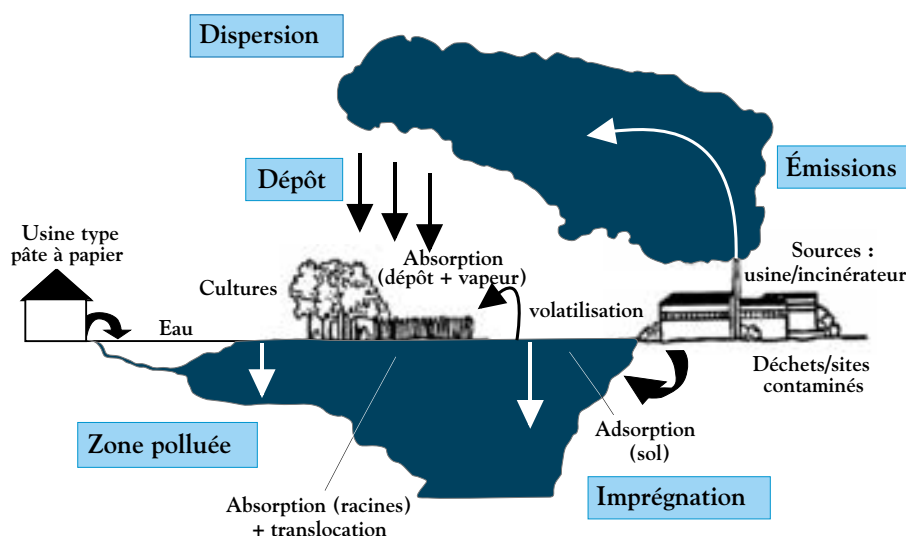


Figure 4.6 : Représentation schématique des voies potentielles d'exposition des plantes aux contaminants organiques (PCB, dioxines...)

- absorption à partir de vapeur de l'air autour de la plante après volatilisation des contaminants ;
- contamination externe des pousses par le sol et/ou la poussière, par rétention dans ou pénétration à travers la cuticule ;
- absorption et transport dans les cellules grasses.

Il est à noter que ces deux dernières voies interviennent seulement dans des conditions particulières et, par conséquent, dans les descriptions générales d'absorption des contaminants organiques par les plantes, ces voies sont généralement ignorées. D'autre part, pour certains légumes qui se développent dans ou à proximité du sol, la contamination peut également avoir lieu par des phénomènes d'éclaboussures (« *splash-over* ») lors de pluies intenses. Dans ce cas précis, ce sont principalement des particules de sol qui seront déposées sur les végétaux et on peut penser qu'elles seront très majoritairement éliminées lors du lavage pour les parties comestibles, mais ingérées par les animaux.

Résultats expérimentaux

Généralement, le transfert des composés organiques des racines vers les pousses est négligeable du fait de la faible hydrosolubilité de ces composés d'une part et de la forte adsorption de beaucoup d'entre eux sur les particules ou la matière organique du sol d'autre part. Ainsi, il a été montré que le transfert des composés hydrophobes dans les récoltes est inversement proportionnel à la quantité de matière organique dans le sol. On peut cependant noter que la présence de certains surfactants peut augmenter la solubilité de ces composés et faciliter leur absorption par les racines.

Des travaux réalisés dans des chambres de culture sur l'absorption des dioxines par les plantes (Bacci et coll., 1992 ; McCrady, 1994) ont montré que, plus que l'absorption par les racines, c'est la volatilisation des composés à partir du sol qui était la principale source de contamination des feuilles des fruits et légumes. Toutefois, en milieu extérieur, la volatilisation à partir des sols est un phénomène de faible importance et la principale source de contamination est le dépôt atmosphérique (Hülster et Marschner, 1993). On peut citer pour souligner et confirmer l'importance de cette voie de contamination les mesures effectuées en Italie en 1977, un an après l'accident de Seveso. Ces mesures ne révèlent aucune trace de dioxines dans la chair de pommes, de poires et de pêches ni dans les épis de maïs ou les amandes cultivées près de l'usine alors que la peau des fruits contient environ 100 ng TEQ/kg de poids frais. Cela suggère en outre l'absence probable de transfert des dioxines de la peau vers l'intérieur des fruits. Une expérience réalisée sur des cultures de carottes en laboratoire montre que l'octachlorodibenzo-*p*-dioxine (OCDD) peut être absorbée à la fois par les racines et les feuilles. Cependant, il n'y a pas de déplacement de l'OCDD des racines vers les pousses dans les 14 jours que dure l'expérience.

Toutefois, si ces résultats sont en accord avec la majeure partie de la littérature sur le transfert des dioxines vers les végétaux, on peut noter quelques exceptions. En effet, les plantes de la famille des cucurbitacées peuvent absorber les PCDD et les PCDF à partir du sol et sont capables de les transférer dans les feuilles et les fruits. Cependant, même pour ces espèces, la voie dominante pour la contamination reste la voie atmosphérique. En effet, les composés organiques peuvent également atteindre les feuilles des végétaux directement par dépôt atmosphérique à travers la cuticule ou les stomates. C'est en fait, le mode d'exposition prépondérant des végétaux aux contaminants. En effet, la cuticule est composée de cire qui peut stocker les composés lipophiles et repousser les composés les plus hydrosolubles. Ainsi, les composés plus solubles sont susceptibles d'être plus facilement transportés à travers la plante *via* le phloème alors que les plus lipophiles auront tendance à être absorbés et retenus au niveau de la cuticule des feuilles. Cette voie de contamination dépend donc des retombées atmosphériques. À partir des études allemandes, on peut calculer un taux moyen de dépôt par unité de surface en fonction de la contamination des masses d'air. Pour ce qui concerne les zones rurales et urbaines, un facteur moyen de 200 peut être calculé (par exemple une teneur de 25 fg/m³ dans l'air correspond à un dépôt de 5 pg/m² par an). Dans le cas d'émissions de poussières fortement concentrées en dioxines, des taux de dépôt supérieurs à un facteur de 2 000 peuvent être constatés.

Contamination des animaux

Dans les systèmes aquatiques, les analyses ont porté sur les poissons, les mollusques et les crustacés. Une étude finlandaise sur les muscles de poissons capturés dans la zone arctique donne des valeurs de 0,06 à 0,1 pg TEQ/g de poids frais (tableau 4.V). En Suède, une étude sur le muscle de 184 harengs donne une teneur moyenne de 3,9 pg TEQ/g de poids frais. Cependant pour le hareng de la mer Baltique, la moyenne s'élève à 9,5 pg TEQ/g de poids frais, ce qui correspond à une teneur de 150 pg TEQ/g de matière grasse.

Une étude allemande rapporte des valeurs de 1,9 à 2,8 pg TEQ/g de poids frais dans le muscle d'une grande variété de poissons. En France, pour des mesures effectuées sur 40 échantillons de saumons et des poissons de mer, la valeur moyenne obtenue est de 5,2 pg TEQ/g de poids frais pour le muscle (Agence française de sécurité sanitaire des aliments, 2000). Des valeurs plus importantes sont notées dans le foie et peuvent atteindre 158 pg TEQ/g de poids frais. Pour les mollusques (moules), des valeurs de 0,09 à 0,58 pg TEQ/g de poids frais sont rapportées dans les études suédoises et une valeur moyenne de 0,8 pg TEQ/g de poids frais est signalée dans l'étude allemande. Enfin, des valeurs élevées (de l'ordre de 350 pg TEQ/g de poids frais) sont mesurées dans l'hépatopancréas de crustacés.

Chez les oiseaux consommant des poissons, on trouve des valeurs de 0,8 à 66 ng TEQ/g de matière grasse pour les aigles alors que, pour le guillemot, on note des valeurs moyennes voisines de 1,5 pg TEQ/g de matière grasse. Chez les mammifères marins, on note une teneur maximale dans la graisse d'un phoque de 216 pg TEQ/g de matière grasse.

Tableau 4.V : Concentrations moyennes en PCDD et PCDF chez les animaux marins en Europe du Nord

	Concentration en PCDD/PCDF (pg TEQ/g de poids frais)
Poissons (Finlande, mer arctique)	0,06 à 0,1
Harengs (Suède)	3,9
Harengs (mer Baltique)	9,5
Poissons (Allemagne)	1,9 à 2,8
Saumons et poissons de mer (France)	5,2*
Moules (Suède)	0,09 à 0,58
Moules (Allemagne)	0,8
Crustacés (Suède)	17,2 à 380,0**

* : données AFSSA, 2000 ; ** valeurs mesurées dans l'hépatopancréas

Pour les animaux terrestres les données concernent surtout le lait de vache. Les résultats varient selon que l'on considère un lait de grand mélange ou un lait de producteur. Dans le premier cas, on note rarement des valeurs supérieures à 3 pg TEQ/g de matière grasse et les niveaux ont baissé au cours des dernières années pour atteindre un taux moyen inférieur à 1 pg TEQ/g de matière grasse pour les laits et les produits laitiers. Au contraire, chez certains producteurs situés en zones contaminées, des valeurs supérieures à 20 pg TEQ/g de matière grasse ont pu être observées en France. En Autriche, des valeurs extrêmes de 69 pg TEQ/g de matière grasse ont été rapportées à proximité d'une usine de cuivre. Sur des champs contaminés, un taux de transfert moyen a pu être calculé à partir des valeurs en TEQ du lait par rapport aux concentrations en TEQ notées dans l'herbe des pâturages. Ainsi, un taux moyen de transfert de 2 peut être retenu à partir des données autrichiennes. L'étude présentée ici concerne les transferts à partir des compartiments de l'environnement et ne concerne pas les transferts à partir des aliments pour animaux.

Contamination de l'homme

60 Du fait de leur liposolubilité et de leur faible dégradabilité, les dioxines vont se retrouver dans les lipides de différents tissus. Les teneurs mesurées vont

dépendre essentiellement du niveau de contamination des aliments puisque ceux-ci constituent la voie majeure d'exposition. De plus, il y aura une accumulation avec l'âge. Cependant, d'autres facteurs peuvent aussi intervenir comme l'exposition professionnelle ou accidentelle, le lieu d'habitation, le nombre d'enfants pour les femmes, la durée de l'allaitement, le sexe, le poids du corps. Les tissus qui ont fait l'objet de mesures sont essentiellement le lait du fait de son obtention non invasive, mais aussi les lipides du sang ou d'autres tissus.

Lait humain

La principale source de données est l'étude effectuée par l'OMS au cours des périodes 1986-1988 et 1992-1993 (WHO, 1989, 1996). Les résultats montrent que les concentrations sont généralement plus faibles en milieu rural qu'en milieu industriel (tableau 4.VI).

Tableau 4.VI : Concentrations moyennes de dioxines dans le lait humain dans les États membres de l'Union européenne

Secteur	Concentration moyenne (pg TEQ/g de matières grasses)		
	1988	1993	Variation (%)
Rural	28,2	17,7	37
Urbain	29,5	19,2	35
Industriel	35,9	24,0	33

De plus les teneurs ont diminué dans l'intervalle de cinq ans entre les deux campagnes d'environ 35 % soit plus de 8 % par an. Une étude allemande indique une diminution de 41 % sur une période de 1992 à 1997 soit en moyenne 10 % par an. En France, l'étude la plus récente a été effectuée par le CAREPS, l'ADEME et l'InVS en 1998-1999 sur 244 échantillons de lait provenant de mères primipares réparties sur le territoire national (8 zones). Les résultats montrent que les teneurs en PCDD et PCDF vont de 6,5 à 34,3 pg TEQ par gramme de matière grasse. La valeur moyenne est de 16,4 pg TEQ/g. La présence de dioxines dans le lait humain à cette concentration permet de calculer un niveau d'exposition pour l'enfant nouveau-né de 70 pg/kg de poids corporel et par jour (InVS/CAREPS, 2000). Ceci correspond toutefois à un niveau maximum car la concentration dans le lait humain n'est pas constante et diminue d'environ 12 % par mois et diminue aussi avec le nombre d'enfants. Cependant, les enfants recevant du lait humain restent de loin la population la plus fortement exposée aux dioxines. Sur les 25 premières années de la vie, un allaitement maternel pendant 6 mois représente plus de 12 % de l'apport total en dioxines.

Sang et tissus

L'étude la plus intéressante est celle réalisée en Allemagne de 1991 à 1996 (Wittsiepe et coll., 2000) sur une population d'hommes de 10 à plus de 80 ans. Cette étude montre, d'une part, l'augmentation des concentrations en fonction de l'âge (d'un facteur 4 entre un enfant de 10 ans et un adulte de 70 ans pour l'étude de 1996) et, d'autre part, une diminution des concentrations au cours de la période étudiée d'environ 12 % par an. Pour ce qui concerne les autres tissus, les données sont très fragmentaires et peu représentatives. Il s'agit la plupart du temps de graisse abdominale. Les résultats obtenus de différents pays (France, Espagne, Suède) sont du même ordre de grandeur que ceux rapportés dans l'étude allemande sur le sang.

En conclusion, tous les compartiments de l'environnement sont concernés par une contamination par les PCDD et les PCDF : masses d'air, sols et sédiments, végétaux et animaux. Globalement, la concentration en PCDD/PCDF dans les sols dépend de la présence de sources potentielles telles que des usines chimiques ou métallurgiques, et d'incinérateurs. La contamination se fait essentiellement par dépôt des particules atmosphériques, plus de 90 % des composés se retrouvant dans les 10 cm supérieurs des sols. La contamination des sédiments dépend aussi des sources de pollution, de la distance de la zone de prélèvement par rapport aux points sources, de la circulation des masses d'eau et des capacités de dilution des systèmes d'eau douce ou marins. Pour les espèces végétales, différentes voies d'exposition et de pénétration des contaminants sont possibles. Mais en milieu extérieur, la principale source de contamination reste le dépôt atmosphérique. Un taux moyen annuel de dépôt peut être calculé par unité de surface, en fonction de la contamination des masses d'air.

BIBLIOGRAPHIE

AGENCE FRANÇAISE DE SÉCURITÉ SANITAIRE DES ALIMENTS (AFSSA). Dioxine : données de contamination et d'exposition de la population française. Rapport rédigé dans le cadre du groupe de travail : « Contaminants et phytosanitaires » du Conseil supérieur d'hygiène publique de France, section « Alimentation et Nutrition ». Juin 2000

BACCI E, CEREJEIRA MJ, GAGGI C, CHEMELLO G, VIGHI M. Chlorinated dioxins – Volatilisation from soils and bioconcentration in plant leaves. *Bull Environ Contam Toxicol* 1992, **48** : 401-408

BECK AJ, JOHNSON DL, JONES K. The form and bioavailability of non-ionic organic chemicals in sewage sludge-amended agricultural soils. *Sci Total Environ* 1996, **185** : 125-149

BERNES C. *Persistent organic pollutants : a swedish view of an international problem*. Swedish Environmental Protection Agency, 1998 : 152 pp

Comptes rendus des communications du congrès « Dioxin 2000 », août 2000, Monterey. *Organohalogen Compounds* 2000, **46**

DUARTE-DAVIDSON R, JONES KC. Screening the environmental fate of organic contaminants in sewage sludges applied to agricultural soils. The potential for transfers to plants and grazing animals. *Sci Total Environ* 1996, **185** : 59-70

EUROPEAN COMMISSION DG ENVIRONMENT. Compilation of EU dioxin exposure and health data, October 1999

FRIES GF, MARROW GS. Influence of soil properties on the uptake of hexachlorobiphenyls by rats. *Chemosphere* 1992, **3** : 109-113

GONZALES MJ, JIMENEZ B, HERNANDEZ LM, GONNORD MF. Levels of PCDDs and PCDFs in human milk from populations in Madrid and Paris. *Bull Environ Contam Toxicol* 1996, **56** : 197-204

HAGENMAIER H, SHE J, LINDIG C. Persistence of polychlorinated dibenzo-*para*-dioxins and polychlorinated dibenzofurans in contaminated soil at Maulach and Rastatt in southwest Germany. *Chemosphere* 1992, **25** : 1449-1456

HÜLSTER A, MARSCHNER H. Transfer of PCDD/PCDF from contaminated soils to food and fodder crop plants. *Chemosphere* 1993, **27** : 439-446

IARC. Polychlorinated dibenzo-*para*-dioxins and polychlorinated dibenzofurans. *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans* 1997, **69** : 665 p

INVS/CAREPS. Étude sur les dioxines et les furanes dans le lait maternel en France, 2000

JENSEN S. The PCB story. *Ambio* 1972, **1** : 123

KJELLER LO, RAPPE C. Time trends in levels, patterns, and profiles for polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins, dibenzofurans, and biphenyls in a sediment core from the Baltic proper. *Environ Sci Tech* 1995, **29** : 346-355

KJELLER LO, JONES KC, JOHNSON AE, RAPPE C. Evidence for a decline in atmospheric emissions of PCDD/Fs in the UK. *Environ Sci Tech* 1996, **30** : 1398-1403

LOWETT AA, FOXALL CD, CREASER CS, CHEWE D. PCB and PCDD/DF congeners in locally grown fruit and vegetable samples in Wales and England. *Chemosphere* 1997, **34** : 1421-1436

MC CRADDY JK. Vapor-phase 2,3,7,8-TCDD adsorption to plant foliage – a species comparison. *Chemosphere* 1994, **28** : 207-216

MÜLLER JF, HÜLSTER A, PÄPKE O, BALL M, MARSCHNER H. Transfer of PCDD/PCDF from contaminated soils to carrots, lettuce and peas. *Chemosphere* 1994, **29** : 2175-2181

PATERSON S, MACKAY D, TAM D, SHIU WY. Uptake of organic chemicals by plants : a review of processes, correlations and models. *Chemosphere* 1990, **21** : 297-331

RYAN JA, BELL RM, DAVIDSON JM, O'CONNOR GA. Plant uptake of non-ionic chemicals from soils. *Chemosphere* 1998, **17** : 2299-2323

SHE J, HAGENMAIER H. Levels and fate of PCDD/Fs in soil around Rastatt in southwest Germany. *Organohalogen Compounds* 1996, **28** : 31-34

World Health Organisation, Regional Office for Europe. Levels of PCB, PCDD and PCDF in breast milk : results of WHO-coordinated interlaboratory quality control studies and analytical field studies. Environmental health series 1989, n° 34, PUBL FADL Publishers, Copenhagen on behalf of the WHO Regional Office for Europe

World Health Organisation, Regional Office for Europe. Levels of PCB, PCDD and PCDF in breast milk : results of WHO-coordinated exposure studies. Environmental health series 1996, n° 3, Copenhagen on behalf of the WHO Regional Office for Europe

WITTSIEPE J, SCHREY P, EWERS U, SELENKAF, WILHEM M. Decrease of PCDD/F levels in human blood from Germany over the past ten years (1989-1998). *Chemosphere* 2000, 40 : 1103-1109

5

Chaînes alimentaires

Le comportement des dioxines dans les chaînes alimentaires joue un rôle majeur dans l'étude de l'exposition de l'homme et des animaux à ces contaminants. Comme de nombreux polluants organochlorés, notamment les hydrocarbures aromatiques polychlorés dont font également partie les polychlorobiphényles (PCB) et les insecticides organo-chlorés (DDT, lindane...), les dioxines (PCDD et PCDF) se caractérisent par une bioaccumulation importante du milieu environnemental aux êtres vivants. Surtout, les dioxines font l'objet d'un processus de bioconcentration et de bioamplification dans la chaîne alimentaire, aboutissant à des taux élevés au niveau terminal, dont l'homme fait partie.

Comment expliquer ce phénomène de bioamplification ? Il tient d'une part à deux caractéristiques physicochimiques des dioxines :

- leur forte stabilité chimique et métabolique (vis-à-vis des enzymes), qui explique leur faible dégradation dans le milieu et les organismes vivants ;
- leur forte liposolubilité ou lipophilie, due à leur caractère peu polaire, ce que traduit un coefficient de partage octanol/eau (K_{ow}) élevé ; cette lipophilie entraîne un passage facile des dioxines par diffusion passive à travers les membranes biologiques des êtres vivants, entre le milieu et les organismes qui y vivent (par transfert cutané ou branchial par exemple) mais aussi lors d'ingestion d'un aliment végétal ou animal, à travers la muqueuse digestive. Ce passage facile des dioxines à travers les membranes biologiques correspond à la notion de biodisponibilité élevée, propre à ces contaminants dits « biocumulatifs ».

Soulignons que, pour ces deux paramètres, stabilité et lipophilie, le nombre et la position des atomes de chlore sur les cycles benzéniques jouent un rôle important ; les comportements des divers congénères dans les chaînes alimentaires peuvent donc être relativement différents, comme nous le verrons plus loin.

Une chaîne alimentaire peut être représentée sous forme d'une pyramide dite trophique (figure 5.1) : d'un niveau à l'autre, la biomasse de chaque compartiment de la pyramide diminue fortement du fait des pertes énergétiques.

Pour un contaminant stable et biocumulatif, comme les dioxines, les concentrations augmentent de façon inversement proportionnelle à la diminution de la biomasse, aboutissant à des teneurs élevées dans les niveaux supérieurs

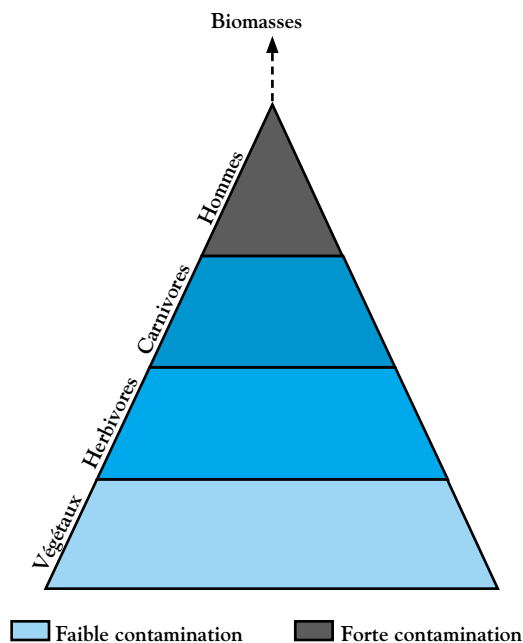


Figure 5.1 : Pyramide trophique représentant une chaîne alimentaire : les taux de contamination par les PCDD/PCDF s'accumulent d'un niveau à l'autre

(animaux prédateurs, herbivores, omnivores, homme), qui seront les plus exposés aux effets toxiques à long terme. Cette représentation est certes approximative ; en réalité, les chaînes alimentaires sont reliées sous forme de « réseaux trophiques », ce qui complique singulièrement les transferts. Par ailleurs, les espèces omnivores comme l'homme se situent en fonction de leur régime à divers niveaux des chaînes alimentaires.

Elle permet toutefois de rendre compte d'une réalité pouvant être étudiée soit sur le terrain, par l'analyse des taux de contamination à différents niveaux trophiques, soit au laboratoire dans des « écosystèmes simplifiés » ou mésocosmes, basés sur des modèles de chaînes alimentaires simples.

Ces approches s'appliquent aux chaînes alimentaires « naturelles » aquatiques ou terrestres ainsi qu'« artificielles », chaînes agro-alimentaires basées sur les espèces domestiques ; elles conduisent en particulier à déterminer les coefficients de transfert des dioxines d'un niveau à l'autre, qui varient comme on l'a vu plus haut en fonction des divers congénères. Ceci se traduira par des profils chromatographiques différents entre l'herbe et le lait de vache par exemple. Comme les taux de contamination sont exprimés le plus souvent en unités TEQ (équivalent toxique par rapport à la 2,3,7,8-TCDD), ces différences n'apparaissent pas dans les résultats globaux.

Seule la 2,3,7,8-TCDD était mesurée dans les études antérieures à 1990. Les études plus récentes prennent en compte tout ou partie des PCDD/PCDF avec souvent les PCB coplanaires, ce qui rend les résultats plus difficiles à comparer.

Taux de contamination dans les milieux aquatiques

Les chaînes aquatiques sont généralement plus longues que les chaînes terrestres. En outre, les animaux aquatiques présentent souvent une moindre aptitude à la dégradation des polluants, d'où une accumulation importante des dioxines dans les maillons terminaux.

Les valeurs des taux de contamination rapportées par diverses études de terrain considérées comme représentatives par Niimi (1994) s'étagent comme suit :

- eau : taux généralement non détectables (< 1 pg/l), sauf OCDD (1-100 pg TEQ/l) ;
- sédiments : très variables selon la distance à la source ; 1 à 100 000 pg TEQ/g de poids sec ;
- plancton, invertébrés, poissons : 1-100 pg TEQ/g de poids frais ;
- oiseaux piscivores, mammifères marins : 10-1 000 pg TEQ/g de poids sec.

En comparaison avec les PCB, les PCDD/PCDF présentent indéniablement une moindre aptitude à la biomagnification, probablement en relation avec une biodisponibilité et surtout une stabilité plus faibles.

Bioaccumulation chez les poissons

Les tests de bioconcentration sur des poissons au laboratoire montrent des coefficients de transfert relativement faibles entre l'aliment et le poisson (Berends et coll., 1997). Les congénères octachlorés sont le plus souvent retrouvés dans l'eau et les sédiments ; ils sont présents en très faibles concentrations dans les poissons. *A contrario*, les congénères peu chlorés notamment 2,3,7,8-substitués montrent un net enrichissement chez les poissons par rapport aux sédiments (Bonn, 1998), ce qui atteste de leur plus forte biodisponibilité.

Pour la 2,3,7,8-TCDD, les facteurs de bioconcentration (BCF) entre l'eau et les poissons sont relativement élevés, de 8 000 à 80 000. Les coefficients de transfert entre proies et prédateurs oiseaux ou mammifères (c'est-à-dire le rapport de la concentration dans le prédateur sur la concentration dans la proie) peuvent être estimés à environ 24 pour les oiseaux et 20 pour les mammifères (Loonen et coll., 1995).

Les coefficients de transfert globaux de la 2,3,7,8-TCDD entre l'eau et le prédateur final sont de l'ordre de 10^5 , alors que pour les PCB, ils sont de 10^7 (Loonen et coll., 1995).

Les taux de PCDD/PCDF retrouvés en mer Baltique dans la chaîne phytoplancton-zooplancton-hareng-morue indiquent un facteur de magnification de 5 environ (Broman et coll., 1992), alors qu'il est de plusieurs centaines pour les PCB.

Les poissons marins échantillonnés sur les côtes européennes présentent des taux de 6 pg TEQ/g de poids frais en Grande-Bretagne (Startin et coll., 1990), de 20 pg TEQ/g en Allemagne (Furst et coll., 1990).

Les poissons de la mer Baltique contiennent des taux de PCDD/PCDF nettement plus élevés : hareng, 23 pg TEQ/g de poids frais ; saumon, 78 pg TEQ/g (Rappe et coll., 1987), d'où les recommandations de limiter leur consommation faites aux populations suédoises ou finnoises.

Du fait de leur exposition aux sédiments contaminés et de leur richesse en lipides, les anguilles renferment souvent des taux élevés de dioxines : 31 pg TEQ/g de poids frais dans le Rhin (Frommberger, 1991).

Les taux les plus élevés sont observés dans les grands lacs américains : 30 pg TEQ/g de poids frais dans des truites du Lac Supérieur ; 76 et 118 pg TEQ/g de poids frais dans celles des lacs Michigan et Ontario (Zacharevski et coll., 1989).

Lors d'une pollution particulière comme des rejets, en rivière, de papeterie utilisant le chlore comme agent de blanchiment, les taux de contamination chez les poissons peuvent devenir problématiques pour la consommation humaine : dans la rivière Fraser, en Colombie-Britannique, certaines espèces comme le « *mountain whitefish* » présentent des taux supérieurs à 50 pg TEQ/g de poids frais, ce qui conduit à des niveaux d'ingestion très supérieurs à 10 pg TEQ/kg de poids corporel/jour, selon l'analyse de risque effectuée (Law et Gudaitis, 1994). Ces rivières ont fait l'objet de recherches intensives par les autorités canadiennes du fait de leur richesse biologique (ce sont des voies de passage majeures des saumons du Pacifique) et de la densité de papeteries dans leur environnement : des relations ont été mises en évidence entre l'accumulation de PCDD/PCDF dans les saumons *chinook* et l'induction du CYP1A1 et de l'activité EROD (7-éthoxyrésorufin-O-dééthylase) ; mais ces relations sont probablement faussées par d'autres contaminants de type hydrocarbures aromatiques polycycliques (Addison et Wilson, 1998). Ces auteurs notent une forte diminution des taux de 2,3,7,8-TCDF, congénère le plus représentatif, de 1989 (40 pg TEQ/g de poids frais) à 1995 (< à 1 pg TEQ/g), ainsi que de l'activité EROD.

En France, des résultats récents obtenus par la Direction générale de l'alimentation (DGAL) en 1998-1999 font état de concentrations de 4 à 10 pg TEQ/g de matières grasses dans des truites de pisciculture (moyenne : 7,5 pg TEQ/g), les taux croissant avec l'âge des poissons.

Dans les poissons de mer, les teneurs vont de 1 à 9 pg TEQ/g de matières grasses avec une moyenne de 4,7 pg TEQ/g de matières grasses, les saumons ayant en général des taux un peu plus élevés que les espèces pêchées au large.

Les harengs de la mer Baltique présentent des teneurs de 10 à 270 pg TEQ/g de matières grasses, les poissons les plus âgés étant là aussi les plus contaminés, ce qui pose des problèmes pour la consommation humaine qui a fait l'objet de recommandations très strictes mais également pour leur distribution aux poissons d'élevage, notamment les saumons.

Les déterminations analytiques les plus fines mettent en évidence dans les poissons des cours d'eau contaminés une grande variété de contaminants organochlorés : dans la chair de carpes de la région des Grands Lacs, les taux de PCDD/PCDF et PCB coplanaires étaient de l'ordre de 50 à 100 pg TEQ/g (les PCB mono-ortho constituant près de la moitié en équivalent toxique) mais ne représentaient que 13 % à 58 % des organo-chlorés extractibles, à côté de biphényle-éthers polybromés et d'autres composés non encore identifiés (Loganathan et coll., 1995).

L'impact potentiel des contaminants organochlorés accumulés par les truites des Grands Lacs américains a été étudié selon une procédure originale en injectant dans des œufs de truite des extraits de poissons collectés dans le lac Michigan, afin d'évaluer leurs effets sur la croissance des embryons ; des effets subaigus analogues à ceux provoqués par les dioxines ont été observés à des taux relativement bas, correspondant à 8,8 ng TEQ/g de PCB (Wilson et Tillitt, 1996).

Ces données confirment l'implication probable des contaminants organochlorés dans les troubles reproductifs des poissons dans les milieux pollués, en particulier les PCDD/PCDF et les PCB coplanaires. Sur les côtes de la mer Baltique, le « syndrome M74 » (mortalité au stade larvaire) du saumon salar serait également en relation avec les taux de ces contaminants ainsi que ceux des diphenyléthers polychlorés (Vuorinen et coll., 1997).

Bioaccumulation chez les mollusques et les crustacés

Les mollusques aquatiques présentent une aptitude particulière à la bioaccumulation des contaminants en raison des volumes importants d'eau qu'ils filtrent et de leur relative richesse en lipides.

À ce titre, les moules sont souvent utilisées comme indicateurs de la qualité des milieux côtiers (« mussel watch ») ; elles accumulent plus facilement les dioxines faiblement chlorées de même que d'autres coquillages (huîtres, clams...). Toutefois, l'impact d'un effluent de papeterie sur les niveaux de dioxines dans des moules de la côte australienne s'est avéré très faible (Haynes et coll., 1995).

Sur les côtes coréennes, les taux accumulés par les moules et les huîtres reflètent la pollution induite par des combustions industrielles. Au Japon, les taux de PCDD/PCDF exprimés en TEQ ont régulièrement baissé dans les baies de Tokyo et d'Osaka entre 1989 (1,4 et 1,7 pg TEQ/g de poids frais) et 1993 (0,1 et 0,007 pg TEQ/g) ; les travaux japonais soulignent toutefois les

différences entre les valeurs exprimées en TEQ et en PCDD/PCDF totaux en fonction des sites de prélèvement (Hashimoto et coll., 1998).

En France, les taux retrouvés dans les moules en 1999 étaient de 50 pg TEQ/g de matières grasses environ (données DGAL) ; les huîtres présentaient des taux légèrement inférieurs ($\approx$ 45 pg TEQ/g).

Parmi les crustacés, les petites crevettes présentent des taux relativement faibles (0-4 pg TEQ/g de matières grasses) par rapport aux grandes espèces tels que les tourteaux (30-60 pg TEQ/g de matières grasses) ou les homards ; ceci est probablement en relation avec le caractère fouisseur de ces crustacés et leur âge relativement élevé au moment de la commercialisation, d'où une exposition plus importante au milieu contaminant.

Bioaccumulation chez les oiseaux et les mammifères

Chez les oiseaux piscivores, on met en évidence une bioamplification des dioxines, mais ici encore plus limitée que celle des PCB : le facteur d'amplification déterminé pour la 2,3,7,8-TCDD entre le poisson consommé et les œufs de hérons est de 21 (Elliott et coll., 1989) ; il est de 3 pour les PCDD et de 0,3 pour les PCDF chez les mouettes (Macdonald, 1992), de 11 à 32 chez les aigles (De Wit et coll., 1992).

Ces taux sont néanmoins représentatifs de la contamination des chaînes alimentaires et de leurs variations : depuis 1990, une tendance constante à la baisse est observée dans les œufs de guillemots en Suède : de 4 000 pg TEQ/g en 1970, les taux sont passés à 900 pg TEQ/g en 1994 (Alcock et Jones, 1996).

Au Canada, sur l'estuaire du fleuve Saint-Laurent, les taux de PCDD/PCDF dans les œufs sont de 3 pg TEQ/g de poids frais pour les eiders, 6 pg TEQ/g de poids frais pour les mouettes, 22 pg TEQ/g de poids frais pour les cormorans ; les taux de PCB sont nettement plus élevés (Ryan et coll., 1997).

Sur les cours d'eau canadiens, pollués par des effluents de papeterie, comme les rivières de Colombie-Britannique, en 1991-1993, les œufs de balbuzards fluviatiles présentaient des taux de 2,3,7,8-TCDD de 30 à 40 pg TEQ/g de poids frais ; ils sont progressivement passés à moins de 5 pg TEQ/g en 1997, du fait de la modification des procédés et des mesures de dépollution (Elliott et coll., 1998). Notons que, dans ces rivières, les profils de PCDD/PCDF dans les œufs de poissons piscivores peuvent varier fortement d'un site à l'autre.

Chez les mammifères marins, le facteur d'amplification entre poissons et phoques n'est pas aussi marqué pour les dioxines que celui des PCB ; il est de 5 environ pour le phoque arctique au Canada et de 10 pour l'ours (De Wit et coll., 1992). En mer Baltique, les taux sont équivalents à ceux des poissons (Niimi, 1994).

70 Les taux retrouvés dans la graisse des phoques de la mer du Nord sont de 34 pg TEQ/g de poids frais (Beck et coll., 1990), de 64 pg TEQ/g chez le

dauphin en Nouvelle-Zélande (Buckland et coll., 1990) et de 88 pg TEQ/g de poids frais chez l'orque au Japon (Ono et coll., 1987).

Les PCDD/PCDF n'ont pas été détectés dans les tissus des phoques au large de l'estuaire du Saint-Laurent, ni dans les saumons et les morues (Ryan et coll., 1997).

Les PCDD/PCDF et les PCB non ortho-substitués ont été retrouvés dans la graisse de phoques antarctiques : exprimés en TEQ (modèle nordique), les taux de PCDD/PCDF vont de 1 à 2 pg TEQ/g de poids frais alors que les PCB non ortho représentent 3 à 7 pg TEQ/g de poids frais (Oehme et coll., 1995).

Les mammifères d'eau douce piscivores sont également affectés par la bioaccumulation des dioxines : au Québec, les visons sauvages (*Mustela vison*) en aval de papeteries présentent des taux hépatiques de PCDD/PCDF de 32 pg TEQ/g de poids frais contre 2 pg TEQ/g en amont ; ces taux pourraient avoir un impact sur la reproduction de cette espèce très sensible aux effets toxiques à long terme des organochlorés. Les effets propres des PCB, largement présents également dans ces sites, sont toutefois difficiles à discriminer de ceux des PCDD/PCDF (Champoux, 1996).

Il en va probablement de même pour la loutre, autre grande consommatrice de poissons, dont la survie et la reproduction ont été mises en relation avec les taux de PCB bioaccumulés, selon de nombreuses études en France et ailleurs (Bordet, 1999).

Dans les populations humaines, la consommation importante de poissons, par exemple sur les côtes de la mer Baltique ou sur certaines côtes de la mer du Nord, entraîne une exposition particulière, traduite par des taux plasmatiques élevés de PCDD/PCDF. Plus encore, la consommation d'œufs d'oiseaux piscivores et de graisse de cétacés, traditionnelle dans les zones arctiques conduit à des taux plasmatiques importants de PCDD/PCDF, particulièrement chez les sujets âgés ; au Canada, les taux plasmatiques de 57 pg TEQ/g de matières grasses chez ces consommateurs sont près de trois fois supérieurs à ceux des habitants urbains (21 pg TEQ/g de matières grasses) ; la différence est encore plus marquée pour les PCB (Ryan et coll., 1997).

Milieux terrestres

Les données sont moins détaillées pour les milieux terrestres que pour les milieux aquatiques ; elles vont toutefois dans le sens d'une bioamplification moindre, du fait des chaînes alimentaires plus courtes et d'une meilleure aptitude des vertébrés terrestres aux biotransformations.

À partir d'un sol fortement contaminé (0,1 à 5 ng TEQ/g de matière sèche), la 2,3,7,8-TCDD peut être transférée dans les lombrics pour atteindre des taux de 0,2 à 2 ng TEQ/g de poids frais ; des taux de 109 pg TEQ/g de poids frais

dans les souris et de 700 pg TEQ/g de poids frais dans les serpents ne vont pas dans le sens d'une amplification en relation avec une biodégradation des PCDD/PCDF (Lower et coll., 1989).

Des lapins canadiens (« cottontail rabbit », *Sylvilagus floridanus*) collectés après un feu de PCB au Québec présentaient des taux élevés de PCDF dans le foie (426 pg TEQ/g de 2,3,7,8-TCDF et 423 pg TEQ/g de 23478-PnCDF) mais pas de 2,3,7,8-TCDD (Champoux, 1996).

Chez des animaux éloignés de toute source de pollution, comme l'élan et le loup des zones sub-arctiques, les taux de PCDD/PCDF sont inférieurs aux limites de détection (De Wit et coll., 1992).

Chaînes agroalimentaires

Les chaînes alimentaires résultant de l'élevage d'animaux domestiques herbivores sont généralement courtes, mais fournissent des produits largement consommés par l'homme, d'où leur importance sur le plan de la surveillance des taux de bioaccumulation de PCDD/PCDF et de la compréhension des modalités de transfert.

La poule pondeuse représente un modèle d'étude intéressant. Chez des poules élevées sur des sols contaminés avec différents taux de PCDD/PCDF (< 0,5-42-460 pg TEQ/g de matière sèche), les congénères peu chlorés sont de loin les plus biodisponibles (de l'ordre de 80 % pour les tétrachlorés contre 10 % pour les octa-). La répartition dans les tissus dépend également des congénères. De 5 % à 30 % des quantités ingérées sont excrétées dans les œufs qui contiennent des taux de 100 à 300 pg TEQ/g de matières grasses pour l'exposition élevée, 10 à 30 pg TEQ/g de matières grasses pour l'exposition moyenne et 2 à 3 pg TEQ/g de matières grasses pour l'exposition basse ; 7 % à 54 % se fixent dans le tissu adipeux, moins de 1 % dans le foie.

Ces chiffres sont très différents de ceux observés chez les rongeurs de laboratoire. Ils indiquent que des poules élevées sur un sol contaminé aux taux envisagés constituent par leurs œufs et leur chair des apports importants de dioxines dans l'alimentation, estimés sur la base des consommations standards à 6 000 pg/j pour le sol fortement contaminé, 250 pg/j pour le sol moyennement contaminé et 17 pg/j pour le sol faiblement contaminé (Stephens et coll., 1995).

Les poulets de chair et poules pondeuses élevés sur sol présentent de fait des taux de PCDD/PCDF plus élevés que des volailles élevées en bâtiment ; cela tient d'une part à l'ingestion de sol et d'autre part à la consommation de vers et insectes pouvant concentrer les contaminants. Dans une récente enquête DGAL en Alsace (1998), les œufs de poules élevées au sol présentent des taux de 1,5 à 5,5 pg TEQ/g de matières grasses contre 0,3 à 1 pg TEQ/g de matières grasses dans des œufs de poules élevées en bâtiments.

En France, les viandes de volaille présentent un taux moyen de 0,6 pg TEQ/g de matières grasses.

La chaîne alimentaire passant par les bovins est certainement la plus importante à considérer pour plusieurs raisons :

- le lait et les produits laitiers occupent une place majeure et croissante dans la consommation, notamment chez les jeunes, de même que la viande bovine ; ce sont par ailleurs des produits riches en lipides, dans lesquels les PCDD/PCDF s'accumulent facilement ;
- les bovins sont élevés pratiquement toute l'année à l'extérieur et peuvent être exposés à des contaminations d'origines industrielles ou ponctuelles très diverses ;
- les bovins ont une durée de vie relativement longue, notamment les vaches laitières (jusqu'à 8-10 ans).

Contrairement aux espèces à cycle court, souvent élevées en bâtiments, comme les poulets et les porcs, les bovins sont ainsi des indicateurs mais aussi des vecteurs importants de la pollution environnementale par les dioxines et d'autres contaminants lipophiles.

Les transferts des PCDD/PCDF à partir d'une source industrielle atmosphérique comme un incinérateur sont schématisés dans la figure 5.2.

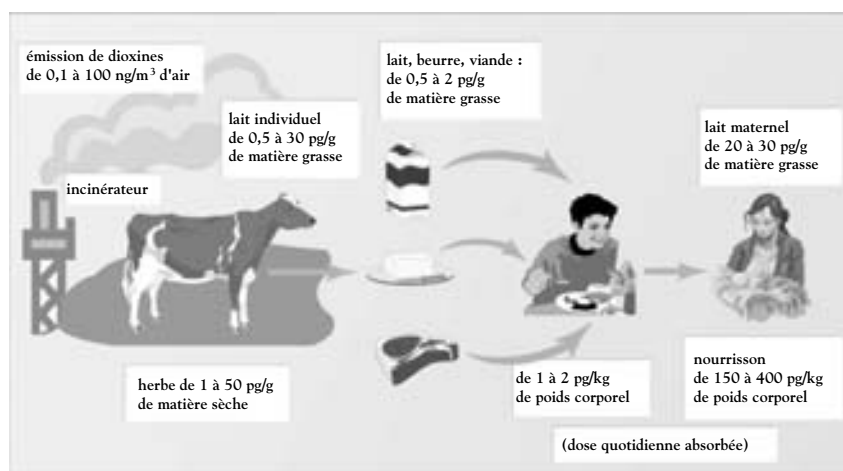


Figure 5.2 : Transfert des dioxines dans la chaîne alimentaire (valeurs moyennes exprimées en TEQ) (d'après le Point Vétérinaire, 1998, reproduit avec l'autorisation des Éditions du Point Vétérinaire)

Les taux dans les émissions à la cheminée varient considérablement en fonction des conditions d'incinération et d'épuration des fumées ; en France, une enquête menée en 1997-1998 par le Ministère de l'Environnement sur 183 incinérateurs indique des valeurs de 0,1 à 170 ng TEQ/m³.

Le seuil de $0,1 \text{ ng TEQ/m}^3$, imposé par une directive européenne de décembre 1994, est applicable en France, depuis février 1997, aux incinérateurs d'ordures ménagères, et depuis octobre 1996, aux incinérateurs de déchets industriels dits spéciaux.

Dans l'air ambiant, les valeurs à l'émission sont bien entendu très variables : elles ont été estimées à environ $0,1 \text{ pg TEQ/m}^3$ en zone urbaine et périurbaine et à environ 6 fois moins en milieu rural ($0,04\text{-}0,4 \text{ pg TEQ/m}^3$) (Lorber et coll., 1994).

Les PCDD/PCDF de l'atmosphère se déposent sur le sol et sur les végétaux en partie sous forme gazeuse ou vapeur, en partie sous forme solide adsorbée sur des particules ou poussières, dite phase particulaire ; le rapport entre ces deux formes, dit ratio V/P, dépend des caractéristiques physiques de chaque congénère (température de volatilisation...).

Le dépôt gazeux est la voie prédominante des congénères faiblement chlorés (tétra- à hexa-), le dépôt particulaire celle des dérivés à 7 et 8 chlores (McLachlan, 1997).

Globalement, la proportion de la phase particulaire semble plus importante, d'où un dépôt relativement proche de la source d'émission. Un « effet cheminée » s'observe néanmoins : à proximité immédiate de l'usine, les retombées sont souvent plus faibles qu'à quelques centaines de mètres. Les valeurs retrouvées en périphérie des incinérateurs d'ordures ménagères, comme celui de Lille à Halluin correspondent à ces données (Bertrand, 1999).

Les composés gazeux se fixent dans la couche cireuse qui recouvre les végétaux, et semblent peu migrer à l'intérieur ; la phase particulaire reste en surface du végétal et peut donc être facilement entraînée vers le sol par les précipitations ou par le vent.

Les PCDD/PCDF se déposent également directement sur le sol, en grande partie sous forme fixée aux particules. Ils semblent peu migrer en profondeur, du fait de leur forte affinité pour les colloïdes du sol en relation avec leur coefficient de partage octanol/eau (Kow) élevé. Ils sont retrouvés généralement (95 %) dans les 10 cm situés au-dessous de la surface, dans les sols cultivés ou pâturés (Jones et Sewart, 1997). Pour la même raison, le transfert par voie racinaire du sol vers les végétaux est très limité, sauf semble-t-il certaines exceptions comme les cucurbitacées. En revanche, les végétaux peuvent être souillés par de la terre contaminée, non seulement au niveau des racines, mais également des parties aériennes, notamment lorsque les pluies projettent des particules (phénomène dit de « *splash over* »). Une partie plus réduite peut se volatiliser à partir du sol et se fixer dans la couche cireuse des végétaux.

Les conditions météorologiques et topographiques interviennent de façon importante dans le dépôt des PCDD/PCDF par rapport à la source d'émission ; elles sont étudiées tant au niveau général (courants atmosphériques élevés) qu'au niveau local (rose des vents, courants de vallée, précipitations) pour

expliquer et si possible prévoir les retombées sur le sol et la couverture végétale. Plusieurs modèles de dispersion existent à l'heure actuelle (Polair, Aria) et, même s'ils demandent encore à être affinés, s'avèrent d'une grande utilité pour estimer les retombées en fonction des données d'émission.

À proximité d'une source industrielle, incinérateur, sidérurgie, les taux dans le sol peuvent augmenter à des valeurs de 10 à 100 pg TEQ/g de matière sèche : à Halluin, les sols exposés aux retombées de l'incinérateur de la communauté urbaine de Lille montraient des teneurs de 15 à 64 pg TEQ/g de matière sèche (Vindel et Duhem, 1999) ; cette installation a été interdite d'exploitation en 1998 après la mise en évidence de taux élevés de dioxines dans le lait des vaches pâturent sur cette zone, qui ont donc servi de révélateur de la pollution.

En Allemagne, des sols situés à proximité d'une fonderie de cuivre et d'une fabrique de câbles présentaient des taux très élevés de 30 ng TEQ/g de matière sèche ; l'étude de leur répartition a montré que 90 % se situaient dans les 10 cm supérieurs ; sur une période de trois ans après la fermeture des usines, les taux ont très peu évolué.

Outre les dépôts atmosphériques, l'épandage de boues de stations d'épuration domestiques ou industrielles peut représenter des apports non négligeables de PCDD/PCDF sur les sols et les végétaux : les teneurs moyennes sont de l'ordre de 25 pg TEQ/g de matière sèche mais peuvent aller dans le cas de boues industrielles jusqu'à 200 pg TEQ/g d'après les données anglaises et allemandes (Jones et Sewart, 1997) ; notons la carence de données françaises à cet égard. Des épandages à 12 tonnes/ha/an entraînent un incrément de 10 % par an dans un sol rural dont le taux de base est estimé à 2 pg TEQ/g de matière sèche pour une boue moyenne et de 80 % pour une boue à forte contamination (Jones et Sewart, 1997). En Allemagne, le seuil fixé en 1993 pour les sols cultivables est de 5 pg TEQ/g de matière sèche.

La persistance des PCDD/PCDF dans les sols est très longue : la cinétique de disparition est très probablement biphasique avec une première phase plus rapide et une seconde très lente, ce qui permet d'estimer la demi-vie de la 2,3,7,8-TCDD à environ 10 ans, les congénères plus chlorés persistant encore plus longtemps (Jones et Sewart, 1997).

Cinétique des dioxines chez les animaux d'élevage

L'absorption des dioxines par les bovins se fait essentiellement par voie alimentaire : l'air et l'eau apparaissent négligeables. Des études de terrain en Allemagne montrent que l'herbe est la source la plus importante suivie par l'ensilage de maïs, les concentrés et autres aliments n'apportant qu'une contribution modeste (Mc Lachlan, 1997). Les fourrages verts fournissent en effet des surfaces d'adsorption des dioxines bien plus importantes que les grains de céréales dont sont constitués majoritairement les concentrés. La vitesse de croissance et le format du végétal interviennent également.

A Halluin, l'herbe dans une périphérie de 5 km de l'incinérateur contenait 10 à 42 pg TEQ/g de matière sèche, et l'ensilage de maïs 2 à 8 pg TEQ/g.

L'ingestion de sols contaminés par les bovins constitue une source d'importance très variable et très discutée ; elle dépend largement des conditions climatiques et de celles propres aux sols ; dans les pays tempérés, on peut admettre qu'elle ne dépasse pas 1 % à 2 % de l'ingéré alimentaire exprimé en matière sèche (des pourcentages de 6 % à 10 % sont parfois avancés) ; cette notion est relativement importante à prendre en compte, notamment dans le cas de sols industriels anciens ou d'épandage de boues. Une vache laitière ingère environ 15 kg de matière sèche par jour ; les quantités de sol ingérées peuvent donc représenter quelques centaines de grammes. On sait par ailleurs que certains herbivores comme le cheval ou le mouton ingèrent des quantités de terre plus importantes que les bovins.

D'autres sources de contamination plus ponctuelles des animaux d'élevage méritent d'être citées. Certains aliments préfabriqués peuvent être fortement contaminés ; en 1997, des granulés à base de pulpes de citrus fabriqués au Brésil contenaient des taux de 10 à 30 pg TEQ/g de matière sèche, du fait semble-t-il de l'emploi d'argile contaminée au cours du séchage (ou de carburants contaminés) ; le lait des vaches européennes ayant consommé ces aliments présentait des taux de 7 pg TEQ/g de matières grasses, ce qui a conduit à l'interdiction d'importer ces pulpes et à la destruction des stocks, un seuil de 0,5 pg TEQ/g de matière sèche ayant été fixé.

Plus récemment, en 1999, des kaolins, utilisés comme additifs techniques dans la fabrication des aliments granulés, ont montré des taux élevés de PCDD issus semble-t-il de contaminations naturelles.

Dans les bâtiments d'élevage, les animaux peuvent être exposés à une contamination permanente et relativement marquée par les PCDD/PCDF relargués par les bois traités au pentachlorophénol, ce qui était la règle générale jusqu'en 1995, date de l'interdiction de ce produit. Ceci pourrait expliquer les taux élevés dans certaines exploitations laitières, à l'écart de toute source identifiée de pollution.

La biodisponibilité des PCDD/PCDF à travers le tube digestif des bovins est très variable selon les congénères, mais également selon les conditions d'absorption : doses ingérées, support ou « matrice » des contaminants. Le pourcentage d'absorption digestive dépend essentiellement du K_{ow} des divers congénères : il est élevé (jusqu'à 80 %) jusqu'à un $\log K_{ow}$ de 6,5 puis diminue brutalement à 20 % pour un $\log K_{ow} > 8$, les composés trop hydrophobes traversant difficilement les membranes biologiques de la paroi digestive. Les congénères tétra- et penta- sont de ce fait beaucoup mieux absorbés que les hepta- et octa- (McLachlan, 1997).

Le support ou « matrice » des PCDD/PCDF influe également sur leur biodisponibilité : lors d'essais expérimentaux avec de l'herbe contaminée par des cendres d'incinérateur, les congénères octa- présentaient chez la vache laitière

un passage dans le lait voisin de zéro, donc une biodisponibilité orale minimale ; elle était de 15 % pour la 2,3,7,8-TCDD et de 7 % pour l'ensemble des PCDD/PCDF exprimés en TEQ. En pratique, dans ces conditions d'exposition assez réalistes, des valeurs de l'ordre de 10 pg TEQ/g de matière sèche dans l'herbe conduisaient à des taux de 10 pg TEQ/g de matières grasses dans le lait (Slob et coll., 1995), ce qui correspond aux observations effectuées sur le terrain, par exemple à Halluin.

La distribution des PCDD/PCDF dans l'organisme des bovins s'effectue essentiellement en fonction de leur liposolubilité ; ils se fixent donc surtout dans le tissu adipeux, où ils atteignent leur état d'équilibre en 40 à 60 jours d'ingestion (Fries et Paustenbach, 1990). Chez des bovins recevant une alimentation contaminée par 24 pg de 2,3,7,8-TCDD/g de matière sèche, des taux de 95 pg TEQ/g sont observés dans le tissu adipeux, alors que la 2,3,7,8-TCDD n'était pas détectable (< 2 pg TEQ/g) dans le muscle contenant pourtant 2 % de matières grasses (Roeder et coll., 1998).

La viande de bovin est en effet riche en lipides intra- et intermusculaire, la teneur en matières grasses allant de 2 % à 15 % voire 20 %, ce qui explique leurs apports relativement importants de dioxines dans l'alimentation humaine.

La fixation hépatique est importante également : chez des bovins nourris avec un aliment supplémenté au pentachlorophénol, les taux hépatiques en PCDD/PCDF à 6,7 et 8 chlores étaient supérieurs à ceux du muscle. En Grande-Bretagne, sur les bovins exposés à l'incinérateur industriel (très polluant) de Bolsover, les teneurs hépatiques atteignaient 500 à 1 000 pg TEQ/g (Harrison et coll., 1996).

L'élimination des PCDD/PCDF chez la vache laitière est beaucoup plus rapide que chez l'homme et la plupart des mammifères ; les demi-vies d'élimination globales sont comprises entre 30 et 60 jours (McLachlan, 1997). Le mécanisme essentiel d'élimination est l'excrétion dans le lait ; il existe probablement, en particulier pour les congénères faiblement chlorés, des biotransformations notamment par hydroxylation ; mais leur importance reste mal évaluée.

La notion de « *carry-over* » a été développée par McLachlan (1997) comme la quantité de contaminant excrétée dans le lait, divisée par la quantité ingérée par une vache exposée à l'état d'équilibre (c'est-à-dire que les quantités stockées dans les tissus demeurent constantes, l'élimination compensant les quantités absorbées) : il s'agit en fait d'un coefficient de biodisponibilité entre l'alimentation et le lait. Le tableau 5.I indique les valeurs des coefficients de biodisponibilité pour les divers congénères ; cette valeur est maximale pour la 2,3,7,8-TCDD (0,34) puis décroît pour la 1,2,3,7,8-PCDD (0,15) et le 2,3,4,7,8-PCDF (0,23) ; il est de l'ordre de 0,1 pour les congénères hexa- et < 0,1 pour les hepta- et octachlorés. À Halluin, les taux de contamination

des laits de vache calculés à partir de ceux des végétaux (herbe et maïs) étaient en accord avec les valeurs mesurées (tableau 5.I, d'après Bertrand, 1999).

Tableau 5.I : Valeurs des coefficients de biodisponibilité des différents congénères et valeurs calculées avec ces coefficients à Halluin, dans les laits de vaches, à partir des taux de PCDD/PCDF dans les végétaux

Congénères	Valeur calculée	Coefficient de biodisponibilité
2,3,7,8-TCDD	0,23	0,340
1,2,3,7,8-PCDD	3,20	0,158
1,2,3,4,7,8-HCDD	2,05	0,090
1,2,3,6,7,8-HCDD	4,24	0,130
1,2,3,7,8,9-HCDD	1,61	0,051
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	5,34	0,028
OCDD	3,00	0,010
2,3,7,8-TCDF	0,20	0,031
1,2,3,7,8-PCDF	0,52	0,024
2,3,4,7,8-PCDF	6,63	0,231
1,2,3,4,7,8-HCDF	6,75	0,160
1,2,3,6,7,8-HCDF	7,43	0,170
2,3,4,6,7,8-HCDF	8,14	0,139
1,2,3,7,8,9-HCDF	0,15	0,054
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	4,29	0,028
1,2,3,4,7,8,9HpCDF	0,69	0,032
OCDF	0,31	0,004
Totaux	54,79	

Chez les bovins à viande, les demi-vies sont nettement plus élevées, de l'ordre de plusieurs centaines de jours (McLachlan, 1997) ; toutefois, la croissance rapide de ces animaux opère une certaine « dilution » des dioxines stockées.

Ainsi, le lait peut servir d'indicateur de contamination, soit au niveau général, soit au niveau local, afin d'identifier ou d'effectuer le suivi d'une source de contamination.

Au niveau général, plusieurs enquêtes ont été effectuées en France, dans le cadre des plans de surveillance de la DGAL, depuis 1994. Les valeurs de référence dans le lait, établies par le Conseil supérieur d'hygiène publique de France (CSHPF) en 1998, en fonction des données toxicologiques et de consommation alimentaire, sont indiquées dans le tableau 5.II.

Elles ont conduit à identifier des départements et des secteurs plus contaminés que d'autres et à mettre en évidence des sources de pollution entraînant des dépassements des seuils, comme l'incinérateur de Lille à Halluin ; les teneurs de PCDD/PCDF dans le lait dépassaient la valeur-seuil de 5 pg TEQ/g de

Tableau 5.II : Recommandations pour les laits (Conseil supérieur d'hygiène publique de France, 1998)

Valeurs guides (pg TEQ/g de matières grasses laitières)	
1	valeur considérée comme « bruit de fond », objectif à atteindre
3	valeur maximale recommandée, si dépassement, rechercher les causes et les réduire
5	valeur maximale admise, si dépassement, le lait n'est pas commercialisable

matières grasses dans la plupart des fermes situées dans un rayon de 5 km autour de l'incinérateur, atteignant 20 à 25 pg TEQ/g dans les exploitations situées sous les vents dominants ; par ailleurs, une grande partie de ces laits était consommée localement, par vente directe à la ferme (Vindel et Duhem, 1999). Outre la fermeture de l'incinérateur, des mesures de dépollution telles que l'apport de fourrage non contaminé, le labourage retournant des pâtures ont permis un abaissement considérable des taux dans le lait en 8 mois, au-dessous du seuil de 5 pg TEQ/g de matières grasses.

A contrario, dans le Connecticut (États-Unis), un suivi de la contamination du lait de cinq fermes situées à 5-15 km sous le vent d'un incinérateur moderne installé un an auparavant n'a pas montré de différence significative entre les taux de PCDD/PCDF, avant et après la mise en service (Eitzer, 1995).

Sur le plan qualitatif, la distribution des divers congénères dans le lait est généralement très différente de celles retrouvées dans les fumées, dans l'herbe ou le sol qui sont assez proches ; il est donc difficile d'identifier une source de pollution par rapport à une autre sur ce critère. Toutefois, selon les résultats du plan de surveillance DGAL de 1997, à proximité de sources de pollution relativement bien identifiées, la contamination des laits à partir des usines sidérurgiques montre une certaine dominance des congénères octachlorés ; à proximité des incinérateurs d'ordures ménagères, on note la prédominance du 2,3,4,7,8-PeCDF, du 1,2,3,7,8-PeCDD et du 1,2,3,6,7,8-HxCDD.

Dans une situation de contamination industrielle importante comme dans le cas d'Halluin, la consommation de lait contaminé à des taux aussi élevés que 15 pg TEQ/g de matières grasses conduit à elle seule à des quantités ingérées importantes ; pour une personne consommant l'équivalent d'un litre de lait par jour (en lait et dérivés) contenant 4 % de matières grasses, la quantité de PCDD/PCDF ingérée est de 600 pg TEQ par jour, soit pour un poids corporel de 60 kg, une dose journalière de 10 pg TEQ/kg/j, ce qui correspond à 10 fois la dose journalière admissible (DJA).

A l'échelle nationale, le lait de consommation type UHT (stérilisé à très haute température) correspond à des grands mélanges au niveau des coopératives ; plusieurs campagnes d'analyses ont été réalisées en 1998, sous l'égide du CNIEL (Centre national de l'industrie laitière) sur 148 échantillons provenant des 33 principales usines françaises : la valeur moyenne était de 0,65 pg TEQ/g de matières grasses (CNIEL, 1998). Les teneurs retrouvées

dans les fromages et autres produits laitiers exprimées par rapport à la matières grasses sont du même ordre.

Une diminution progressive des taux observés en France depuis 1994 semble se dessiner, ce qui correspond à la tendance générale, notamment en Allemagne (Wesp et coll., 1996) et en Grande-Bretagne (Alcock et Jones, 1996).

Dans la viande bovine, les taux, exprimés par rapport aux matières grasses sont du même ordre que dans le lait, en général inférieurs à 1 pg TEQ/g de matières grasses ; six échantillons prélevés en 1998, par le Centre national indépendant d'étude des déchets (CNID), dans divers points de vente en France, indiquent des taux de 0,2 à 0,6 pg TEQ/g de matières grasses. Des analyses effectuées en Alsace par la DGAL en collaboration avec le *land* de Bade-Wurtemberg en 1998 confirment ces données, les valeurs étant un peu supérieures à 1 pg TEQ/g dans la viande des animaux les plus âgés (taureau de plus de 2 ans, vache laitière de 8 ans).

Une enquête américaine de 1996, sur 63 échantillons, va dans le même sens : les teneurs dans la viande de taureau (2,9 pg TEQ/g de matières grasses) s'avèrent nettement supérieures à celles des bœufs (0,3), des génisses (0,5), des vaches à viande (0,3) et des vaches laitières (0,02). Les congénères prédominants étaient de loin les heptaCDD (72 %) et heptaCDF (20 %) (Winters et coll., 1996).

Lors de pollution industrielle, les taux dans la viande peuvent augmenter fortement ; dans le Derbyshire, en 1991, en périphérie d'un incinérateur de déchets industriels, ils étaient de 70 à 300 pg TEQ/g de matières grasses dans la ferme la plus exposée ; dans le foie, ils atteignaient 700 à 1 300 pg TEQ/g de matières grasses, ce qui atteste d'une concentration particulière au niveau hépatique, surtout semble-t-il chez les animaux les plus jeunes, alors que chez les plus âgés, les taux musculaires étaient plus proches des taux hépatiques, dans un rapport de 1 à 5, et augmentaient nettement en fonction de l'âge (Harrison, communication personnelle).

Contribution des différents types d'aliments à l'exposition de la population générale

La plupart des études montrent que l'exposition humaine s'effectue à près de 95 % par les aliments d'origine animale. Récemment, un groupe d'études AFSSA a calculé la contribution des différents aliments à l'exposition aux dioxines en France, à partir de divers aliments, pour différentes tranches d'âge ; elle est indiquée dans la figure 5.3 (AFSSA, 2000).

Les produits d'origine bovine constituent des apports prépondérants : lait et dérivés environ 40 % des apports totaux, viande 10 % à 20 %, en raison, d'une part de leur teneur relativement élevée en matières grasses (lait : 4 %, produits laitiers 10 % à 50 % ; viande 3 % à 20 %), d'autre part de leur exposition aux sources de contamination en relation avec le mode d'élevage extérieur des bovins.

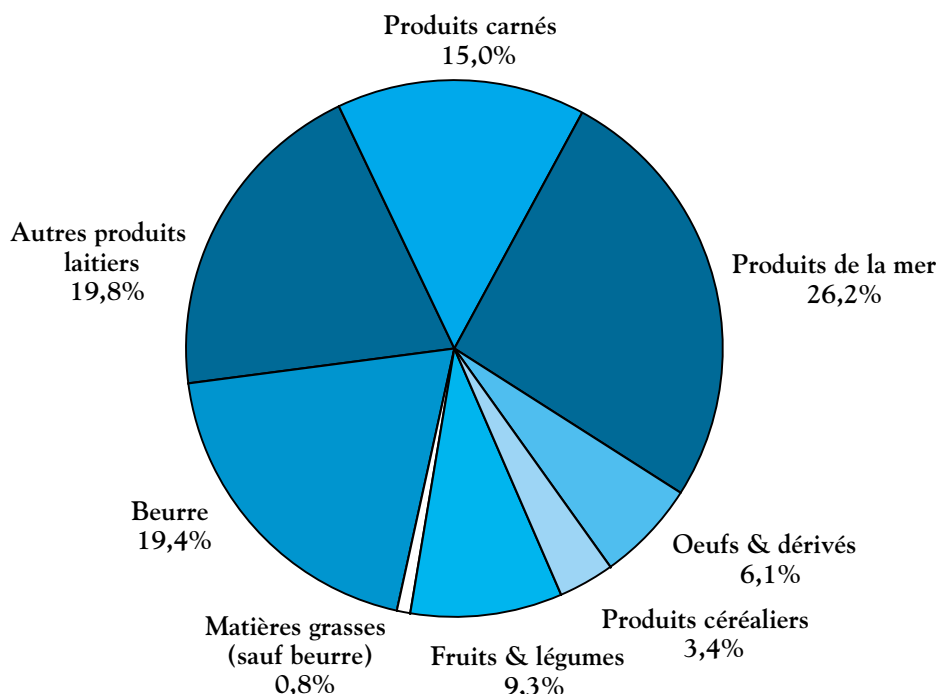


Figure 5.3 : Contribution des différents aliments à l'exposition aux dioxines (d'après l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments, 2000)

La viande de porc et de volaille représente des apports plus faibles, de l'ordre de 2 % à 3 % chacun, en raison notamment de leur mode d'élevage en bâtiment, ce qui les protège dans une large mesure des contaminations environnementales. Des pollutions accidentelles ou frauduleuses des aliments distribués peuvent toutefois entraîner des contaminations de la viande ou des œufs, comme l'a montré l'épisode de contamination des poulets belges en 1998 : la contamination par les PCDD/PCDF était due à une introduction d'huile industrielle de transformateurs, riche en PCB, dans la graisse animale incorporée dans les aliments granulés distribués aux poulets. Les dioxines, surtout les PCDF, étaient présents en tant qu'impuretés et produits de dégradation des PCB, à des taux beaucoup plus faibles. À cette occasion, un groupe d'experts de l'AFSSA avait fixé un taux maximal admissible dans les aliments d'origine animale de 0,2 µg TEQ/g de matières grasses pour les PCB ; pour les PCDD/PCDF, les taux fixés étaient de 5 pg TEQ/g de matières grasses dans les viandes et produits dérivés et de 20 pg TEQ/g de matières grasses dans les œufs et ovoproduits, les abats et les poissons. Ces valeurs ne correspondent toutefois pas à des seuils définitifs, ceux-ci étant en cours d'élaboration.

Les produits de la mer constituent des apports majeurs en PCDD/PCDF (20 % à 30 %) mais dont l'importance est très variable selon les espèces aquicoles

considérées, et leur origine géographique, en fonction de la contamination du milieu de pêche ou d'élevage (voir plus haut). Dans les pays nordiques, les proportions estimées d'apport sont plus élevées : 42 % en Suède, 63 % en Finlande (Hallikainen et Vartiainen, 1997).

Les œufs et dérivés représentent environ 6 %. La part des produits végétaux est plus importante dans l'estimation française que dans la majorité des autres études : environ 10 % pour les fruits, légumes et graisses végétales ; 3,4 % pour les produits céréaliers.

En France, en 1999, les apports alimentaires totaux quotidiens moyens ont été estimés à 67 pg TEQ/j, soit une exposition moyenne de 1,3 pg TEQ/kg poids corporel par jour chez l'adulte. L'exposition du 95^e centile de la population a été évaluée à 2,5 pg TEQ/kg de poids corporel/jour. Les enfants de 2 à 9 ans ont une exposition plus élevée, du fait notamment d'une consommation plus importante de produits laitiers, estimée en moyenne à 2,3 pg TEQ/kg de poids corporel/jour, avec une exposition du 95^e centile à 3,9 pg TEQ/kg de poids corporel/jour.

Ces estimations, pour une personne adulte, sont assez proches de celles effectuées dans d'autres pays (Hallikainen et Vartiainen, 1997).

Depuis 1990, ces valeurs ont significativement diminué, d'environ un facteur 2. En 1998, une étude allemande très large portant sur 1 414 échantillons d'aliments conclut à une quantité moyenne ingérée de 0,88 pg TEQ/kg de poids corporel/jour, contre une valeur de 1,8 pg TEQ/kg de poids corporel/jour entre 1986 et 1991 (Malisch, 1998).

L'influence de la cuisson sur les taux de PCDD/PCDF des aliments a été étudiée ; ceux-ci ont augmenté de 14 % dans les steacks hachés, de 29 % dans le bacon mais ont diminué dans diverses espèces de poissons (Zabik, 1995 ; Schecter et coll., 1998).

Modèles de transfert dans les chaînes alimentaires

Divers auteurs ont tenté de modéliser les transferts des dioxines, notamment dans la chaîne air-plante-bovin (lait notamment) (Lorber et coll., 1994 ; McLachlan, 1997).

Ils se basent sur les paramètres physiques des PCDD/PCDF, Kow, pression de vapeur, ratio V/P (c'est-à-dire la répartition des PCDD/PCDF entre la phase vapeur et la phase particulaire), coefficients de biodisponibilité...

La comparaison des valeurs estimées par ces modèles avec les valeurs mesurées fait apparaître des divergences importantes : par exemple, dans le lait, les PCDD/PCDF les plus chlorés sont généralement sous-estimés.

Des modèles d'exposition alimentaire comme Caltox, développé par l'US EPA pour l'évaluation des risques sanitaires liés aux sols contaminés ont été appliqués par un groupe de travail sous l'égide de la Société française de santé

publique pour estimer l'exposition des populations aux retombées d'un incinérateur dont les valeurs de PCDD/PCDF à l'émission sont connues ; les taux de contamination des sols et des aliments peuvent être estimés à partir d'un logiciel de dispersion atmosphérique comme Polair qui calcule les dépôts surfaciques à partir des valeurs d'émission et des données météorologiques et topographiques (SFSP, 1999).

Dans un scénario pessimiste portant sur un incinérateur polluant (valeur à l'émission : $38,5 \text{ ng/m}^3$), la quantité de dioxines théoriquement ingérées à partir d'aliments végétaux et animaux, produits en périphérie, s'élèverait à environ 25 pg TEQ/kg/j . L'exposition par inhalation représenterait $0,02$ à $0,2 \text{ pg TEQ/kg}$ de poids corporel/j.

Dans un scénario moyen, à l'échelle du territoire français, en prenant en compte les valeurs d'émission des 70 incinérateurs les plus importants, l'exposition de la population générale par ingestion a été estimée selon ces modèles à environ $0,27 \text{ pg/kg}$ de poids corporel/j. Notons toutefois que le modèle Caltox correspond imparfaitement à la situation française : 66 % des quantités de dioxines ingérées sont attribuées à la viande et 5 % seulement au lait et produits laitiers ; par ailleurs, ce modèle est très maximisant, les transferts d'un niveau à l'autre de la chaîne étant considérés comme très élevés, ce qui ne correspond pas à la réalité, comme on l'a vu plus haut.

En conclusion, pour des polluants liposolubles stables et peu biodégradés comme les PCDD et PCDF, les concentrations dans les divers niveaux trophiques augmentent de façon inversement proportionnelle à la diminution des biomasses. Dans les systèmes aquatiques, les espèces (poissons, mollusques, crustacés...) accumulent plus de dioxines que les animaux terrestres (vache, cochon, poulet...) et des concentrations de plusieurs centaines de pg TEQ/g de matières grasses ont pu être détectées dans des poissons. Chez les animaux terrestres, les données concernent surtout le lait de vache. Les bovins en pâture sont exposés surtout par l'ingestion d'herbe ou de foin contaminé.

La distribution dans l'organisme s'effectue essentiellement en fonction de la teneur en lipides des tissus. La mobilisation des graisses lors de la lactation explique les taux élevés de dioxines retrouvés dans le lait et dérivés.

Il est possible d'établir, d'après les données expérimentales et de terrain, des coefficients de transfert entre les différents compartiments (air, sol, herbe, graisse, lait). La détermination de ces coefficients permet de proposer des modèles pour prévoir l'incidence de niveaux donnés d'émission de PCDD et PCDF par une source industrielle. On peut également prévoir la cinétique de décontamination de vaches laitières après suppression d'une source de contamination, la diminution des teneurs dans le lait étant relativement rapide (quelques mois) du fait de la cinétique rapide chez la vache en lactation.

Les concentrations en PCDD et PCDF dans les matières grasses humaines sont dix fois plus élevées que dans les matières grasses des bovins. Cette charge

corporelle chez l'homme explique la concentration de 10 à 30 pg TEQ/g observée dans le lait maternel.

BIBLIOGRAPHIE

ADDISON RF, WILSON JY. Effects of chlorinated dioxins, furans and related environmental contaminants on fish in British Columbia, Canada. *International journal of environmentally conscious design & manufacturing* 1998, **7** :1-7

AGENCE FRANÇAISE DE SÉCURITÉ SANITAIRE DES ALIMENTS (AFSSA). Dioxine : données de contamination et d'exposition de la population française. Rapport rédigé dans le cadre du groupe de travail : « Contaminants et phytosanitaires » du Conseil supérieur d'hygiène publique de France, section « Alimentation et Nutrition ». Juin 2000

ALCOCK R E, JONES K C. Dioxins in the Environment : a review of trend data. *Environ Sci Technol* 1996, **30** : 3133-3144

BECK H, BREUER EM DROSS A, MATHAR W. Residue of PCDDs, PCBs and other organochlorine compounds in harbour seals and harbour porpoise. *Chemosphere* 1990, **20** : 1027-1034

BERENDS AG, BOELHOUWERS EJ, THUS JL, DE GERLACHE J, DE ROOIJ CG. Bioaccumulation and lack of toxicity of octachlorodibenzofuran (OCDF) and octachlorodibenzo-*p*-dioxin (OCDD) to early-life stages of zebra fish (*Brachydanio rerio*). *Chemosphere* 1997, **35** : 853-865

BERTRAND M. Dioxines : diagnostic d'une situation et protocoles de restauration sur les exploitations d'élevages contaminés. CR journées techniques ADEME « Dioxines : toute la vérité sur une grande peur » Angers, 8-9 juin 1999

BONN BA. Polychlorinated dibenzo-*p*-dioxin and dibenzofuran concentration. *Environ Sci Technol* 1915, **32** : 729-736

BORDET G. Contamination de la loutre par les résidus organochlorés dans l'est de la France. *Bulletin BIPAS* 1999, **20** : 96-102

BROMAN D, NÄF C, ROLFF C, ZEBUHR Y, FRY B, HOBBIIE J. Using ratios of stable nitrogen isotopes to estimate bioaccumulation and flux of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins (PCDDs) and dibenzofurans (PCDFs) in two food chains from the northern Baltic. *Environ Toxicol Chem* 1992, **11** : 331-345

BUCKLAND SJ, HANNAH DJ, TAUCHER JA, SLOOTEN E, DAWSON S. Polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans in New Zealand's Hector's dolphin. *Chemosphere* 1990, **20** : 1035-1042

CHAMPOUX L. PCBs, Dioxins and furans in hooded merganser (*Lophodytes cucullatus*), common merganser (*Mergus merganser*) and mink (*Mustela vison*) collected along the St. Maurice river near La Tuque, Quebec. *Environ Pollut* 1996, **92** : 147-154

DE WIT C, JANSSON B, BERJEK S, HJELT M, RAPPE C et coll. Polychlorinated dibenzo-*p*-dioxin and polychlorinated dibenzofuran levels and patterns in fish and fish-eating wildlife in the Baltic Sea. *Chemosphere* 1992, **25** : 185-188

EITZER BD. Polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans in raw milk samples from farms located near a new resource recovery incinerator. *Chemosphere* 1995, **30** : 1237-1248

ELLIOTT JE, MACHMER MM, HENNY CJ, WILSON LK, NORSTROM RJ. Contaminants in ospreys from the Pacific Northwest : I. Trends and patterns in polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and -dibenzofurans in eggs and plasma. *Arch Environ Contam Toxicol* 1998, **35** : 620-631

ELLIOTT JE, BUTLER RW, NORSTROM RJ, WHITEHEAD PE. Environmental contaminants and reproductive success of great blue herons *Ardea herodias* in British Columbia, 1986-87. *Environ Pollu* 1989, **59** : 91-114

FRIES GF, PAUSTENBACH DJ. Evaluation of potential transmission of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-contaminated incinerator Emissions to humans via foods. *J Toxicol Environ Health* 1990, **29** :1-43

FROMMBERGER R. Polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and polychlorinated dibenzofurans in fish from south west Germany : River Rhine and Neckar. *Chemosphere* 1991, **22** : 29-38

FURST P, FURST C, GROEBEL W. Levels of PCDDs and PCDFs in food stuffs from the Federal Republic of Germany. *Chemosphere* 1990, **20** : 787-792

HALLIKAINEN A, VARTIAINEN T. Food control surveys of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans and intake estimates. *Food Addit Contam* 1997, **14** : 355-366

HARRISON N, GEM MG, STARTIN JR, WRIGHT C, KELLY M, ROSE M. PCDDs and PCDFs in milk from farms in Derbyshire, U.K. *Chemosphere* 1996, **32** : 453-460

HASHIMOTO S, HYEON-SEO C, MORITA M. Polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and polychlorinated dibenzofurans in shellfishes from south coast of Korea. *Chemosphere* 1998, **37** :951-959

HAYNES D, MOSSE P, OSWALD L. The use of transplanted cultured mussels (*mytilus edulis*) to monitor pollutants along the ninety mile beach, Victoria, Australia-II. Polychlorinated dibenzo-*p*-dioxin and dibenzofurans. *Mar Pollut Bull* 1995, **30** : 834-839

JONES KC, SEWART AP. Dioxins and furans in sewage sludges : A review of their occurrence. *Crit Rev Environ Sci Technol* 1997, **27** : 1-85

LAW FCP, GUDAITIS JA. A preliminary assessment of human health risks due to consumption of fish contaminated by dioxins and furans in the Fraser and Thompson rivers. *Chemosphere* 1994, **28** : 1079-1086

LE POINT VÉTÉRINAIRE. Toxicologie des ruminants. 1998, vol. 29

LOGANATHAN BG, KANNAN K, WATANABE I, KAWANO M IRVINE K et coll. Isomer-specific determination and toxic evaluation of polychlorinated/brominated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans, polybrominated biphenyl ethers and extractable organic halogen in carp from the Buffalo River, New York. *Environ Sci Technol* 1995, **29** : 1832-1840

LOONEN H, VAN GC, PARSONS JR, DE VP, GOVERS HAJ. Ecological hazard assessment of dioxins : hazards to organisms at different levels of aquatic food webs -Fish-eating birds and mammals, fish and invertebrates. *Sci Total Environ* 1995, **182** : 93-103

- LORBER M, CLEVERLY D, SCHAUM J, PHILLIPS L, SCHWEER G, LEIGHTON T. Development and validation of an air-to-beef food chain model for dioxin-like compounds. *Sci Total Environ* 1994, **156** : 39-65
- LOWER WR, YANDERS AF, ORAZIO CE, PURI RK, HANCOCK J, KAPILA S. A survey of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin residues in selected animal species from Times Beach, Missouri. *Chemosphere* 1989, **18** : 1079-1088
- MACDONALD CR, NORSTROM RJ, TURLE R. Application of pattern recognition techniques to assessment of biomagnification and sources of polychlorinated multicomponent pollutants, such as PCBs, PCDDs and PCDFs. *Chemosphere* 1992, **25** : 129-134
- MALISCH R. Update of PCDD/PCDF-intake from food in Germany. *Chemosphere* 1998, **37** : 1687-1698
- MCLACHLAN MS. A simple model to predict accumulation of PCDD/Fs in an agricultural food chain. *Chemosphere* 1997, **34** : 1263-1276
- NIIMI AJ. PCBs, PCDDs and PCDFs. In : *Handbook of Ecotoxicology*, Ed. CALOW, P. Blackwell Scientific, Oxford, 1994
- OEHME M, SCHLABACH M, HUMMERT K, LUCKAS B, NORDOY ES. Determination of levels of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins, dibenzofurans, biphenyls and pesticides in harp seals from the Greenland Sea. *Sci Total Environ* 1995, **162** : 75-91
- ONO M, KASHIMA Y, WAKIMOTO T, TATSUKAMA R. Daily intake of PCDDs and PCDFs by Japanese through food. *Chemosphere* 1987, **16** : 1823-1828
- RAPPE C, ANDERSSON R, BERGVIST PA, BROHEDE C, HANSON M et coll. Overview of environmental fate of chlorinated dioxins and dibenzofurans. Sources, levels and isometric patterns in various matrices. *Chemosphere* 1987, **16** : 1603-1618
- ROEDER RA, GARBER MJ, SCHELLING GT. Assessment of dioxins in foods from animal origins. *J Anim Sci* 1998, **76** : 142-151
- RYAN JJ, DEWAILLY E, GILMAN A, LALIBERTE C, AYOTTE P, RODRIGUE J. Dioxin-like compounds in fishing people from the Lower North Shore of the St. Lawrence River, Quebec, Canada. *Arch Environ Health* 1997, **52** : 309-316
- SCHecter A, DELLARCO M, PÄPKE O, OLSON J. A comparison of dioxins, dibenzofurans and coplanar PCBs in uncooked and broiled ground beef, catfish and bacon. *Chemosphere* 1998, **37** : 1723-1730
- SFSP. *L'incinération des déchets et la santé publique : bilan des connaissances récentes et évaluation du risque*. Collection Santé et Société, n°7, 1999
- SLOB W, OLLING M, DERKS HJ, DE JONG AP. Congener-specific bioavailability of PCDD/Fs and coplanar PCBs in cows : laboratory and field measurements. *Chemosphere* 1995, **31** : 3827-3838
- STARTIN JR, ROSE M, WRIGHT C, PARKER I, GILBERT J. Surveillance of british foods for PCDDs and PCDFs. *Chemosphere* 1990, **20** : 793-798
- STEPHENS RD, PETREAS MX, HAYWARD DG. Biotransfer and bioaccumulation of dioxins and furans from soil : chickens as a model for foraging animals. *Sci Total Environ* 1995, **175** : 253-273

VINDEL E, DUHEM K. Dioxines : pollution du lait et des produits laitiers : causes et conséquences. CR journées techniques ADEME « *Dioxines : toute la vérité sur une grande peur* » Angers, 8-9 juin 1999

VUORINEN PJ, PAASIVIRTA J, KEINANEN M, KOISTINEN J, RANTIO T et coll. The M74 syndrome of Baltic salmon (salmon salar) and organochlorine concentrations in the muscle of female salmon. *Chemosphere* 1997, **34** : 1151-1166

WESP HF, RIPPEN G, FIEDLER H, LAU C, HUTZINGER O et coll. Dioxin mass balance for the city of Hamburg, Germany. Part 3 : Update of food consumption data and human exposure. *Organohalogen Compounds* 1996, **30** : 37-42

WILSON PJ, TILLITT DE. Rainbow trout embryotoxicity of a complex contaminant mixture extracted from Lake Michigan lake trout. *Mar Environ Res* 1996, **42** : 129-134

WINTERS D, CLEVERLY D, MEIER K, DUPUY A, BYRNE C et coll. A statistical survey of dioxin-like compounds in United States beef : a progress report. *Chemosphere* 1996, **32** : 469-478

ZABIK ME, ZABIK MJ. Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin Residue reduction by cooking/processing of fish fillets harvested from the Great Lakes. *Bull Environ Contam Toxicol* 1995, **55** : 264-270

ZACHAREWSKI T, SAFE L, SAFE S, CHITTIM B, DE VAULT D et coll. Comparative analysis of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxin and dibenzofurans congeners in Great Lakes fish extracts by gas chromatography-mass spectrometry and *in vitro* enzyme induction activities. *Environ Sci Technol* 1989, **23** : 730-735

II

Effets toxiques chez l'animal

6

Toxicité aiguë

La toxicité des PCDD et PCDF a été démontrée expérimentalement sur de nombreuses espèces animales, mais la plupart des études ont été réalisées avec la 2,3,7,8-TCDD. Les doses létales n'entraînent pas une mort immédiate après le traitement ; elle survient quelques jours ou quelques semaines plus tard.

Les résultats des nombreuses études de toxicité aiguë, subchronique et chronique, obtenus avec la 2,3,7,8-TCDD ou un mélange de congénères dépendent de l'espèce, de la souche et du critère retenus. Des différences importantes ont été observées entre congénères. Cependant, ceux-ci peuvent induire des effets identiques comme par exemple une perte de poids, une perte d'appétit, une atrophie du thymus et une hémorragie gastro-intestinale. Les organes les plus fréquemment atteints sont le foie, la peau et le système endocrinien.

Doses létales

L'administration d'une dose unique ou un traitement pendant une courte période provoque des réponses comparables. Les doses létales 50 (DL50) ont été estimées chez plusieurs espèces animales (tableau 6.I).

Les valeurs obtenues montrent qu'elles varient fortement non seulement en fonction de l'espèce et de la souche mais aussi du sexe, de l'âge et de la voie d'administration. Ainsi les DL50 exprimées en $\mu\text{g/kg}$ varient d'un facteur pouvant atteindre 8 000 chez le cobaye, l'espèce la plus sensible (Schwetz et coll., 1973) et le hamster syrien (Henck et coll., 1981) en administration orale et d'un facteur 300 entre le rat souche Long Evans et le rat de souche Han Wistar (Pohjanvirta et Tuomisto, 1987) en administration intrapéritonéale. Des souches de souris C57B/6J ne différant qu'au niveau du locus Ah montrent une différence d'un facteur 20, la souche sauvage étant la plus sensible (Birnbbaum et coll., 1990). Mais le récepteur ne semble pas en cause, tout au moins dans tous les cas. En effet de telles variations voire plus (300 fois) ont été rapportées pour des souches de rat sans que des différences quantitatives ou d'affinité du récepteur Ah aient été observées (Pohjanvirta et coll., 1988). Les différences liées au sexe sont en revanche moins claires, voire contradictoires. Celles liées à l'âge sont limitées et difficiles à interpréter car le poids et/ou l'âge des animaux ne sont pas toujours suffisamment précis dans les études réalisées.

Tableau 6.I : Doses létales 50 (DL50) après administration orale de 2,3,7,8-TCDD dans différentes espèces (d'après IARC, 1997)

Espèce/souche (sexe)	DL 50 (µg/kg)
Cobaye Hartley (M)	0,6-2,0
Poulet NR	< 25
Singe rhésus (F)	70
Rat Sherman, Spartan (M)	22
(F)	13-43
Rat Sprague-Dawley (M)	43
Rat Fischer Harlan (M)	340
Souris C57BL/6 (M)	181
Souris DBA2/2J (M)	2 570
Souris B6D2F1 (M)	296
Lapin/New Zealand	115
Hamster syrien (M et F)	1 157-5 051

M : mâle, F : femelle

La résistance à la toxicité aiguë de la 2,3,7,8-TCDD a été associée au contenu en lipides (Geyer et coll., 1990).

Toxicité aiguë et subchronique dans différentes espèces

À doses élevées la 2,3,7,8-TCDD provoque une réduction de poids, et du tissu adipeux (Peterson et coll., 1984) et musculaire (Max et Silbergeld, 1987). Le foie est la première cible chez les rongeurs et les lapins mais, chez le cobaye, l'atrophie du thymus et des tissus lymphatiques semble être des marqueurs plus sensibles (tableau 6.II).

Peau

La chloracné est le premier signe d'intoxication chez l'homme et reste souvent le seul. Elle apparaît après 2 à 4 jours après une forte exposition, 2 à 4 semaines pour une exposition plus faible (Seveso) voire seulement après 2 à 3 mois. Les autres signes incluent l'apparition de comédons puis de kystes, une hyperkératinisation, l'involution de glandes sébacées, une porphyrie cutanée tardive résultant d'une perturbation du métabolisme hépatique des porphyrines. Ces différentes lésions sont reproduites chez le singe mais pas chez les rongeurs.

Foie

L'altération des fonctions hépatiques semble être la cause de la mort chez la plupart des rongeurs. Chez le rat la 2,3,7,8-TCDD induit une nécrose hépatique associée à une sclérose portale avec apparition d'hépatocytes géants

Tableau 6.II : Réponses toxiques aiguës après exposition à la 2,3,7,8-TCDD dans différentes espèces (d'après IARC, 1997)

Réponse	Espèce				
	Singe rhésus	Cochon d'Inde	Rat	Souris	Hamster syrien
Hyperplasie ou métaplasie					
Muqueuse gastrique	++	0	0	0	0
Muqueuse intestinale	+				++
Tractus urinaire	++	++	0	0	
Canal biliaire et/ou vésicule biliaire	++	0		++	0
Poumon : foyer alvéolaire			++		
Peau	++	0	0	0	0
Hypoplasie, atrophie, ou nécrose					
Thymus	+	+	+	+	+
Moelle osseuse	+	+		±	
Testicule	+	+	+	+	+
Autres lésions					
Lésions hépatiques	+	±	+	++	±
Porphyrie	0	0	+	++	0
Cedème	+	0	0	+	+
Hémorragie	+	+	+	+	+

0 : aucune lésion observée ; + : lésion observée ; ++ : lésion sévère observée ; ± : lésion observée de façon plus ou moins importante

multinucléés ; elle provoque également l'apparition d'une stéatose, et d'une réaction inflammatoire. Ces différentes lésions structurales sont associées à la libération d'enzymes cytosoliques, un déficit en vitamine A, une hyperlipidémie, une porphyrie, une diminution de l'albumine sérique et une augmentation des triglycérides sériques (Hudson et coll., 1985).

Toxicité cellulaire

Au niveau cellulaire des altérations de l'activité de prolifération et de l'état de différenciation des cellules épithéliales sont observées (par exemple des kératinocytes). L'augmentation de la prolifération des cellules épithéliales est en accord avec l'hyperplasie de différents types de cellules épithéliales observée *in vivo*. Cependant, des résultats contradictoires sur hépatocytes de rat ont été rapportés en présence de facteurs de croissance. Le cytochrome 1A est induit dans ces cellules par l'intermédiaire du récepteur Ah. Aucune étude n'a été réalisée sur hépatocytes humains.

Autres effets

Les autres altérations observées après l'administration de 2,3,7,8-TCDD sont : des hémorragies dans divers organes, une atrophie testiculaire, une réduction

du poids de la prostate et de l'utérus, une augmentation du poids de la thyroïde, une inhibition de l'hématopoïèse dans la moelle osseuse.

Selon les espèces des signes de toxicité provoqués par la 2,3,7,8-TCDD sont également constatés au niveau des muqueuses gastrique et intestinale et du système nerveux (neuropathie impliquant les nerfs périphériques, troubles de la cognition et de la connaissance) et du cœur. L'endométriase observée chez l'homme l'est également chez le singe.

Mécanismes de toxicité

Le récepteur Ah joue certainement un rôle fondamental comme cela a été montré chez la souris. Les effets de la 2,3,7,8-TCDD semblent passer par l'activation du récepteur Ah qui initie une cascade d'événements impliquant différentes voies de signalisation (protéines kinases, phosphatases). Cependant, il existe des souches de rats sensibles et résistantes à la 2,3,7,8-TCDD qui ont des récepteurs d'affinités comparables ; de même dans des souches de rats, de hamsters et de cobayes pour un récepteur Ah d'affinité comparable, la DL50 varie d'un facteur 5 000. Ces observations suggèrent que d'autres événements importants sont impliqués.

En conclusion, certaines lésions en particulier au niveau cutané et hépatique sont bien démontrées et l'implication du récepteur Ah est indiscutable. Cependant, les différences interspèces dans la réponse aux PCDD et PCDF sont mal connues. Le traitement de cellules humaines différenciées (kératinocytes, hépatocytes...) et l'analyse du transcriptome et/ou du protéome pourraient apporter des informations fort utiles.

BIBLIOGRAPHIE

BIRNBAUM LS, MCDONALD MM, BLAIR PC, CLARK AM, HARRIS MW. Differential toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) in C57BL/6J mice congenic at the Ah locus. *Fund Appl Toxicol* 1990, **15** : 186-200

GEYER HH, SCHEUNTERT I, RAPP K et coll. Correlation between acute toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) and total body fat content in mammals. *Toxicology* 1990, **65** : 97-107

HENCK JM, NEW MA, KOCIBA RJ, RAO KS. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin : acute oral toxicity in hamsters. *Toxicol Appl Pharmacol* 1981, **59** : 405-407

HUDSON LG, TOSCANO WA, GREENLES WF. 1985. Regulation of epidermal growth factor binding in a human keratinocyte cell line by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Toxicol Appl Pharmacol* 1985, **77** : 251-259

IARC. Polychlorinated dibenzo-*para*-dioxins and polychlorinated dibenzofurans. *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans* 1997, **69** : 665 p

MAX SR, SILBERGELD EK. Skeletal muscle glucocorticoid receptor and glutamine synthetase activity in the wasting syndrome in rats treated with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Toxicol Appl Pharmacol* 1987, **87** : 523-527

PETERSON RE, SEEFELD M.D, CHRISTIAN BJ, POTTER CL, KELLING K, KEESEY R. The wasting syndrome in 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin toxicity : basic features and their interpretation. In : *Banbury Report : Biological Mechanisms of Dioxin Action*, Vol. 18, A Poland and R Kimbrough, Ed. Cold Spring Harbor Laboratory 1984, pp 291-308

POHANVIRTA R, JUVONEN R, KÄRENLAMPI S, RAUNIO H, TUOMISTO J. Hepatic Ah-receptor levels and the effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) on hepatic microsomal monooxygenase activity in a TCDD-susceptible and-resistant rat strain. *Toxicol Appl Pharmacol* 1988, **92** : 131-140

POHJANVIRTA R, TUOMISTO J. Han/Wistar rats are exceptionally resistant to TCDD. *Arch Toxicol* 1987, **11** : 344-347

SCHWETZ BA, NORRIS JM, SPARSCHU GL et coll. 1973. Toxicology of chlorinated dibenzo-*p*-dioxins. *Environ Health Perspect* 1973, **5** : 87-99

WHO/IPC (World health organization/International Programme on Chemical Safety). Polychlorinated dibenzo-*p*-dioxine and dibenzofurans. *Environmental Health Criteria* 1989, **88**

7

Immunotoxicité

Le système immunitaire figure parmi les cibles régulièrement citées de l'effet toxique des dioxines. L'immunotoxicité des dioxines a fait l'objet de nombreux travaux au cours de ces deux dernières décennies (Kerkvliet, 1995). Il convient cependant de rappeler que la quasi-totalité des données expérimentales disponibles concerne la seule 2,3,7,8-TCDD, alors que les données humaines associent le plus souvent polychlorobiphényles (PCB) et dioxines. Par ailleurs, l'évaluation actuelle de l'immunotoxicité de la dioxine est le reflet malheureusement fidèle des limites auxquelles est confronté tout évaluateur du risque immunotoxique aujourd'hui.

Préliminaires à toute évaluation du risque immunotoxicologique

L'immunotoxicité d'un xénobiotique doit se décliner selon trois aspects : l'immunotoxicité « directe » (regroupant immunodépression et immunostimulation), l'auto-immunité et l'allergie. Chacun de ces aspects correspond à des conséquences cliniques, des méthodes d'exploration et des mécanismes relativement distincts, sans pour autant exclure certains éléments communs (Descotes, 1999).

Une abrogation de la capacité fonctionnelle du système immunitaire (immunosuppression) peut être à l'origine d'infections plus fréquentes, plus graves et souvent atypiques, ainsi que de certains cancers (lymphomes non hodgkiniens en particulier). Ces conséquences cliniques sont bien avérées grâce à l'expérience acquise avec les médicaments immunosuppresseurs. Elles le sont beaucoup moins lorsque la réduction de la capacité fonctionnelle du système immunitaire n'est que partielle (immunodépression). Une augmentation de la capacité fonctionnelle du système immunitaire (immunostimulation ou immunoactivation) est à l'origine de réactions hyperthermiques (réactions pseudo-grippales ou syndrome aigu des cytokines), de maladies auto-immunes plus fréquentes, de réactions allergiques dirigées contre des allergènes non apparentés, également plus fréquentes, et d'une possible inhibition de certaines voies de biotransformation cytochrome P450 dépendantes. Par ailleurs, un xénobiotique peut déclencher des réactions immuno-allergiques et des réactions auto-immunes de manière directe.

A la différence d'autres domaines de la toxicologie, l'immunotoxicologie se caractérise par une connaissance relativement approfondie des phénomènes chez l'animal et par une profonde méconnaissance de ces mêmes phénomènes chez l'homme. Cette situation pose un certain nombre de problèmes. Les modèles expérimentaux utilisés, s'ils sont de mieux en mieux standardisés, n'ont pas été complètement validés en termes d'extrapolation de l'animal à l'homme. On ignore donc souvent dans quelle mesure les résultats expérimentaux sont applicables à l'homme, essentiellement d'ailleurs en raison de l'absence de données humaines : peut-on parler d'immunotoxicité devant une atrophie thymique isolée ou une réduction limitée de la production d'anticorps, ou doit-on limiter ce terme à la mise en évidence de conséquences cliniques avérées, telles qu'infections ou lymphomes ?

La démarche d'évaluation du risque immunotoxicologique reste à inventer, non pas d'un point de vue théorique (il n'y a pas de raison *a priori* qu'elle diffère de la démarche applicable à tout risque toxique), mais d'un point de vue opérationnel : manque de données humaines validées, inconnues quant à la relation dose-réponse, importance de la réserve fonctionnelle du système immunitaire...

Immunotoxicité chez l'animal

On peut différencier plusieurs types d'effets immunotoxiques, observés à des degrés divers chez l'animal de laboratoire. La majorité de ces données ont été obtenues chez la souris et le rat, et dans une moindre mesure chez le singe, pratiquement toujours à partir de la seule 2,3,7,8-TCDD (tableau 7.1). Il

Tableau 7.1 : Effets immunotoxiques de la 2,3,7,8-TCDD : DME0 (dose minimale entraînant un effet observé) (d'après IARC, 1997)

Références	Espèce	Protocole	DME0	Effet
Hong et coll., 1989	Singe rhésus	25 ng/kg 4 ans, vo	0,642 ng/kg/j	↘ Lymphocytes
Neubert et coll., 1992	Singe ouistiti	0,3 ng/kg/sem 24 semaines	0,135 ng/kg/j	↘ Lymphocytes
Clark et coll., 1983	Souris C57BL/6	1 ng/kg/sem 4 sem, vi	1 ng/kg/sem	Immunosuppression Faible régénération des lymphocytes T cytotoxiques
Lebrec et Burlison, 1994	Souris B6C3F1	10 ng/kg 7 j après la fécondation	10 ng/kg à j 7	Augmentation de l'infection virale
Vos et coll., 1973	Cochon d'Inde	8-200 ng/kg/sem 8 sem	8 ng/kg/sem 200 ng/kg/sem	Immunosuppression Faible réponse à la toxine tétanique

existe quelques données confirmatives chez certaines espèces (Spitsbergen et coll., 1986 ; De Swart et coll., 1995).

Modifications histologiques des organes lymphoïdes

L'involution thymique est l'une des caractéristiques de l'exposition à la 2,3,7,8-TCDD. Elle apparaît à très faible dose et est constamment retrouvée chez le rongeur. À titre d'exemple, on peut citer : 1 µg/kg par voie intrapéritonéale, une fois par semaine pendant 4 semaines chez la souris C57Bl/6 (Hanson et Smialowicz, 1994) ; 25 µg/kg en dose orale unique chez le rat Wistar (De Heer et coll., 1994a) ; 0,3 µg/kg en dose intrapéritonéale unique chez le rat Fischer 344 (Rice et coll., 1995) ; 0,04 µg/kg par voie orale, en huit administrations chez le cobaye (Vos et coll., 1973).

Le mécanisme de l'involution thymique induite par la 2,3,7,8-TCDD n'est pas clairement élucidé (Vos et coll., 1998). Il ne s'agit pas d'un mécanisme indirect mettant en cause l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien. L'effet de la 2,3,7,8-TCDD est différent de celui de la dexaméthasone (Lundberg, 1991). Il ne s'agit pas non plus d'un mécanisme de type « perturbateur endocrinien » (Frazier et coll., 1994 ; Silverstone et coll., 1994). Il semble que l'involution soit due à un effet direct de la 2,3,7,8-TCDD sur les cellules de l'épithélium thymique (Greenlee et coll., 1985), effet impliquant le récepteur Ah (*arylhydrocarbon*) (Staples et coll., 1998a) qui est exprimé sur les cellules épithéliales thymiques chez la souris et le rat. Il ne semble pas y avoir d'interférence avec les hormones thymiques (Vos et coll., 1978). La 2,3,7,8-TCDD provoque la formation d'agrégats de cellules épithéliales thymiques d'apparence anormale (De Waal et coll., 1992, 1993). Les cellules épithéliales corticales seraient la première cible des dioxines (De Heer et coll., 1994b).

Perturbations fonctionnelles de la réponse immunitaire

On peut distinguer immunité humorale (production d'anticorps), immunité à médiation cellulaire, défenses non spécifiques (phagocytose, activité *Natural Killer* (NK) ...) et tests de résistance (infections expérimentales...). Pour chaque aspect, il existe des données positives et des données négatives.

Immunité humorale

Les données publiées ont été obtenues essentiellement avec le test des plages d'hémolyse qui est le test le mieux validé et donc le plus fréquemment utilisé en immunotoxicologie. Elles mettent constamment en évidence un effet dépresseur. Vecchi et coll. (1980) ont montré qu'une dose intrapéritonéale unique de 1,2 µg/kg de 2,3,7,8-TCDD chez la souris C57Bl/6 adulte provoquait une diminution significative des plages d'hémolyse directes et indirectes. Ces résultats ont été confirmés par Hanson et Smialowicz (1994) à la dose de 1 µg/kg de 2,3,7,8-TCDD une fois par semaine par voie intrapéritonéale

pendant 4 semaines. Quant à Narashimhan et coll. (1994), ils ont trouvé que l'administration intrapéritonéale unique de 90 ng/animal de 2,3,7,8-TCDD induisait une diminution significative du nombre de cellules formant des plages d'hémolyse chez la souris B6C3F1.

Immunité à médiation cellulaire

Les résultats sont ici contradictoires, sans doute parce que les modèles utilisés sont différents. En effet, si Luster et coll. (1979) ont mis en évidence une diminution significative de la prolifération lymphocytaire induite par des mitogènes, plus nette pour les lymphocytes T que les lymphocytes B, après exposition *in vitro* à 2×10^{-7} M de 2,3,7,8-TCDD, Vecchi et coll. (1980) n'ont pas retrouvé d'effets sur une réaction GvH (*graft versus host*) expérimentale ou prolifération lymphocytaire après une dose intrapéritonéale unique de 1,2 µg/kg de 2,3,7,8-TCDD chez la souris C57Bl/6 adulte. De même, Hanson et Smialowicz (1994) n'ont pas montré d'effet sur la réponse cytotoxique des lymphocytes T chez la souris C57Bl/6 adulte à la dose de 3 µg/kg de 2,3,7,8-TCDD une fois par semaine pendant 4 semaines (voie intrapéritonéale).

Défenses non spécifiques

Les résultats sont discordants et limités à la seule activité des cellules NK : Yang et coll. (1994) ont montré qu'une dose unique orale de 10 µg/kg de 2,3,7,8-TCDD diminuait l'activité NK chez le rat Fischer 344 adulte tandis qu'une dose intrapéritonéale unique de 1,2 µg/kg chez la souris C57Bl/6 adulte n'avait aucun effet.

Tests de résistance

La résistance à une infection expérimentale est souvent considérée comme le moyen ultime d'affirmer ou d'infirmer le potentiel immunosuppresseur d'un xénobiotique. Plusieurs études ont montré un effet négatif de la 2,3,7,8-TCDD. Pour Thigpen et coll. (1975), l'administration orale de 1 µg/kg de 2,3,7,8-TCDD (une fois par semaine pendant 4 semaines) chez la souris C57Bl/6 provoque une diminution de la résistance à une infection à *Salmonella bern.* Vos et coll. (1978) ont montré que l'administration orale unique de 100 µg/kg de 2,3,7,8-TCDD chez la souris Swiss SPF provoque une augmentation de la sensibilité vis-à-vis d'endotoxines (LPS d'*E. Coli*). On observe également une diminution de la résistance vis-à-vis d'une infection à virus coxsackie B3 chez la souris A/L (mâle, adulte) après administration d'une dose totale de 9 µg de 2,3,7,8-TCDD, répartie sur quatre semaines (Funseth et Ilbäck, 1994) et une diminution de la résistance à une infection à *Trichinella spiralis* chez la souris B6C3F1 femelle adulte après une dose intrapéritonéale unique de 1 µg/kg de 2,3,7,8-TCDD (Luebke et coll., 1994). De même, Yang et coll. (1994) ont montré qu'une dose unique orale de 10 µg/kg de 2,3,7,8-TCDD diminuait la résistance à une infection au virus *Influenza* chez le rat

Fischer 344 adulte. Le même résultat est obtenu avec une dose unique orale de 0,1 µg/kg de 2,3,7,8-TCDD chez la souris B6C3F1 adulte (Burleson et coll., 1996).

D'autres études, parfois réalisées par les mêmes auteurs, ont donné des résultats négatifs. Le choix du modèle (impliquant des mécanismes de résistance différents), les conditions expérimentales peuvent expliquer ces différences qui rendent l'interprétation délicate. Thigpen et coll. (1975) ont montré que l'administration orale de 20 µg/kg de 2,3,7,8-TCDD (une fois par semaine pendant 4 semaines) chez la souris C57Bl/6 n'avait aucun effet sur la résistance à une infection à *Herpesvirus suis* alors que pour Luebke et coll. (1994), l'administration intrapéritonéale quotidienne jusqu'à 30 µg/kg/j de 2,3,7,8-TCDD ne modifiait pas les principaux paramètres de résistance à une infection à *Trichinella spiralis* chez le rat Fischer 344.

Auto-immunité et allergie

Ces deux aspects de l'immunotoxicité d'un xénobiotique ont rarement été étudiés pour les dioxines. Korte et coll. (1991) n'ont pas mis en évidence de réponse positive avec la 2,3,7,8-TCDD dans le test du ganglion poplité, considéré comme un modèle prédictif de réactions auto-immunes systémiques. De même, une injection sous-cutanée unique de 3 µg de 2,3,7,8-TCDD n'induit pas de modification de la réponse à la streptozotocine une semaine après (Stroh et coll., 1992). Aucune étude ne s'est attachée à la relation entre allergie et exposition à la 2,3,7,8-TCDD.

Immunotoxicité de la dioxine chez l'homme

Il n'existe aucune donnée humaine en ce qui concerne l'atrophie thymique. Vos et coll. (1997, 1998) sur la base d'un modèle de greffe de thymus humain fœtal chez la souris SCID, proposent que la sensibilité du thymus humain vis-à-vis de la 2,3,7,8-TCDD est identique à celle du rat.

Perturbations fonctionnelles de la réponse immunitaire : études positives

Sirchia (1982) et Mocarelli et coll. (1986) ont retrouvé une augmentation de la prolifération lymphocytaire aux mitogènes et une augmentation du nombre des lymphocytes totaux chez des enfants exposés de Seveso comparativement à des enfants témoins. Hoffman et coll. (1986) et Knutsen et coll. (1987) ont comparé 154 sujets exposés (*Quail Run Mobile Home Park*) à 155 témoins non exposés. Ils ont mis en évidence une diminution non significative de la réactivité aux tests cutanés, une réduction de la prolifération lymphocytaire vis-à-vis des mitogènes classiques et une diminution du pourcentage de lymphocytes T CD4⁺. Toutes les anomalies avaient disparu au bout de deux ans

(Evans et coll., 1988). Neubert et coll. (1993) ont retrouvé une légère augmentation des lymphocytes $CD4^+CD45-RO^+$ chez des ouvriers exposés aux PCDD et aux PCDF.

Onze ouvriers exposés à la 2,3,7,8-TCDD pendant plusieurs années vingt ans auparavant et qui présentaient une charge corporelle dix fois supérieure à celle de la population générale (43-874 pg TEQ/g de matières grasses) montraient une diminution de la prolifération en réponse à des cellules allogéniques et à l'IL-2 (Tonn et coll., 1996). Wolf et Karmaus (1995) ont retrouvé une légère diminution de la réactivité des tests cutanés chez des travailleurs exposés aux PCP et aux dioxines par inhalation (conservateurs du bois). Halperin et coll., (1998) ont comparé 259 travailleurs d'une usine chimique exposés au 2,4,5-trichlorophénate (TCP) (concentration sérique moyenne = 229 parties par trillion - ppt) à 243 témoins non exposés (concentration sérique moyenne = 6 ppt). Il y avait une diminution significative et dose-dépendante du nombre des lymphocytes T activés ($CD26^+$), une diminution peu marquée de la prolifération spontanée des lymphocytes en culture et une augmentation de la réponse proliférative aux mitogènes. Enfin, Ernst et coll. (1998) ont comparé 21 ouvriers exposés (116 pg TEQ/g) à 21 témoins non exposés (4 pg TEQ/g). Il n'y avait pas de différence en ce qui concerne les sous-populations lymphocytaires et le nombre de cellules NK, mais une réduction de la production d'interféron-gamma induite par l'anatoxine tétanique *in vitro*.

Perturbations fonctionnelles de la réponse immunitaire : études négatives

Reggiani (1978) et Pocchiari et coll. (1979) ont comparé 45 enfants exposés de Seveso (dont 21 avec chloracné) et 45 enfants témoins. Ils n'ont retrouvé aucune différence au niveau des immunoglobulines sériques, du complément, des sous-populations lymphocytaires et de la réponse proliférative aux mitogènes classiques, lors de mesures répétées tous les quatre mois. De même, Stehr et coll. (1986) n'ont retrouvé aucune différence de prévalence des anomalies immunologiques entre un groupe de résidents du Missouri exposés par le biais d'une décharge contaminée par la 2,3,7,8-TCDD et un groupe témoin (réactivité aux tests cutanés prolifération lymphocytaire vis-à-vis des mitogènes classiques). Chez 15 ouvriers exposés accidentellement aux dioxines dix sept ans auparavant, les lymphocytes totaux et les sous-populations lymphocytaires étaient normaux, le nombre des cellules NK légèrement augmenté (Jennings et coll., 1988). Webb et coll. (1989) ont mesuré les taux de dioxines dans le tissu adipeux de 41 personnes et n'ont pas retrouvé de corrélation avec la réponse aux tests cutanés. Des modifications marginales des sous-populations lymphocytaires étaient présentes. Wolfe et coll., (1990) n'ont pas retrouvé de modification du nombre des lymphocytes totaux et des sous-populations lymphocytaires chez des anciens combattants du Viêt Nam ayant un taux moyen de dioxines de 618 ppt, vingt ans après l'exposition. De même, Zober et coll.

(1992) n'ont retrouvé aucune différence entre 42 ouvriers exposés et 42 témoins, en ce qui concerne les taux d'immunoglobulines sériques, d'anticorps antinucléaires, les sous-populations lymphocytaires, la présence de complexes immuns circulants. Enfin, Neubert et coll. (1995) ne mettent en évidence aucune modification de la réponse proliférative des lymphocytes chez des ouvriers modérément exposés et Michalek et coll. (1999) ne retrouvent aucune différence (sous-populations lymphocytaires, immunoglobulines sériques, auto-anticorps, tests cutanés à des antigènes de rappel) en fonction des concentrations sériques de 2,3,7,8-TCDD (de 4 à 194,7 ppt en moyenne) chez des ouvriers agricoles.

Infections

Une seule étude fait état d'un impact éventuel de l'exposition aux PCDD : Zober et coll. (1994) ont retrouvé une légère augmentation de l'incidence des infections respiratoires chez les ouvriers exposés aux PCDD.

Lymphomes

Pour Bertazzi et coll. (1993), il existe une augmentation du risque relatif de lymphomes non hodgkiniens ($\times 3,5$) chez les femmes de la zone exposée de Seveso, après dix ans de suivi, alors que Becher et coll. (1996) trouvaient une augmentation significative de la mortalité par lymphomes non hodgkiniens dans une cohorte de 2 479 ouvriers.

Cependant, aucun excès de risque de lymphomes non hodgkiniens n'a été mis en évidence dans une cohorte de 1 583 ouvriers exposés (Manz et coll., 1991), chez les résidents de Seveso après quinze années de suivi (Bertazzi et coll., 1997) ni chez 243 ouvriers exposés en 1953 (Ott et Zober, 1996).

Auto-immunité

Jennings et coll. (1988) ont retrouvé une augmentation des anticorps antinucléaires chez 15 ouvriers exposés accidentellement aux PCDD dix sept ans auparavant, tandis que Zober et coll. (1992) n'ont retrouvé aucune différence entre 42 ouvriers exposés et 42 témoins. De même Michalek et coll. (1999) ne mettent en évidence aucune différence en fonction des concentrations sériques de dioxines (de 4 à 194,7 ppt en moyenne) en ce qui concerne les taux d'auto-anticorps circulants.

Allergie

Il n'existe aucune donnée suspectant un lien de causalité entre allergie et exposition aux dioxines, qu'il s'agisse de réactions allergiques aux dioxines ou de réactions allergiques vis-à-vis d'un allergène non apparenté chez des sujets exposés.

Immunotératologie des dioxines

« Immunotératologie » est le terme souvent utilisé pour définir les effets d'une exposition toxique *in utero* sur la réponse immunitaire postnatale.

Expérimentalement, plusieurs études montrent une plus grande sensibilité vis-à-vis de l'immunotoxicité de la 2,3,7,8-TCDD après exposition *in utero*. Vos et Moore (1974) ont montré que l'administration orale de 2,3,7,8-TCDD à raison de 5 µg/kg/j chez le rat Fischer 344 pendant la gestation induisait une diminution de la réponse proliférative à la phytohémostagglutinine tandis que dans les mêmes conditions la réponse à la concanavaline-A n'était pas modifiée. Thomas et Hinsdill (1979) ont montré que des souris de cinq semaines nées de mères exposées à 5 ppb de 2,3,7,8-TCDD pendant la gestation présentaient une diminution des plages d'hémolyse et de la sensibilisation de contact au dinitrofluorobenzène, alors que la réponse proliférative aux mitogènes et les sous-populations lymphocytaires n'étaient pas modifiées.

Toutefois, Hong et coll., (1989) n'ont retrouvé qu'une légère augmentation de la réponse humorale vis-à-vis de l'anatoxine tétanique chez les petits de femelles rhésus exposées à 50 ppt de 2,3,7,8-TCDD pendant 33 mois. Il n'y avait aucune anomalie chez les mères. Badesha et coll. (1995) n'ont pas retrouvé d'atrophie thymique chez le rat après exposition pendant la gestation à 5 µg/kg de 2,3,7,8-TCDD. En revanche, il y avait une diminution de la réponse aux mitogènes 130 jours après la naissance, après exposition à 0,3-1 µg/kg.

Les seules données cliniques sont celles de Weisglas-Kuperus et coll. (1996) qui ont montré que de jeunes enfants exposés pendant la grossesse, puis nourris au sein, présentaient davantage d'anomalies des sous-populations lymphocytaires que des témoins non exposés. En revanche, il n'y avait pas de différence au niveau de l'immunité humorale et de la fréquence des infections respiratoires et ORL.

Évaluation du risque immunotoxique de la dioxine

Les mécanismes de l'immunotoxicité des dioxines ne sont pas complètement élucidés. Pour Holsapple et coll. (1986), l'effet supprimeur des dioxines sur l'immunité humorale ne passerait pas par le récepteur Ah. Clark et coll. (1991) montrent que la 2,3,7,8-TCDD augmente la tyrosine-phosphorylation au niveau des lymphocytes B. De Krey et Kerkvliet (1995) ont montré que la 2,3,7,8-TCDD diminue l'activité cytotoxique des lymphocytes T *in vivo* chez la souris C57Bl/6 (dose orale unique > 2,5 µg/kg), mais pas *in vitro*, indépendamment de toute élévation de la corticostérone. Bien que certains résultats soient contradictoires (Staples et coll., 1998b), il semble que la 2,3,7,8-TCDD induise la mort des thymocytes par apoptose (McConkey et coll., 1988 ;

Silverstone et coll., 1994 ; Rhile et coll., 1996 ; Kamath et coll., 1997 ; Pryputniewicz et coll., 1998).

Les données disponibles ne permettent pas une évaluation précise d'un risque immunotoxique éventuel des dioxines. La 2,3,7,8-TCDD provoque une atrophie du thymus et une inhibition plus ou moins marquée de l'immunité humorale et, dans une moindre mesure, de l'immunité cellulaire. La souris est nettement plus sensible que les autres espèces animales étudiées. Il semble que la sensibilité de l'espèce humaine soit comparable à celle du rat. On ne connaît pas l'impact d'une exposition prolongée à faibles doses chez l'animal de laboratoire.

Les conséquences toxicologiques d'une atrophie du thymus ne sont pas clairement établies. Si le thymus joue un rôle essentiel dans le développement anténatal et postnatal précoce du répertoire des lymphocytes T, son rôle au cours de la vie adulte est moins net : la thymectomie chez la souris adulte n'induit pas de modifications du nombre des lymphocytes T ou des réponses fonctionnelles du système immunitaire (production d'anticorps, immunité cellulaire, par exemple). De même, chez l'homme, la thymectomie n'induit pas d'effets indésirables identifiés en dehors de la petite enfance. En revanche, une aplasie thymique congénitale ou une thymectomie néonatale provoquent, expérimentalement, une nette diminution du nombre et des fonctions des lymphocytes T. Il n'est donc pas surprenant que, chez le rongeur nouveau-né, l'immunosuppression induite par la 2,3,7,8-TCDD survienne à des niveaux d'exposition nettement inférieurs à ceux de l'adulte (Gehrs et coll., 1997) et avec une spécificité plus marquée pour l'immunité à médiation cellulaire.

Quant aux perturbations fonctionnelles, seul l'effet dépresseur sur l'immunité humorale chez la souris est constant ; tous les autres résultats, qu'il s'agisse de données expérimentales ou cliniques, sont contradictoires et ne permettent donc pas de définir un profil immunotoxicologique net.

En conclusion, l'affirmation souvent reprise selon laquelle la dioxine serait immunotoxique dans toutes les espèces étudiées, ne paraît pas fondée. La majorité des données concerne la souris et le rat, espèces dont la sensibilité est par ailleurs différente. Les autres espèces ont été peu utilisées et les résultats (notamment chez le singe) sont loin d'être aussi nets. Les données humaines sont nombreuses, mais elles sont peu convaincantes en raison de la grande discordance des résultats et du caractère souvent marginal des modifications observées. La période périnatale paraît être un moment de plus grande sensibilité vis-à-vis des effets immunotoxiques de la 2,3,7,8-TCDD encore que les modifications notées à distance ont souvent le caractère marginal déjà indiqué. Sur la base de ces données, il semble indiscutable que la 2,3,7,8-TCDD puisse induire des modifications immunologiques dans certaines conditions chez l'animal, mais il ne peut pas être démontré d'immunotoxicité au niveau d'exposition qui est celui de la population française aujourd'hui.

BIBLIOGRAPHIE

BADESHA JS, MALIJI G, FLAKS B. Immunotoxic effects of exposure to rats to xenobiotics via maternal lactation. Part I 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Indian J Exp Path* 1995, **76** : 425-439

BECHER H, FLESCHE-JANYNS D, KAUPPINEN, KOGEVINAS M, STEINDORF K et coll. Cancer mortality in German male workers exposed to phenoxy herbicides and dioxins. *Cancer Causes Control* 1996, **7** : 312-321

BERTAZZI PA, PESATORI AC, CONSONNI D, TIRONI A, LANDI AT, ZOCCHETTI C. Cancer incidence in a population incidentally exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*para*-dioxin. *Epidemiology* 1993, **4** : 398-406

BERTAZZI PA, ZOCCHETTI C, GUERCILENA S, CONSONNI D, TIRONI A et coll. Dioxin exposure and cancer risk : a 15-year mortality survey after the « Seveso accident ». *Epidemiology* 1997, **8** : 646-652

BURLESON GR, LEBREC H, YANG YG, IBANES JD, PENNINGTON KN, BIRNBAUM LS. Effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) on influenza virus host resistance in mice. *Fund Appl Toxicol* 1996, **29** : 40-47

CLARK DA, SWEENEY G, SAFE S, HANCOCK E, KILBURN DG, GAULDIE J. Cellular and genetic basis for suppression of cytotoxic T-cell generation by haloaromatic hydrocarbons. *Immunopharmacology* 1983, **6** : 143-153

CLARK GC, BLANK JA, GERMOLEC DR, LUSTER MI. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin stimulation of tyrosine phosphorylation in B lymphocytes : potential role in immunosuppression. *Mol Pharmacol* 1991, **39** : 495-501

DE HEER C, DE WAAL EJ, SCHUURMAN HJ, VOS JG, VAN LOVEREN H. The intrathymic target cell for the thymotoxic action of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Exp Clin Immunogenet* 1994b, **11** : 86-93

DE HEER C, VERLAAN APJ, PENNINKS AH, VOS JG, SCHUURMAN HJ, VAN LOVEREN H. Time course of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD)-induced thymic atrophy in the Wistar rat. *Toxicol Appl Pharmacol* 1994a, **128** : 97-104

DE KREY GK, KERVLIT NI. Suppression of cytotoxic T lymphocyte activity by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin occurs *in vivo*, but not *in vitro*, and is independent of corticosterone elevation. *Toxicology* 1995, **97** : 105-112

DE SWART RL, ROSS PS, TIMMERMAN HH, VOS HM, REIJNDERS PJH et coll. Impaired cellular immune response in harbour seals (*Phoca vitulina*) feeding on environmentally contaminated herring. *Clin Exp Immunol* 1995, **101** : 480-486

DE WAAL EJ, RADEMAKERS LHPM, SCHUURMAN HJ, VAN LOVEREN H, VOS JG. Ultrastructure of the cortical epithelium of the rat thymus after *in vivo* exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD). *Arch Toxicol* 1993, **67** : 558-564

DE WAAL EJ, SCHUURMAN HJ, LOEBER JG, VAN LOVEREN H, VOS JG. Alterations in the cortical thymic epithelium of rats after *in vivo* exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) : an (immuno)histological study. *Toxicol Appl Pharmacol* 1992, **115** : 80-88

- ERNST M, FLESCH-JANYS D, MORGENSTERN I, MANZ A. Immune cell function in industrial workers after exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin : dissociation of antigen-specific T-cell responses in cultures of diluted whole blood and of isolated peripheral blood mononuclear cells. *Environ Health Perspect* 1998, **106** : 701-705
- EVANS RG, WEBB KE, KNUTSEN AP, ROODMAN ST, ROBERTS DW et coll. A medical follow-up of the health effects of long-term exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Arch Environ Health* 1988, **43** : 273-278
- FRAZIER DE, SILVERSTONE AE, GASIEWICZ TA. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-induced thymic atrophy and lymphocyte stem cell alterations by mechanisms independent of the estrogen receptor. *Biochem Pharmacol* 1994, **47** : 2039-2048
- FUNSETH E, ILLBACK NG. Coxsackie virus B3 infection alters the uptake of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin into various tissues of the mouse. *Toxicology* 1994, **31** : 29-38
- GEHRS BC, RIDDLE MM, WILLIAMS WC, SMIALOWICZ RJ. Alterations in the developing immune system of the F344 rat after perinatal exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin II. Effects on the pup and the adult. *Toxicology* 1997, **122** : 229-240
- GREENLEE WF, DOLD KM, IRONS RD, OSBORNE R. Evidence for direct action of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) on thymic epithelium. *Toxicol Appl Pharmacol* 1985, **79** : 112-120
- HALPERIN W, VOGT R, SWEENEY MH, SHOPP G, FINGERHUT M et coll. Immunological markers among workers exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Occup Environ Med* 1998, **55** : 742-749
- HANSON CD, SMIALOWICZ RJ. Evaluation of the effect of low-level 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin exposure on cell mediated immunity. *Toxicology* 1994, **88** : 213-224
- HOFFMAN RE, STEHR-GREEN PA, WEBB KB, EVANS RG, KNUTSEN AP et coll. Health effects of long-term exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *JAMA* 1986, **255**, 2031-2038
- HOLSAPPLE MP, DOOLEY RK, MCNERNEY PJ, MCCAY JA. Direct suppression of antibody responses by chlorinated dibenzodioxins in cultured spleen cells from (C57Bl/6 x C3H)F1 and DBA/2 mice. *Immunopharmacology* 1986, **12** : 175-186
- HONG R, TAYLOR K, ABONDOUR R. Immune abnormalities associated with chronic TCDD exposure in rhesus. *Chemosphere* 1989, **18** : 313-320
- IARC. Polychlorinated dibenzo-*para*-dioxins and polychlorinated dibenzofurans. *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans* 1997, **69** : 665 p
- JENNINGS AM, WILD G, WARD JG, WARD AM. Immunological abnormalities 17 years after accidental exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Br J Indust Med* 1988, **45** : 701-704
- KAMATH AB, XU H, NAGARGATTI PS, NAGARKATTI M. Evidence for the induction of apoptosis in thymocytes by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin *in vivo*. *Toxicol Appl Pharmacol* 1997, **142** : 367-377
- KERKVLIT NI. Immunological effects of chlorinated dibenzo-*p*-dioxins. *Environ Health Perspect* 1995, **103** : 47-53

KNUTSEN AP, ROODMAN ST, EVANS RG, MUELLER KR, WEBB KB et coll. Immune studies in dioxin-exposed Missouri residents : Quail Run. *Bull Environ Contam Toxicol* 1987, **39** : 481-489

KORTE M, STAHLMANN R, KUBICKA-MURANYI M, GLEICHMANN E, NEUBERT D. Polyhalogenated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans and the immune system. 3- No immunosuppressive effect of 2,3,7,8-TCDD in the popliteal lymph node assay (PLNA) in rats. *Arch Toxicol* 1991, **65** : 656-660

LANG DS, BECKER S, CLARK GC, DEVLIN RB, KOREN HS. Lack of direct immunosuppressive effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) on human peripheral blood lymphocyte subsets *in vitro*. *Arch Toxicol* 1994, **68** : 296-302

LEBREC H, BURLESON GR. Influenza virus host resistance models in mice and rats : utilization for immune function assessment and immunotoxicology. *Toxicology* 1994, **91** : 179-188

LUEBKE RW, COPELAND CB, ANDREWS DL. Host resistance to *Trichinella spiralis* infection in rats exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD). *Fund Appl Toxicol* 1994, **24** : 285-289

LUNDBERG K. Dexamethasone and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin can induce thymic atrophy by different mechanisms in mice. *Biochem Biophys Res Comm* 1991, **178** : 16-23

LUSTER MI, CLARK G, LAWSON LD, FAITH RE. Effects of brief *in vitro* exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin on mouse lymphocytes. *J Environ Pathol Toxicol* 1979, **2** : 965-977

MANZ A, BERGER J, DWYER JH, FLESCHE-JANYS D, NAGEL S, WALTSGOTT H. Cancer mortality among workers in chemical plant contaminated with dioxin. *Lancet* 1991, **338** : 959-964

MCCONKEY DJ, HARTZELL P, DUDDY SK, HAKANSSON H, ORRENIUS S. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin kills immature thymocytes by Ca^{2+} -mediated endonuclease activation. *Science* 1988, **242** : 256-257

MICHALEK JE, KETCHUM NS, CHECK IJ. Serum dioxin and immunologic response in veterans of operation ranch hand. *Am J Epidemiol* 1999, **149** : 1038-1046

MOCARELLI P, MAROCCHI A, BRAMBILLA P, GERTHOUX PM, YOUNG DS, MANTEL N. Clinical laboratory manifestations of exposure to dioxin in children. A six year study of the effects of an environmental disaster near Seveso, Italy. *J Am Med Assoc* 1986, **256** : 2687-2695

NARASIMHAN TR, CRAIG A, ARELLANO L, HARPER N, HOWIE L et coll. Relative sensitivities of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-induced Cyp1a-1 and Cyp1a-2 gene expression and immunotoxicity in female B6C3F1 mice. *Fund Appl Toxicol* 1994, **23** : 598-607

NEUBERT R, GOLOR G, STAHLMANN R, HELGE H, NEUBERT D. Polyhalogenated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans and the immune system. 4. Effects of multiple-dose treatment with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) on peripheral lymphocyte subpopulations of a non-human primate (*Callithrix jacchus*). *Arch Toxicol* 1992, **66** : 250-259

NEUBERT R, GOLOR G, STAHLMANN R, HELGE H, NEUBERT D. Dose-dependent TCDD-induced increase or decrease in T-lymphocyte subsets in the blood of new world monkeys (*Callithrix jacchus*). *Chemosphere* 1992, **25** : 1201-1206

NEUBERT R, MASKOW L, DELGADO I, HELGE H, NEUBERT D. Chlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans and the human immune system. 2. *In vitro* proliferation of lymphocytes from workers with quantified moderately-increased body burdens. *Life Sci* 1993, **56** : 421-436

NEUBERT R, MASKOW L, WEBB J, JACOB-MÜLLER U, NOGUEIRA AC et coll. Chlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans and the human immune system. 1. Blood cell receptors in volunteers with moderately increased body burdens. *Life Sci* 1993, **53** : 1995-2006

NEUBERT R, STAHLMANN R, KORTE M, VAN LOVEREN H, VOS JG et coll. Effects of small doses of dioxins on the immune system of marmosets and rats *Ann NY Acad Sci* 1993, **686** : 662-686

OTT MG, ZOBER A. Cause specific mortality and cancer incidence among employees exposed to 2,3,7,8-TCDD after a 1953 reactor accident. *Occup Environ Med* 1996, **53** : 606-612

POCCHIARI F, SILVANO V, ZAMPIERI A. Human health effects from accidental release of tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) at Seveso, Italy. *Ann N Y Acad Sci* 1979, **320** : 311-320

PRYPUTNIEWICZ SJ, NAGARKATTI M, NAGARKATTI PS. Differential induction of apoptosis in activated and resting T cells by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) and its repercussion on T cell responsiveness. *Toxicology* 1998, **129** : 211-226

REGGIANI G. Medical problem raised by the TCDD contamination in Seveso, Italy. *Arch Toxicol* 1978, **40** : 161-188

RHILE MJ, NAGARKATTI M, NAGARKATTI PS. Role of Fas apoptosis and MHC genes in 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD)-induced immunotoxicity of T cells. *Toxicology* 1996, **110** : 153-167

RICE CD, MERCHANT RE, JEONG TC, KARRAS KB, HOLSAPPLE MP. The effects of acute exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin on glioma-specific cytotoxic T-cell activity in Fischer 344 rats. *Toxicology* 1995, **95** : 177-185

SILVERSTONE AE, FRAZIER DE, GASIEWICZ TA. Alternate immune system targets for TCDD : lymphocyte stem cells and extrathymic T-cell development. *Exp Clin Immunogenet* 1994, **11** : 94-101

SIRCHIA G. Exposure to TCDD : immunologic effects. *Proceedings of an International Workshop, Washington DC March 17, 1980*. Washington DC National Academy Press, 1982, 234-266

SPITSBERGEN JM, SCHAT KA, KLEEMAN JM, PETERSON RE. Interactions of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) with immune responses of rainbow trout. *Vet Immunol Immunopathol* 1986, **12** : 263-280

STAPLES JE, FIORE NG, FRAZIER DE, GASIEWICZ TA, SILVERSTONE AE. Overexpression of the anti-apoptotic oncogene, bcl-2, in the thymus does not prevent thymic atrophy induced by estradiol 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Toxicol Appl Pharmacol* 1998b, **151** : 200-210

- STAPLES JE, MURANTE FG, FIORE NG, GASIEWICZ TA, SILVERSTONE AE. Thymic alterations induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin are strictly dependent on aryl hydrocarbon receptor activation in hemopoietic cells. *J Immunol* 1998a, **160** : 3844-3854
- STEHR PA, STEIN G, FALK H, SAMPSON E, SMITH SJ et coll. A pilot epidemiologic study of possible health effects associated with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin contaminations in Missouri. *Arch Environ Health* 1986, **41**, 16-22
- STROH HJ, SCHMIDT A, KORTE M, STAHLMAN R. Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin on livern thymus and cell proliferation in popliteal lymph nodes after footpad injection of streptozotocin in rats. *Chemosphere* 1992, **25** : 1221-1226
- THIGPEN JE, FAITH RE, MCCONNELL EE, MOORE JA. Increased susceptibility to bacterial infection as a sequela of exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Infect Immun* 1975, **12** : 1319-1324
- THOMAS PT, HINS DILL RD. The effect of perinatal exposure to tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin on the immune response of young mice. *Drug Chem Toxicol* 1979, **2** : 77-98
- TONN T, ESSER C, SCHNEIDER EM, STEINMAN-STEINER-HALDENSTÄTT W, GLEICHMANN E. Persistence of decreased T-helper cell function in industrial workers 20 years after exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Environ Health Perspect* 1996, **104** : 422-426
- VECCHI A, MANTOVANI A, SIRONI M, LUINI W, SPREAFICO F, GARATTINI S. The effect of acute administration of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) on humoral antibody production and cell-mediated activities in mice. *Arch Toxicol* 1980, **4** : 163-165
- VOS JG, DE HEER C, VAN LOVEREN H. Immunotoxic effects of TCDD and toxic equivalency factors. *Teratog Carcinog Mutagen* 1997/98, **17** : 275-284
- VOS JG, KREEFTENBERG JG, ENGEL HWB, MINDERHOUD A, VAN NOORLE JANSEN LM. Studies on 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-induced immune suppression and decreased resistance to infection : endotoxin hypersensitivity, serum zinc concentrations and effect of thymosin treatment. *Toxicology* 1978, **9** : 75-86
- VOS JG, MOORE JA, ZINKL JG. Effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin on the immune system of laboratory animals. *Environ Health Perspect* 1973, **5** : 149-162
- VOS JG, MOORE JA. Suppression of cellular immunity in rats and mice by maternal treatment with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1974, **47** : 777-794
- WEBB KB, KNUSTEN AP, ROODMAN ST, ROBERTS DW, SCHRAMM WF et coll. Medical evaluation of subjects with known body levels of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *J Toxicol Environ health* 1989, **28** : 183-193
- WEISGLAS-KUPERUS N, SAS TCJ, KOOPMAN-ESSEBOOM C, VAN DER ZWAN C, DE RIDDER MAJ et coll. Immunological effects of background prenatal and postnatal exposure to dioxins and polychlorinated biphenyl in infants. *Organohalogen Compounds* 1996, **30** : 204-208
- WOLF N, KARMAUS W. Effects of inhalative exposure to dioxins in wood preservatives on cell-mediated immunity in day-care center teachers. *Environ Res* 1995, **68** : 96-105

WOLFE WH, MICHALEK JE, MINER JC, RAHE AR, SILVA J et coll. Health status of Air force veterans occupationally exposed to herbicides in Vietnam 1. Physical health. *J Am Med Assoc* 1990, **264** : 1824-1831

YANG YG, LEBREC H, BURLESON G. Effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) on pulmonary influenza virus titer and natural killer (NK) activity in rats. *Fund Appl Toxicol* 1994, **23** : 125-131

ZOBER MA, OTT MG, MESSERER P. Morbidity follow-up study of BASF employees exposed to 2,3,7,8-TCDD after a 1953 chemical reactor accident. *Int Arch Occup Environ Health* 1994, **65**, 1-8

ZOBER MA, OTT MG, MESSERER P. Morbidity follow up study of BASF employees exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) after a 1953 chemical reactor incident. *Occup Environ Med* 1994, **51** : 479-486

ZOBER MA, OTT MG, PÄFKE O, SENFT K, GERMANN C. Morbidity study of extruder personnel with potential exposure to brominated dioxins and furans. I : Results of blood monitoring and immunological tests. *Br J Ind Med* 1992, **49** : 532-544

8

Effets sur la reproduction et le développement

L'effet toxique de la 2,3,7,8-TCDD ayant été au premier plan lors de l'accident de Seveso, cette dioxine a rapidement fait l'objet de nombreuses recherches expérimentales destinées à mettre en évidence et à comprendre son éventuelle action sur la croissance et le développement.

Pour l'étude de la toxicité sur le développement animal, comme en biologie moléculaire, la 2,3,7,8-TCDD rassemble le plus de connaissances du fait de sa grande affinité pour le récepteur Ah. Cependant, en plus des effets d'activation du récepteur AhR il existe probablement des modulations de ces effets, quand l'organisme en développement est exposé à des mélanges de PCDD, PCDF et d'autres molécules « *dioxin like* ». Prévoir l'effet de tels mélanges en les modélisant par le seul TEQ (équivalent toxique) est réducteur.

D'après les premières études menées sur la 2,3,7,8-TCDD, deux particularités de la toxicité développementale sont apparues :

- l'extraordinaire différence de sensibilité aux effets entre espèces (McNulty, 1985), au sein d'une même espèce et parmi les différentes souches (Huuskonen et coll., 1994) ;
- l'étroitesse de la fenêtre du calendrier de l'organogenèse dans laquelle l'administration de 2,3,7,8-TCDD peut produire les effets tératogènes caractéristiques (Couture et coll., 1990).

À la suite de ces travaux, ont émergé un certain nombre de modèles expérimentaux qui ont été étudiés de façon approfondie. Les récents progrès des outils de la biologie moléculaire, appliqués à l'étude de ces modèles, ont permis de mieux comprendre les mécanismes par lesquels la 2,3,7,8-TCDD exerce sa toxicité sur la croissance et le développement.

Les effets ont été étudiés à des doses inférieures aux doses toxiques pour les animaux adultes ; l'exposition des mères à des doses toxiques empêchant la survenue de grossesses menées à terme et l'observation de la descendance (Gray et coll., 1995).

Il faut noter qu'une plus grande résistance des adultes à la toxicité de la 2,3,7,8-TCDD n'est pas associée linéairement à une plus grande résistance de leur descendance aux effets tératogènes de ce toxique (Huuskonen et coll., 1994 ; Chahoud et coll., 1999).

Concernant les effets anatomiques, ce sont les rongeurs qui ont principalement été étudiés. Les anomalies les plus étudiées sont : l'apparition de fente palatine, d'hydronéphrose, de malformations de l'appareil reproducteur, de défauts dans la formation des dents.

Pour le développement cognitif et comportemental, ont été étudiés le comportement sexuel des rongeurs, leur faculté d'apprentissage, ainsi que les fonctions mentales et cognitives des singes.

D'autres résultats ont été obtenus sur des espèces différentes allant de la truite (Hornung et coll., 1998 ; Abnet et coll., 1999), au poulet (Alonso et coll., 1998).

Pour le présent chapitre, les différents effets des dioxines sur le développement animal sont parcourus en suivant le cycle du développement : fécondation, nidification, organogenèse, développement. Ces étapes sont rappelées à la figure 8.1

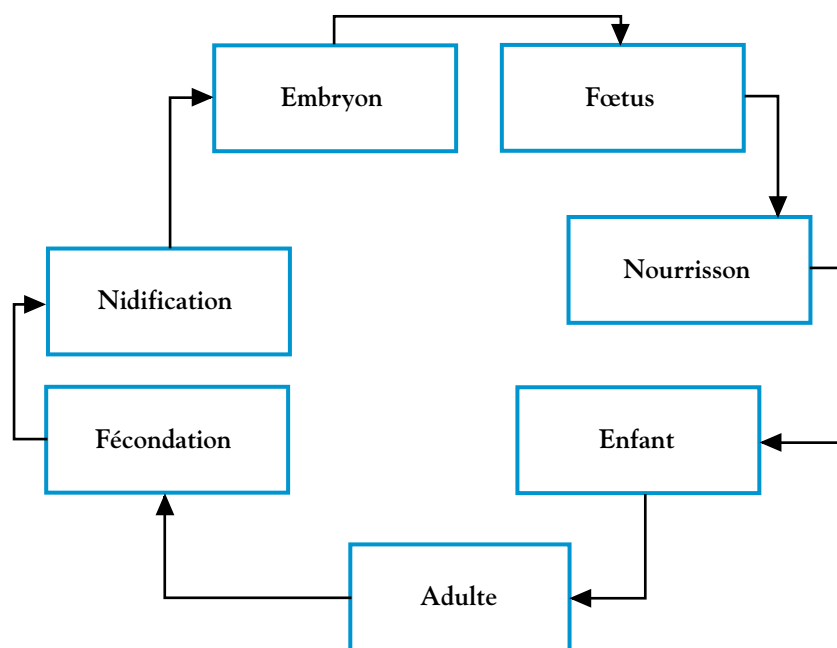


Figure 8.1 : Cycle du développement

Fécondation-fertilité

Chez les rongeurs, les effets sur la descendance d'une exposition *in utero* à la 2,3,7,8,TCDD sont différents suivant le sexe. Chez le rat mâle, une diminution du nombre de spermatozoïdes par éjaculat, ainsi qu'une diminution du

volume et de la fréquence de ceux-ci apparaissent, mais sans que cela porte atteinte à sa fertilité ni à la croissance de sa descendance (Gray et coll., 1995 ; Sommer et coll., 1996). Il n'est pas rapporté d'anomalies génétiques viables.

En revanche, chez la rate et la souris femelle les modifications de l'axe hypothalamo-hypophysaire entraînent une réduction de la fertilité sans observation de déficits génétiques chez les nouveau-nés (Chaffin et coll., 1996 ; Theobald et coll., 1997). Cet effet peut persister pendant plusieurs générations chez le hamster (Wolf et coll., 1999).

Des études, peu nombreuses sur le sujet, il ressort que le déroulement de la fécondation ne semble pas perturbé à la dose de 2 µg de 2,3,7,8-TCDD/kg (Wolf et coll., 1999).

Nidification

Les techniques avancées de biologie moléculaire (réactions par polymérisation de chaîne, PCR) ont permis de suivre dès les premières divisions de l'œuf fécondé, l'apparition du récepteur *arylhydrocarbon* (Ah) dans l'embryon. Le récepteur Ah est présent dans l'ovule non fécondé (apport maternel), sa synthèse *de novo* par l'œuf fécondé est détectable dès le stade de huit cellules (Aliverti et coll., 1982 ; Blankenship et coll., 1993). En cas d'exposition d'œufs fécondés à la 2,3,7,8-TCDD avant la nidification, la cavité blastocœle se forme plus précocement que chez les témoins (Faqi et coll., 1998).

En ce qui concerne la nidification proprement dite, il semble que l'exposition à la 2,3,7,8-TCDD aux doses non toxiques pour l'adulte entraîne peu d'échecs (Giavini et coll., 1982 ; Blankenship et coll., 1993).

Le pourcentage de perte fœtale précoce augmente avec la dose administrée à la mère. Il devient très important quand les doses administrées s'approchent des doses toxiques pour l'adulte de l'espèce considérée (McNulty et coll., 1985).

Le rôle des perturbations du contexte hormonal chez la mère comme cause de l'échec de la nidification semble être prépondérant (Rogan et coll., 1999), quoiqu'une toxicité vasculaire intraplacentaire ait aussi été décrite (Hurst et coll., 1998).

Organogenèse

Plusieurs modèles expérimentaux ont émergé à partir des travaux de recherche menés dans de nombreuses directions.

Le modèle d'apparition de fente palatine chez les rongeurs a été le mieux étudié et les dernières avancées ayant permis de comprendre assez finement le

mécanisme des troubles de l'organogenèse dus à la dioxine, ce modèle sera décrit en détail. Les effets sur le rein et le thymus seront aussi évoqués. Les effets sur l'organogenèse dentaire seront détaillés en raison des effets semblables constatés dans l'espèce humaine. Les effets sur le développement sexuel, la thyroïde, et la croissance intra-utérine seront aussi rapportés.

Fente palatine

Les fentes palatines sont connues pour être une manifestation précoce de problèmes d'organogenèse liés chez les rongeurs à des substances aussi différentes que la vitamine A (Abbott et Pratt, 1991) ou l'hydrocortisone (Ballard et coll., 1977). Il était donc naturel que la 2,3,7,8-TCDD, dont l'action tératogénique était soupçonnée, ait été étudiée dans ce cadre.

L'étude de l'apparition des fentes palatines avait par ailleurs été entamée par les embryologistes qui cherchaient à comprendre le mécanisme de fusion des bourgeons palatins, conçus comme un modèle d'organogenèse par mort cellulaire programmée. Les études histologiques et anatomiques ont montré que la mort programmée des cellules épithéliales n'est pas le mécanisme qui permet la fusion des cellules mésodermiques des bourgeons palatins. Les cellules épithéliales ne présentent pas d'apoptose (Shuler et coll., 1992), et ont la possibilité de se transformer en cellules mésenchymateuses (Fitchett et coll., 1989).

D'après les études anatomiques on constate que la vitamine A et l'hydrocortisone causent une fente palatine d'un type anatomiquement différent de celle obtenue lors d'administration de 2,3,7,8-TCDD. Les fentes palatines en rapport avec une exposition à la vitamine A ou à l'hydrocortisone sont dues en fait à une croissance insuffisante du mésenchyme des bourgeons palatins, empêchant la mise en contact des bourgeons eux-mêmes (Abbott et Birnbaum, 1989), alors que la 2,3,7,8-TCDD n'empêche pas la mise en contact des épithéliums des bourgeons palatins. Toutefois, malgré ce contact, la disparition de la membrane basale et la dédifférenciation des cellules épithéliales ne se produisent pas (Pratt et coll., 1984), et en conséquence les mésenchymes ne peuvent fusionner.

Les rôles du récepteur Ah, du récepteur des glucocorticoïdes, du récepteur de l'acide rétinoïque, de différents facteurs de croissance épithéliaux ont été étudiés en combinaison avec l'exposition aux trois substances, 2,3,7,8-TCDD, vitamine A et hydrocortisone.

Différentes séries d'expériences ont été menées, en associant les toxiques et en recherchant les effets antagonistes ou synergiques de leur action.

Les résultats de ces différentes expériences montrent que la 2,3,7,8-TCDD et l'acide rétinoïque administrés ensemble donnent des fentes palatines de type acide rétinoïque s'ils sont administrés au jour gestationnel 10, et des fentes palatines de type « dioxine » s'ils sont administrés au jour 12. Les fentes

palatines dans un cas comme dans l'autre sont obtenues pour des doses de 2,3,7,8-TCDD et de vitamine A bien inférieures à celles nécessaires quand un seul toxique est appliqué : il y a donc un effet synergique (Abbott et Birnbaum, 1989 ; Birnbaum et coll., 1989). La 2,3,7,8-TCDD inhibe l'induction par l'acide rétinoïque de gènes codant pour des récepteurs (protéines) impliqués dans la voie d'action de la vitamine A (Weston et coll., 1995), ainsi que l'expression du facteur de croissance épithélial (EGF) et des facteurs de croissance transformants TGF α , TGF β (Abbott et Birnbaum, 1990b). La 2,3,7,8-TCDD et les glucocorticoïdes administrés ensemble donnent de manière synergique des fentes palatines de type glucocorticoïde (Abbott, 1995). La 2,3,7,8-TCDD et les glucocorticoïdes, séparément ou ensemble, altèrent l'expression du facteur de croissance épithélial (EGF) et des facteurs de croissance transformants (TGF β 1 et TGF β 2) ainsi que la présence de leurs récepteurs réciproques, AhR et GR.

Les souris qui n'expriment pas le récepteur Ah ne sont pas sensibles à l'action tératogène de la 2,3,7,8-TCDD (Peters et coll., 1999). Il est connu par d'autres études que l'effet toxique de la 2,3,7,8-TCDD sur la souris migre avec le locus Ah (Poland et Glover, 1979).

La 2,3,7,8-TCDD, du fait de sa capacité, par sa liaison avec le récepteur Ah, à modifier directement ou indirectement (par son action sur les récepteurs des glucocorticoïdes ou de l'acide rétinoïque) l'expression de facteurs de croissance (EGF, TGF α et β) impliqués dans l'organogenèse, induit des malformations palatines chez la souris.

Il a été montré que les cellules palatines chez l'humain réagissaient *in vitro* comme celles de la souris (Abbott et Pratt, 1987) mais étaient, comme les cellules du rat, 200 fois moins sensibles à la 2,3,7,8-TCDD que les lignées sensibles de souris (Abbott et Birnbaum, 1991). Ceci est cohérent avec les études récentes montrant que les cellules de palais humains expriment 350 fois moins d'ARNm d'AhR que les cellules de souris sensibles (Abbott et coll., 1999).

Hydronéphrose

L'hydronéphrose résultant de l'exposition de souris à la 2,3,7,8-TCDD a été étudiée (Abbott et Birnbaum, 1990a ; Couture-Haws et coll., 1991) comme les fentes palatines. Les études ont conduit aux mêmes conclusions (Couture et coll., 1990 ; Abbott et Birnbaum, 1990a ; Peters et coll., 1999), l'hydronéphrose étant consécutive à une prolifération anormale de l'épithélium urétéral, liée à des perturbations dans la production du facteur de croissance épithélial. Cette prolifération entraîne une hydronéphrose par obstruction mécanique (Abbott et coll., 1987).

Atrophie thymique

De manière systématique les études décrivent une atrophie thymique suite à l'exposition à la 2,3,7,8-TCDD et ceci même chez les espèces qui possèdent une résistance importante aux autres manifestations toxiques de la 2,3,7,8-TCDD (Huuskonen et coll., 1994). La toxicité de la 2,3,7,8-TCDD nécessite la présence du récepteur Ah (Staples et coll., 1998). Les effets de cette toxicité thymique sur les réactions d'hypersensibilité à l'albumine bovine se maintiennent jusqu'à l'âge adulte, alors que d'autres réponses immunitaires ne sont pas affectées (Gehrs et coll., 1997 ; Gehrs et Smialowicz, 1997 ; Gehrs et Smialowicz, 1999).

Effets sur les dents

À cheval sur la vie fœtale et sur le développement postnatal, les dents sont un modèle intéressant pour l'étude des effets tératogènes de toxiques, entre autres parce qu'elles gardent la trace des perturbations même mineures de la formation de l'émail et de la dentine.

La formation des dents passe par un stade bourgeon, cupule, cloche. L'organisation des adamantoblastes et des odontoblastes est primordiale pour assurer une formation de la dentine et de l'émail, les dents sont dès le départ innervées (Mohamed et Atkinson, 1983).

Les recherches sur l'organogenèse des dents ont montré que le facteur de croissance épithélial (EGF) et son récepteur jouent un rôle important dans l'organogenèse de la dent, chez les rongeurs (Wise et coll., 1992 ; Thesleff et Nieminen, 1996) comme chez l'homme (Fantoni et coll., 1997).

Les perturbations de l'organogenèse dentaire dues à une exposition à la 2,3,7,8-TCDD ont été décrites (Aulerich et coll., 1988) et vont de l'absence d'émail à une désorganisation très importante de tout le tissu dentaire empêchant la formation de la dent (Alaluusua et coll., 1993). Comme pour les bourgeons palatins, le facteur de croissance épithélial est impliqué dans l'organogenèse (Partanen et coll., 1985 ; Abbott et Pratt, 1988 ; Shroff et coll., 1996).

La possibilité d'avoir des souris qui n'expriment pas le récepteur du facteur de croissance épithélial a permis de réaliser des recherches fines sur l'influence de la 2,3,7,8-TCDD sur l'organogenèse de la dent et les facteurs de croissance impliqués. Les résultats de ces recherches sont résumés dans le tableau 8.1 (d'après Partanen et coll., 1985 ; Thesleff et coll., 1987 ; Partanen et coll., 1998).

Le récepteur du facteur de croissance épithélial n'est pas nécessaire à une organogenèse normale de la dent, son absence empêche la 2,3,7,8-TCDD d'exprimer son effet tératogène. Un ajout de facteur de croissance épithélial ralentit la croissance des dents chez la souris normale et, chez cette même

Tableau 8.1 : Influence de la 2,3,7,8-TCDD sur l'organogenèse de la dent chez la souris, importance du récepteur à l'EGF et facteurs de croissance impliqués

	Matrice émail	Prédentine	Odontoblaste	Améloblaste	Morphologie
Contrôle EGFr (+/+)	+	+	organisé	polarisé	cuspidé
Contrôle EGFr (-/-)	+	+	organisé	polarisé	cuspidé
2,3,7,8-TCDD 1µM EGFr (+/+)	absente	prédentine	désorganisé	dépolarisé	perturbée +++
2,3,7,8-TCDD 1µM EGFr (-/-)	présente	dentine	organisé	polarisé	perturbée +
Contrôle+EGF EGFr (+/+)	+ fine	+	organisé, + tard	polarisé + tard	cuspidé
Contrôle+EGF EGFr (-/-)	+	+	organisé	polarisé	cuspidé
2,3,7,8-TCDD 1µM + EGF EGFr (+/+)	présente	dentine	organisé	polarisé	perturbée+
2,3,7,8-TCDD 1µM + EGF EGFr (-/-)	présente	dentine	organisé	polarisé	perturbée+

Le mécanisme par lequel la 2,3,7,8-TCDD agit n'est pas encore bien compris car le récepteur du facteur de croissance épithélial n'est pas présent sur les améloblastes.

D'autres facteurs tel le facteur neurotrophique dérivé des cellules gliales (GDNF), le facteur de croissance nerveux (NGF), le facteur neurotrophique cérébral (BDNF), les neurotrophines 3 et 4 (NT3, NT4) interviennent dans l'organogenèse des dents (Nosrat et coll., 1996 ; Luukko et coll., 1996, 1997 ; Nosrat et coll., 1998 ; Bouwman et coll., 2000). Sans doute, lorsque l'agencement de ces différents facteurs sera mieux connu, le mécanisme d'action de la 2,3,7,8-TCDD sur l'organogenèse dentaire sera-t-il mieux élucidé.

Il a pu être démontré que les tissus humains impliqués dans l'organogenèse de la dent se comportaient comme les modèles animaux (Thesleff et coll., 1987 ; Bellone et coll., 1990 ; Christensen et coll., 1993 ; Fantoni et coll., 1997) et que l'exposition humaine aux doses environnementales pouvait être mise en relation chez l'enfant nourri au sein avec l'apparition d'un déficit dans l'émail des première prémolaires (Alaluusua et coll., 1996, 1999).

Développement de la morphologie sexuelle

Un autre organe cible de l'action de la 2,3,7,8-TCDD dont l'activité antioestrogénique est connue, est le développement des organes sexuels.

Chez le rat mâle, les recherches ont montré que l'exposition périnatale affecte le statut androgénique de l'état de fœtus à celui d'adulte. Les organes les plus

sensibles sont la prostate (Roman et Peterson, 1998 ; Roman et coll., 1998a) et l'épididyme (Gray et coll., 1995 ; Sommer et coll., 1996). L'exposition *in utero* et/ou par l'allaitement montre que le système reproducteur est chez le rat, de loin, le système le plus sensible à la 2,3,7,8-TCDD (Mably et coll., 1992a ; Roman et Peterson, 1998). L'atteinte de la prostate ainsi que la diminution des spermatozoïdes dans l'éjaculat ne nuisent pourtant pas à la capacité reproductive du rat mâle exposé (Mably et coll., 1992a et b ; Roman et coll., 1998a et b).

La souris mâle semble moins affectée (Theobald et Peterson, 1997). La féminisation du comportement chez les souris exposées *in utero* est accentuée par l'exposition par l'allaitement (Bjerke et Peterson, 1994).

Chez le porc mâle, la régulation du récepteur œstrogénique est perturbée par la 2,3,7,8-TCDD et cela peut participer à la cryptorchidie constatée chez les porcs exposés (Barthold et coll., 1999).

Chez la rate, les recherches montrent que l'exposition à la 2,3,7,8-TCDD entraîne une atrophie vaginale (Flaws et coll., 1997) tandis que les ovaires ne semblent pas atteints.

Toujours chez la rate, les œstrogènes sériques sont diminués (Chaffin et coll., 1997) sans que l'axe hypothalamo-hypophysaire paraisse être en cause. On observe aussi chez les rates exposées une diminution du nombre de follicules entrant en maturation (Heimler et coll., 1998). Le partage entre l'influence des facteurs de croissance et le rôle de l'activité antiœstrogénique de la 2,3,7,8-TCDD est en discussion. Les relations entre ces différents acteurs du développement relèvent plus de l'analyse combinatoire que de relations linéaires (Birnbaum, 1995).

Développement thyroïdien

Les atteintes du métabolisme thyroïdien sont surtout le fait des PCB ou de situations dans lesquelles est décrit un mélange de PCB et de dioxines.

Atteinte générale

De manière constante, les travaux de la littérature décrivent des petits poids chez les fœtus exposés à la 2,3,7,8-TCDD, ce fait étant relié négativement à la dose reçue par la mère.

Développement neurologique

La maturation du système nerveux central et les fonctions mentales supérieures d'apprentissage sont les dernières grandes fonctions à se mettre en place avant la puberté et l'acquisition des comportements reproducteurs. Ces fonctions ont été étudiées chez le rat (Thiel et coll., 1994 ; Seo et coll., 1999) et chez le singe rhésus (Schantz et coll., 1992).

Chez le singe rhésus, il n'y a pas de différence entre les exposés et les non exposés du point de vue de leur poids de naissance ou de leur croissance.

Les tests suivants ne montrent pas de différence entre les deux groupes : *fine motor control (Hamilton search)* ; *global performance in delayed spatial attention (DSA)*.

En revanche, lorsque l'apprentissage d'une position (ou forme ou couleur) associée à une récompense est suivi d'une autre séance où la situation opposée est récompensée, un effet de l'exposition à des taux environnementaux de 2,3,7,8-TCDD a pu être mis en évidence. Ces tests explorent la capacité à apprendre et à réagir, à s'adapter à une évolution des situations apprises. Le nombre de tests nécessaires pour changer le premier apprentissage est, de manière surprenante, associé positivement à l'exposition à la 2,3,7,8-TCDD en ce qui concerne les situations spatiales et négativement en ce qui concerne les couleurs. En d'autres termes, la dioxine serait néfaste, dans ce test, à l'apprentissage lié à l'espace mais favoriserait l'apprentissage lié aux couleurs et aux formes (Schantz et coll., 1989). Une dissociation de ce type a aussi été décrite pour des singes exposés aux PCB (Schantz et coll., 1989).

Les singes rhésus nouveau-nés semblent moins toniques et le comportement des mères vis-à-vis des nouveau-nés exposés à la 2,3,7,8-TCDD (comportement très protecteur) rappelle celui des mères vis-à-vis des petits exposés au plomb (Schantz et coll., 1986). Cette hypotonie ne dure pas puisque les nouveau-nés exposés deviennent les meneurs de chahuts (Schantz et coll., 1992).

Chez les rats (Seo et coll., 1999), il a été montré que le test de participation spatiale est favorisé par l'exposition à la 2,3,7,8-TCDD alors que le test qui implique les couleurs est moins bien réussi. De plus, les rats exposés réussissent moins bien à tenir en équilibre sur un bâton en mouvement (Thiel et coll., 1994). Le test de stimulation par les amphétamines montre que les rats exposés réagissent moins que les contrôles (Thiel et coll., 1994).

Maturation et comportement sexuel

La maturation et le comportement sexuel ont été principalement étudiés chez les rongeurs. Les déficits constatés à la naissance (voir organogenèse) vont se maintenir et s'exprimer pendant et après la puberté.

Chez les mâles

Le statut hormonal des rats mâles exposés *in utero* à la 2,3,7,8-TCDD montre une réduction de la testostérone plasmatique, pendant et après la gestation (Cooke et coll., 1998).

Les paramètres dépendants de la présence des androgènes plasmatiques comme la distance ano-génitale sont eux aussi réduits. La descente testiculaire

est retardée, la prostate et les vésicules séminales sont de poids inférieur à la normale à tous les stades du développement sexuel (Mably et coll., 1992c), le développement pubertaire est par ailleurs retardé.

La testostérone plasmatique, comme la 5-alpha-dihydrotestostérone, restent basses dans un contexte d'hormones hypophysaires maintenues normales.

La démasculinisation comportementale est mesurée par le retard pubertaire (Gray et coll., 1997a), et par le retard des intromissions, les délais plus importants avant éjaculation, les positions de lordose, etc. Cette démasculinisation ne semble pas en relation avec des modifications anatomiques cérébrales car il n'est pas montré de différences dans le volume des noyaux cérébraux qui présentent une différenciation sexuelle chez le rat (Bjerke et coll., 1994a). La production de spermatozoïdes est abaissée et cet effet se produit pour des doses d'exposition chez la mère parmi les plus basses testées chez le rat.

Le hamster est aussi et pareillement sensible à la 2,3,7,8-TCDD en ce qui concerne le développement sexuel (Wolf et coll., 1999), la souris est plus résistante à cet effet de la 2,3,7,8-TCDD (Theobald et Peterson, 1997).

Chez les femelles

L'ouverture vaginale est retardée, l'organogenèse perturbée par la 2,3,7,8-TCDD entraîne dans un pourcentage supérieur à 50 % l'apparition d'une fente clitoridienne et l'existence de corde fibreuse en travers de l'ouverture vaginale, gênant l'intromission et provoquant des saignements lors de celle-ci (Flaws et coll., 1997 ; Gray et coll., 1997b). Un comportement de retrait a été observé qui pourrait s'expliquer par des raisons anatomiques.

Hypothermie

Les hamsters et les rats exposés à la 2,3,7,8-TCDD ont une température centrale systématiquement moins élevée que les contrôles et cet effet est indépendant de perturbations du métabolisme basal (Gordon et coll., 1996).

En conclusion, l'état actuel des connaissances sur l'effet de la 2,3,7,8-TCDD sur le développement animal permet de relever les points suivants : la 2,3,7,8-TCDD, par la stimulation du récepteur Ah, entraîne des perturbations dans l'expression de facteurs de croissance impliqués dans l'organogenèse animale ; son action perturbe l'émission des signaux endocrines et paracrines indispensables à la réalisation séquentielle de stades de l'organogenèse ; les études *in vitro* montrent que les mêmes messagers paracrines sont en œuvre dans l'espèce humaine, les tissus humains étant moins sensibles que ceux des rongeurs à l'effet de la 2,3,7,8-TCDD.

La perturbation de l'ordonnancement de l'émail dentaire chez les rongeurs et sa confirmation *in vitro* chez l'homme, données cohérentes avec les observations recueillies chez les enfants allaités par leur mère, devrait être retenue comme étant un effet adverse observé dans l'organogenèse de l'espèce humaine.

Étant donné que les facteurs de croissance perturbés par la 2,3,7,8-TCDD sont aussi impliqués dans l'organogenèse et l'organisation du système nerveux central, il serait imprudent de considérer que la 2,3,7,8-TCDD n'a pas d'effets sur le développement du système nerveux central et certaines fonctions cognitives, bien qu'il n'existe pas de preuve expérimentale animale ou humaine de relation de causalité suffisante à ce sujet.

BIBLIOGRAPHIE

ABBOTT BD, BIRNBAUM LS, PRATT RM. TCDD-induced hyperplasia of the ureteral epithelium produces hydronephrosis in murine fetuses. *Teratology* 1987, **35** : 329-334

ABBOTT BD, PRATT RM. Human embryonic palatal epithelial differentiation is altered by retinoic acid and epidermal growth factor in organ culture. *J Craniofac Genet Dev Biol* 1987, **7** : 241-265

ABBOTT BD, PRATT RM. EGF receptor expression in the developing tooth is altered by exogenous retinoic acid and EGF. *Dev Biol* 1988, **128** : 300-304

ABBOTT BD, BIRNBAUM LS. Cellular alterations and enhanced induction of cleft palate after coadministration of retinoic acid and TCDD. *Toxicol Appl Pharmacol* 1989, **99** : 287-301

ABBOTT BD, BIRNBAUM LS. Effects of TCDD on embryonic ureteric epithelial EGF receptor expression and cell proliferation. *Teratology* 1990a, **41** : 71-84

ABBOTT BD, BIRNBAUM LS. TCDD-induced altered expression of growth factors may have a role in producing cleft palate and enhancing the incidence of clefts after coadministration of retinoic acid and TCDD. *Toxicol Appl Pharmacol* 1990b, **106** : 418-432

ABBOTT BD, BIRNBAUM LS. TCDD exposure of human embryonic palatal shelves in organ culture alters the differentiation of medial epithelial cells. *Teratology* 1991, **43** : 119-132

ABBOTT BD, HELD GA, WOOD CR, BUCKALEW AR, BROWN JG, SCHMID J. AhR, ARNT, and CYP1A1 mRNA quantitation in cultured human embryonic palates exposed to TCDD and comparison with mouse palate *in vivo* and in culture. *Toxicol Sci* 1999, **47** : 62-75

ABBOTT BD, PRATT RM. Retinoic acid alters epithelial differentiation during palatogenesis. *J Craniofac Genet Dev Biol* 1991, **11** : 315-325

ABBOTT BD. Review of the interaction between TCDD and glucocorticoids in embryonic palate. *Toxicology* 1995, **105** : 365-373

- ABNET CC, TANGUAY RL, HEIDEMAN W, PETERSON RE. Transactivation activity of human, zebrafish, and rainbow trout aryl hydrocarbon receptors expressed in COS-7 cells : greater insight into species differences in toxic potency of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxin, dibenzofuran, and biphenyl congeners. *Toxicol Appl Pharmacol* 1999, **159** : 41-51
- ALALUUSUA S, LUKINMAA PL, POHJANVIRTA R, UNKILA M, TUOMISTO J. Exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*para*-dioxin leads to defective dentin formation and pulpal perforation in rat incisor tooth. *Toxicology* 1993, **81** : 1-13
- ALALUUSUA S, LUKINMAA PL, KOSKIMIES M, PIRINEN S, HOLTTA P et coll. Developmental dental defects associated with long breast feeding. *Eur J Oral Sci* 1996, **104** : 493-497
- ALALUUSUA S, LUKINMAA PL, TORPPA J, TUOMISTO J, VARTIAINEN T. Developing teeth as biomarker of dioxin exposure. *Lancet* 1999, **353** : 206
- ALIVERTI V, BONANOMI L, GIAVINI E, LEONE VG, MARIANI L, PRATI M et coll. Embryo-toxic effects of 5-hydroxytryptamine during the peri-implantation period in the rat. *Biol Reprod* 1982, **27** : 1231-1237
- ALONSO KR, PEDEN-ADAMS MM, LIU JY, CHARBONNEAU C, HENSHEL D, DICKERSON RL. Effects of *in ovo* exposure to 2,3,7,8-TCDD on F1 generation adult chickens (*Gallus gallus*). *Chemosphere* 1998, **37** : 1873-1883
- AULERICH RJ, BURSIA SJ, NAPOLITANO AC. Biological effects of epidermal growth factor and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin on developmental parameters of neonatal mink. *Arch Environ Contam Toxicol* 1988, **17** : 27-31
- BALLARD PD, HEARNEY EF, SMITH MB. Comparative teratogenicity of selected glucocorticoids applied ocularly in mice. *Teratology* 1977, **16** : 175-180
- BARTHOLD JS, KRYGER JV, DERUSHA AM, DUEL BP, JEDNAK R, SKAFAR DF. Effects of an environmental endocrine disruptor on fetal development, estrogen receptor(alpha) and epidermal growth factor receptor expression in the porcine male genital tract. *J Urol* 1999, **162** : 864-871
- BELLONE C, BARNI T, PAGNI L, BALBONI GC, VANNELLI GB. Growth factors in human tooth development. *Boll Soc Ital Biol Sper* 1990, **66** : 231-238
- BIRNBAUM LS, HARRIS MW, STOCKING LM, CLARK AM, MORRISSEY RE. Retinoic acid and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin selectively enhance teratogenesis in C57BL/6N mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 1989, **98** : 487-500
- BIRNBAUM LS. Developmental effects of dioxins and related endocrine disrupting chemicals. *Toxicol Lett* 1995, **82-83** : 743-750
- BJERKE DL, BROWN TJ, MACLUSKY NJ, HOCHBERG RB, PETERSON RE. Partial demasculinization and feminization of sex behavior in male rats by *in utero* and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin is not associated with alterations in estrogen receptor binding or volumes of sexually differentiated brain nuclei. *Toxicol Appl Pharmacol* 1994, **127** : 258-267
- BJERKE DL, PETERSON RE. Reproductive toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in male rats : different effects of *in utero* versus lactational exposure. *Toxicol Appl Pharmacol* 1994, **127** : 241-249

- BLANKENSHIP AL, SUFFIA MC, MATSUMURA F, WALSH KJ, WILEY LM. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) accelerates differentiation of murine preimplantation embryos *in vitro*. *Reprod Toxicol* 1993, **7** : 255-261
- BOUWMAN P, GOLLNER H, ELSASSER HP, ECKHOFF G, KARIS A, GROSVELD F et coll. Transcription factor Sp3 is essential for post-natal survival and late tooth development. *EMBO J* 2000, **19** : 655-661
- CHAFFIN CL, PETERSON RE, HUTZ RJ. *In utero* and lactational exposure of female Holtzman rats to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin : modulation of the estrogen signal. *Biol Reprod* 1996, **55** : 62-67
- CHAFFIN CL, TREWIN AL, WATANABE G, TAYA K, HUTZ RJ. Alterations to the pituitary-gonadal axis in the peripubertal female rat exposed *in utero* and through lactation to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Biol Reprod* 1997, **56** : 1498-1502
- CHAHOU D I, LIGENSA A, DIETZEL L, FAQI AS. Correlation between maternal toxicity and embryo/fetal effects. *Reprod Toxicol* 1999, **13** : 375-381
- CHRISTENSEN LR, MOLLGARD K, KJAER I, JANAS MS. Immunocytochemical demonstration of nerve growth factor receptor (NGF-R) in developing human fetal teeth. *Anat Embryol* 1993, **188** : 247-255
- COOKE GM, PRICE CA, OKO RJ. Effects of *in utero* and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) on serum androgens and steroidogenic enzyme activities in the male rat reproductive tract. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1998, **67** : 347-354
- COUTURE LA, HARRIS MW, BIRNBAUM LS. Characterization of the peak period of sensitivity for the induction of hydronephrosis in C57BL/6N mice following exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Fundam Appl Toxicol* 1990, **15** : 142-150
- COUTURE-HAWS L, HARRIS MW, MCDONALD MM, LOCKHART AC, BIRNBAUM LS. Hydronephrosis in mice exposed to TCDD-contaminated breast milk : identification of the peak period of sensitivity and assessment of potential recovery. *Toxicol Appl Pharmacol* 1991, **107** : 413-428
- FANTONI G, BARNI T, GLORIA L, REPICE F, BELLONE C, VANNELLI GB. Characterization and localization of epidermal growth factor receptors in human developing tooth. *Ital J Anat Embryol* 1997, **102** : 21-32
- FAQI AS, DALSENTER PR, MERKER HJ, CHAHOU D I. Reproductive toxicity and tissue concentrations of low doses of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in male offspring rats exposed throughout pregnancy and lactation. *Toxicol Appl Pharmacol* 1998, **150** : 383-392
- FITCHETT JE, HAY ED. Medial edge epithelium transforms to mesenchyme after embryonic palatal shelves fuse. *Dev Biol* 1989, **131** : 455-474
- FLAWS JA, SOMMER RJ, SILBERGELD EK, PETERSON RE, HIRSHFIELD AN. *In utero* and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) induces genital dysmorphogenesis in the female rat. *Toxicol Appl Pharmacol* 1997, **147** : 351-362
- GEHRS BC, SMIALOWICZ RJ. Alterations in the developing immune system of the F344 rat after perinatal exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin I. [correction of II]. Effects on the fetus and the neonate [published erratum appears in *Toxicology* 1998, **130** : 69]. *Toxicology* 1997, **122** : 219-228

- GEHRS BC, RIDDLE MM, WILLIAMS WC, SMIALOWICZ RJ. Alterations in the developing immune system of the F344 rat after perinatal exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin : II. Effects on the pup and the adult [published erratum appears in *Toxicology* 1998, **130** : 71]. *Toxicology* 1997, **122** : 229-240
- GEHRS BC, SMIALOWICZ RJ. Persistent suppression of delayed-type hypersensitivity in adult F344 rats after perinatal exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Toxicology* 1999, **134** : 79-88
- GIAVINI E, PRATI M, VISMARA C. Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin administered to pregnant rats during the preimplantation period. *Environ Res* 1982, **29** : 185-189
- GORDON CJ, YANG Y, GRAY LE JR. Autonomic and behavioral thermoregulation in golden hamsters exposed perinatally to dioxin. *Toxicol Appl Pharmacol* 1996, **137** : 120-125
- GRAY LE JR, KELCE WR, MONOSSON E, OSTBY JS, BIRNBAUM LS. Exposure to TCDD during development permanently alters reproductive function in male Long Evans rats and hamsters : reduced ejaculated and epididymal sperm numbers and sex accessory gland weights in offspring with normal androgenic status. *Toxicol Appl Pharmacol* 1995, **131** : 108-118
- GRAY LE, OSTBY JS, KELCE WR. A dose-response analysis of the reproductive effects of a single gestational dose of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in male Long Evans Hooded rat offspring. *Toxicol Appl Pharmacol* 1997a, **146** : 11-20
- GRAY LE, WOLF C, MANN P, OSTBY JS. *In utero* exposure to low doses of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin alters reproductive development of female Long Evans hooded rat offspring. *Toxicol Appl Pharmacol* 1997b, **146** : 237-244
- HEIMLER I, TREWIN AL, CHAFFIN CL, RAWLINS RG, HUTZ RJ. Modulation of ovarian follicle maturation and effects on apoptotic cell death in Holtzman rats exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) *in utero* and lactationally. *Reprod Toxicol* 1998, **12** : 69-73
- HORNUNG MW, MILLER L, GOODMAN B, MELANCON MJ, PETERSON RE. Lack of developmental and reproductive toxicity of 2,3,3',4',4'-pentachlorobiphenyl (PCB 105) in ring-necked pheasants. *Arch Environ Contam Toxicol* 1998, **35** : 646-653
- HURST CH, ABBOTT BD, DEVITO MJ, BIRNBAUM LS. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in pregnant Long Evans rats : disposition to maternal and embryo/fetal tissues. *Toxicol Sci* 1998, **45** : 129-136
- HUUSKONEN H, UNKILA M, POHJANVIRTA R, TUOMISTO J. Developmental toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) in the most TCDD-resistant and -susceptible rat strains. *Toxicol Appl Pharmacol* 1994, **124** : 174-180
- LUUKKO K, MOSHNYAKOV M, SAINIO K, SAARMA M, SARIOLA H, THESLEFF I. Expression of neurotrophin receptors during rat tooth development is developmentally regulated, independent of innervation, and suggests functions in the regulation of morphogenesis and innervation. *Dev Dyn* 1996, **206** : 87-99
- LUUKKO K, SUVANTO P, SAARMA M, THESLEFF I. Expression of GDNF and its receptors in developing tooth is developmentally regulated and suggests multiple roles in innervation and organogenesis. *Dev Dyn* 1997, **210** : 463-471

MABLY TA, BJERKE DL, MOORE RW, GENDRON-FITZPATRICK A, PETERSON RE. *In utero* and lactational exposure of male rats to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. 3. Effects on spermatogenesis and reproductive capability. *Toxicol Appl Pharmacol* 1992a, **114** : 118-126

MABLY TA, MOORE RW, GOY RW, PETERSON RE. *In utero* and lactational exposure of male rats to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. 2. Effects on sexual behavior and the regulation of luteinizing hormone secretion in adulthood. *Toxicol Appl Pharmacol* 1992b, **114** : 108-117

MABLY TA, MOORE RW, PETERSON RE. *In utero* and lactational exposure of male rats to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. 1. Effects on androgenic status. *Toxicol Appl Pharmacol* 1992c, **114** : 97-107

MCNULTY WP. Toxicity and fetotoxicity of TCDD, TCDF and PCB isomers in rhesus macaques (*Macaca mulatta*). *Environ Health Perspect* 1985, **60** : 77-88

MOHAMED SS, ATKINSON ME. A histological study of the innervation of developing mouse teeth. *J Anat* 1983, **136** : 735-749

NOSRAT CA, FRIED K, EBENDAL T, OLSON L. NGF, BDNF, NT3, NT4 and GDNF in tooth development. *Eur J Oral Sci* 1998, **106** : 94-99

NOSRAT CA, TOMAC A, LINDQVIST E, LINDSKOG S, HUMPEL C, STROMBERG I et coll. Cellular expression of GDNF mRNA suggests multiple functions inside and outside the nervous system. *Cell Tissue Res* 1996, **286** : 191-207

PARTANEN AM, ALALUUSUA S, MIETTINEN PJ, THESLEFF I, TUOMISTO J et coll. Epidermal growth factor receptor as a mediator of developmental toxicity of dioxin in mouse embryonic teeth. *Lab Invest* 1998, **78** : 1473-1481

PARTANEN AM, EKBLOM P, THESLEFF I. Epidermal growth factor inhibits morphogenesis and cell differentiation in cultured mouse embryonic teeth. *Dev Biol* 1985, **111** : 84-94

PETERS JM, NAROTSKY MG, ELIZONDO G, FERNANDEZ-SALGUERO PM, GONZALEZ FJ, ABBOTT BD. Amelioration of TCDD-induced teratogenesis in aryl hydrocarbon receptor (AhR)-null mice. *Toxicol Sci* 1999, **47** : 86-92

POLAND A, GLOVER E. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin : segregation of toxicity with the Ah locus. *Mol Pharmacol* 1979, **17** : 86-94

PRATT RM, DENCKER L, DIEWERT VM. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-induced cleft palate in the mouse : evidence for alterations in palatal shelf fusion. *Teratog Carcinog Mutagen* 1984, **4** : 427-436

ROGAN WJ, GLADEN BC, GUO YL, HSU CC. Sex ratio after exposure to dioxin-like chemicals in Taiwan. *Lancet* 1999, **353** : 206-207

ROMAN BL, PETERSON RE. *In utero* and lactational exposure of the male rat to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin impairs prostate development. 1. Effects on gene expression. *Toxicol Appl Pharmacol* 1998, **150** : 240-253

ROMAN BL, POLLENZ RS, PETERSON RE. Responsiveness of the adult male rat reproductive tract to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin exposure : Ah receptor and ARNT expression, CYP1A1 induction, and Ah receptor down-regulation. *Toxicol Appl Pharmacol* 1998a, **150** : 228-239

ROMAN BL, TIMMS BG, PRINS GS, PETERSON RE. *In utero* and lactational exposure of the male rat to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin impairs prostate development. 2. Effects on growth and cytodifferentiation. *Toxicol Appl Pharmacol* 1998b, **150** : 254-270

SCHANTZ SL, LAUGHLIN NK, VAN VALKENBERG HC, BOWMAN RE. Maternal care by rhesus monkeys of infant monkeys exposed to either lead or 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Neurotoxicology* 1986, **7** : 637-650

SCHANTZ SL, LEVIN ED, BOWMAN RE, HEIRONIMUS MP, LAUGHLIN NK. Effects of perinatal PCB exposure on discrimination-reversal learning in monkeys. *Neurotoxicol Teratol* 1989, **11** : 243-250

SCHANTZ SL, FERGUSON SA, BOWMAN RE. Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin on behavior of monkeys in peer groups. *Neurotoxicol Teratol* 1992, **14** : 433-446

SEO BW, SPARKS AJ, MEDORA K, AMIN S, SCHANTZ SL. Learning and memory in rats gestationally and lactationally exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD). *Neurotoxicol Teratol* 1999, **21** : 231-239

SHROFF B, KASHNER JE, KEYSER JD, HEBERT C, NORRIS K. Epidermal growth factor and epidermal growth factor-receptor expression in the mouse dental follicle during tooth eruption. *Arch Oral Biol* 1996, **41** : 613-617

SHULER CF, HALPERN DE, GUO Y, SANK AC. Medial edge epithelium fate traced by cell lineage analysis during epithelial-mesenchymal transformation *in vivo*. *Dev Biol* 1992, **154** : 318-330

SOMMER RJ, IPPOLITO DL, PETERSON RE. *In utero* and lactational exposure of the male Holtzman rat to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin : decreased epididymal and ejaculated sperm numbers without alterations in sperm transit rate. *Toxicol Appl Pharmacol* 1996, **140** : 146-153

STAPLES JE, MURANTE FG, FIORE NC, GASIEWICZ TA, SILVERSTONE AE. Thymic alterations induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin are strictly dependent on aryl hydrocarbon receptor activation in hemopoietic cells [published erratum appears in *J Immunol* 1999, **163** : 1092]. *J Immunol* 1998, **160** : 3844-3854

THEOBALD HM, PETERSON RE. *In utero* and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin : effects on development of the male and female reproductive system of the mouse. *Toxicol Appl Pharmacol* 1997, **145** : 124-135

THESLEFF I, NIEMINEN P. Tooth morphogenesis and cell differentiation. *Curr Opin Cell Biol* 1996, **8** : 844-850

THESLEFF I, PARTANEN AM, RIHTNIEMI L. Localization of epidermal growth factor receptors in mouse incisors and human premolars during eruption. *Eur J Orthod* 1987, **9** : 24-32

THIEL R, KOCH E, ULBRICH B, CHAHOUD I. Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) on the development of rat offspring. *Arch Toxicol* 1994, **69** : 79-86

WESTON WM, NUGENT P, GREENE RM. Inhibition of retinoic-acid-induced gene expression by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Biochem Biophys Res Commun* 1995, **207** : 690-694

WISE GE, LIN F, FAN W. Localization of epidermal growth factor and its receptor in mandibular molars of the rat prior to and during prefunctional tooth eruption. *Dev Dyn* 1992, **195** : 121-126

WOLF CJ, OSTBY JS, GRAY LE JR. Gestational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) severely alters reproductive function of female hamster offspring. *Toxicol Sci* 1999, **51** : 259-264

9

Activité cancérogène

D'abord caractérisée par sa haute toxicité comme impureté contaminante dans les agents défoliants utilisés au Viêtnam de 1965 à 1971, la 2,3,7,8-TCDD, éminemment stable et lipophile, est fréquemment dénommée « dioxine de Seveso » depuis l'accident de fabrication de 2,4,5-trichlorophénol survenu en Italie en 1976. Avec quelques autres cas plus ponctuels d'accidents industriels, ce sont essentiellement ces deux circonstances qui ont conduit à une exposition humaine importante et à la mise en œuvre d'expérimentations de toxicité et de cancérogenèse chez l'animal.

Malgré les nombreuses études qui continuent à être développées sur les activités tissulaires et cellulaires de la 2,3,7,8-TCDD, le nombre d'expérimentations de cancérogenèse publiées chez l'animal se limite à sept (tableau 9.1), si l'on exclut les résultats préliminaires non confirmés d'une expérimentation chez le poisson (Johnson et coll., 1992). Ces études de cancérogenèse ont classiquement été réalisées chez des rongeurs (trois chez le rat, trois chez la souris et une chez le hamster) par traitement chronique (régime) ou à doses répétées (gavages, injections intrapéritonéales ou sous-cutanées) sur des durées allant de 60 semaines à 2 ans et, dans une majorité d'études (5/7), avec des nombres suffisants d'animaux. Si ces conditions expérimentales sont en faveur de la significativité de ces tests, il est toutefois nécessaire de prendre en compte l'utilisation de faibles doses imposée par la haute toxicité à long terme de la 2,3,7,8-TCDD dont l'application à doses plus élevées se traduit par une létalité à plus ou moins long terme excluant toute observation de cancérisation.

Le premier constat qui ressort de ces expérimentations est l'absence, au-delà de la région buccale, de tumorigenèse du tube digestif, ainsi que le nombre restreint d'organes touchés. Parmi ceux-ci, le foie occupe incontestablement la première place. De ce fait, les effets cancérigènes de la 2,3,7,8-TCDD chez l'animal peuvent se résumer en deux volets : cancérisation hépatique et autres tumeurs.

Tableau 9.1 : Activité cancérigène de la 2,3,7,8-TCDD exprimée chez l'animal

Espèce	Lignée, sexe, N	Traitement (µg/kg)	Durée (S)	Organe	% de tumeurs	Référence
Rat	Sprague-Dawley m et f	0,001 ; 0,01 ; 0,1 ; 1/J	105	Foie	f : 40 (adénome + carcinome) m : ≈ 0 (ns)	Kociba et coll., 1978
				Poumon	f : 14	
				Langue/palais	8	
	Osborne-Mendel m et f	0,01 ; 0,05 ; 0,5 ; 2/S	104	Foie	f : 25 Témoins : 0 m : ≈ 0	NTP, 1982a
				Thyroïde	m : 20 (adénome folliculaire)	
	Sprague-Dawley m	1,75 ; 2,0 ; 1/S	60	Foie	0	Walker et coll., 1997
Souris	Swiss/H/Riop m	0,007 ; 0,7 ; 7,0 ; 1/S	52	Foie	47 md - 30 hd	Toth et coll. 1979
				Autres	0	
	B6C3F1 m et f	m : 0,01 ; 0,05 ; 0,5 ; 2/S f : 0,04 ; 0,2 ; 2,0 ; 2/S	104	Foie	m : 34 f : 13	NTP, 1982a
				Thyroïde	f : 10 m : 0	
	C57B1 × C3H m et f	2,5 ; 5,0 ; 1/S	52	Foie	f : 22 hd (adénomes) m : 66 hd (carcinomes)	Della Porta et coll., 1987
Hamster	Syrien doré m	50 ; 100 (sc, ip) ; 1/M 2 à 6 doses au total	-	Peau	21 hd (carcinomes cutanés)	Rao et coll., 1988

m : mâles ; f : femelles ; J : jour ; S : semaine ; M : mois ; md : dose moyenne ; hd : haute dose ; sc : sous-cutané ; ip : intrapéritonéal

Cancérisation hépatique

Tout en restant modérée en incidence par rapport à l'activité d'autres cancérigènes hépatiques, certes administrés à de beaucoup plus fortes doses, l'atteinte hépatique avec cancérisation est, avec une différence marquée de réponse liée au sexe, l'observation convergente des expérimentations menées par administration orale. Ainsi, dans leur étude qui fait référence en raison de sa confirmation par un double réexamen des coupes histologiques par deux groupes indépendants de pathologistes (Keenan et coll., 1991 ; Goodman et Sauer, 1992), Kociba et coll. (1978) ont enregistré chez le rat Sprague-Dawley un niveau de tumeurs hépatiques (adénomes plus carcinomes) de 40 % chez

les femelles alors que l'incidence chez les mâles n'était pas significativement plus élevée que chez les témoins. Si, par un niveau de nodules néoplasiques plus élevé chez les femelles que chez les mâles, une tendance analogue de susceptibilité différente entre les sexes était constatée, il faut noter qu'aucune tumeur hépatique constituée n'a été observée dans une expérimentation chez le rat Osborne-Mendel (NTP, 1982a).

Avec des incidences de tumeurs hépatiques pouvant atteindre 66 %, c'est une susceptibilité sexuelle inverse qui ressort des deux expérimentations chez la souris réalisées sur les deux sexes (NTP, 1982b ; Della Porta et coll., 1987) et où la plus grande sensibilité des mâles est nettement caractérisée. De ce point de vue, il est intéressant de remarquer que, dans l'expérimentation sur la souris B6C3F1 (NTP, 1982b), les femelles qui recevaient, à la même fréquence, des doses quatre fois plus élevées que les mâles, n'ont développé des tumeurs qu'à un niveau trois fois moindre. Bien que la troisième expérimentation chez la souris (Toth et coll., 1979) ait été conduite seulement sur les mâles, les incidences de tumeurs relevées sont également en faveur de la sensibilité particulière de la souris mâle. On notera, cependant, que cette sensibilité peut aussi être regardée comme une résistance de la femelle. Reconnue pour l'espèce, la grande résistance du hamster aux effets toxiques de la 2,3,7,8-TCDD semble pouvoir rendre compte de l'absence d'activité néoplasique hépatique observée dans l'unique expérimentation réalisée par Rao et coll. (1988), effectuée dans des conditions expérimentales très différentes de celles mises en œuvre pour les autres rongeurs.

L'incidence du statut sexuel et hormonal dans la cancérogenèse expérimentale chez le rongeur est un facteur bien connu et largement documenté par de nombreuses publications. Indépendamment des susceptibilités d'espèce ou de lignée qui peuvent être prépondérantes dans l'expression d'activité d'un composé, cet effet se traduit pour la cancérisation hépatique par une plus grande sensibilité du mâle chez le rat et, à l'inverse, de la femelle chez la souris où la différence de réponse liée au sexe est directement traduite, dès l'initiation, par le niveau de formation des adduits à l'ADN hépatique (Valéro et coll., 1985 ; Périn et coll., 1998). Ainsi, avec des composés susceptibles d'agir classiquement par activation métabolique, il est d'usage courant dans des expérimentations de recherche d'activité cancérogène à long terme, ou d'étude de la cancérogenèse, d'utiliser des mâles lorsque l'étude est menée chez le rat et des femelles lorsqu'il s'agit de souris.

Le fait que les expérimentations réalisées avec la 2,3,7,8-TCDD fassent ressortir une disparité de réponse sexuelle inverse de celle habituellement observée pour la cancérisation hépatique chez le rat comme chez la souris évoque d'emblée l'intervention pour la 2,3,7,8-TCDD d'un mode d'expression de son activité cancérogène ne répondant à aucun des processus classiques de l'induction tumorale par une substance chimique.

Cancérisation d'autres organes

Bien qu'aucun cancer de la peau n'ait pu être attribué à une exposition à la dioxine, les effets cutanés du composé, essentiellement traduits dans l'espèce humaine et chez les primates par la chloracné, ont conduit à envisager la possibilité d'une activité cancérogène pour la peau. La seule expérimentation à long terme (NTP, 1982b) par applications cutanées répétées (3 fois par semaine pendant 2 ans) à des souris Swiss-Webster fait état d'une incidence significative (30 % contre 5 % chez les témoins) de fibrosarcomes mais uniquement chez les femelles pour lesquelles la dose appliquée (0,005 µg) était 5 fois supérieure à celle des mâles. Sachant qu'il n'existe généralement pas de différence de susceptibilité sexuelle dans la cancérisation des tissus épithéliaux et conjonctifs, le choix d'un traitement nettement plus lourd pour les femelles peut surprendre. On se limitera donc pour cette étude à constater que l'induction de tumeurs cutanées par la 2,3,7,8-TCDD chez la souris n'est effective, quoique selon une incidence modérée, qu'à la suite d'un traitement intense et de très longue durée.

Les observations d'effets cancérogènes de la 2,3,7,8-TCDD dans d'autres organes que le foie se révèlent beaucoup plus dispersées et découlent toutes des autopsies effectuées dans les expérimentations citées dans le tableau 9.I.

Alors qu'aucune atteinte d'un quelconque autre organe n'est signalée dans l'expérimentation réalisée chez le hamster par Rao et coll. (1988), l'obtention de 22 % de tumeurs cutanées de la face est surprenante lorsqu'on prend en compte que les traitements ont été effectués par injections soit intrapéritonéales soit sous-cutanées. Laissant supposer l'intervention d'un mode d'action particulier, il est regrettable que l'observation d'une localisation tumorale aussi précisément éloignée du site d'administration n'ait pas été confirmée et fait l'objet d'une étude plus poussée.

À l'examen du tableau, le second organe qui paraît visé par la cancérisation est la thyroïde. Provenant de l'expérimentation menée conjointement dans les deux espèces de rongeurs (NTP, 1982a et b), cette constatation repose sur la détection d'adénomes folliculaires de la thyroïde à la fois chez le rat avec une incidence de 20 % pour les deux sexes et chez la souris avec une incidence de 10 %, mais chez les femelles uniquement. Même non confirmée et suggérant l'implication de susceptibilités de lignées, cette observation n'est peut-être pas sans lien avec les altérations des fonctions thyroïdiennes qui ont été relevées lors de tests de toxicité chez l'animal.

Enfin, les deux dernières localisations tumorales signalées ne proviennent que de la principale expérimentation réalisée par Kociba et coll. (1978) sur le rat Sprague-Dawley. Il s'agit d'une part de tumeurs pulmonaires (15 %) chez les femelles traitées à la plus forte dose (0,1 µg/kg/j/2 ans) et d'autre part de carcinomes squameux du palais, des sinus et de la langue chez les femelles

Interprétations historiques des effets cancérogènes de la dioxine

Les qualificatifs de « plus puissant cancérogène connu » et de « cancérogène complet » sont attribués à la 2,3,7,8-TCDD dans de nombreuses publications, y compris les plus récentes. En fait, cette qualification résulte plus de la prise en compte des conditions d'expérimentation ou d'exposition que de l'examen des résultats. En effet, si les activités cancérogènes observées sont obtenues avec des doses effectivement très faibles, il est manifeste qu'elles sont essentiellement dues à la chronicité de traitements de longue durée dans lesquels l'application de doses plus élevées se traduirait par une importante létalité incompatible avec la latence élevée d'apparition des tumeurs. Ainsi, en évoquant la compréhension encore très limitée du mécanisme de la cancérisation hépatique par la 2,3,7,8-TCDD, Walker et coll. (2000) ont récemment montré dans une expérimentation d'initiation-promotion chez le rat Sprague-Dawley toute l'importance de la chronicité dans le déroulement du processus tumoral. Même si la 2,3,7,8-TCDD induit de nombreux effets à très faible dose, il faut noter que divers cancérogènes bien connus peuvent induire 100 % de tumeurs dans l'organe cible avec des latences de quelques mois, et ce après seulement quelques applications, certes à des doses plus élevées mais pas nécessairement massives. Ceci n'a jamais été observé avec la 2,3,7,8-TCDD y compris dans l'expérimentation chez le hamster dont la résistance particulière aux effets toxiques autorise l'application de doses cent fois supérieures.

Dans la définition de cancérogenèse chimiquement induite, un cancérogène « complet » est un composé qui réalise, à lui seul, les deux premières étapes du processus de cancérisation, l'initiation et la promotion. Nécessairement dépendante des processus de transformation métabolique du composé dans le tissu cible, l'initiation est considérée comme l'étape d'établissement de lésions stables dans l'ADN de ce tissu. À l'exception des alkylants directs, ceci suppose que, dans une phase dite d'activation, des entités réactives vis-à-vis des macromolécules cellulaires soient produites, à partir de la substance étrangère, sous l'action des systèmes enzymatiques de détoxification. Or, par sa structure, la 2,3,7,8-TCDD est résistante aux divers processus enzymatiques de détoxification (production très lente de dérivés hydroxylés), ce qui explique son maintien à long terme dans l'organisme. La 2,3,7,8-TCDD se révèle dénuée d'activité mutagène par le fait que, selon la propriété commune aux agents génotoxiques, elle n'induit pas, au moins directement par liaison covalente, de lésions dans l'ADN. Il est admis aujourd'hui que la dioxine n'est pas un « initiateur » classique et est rangée dans la catégorie des « cancérogènes non génotoxiques » où sont classés des composés reconnus pour être typiquement promoteurs.

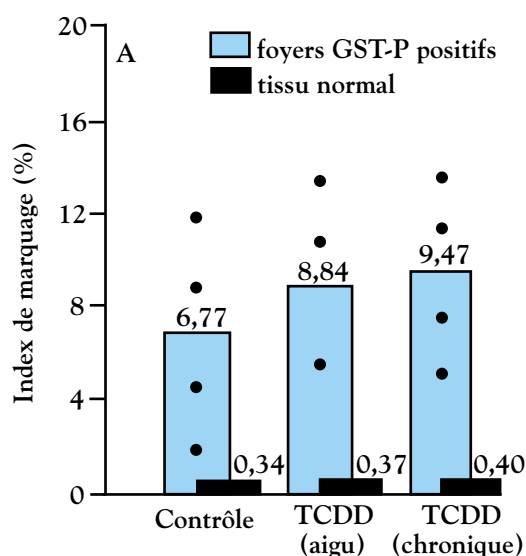
La possibilité d'une activité promotrice de la 2,3,7,8-TCDD a été envisagée dès 1978 et a fait depuis l'objet de nombreuses études récemment répertoriées et analysées par le Centre international de recherche sur le cancer (IARC,

1997). Avec des protocoles discutables quant au choix de la lignée, du cancérigène ou à la mise en œuvre supplémentaire, pour le foie, de l'hépatectomie partielle, ces expérimentations font état de résultats contradictoires qui, pour le moins, ne caractérisent pas de manière évidente l'activité promotrice de la 2,3,7,8-TCDD. Mais les résultats les plus récents apportent quelques informations suggérant de nouvelles hypothèses sur le mode d'action de ce contaminant.

En relation avec la susceptibilité plus marquée de la femelle chez le rat, Lucier et coll. (1991) constataient, après initiation par la diéthylnitrosamine (DEN), une réduction significative de la prolifération hépatocytaire dans le groupe de femelles ovariectomisées par rapport aux femelles normales également initiées et traitées dans les mêmes conditions par la 2,3,7,8-TCDD. Prenant en compte l'observation de Clark et coll. (1991) d'une altération par la 2,3,7,8-TCDD du facteur de croissance épidermique (EGF) chez des femelles normales et non chez les femelles ovariectomisées, Lucier et coll. (1993) suggéraient ultérieurement qu'une accentuation du métabolisme des œstrogènes par la 2,3,7,8-TCDD pourrait favoriser la prolifération tumorale dans laquelle l'EGF est reconnu pour jouer un rôle important. Cependant, cette hypothèse est mise en défaut chez la souris qui fait preuve d'une susceptibilité sexuelle inverse du rat à la cancérisation hépatique par la 2,3,7,8-TCDD.

Par définition, le processus multiétapes de cancérisation fait appel dès son origine à la réplication de l'ADN. Le doublement du génome qui, dans le foie, ne se traduit pas nécessairement par la division cellulaire mais par une augmentation de la ploïdie, aura pour conséquence de transformer des lésions non réparées en mutations susceptibles de se stabiliser ultérieurement. Ainsi, un brin d'ADN porteur de bases modifiées par la liaison covalente de molécules génotoxiques (adduits) sera recopié en un brin vierge d'adduits mais éventuellement porteur de mutations dues à un défaut de réplication. Pour la cellule impliquée, ceci se traduit par une réduction de moitié du niveau global d'adduits (par rapport à l'ADN contenu et au niveau initial d'adduits). Mettant à profit cet effet qui, au même titre que l'incorporation de thymidine tritiée ou de bromodésoxyuridine (BrdU), caractérise une synthèse d'ADN, Randerath et coll. (1988), en utilisant le postmarquage des adduits au radio-phosphore, constataient que le traitement de femelles de rat Sprague-Dawley par la 2,3,7,8-TCDD et la 1,2,3,7,8-PeCDD ne conduisait à aucun adduit attribuable aux composés mais entraînait, dans le foie et non dans le rein, une réduction significative du niveau global des adduits endogènes (*I-compounds*) dont l'accumulation tout au long de la vie dans l'ADN hépatique est habituellement observée chez les mammifères. En raison de la durée du traitement et de l'intensité relativement limitée de cet effet, ils ne concluaient pas en faveur de l'activité promotrice de la 2,3,7,8-TCDD mais à son intervention réductrice, par ailleurs plus efficace que celle de la 1,2,3,7,8-PeCDD, dans la formation œstrogène-dépendante de ces adduits.

L'étude de Stinchcombe et coll. (1995) sur les foyers prénéoplasiques hépatiques exprimant la glutathion transférase placentaire (GST-P), à la suite d'un traitement d'initiation par la diéthylnitrosamine chez des femelles de rat Wistar, fait également état, par l'évaluation de l'incorporation de BrdU dans les foyers et le tissu normal, de l'absence d'activité promotrice de la 2,3,7,8-TCDD, que ce soit après traitement chronique ou ponctuel (figure 9.1).



Figures 9.1 : Absence de promotion par la 2,3,7,8-TCDD (d'après Stinchcombe et coll., 1995) (GST-P : glutathion S-transférase placentaire)

(GST-P : glutathion S-transférase placentaire ; traitement aigu : 1,4 µg/kg en 1 injection sc trois jours avant le sacrifice ; traitement chronique : 1,4 µg/kg tous les 15 jours pendant 115 jours)

Mais l'intérêt majeur de cette étude réside dans la mise en évidence dans ces mêmes foyers d'une inhibition de l'apoptose qui se révèle déjà significative pour un traitement court par la 2,3,7,8-TCDD et remarquablement importante à la suite d'un traitement chronique (figure 9.2). Bien que le mécanisme par lequel la 2,3,7,8-TCDD se montre capable d'agir sur la régulation des gènes impliqués dans le processus apoptotique ne soit pas établi, la seule caractérisation du phénomène ouvre de nouvelles perspectives sur sa participation dans un processus de cancérisation. Récemment reprise dans une étude sur la croissance en culture d'hépatocytes normaux et de nodules pré-tumoraux (Bock et coll., 2000) et surtout dans une analyse mécanistique du processus possible (Schwarz et coll., 2000), c'est cette hypothèse qui retient aujourd'hui le plus d'attention.

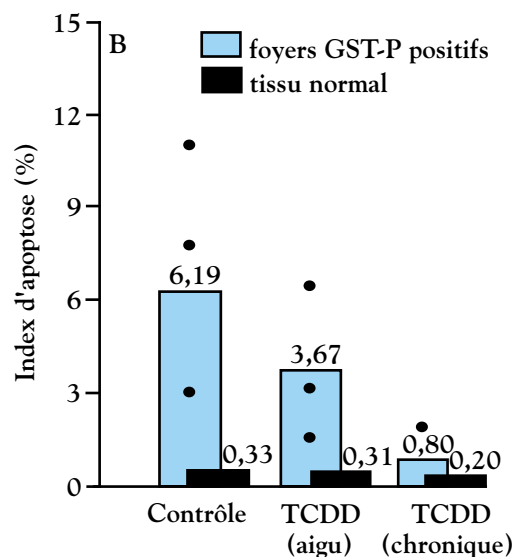


Figure 9.2 : Inhibition de l'apoptose par la 2,3,7,8-TCDD (d'après Stinchcombe et coll., 1995)

(GST-P : glutathion S-transférase placentaire ; traitement aigu : 1,4 µg/kg en 1 injection sc trois jours avant le sacrifice ; traitement chronique : 1,4 µg/kg tous les 15 jours pendant 115 jours))

Malgré toutes les incertitudes persistant sur le véritable mode d'action de la 2,3,7,8-TCDD, le Centre international de recherche sur le cancer considère dans son dernier rapport (IARC, 1997) que l'ensemble des données enregistrées dans les différentes expérimentations constitue une « évidence suffisante » pour une activité cancérogène de la 2,3,7,8-TCDD chez l'animal. Sans prétendre être exhaustive, l'analyse qui vient d'être faite des aspects les plus marquants de ces données montre que le processus d'expression de cette activité ne répond pas aux modèles classiques de l'induction tumorale.

Hypothèses sur un possible mode d'action de la 2,3,7,8-TCDD

Au cours des quinze dernières années, de nombreux effets de la 2,3,7,8-TCDD sur des expressions de fonctions cellulaires ont été caractérisés. Parfois manifestées par certains des composés polyhalogénés qui lui sont associés, ces activités en majorité très ciblées sont, ou peuvent être, impliquées à différents niveaux du déclenchement et de l'évolution du processus de cancérisation. Parmi ces effets, le plus important est incontestablement l'activation du

efficace que la majorité des hydrocarbures aromatiques qui, par cette voie, agissent comme inducteurs de fonctions enzymatiques. En même temps que les très nombreuses expressions de gènes et de fonctions reconnues comme dépendantes du récepteur Ah, la 2,3,7,8-TCDD est ainsi un puissant inducteur des cytochromes 1A1 et 1A2, très impliqués dans les processus oxydatifs de transformation métabolique de substances étrangères mais aussi de composés endogènes tels que les œstrogènes.

Sur cette base, ainsi qu'à partir des observations évoquées plus haut, il devient possible d'avancer quelques hypothèses sur un éventuel mode d'action de la dioxine en tant que composé cancérogène.

Hypothèse métabolique

Il pourrait y avoir formation sur l'ADN de lésions mutagènes de type oxydatif (Tritscher et coll., 1995) résultant d'une accentuation de processus métaboliques radicalaires due à l'induction massive, *via* le récepteur Ah (AhR) dont la 2,3,7,8-TCDD est un puissant ligand, des cytochromes 1A impliqués dans la transformation métabolique de substances endogènes telles que les œstrogènes ou le métabolisme de détoxification de xénobiotiques.

Hypothèse promotionnelle élargie

En admettant que la promotion n'est pas exclusivement une phase proliférative marquée par le déclenchement d'une synthèse d'ADN, mais qu'elle comprend également la notion de sélection, l'inhibition de l'apoptose induite par la 2,3,7,8-TCDD favorise la survie de cellules initiées par d'autres voies, ces cellules porteuses de lésions pouvant ultérieurement entrer dans le processus divisionnel de cancérisation.

Hypothèse cytotoxique

Les effets cytotoxiques à bas niveau de la 2,3,7,8-TCDD induisent une prolifération régénérative discrète qui favorise la fixation en mutations de lésions produites dans l'ADN par d'autres voies.

Il est peut-être intéressant de noter que ces hypothèses qui découlent d'observations expérimentales ciblées ne sont pas contradictoires et peuvent jouer conjointement.

Dans tous les cas, une contribution d'autres congénères PCDD, mais aussi des PCDF et même des PCB à l'expression de l'activité de la 2,3,7,8-TCDD ne peut être exclue si on considère que ces composés, malgré une demi-vie plus courte, présentent, à plus fortes doses et sans être considérés comme des cancérogènes, des activités biologiques et toxiques très comparables.

Il reste que certains effets de la 2,3,7,8-TCDD demeurent très mal compris et pourraient être interprétés comme activité bénéfique. Il a ainsi été récemment

montré (Taras-Valéro et coll., 1998) qu'un prétraitement des animaux par une seule dose de 2,3,7,8-TCDD, 48 h avant l'application d'un hépatocarcérogène strict très actif chez la souris, inhibe totalement la formation des adduits du composé à l'ADN hépatique et, du même coup, la cancérisation hépatique qui résulte ultérieurement de cette adduction initiale. Cette observation pourrait rejoindre celle faite vingt ans plus tôt par Cohen et coll. (1979), qui ont observé une diminution de l'incidence tumorale lorsque de la dioxine était administrée conjointement aux deux puissants sarcomogènes que sont le benzo[a]pyrène et le 7,12-diméthylbenzanthrène.

En conclusion, les études de cancérogenèse ont été réalisées essentiellement avec la 2,3,7,8-TCDD chez les rongeurs (rat, souris, hamster). Le foie est la principale cible de cancer, mais d'autres sites (thyroïde, poumons, cavité orale) peuvent être également concernés. L'incidence moyenne des tumeurs (adénomes et carcinomes) est proche de 50 % et fait apparaître une susceptibilité très marquée selon le sexe.

La qualification de cancérogène complet pour la 2,3,7,8-TCDD par l'US Environmental Protection Agency (US EPA) fait référence au fait que des doses très faibles induisent des cancers après une administration sur une longue période. Cependant, la 2,3,7,8-TCDD n'est pas mutagène et n'induit pas directement de lésions sur l'ADN, contrairement à la capacité commune des agents génotoxiques. Le mécanisme d'action n'est pas encore élucidé.

BIBLIOGRAPHIE

- BOCK KW, GSCHLIDMEIER H, BOCK-HENNING BS, ERIKSSON LC. Density-dependent growth of normal and nodular hepatocytes. *Toxicol Lett* 2000, **144** : 51-56
- CLARK G, TRITSCHER A, MARONPOT R, FOLEY R, LUCIER G. Tumor promotion by TCDD in female rats. In : *Banbury Report 35 : Biological Basis for Risk Assessment of Dioxin and Related Compounds*. GALLO M, SCHEUPLEIN R, VAN DER HEIJDEN K, Eds. Cold Spring Harbor Laboratory, 1991 : 389-404
- COHEN GM, BRACKEN WM, IYER RP, BERRY DL, SELKIRK JK, SLAGA TJ. Anticarcinogenic effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin on benzo[a]pyrene and 7,12-dimethylbenzo[a]anthracene tumor initiation and its relationship to DNA binding. *Cancer Res* 1979, **39** : 4027-4033
- DELLA PORTA G, DRAGANI TA, SOZZI G. Carcinogenic effects of infantile and long term 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin treatment in the mouse. *Tumori* 1987, **73** : 99-107
- GOODMAN DG, SAUER RM. Hepatotoxicity and carcinogenicity in female Sprague-Dawley rats treated with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) : a pathology working group reevaluation. *Regul Toxicol Pharmacol* 1992, **15** : 245-252
- IARC. Polychlorinated dibenzo-*para*-dioxins and polychlorinated dibenzofurans. *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans* 1997, **69** : 665 p

JOHNSON R, TIETGE J, BOTTS S. Carcinogenicity of 2,3,7,8-TCDD to Medaca. (Abstract No 476). *Toxicologist* 1992, **12** : 138

KEENAN RE, PAUSTENBACH DJ, WENNING RJ, PARSONS AH. Pathology reevaluation of the Kociba et coll., (1978) bioassay of 2,3,7,8-TCDD : implications for risk assesment. *J Toxicol Environ Health* 1991, **34** : 279-296

KOCIBA RJ, KEYES DG, BEYER JE, CARREON RM, WADE CE et coll. Results of a two-year chronic toxicity andoncogenicity study of 2,3,7,8-TCDD in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 1978, **46** : 279-303

LUCIER G, CLARK G, HIERMATH C, TRITSCHER A, SEWALL C, HUFF J. Carcinogenicity of TCDD in laboratory animals : implications for risk assessment [published erratum appears in *Toxicol Ind Health* 1994, **10** : 247]. *Toxicol Ind Health* 1993, **9** : 631-668

LUCIER G, TRITSCHER A, GOLDSWORTHY T, FOLEY R, CLARK G et coll. Ovarian hormones enhance 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-mediated increases in cell proliferation and preneoplastic foci in two-stage model for rat hepatocarcinogenesis. *Cancer Res* 1991, **51** : 1391-1397

NTP. (United States National Toxicology Program). Carcinogenesis Bioassay of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (Cas No. 1746-01-6) in Osborne-Mendel Rats and B6C3F1 Mice (Gavage Study). Tech Rep Series No 209. DHEW Publication No (NIH) 82-1765. Research Triangle Park, NC, 1982a

NTP. (United States National Toxicology Program). Carcinogenesis Bioassay of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (Cas No. 1746-01-6) in Swiss-Webster Mice (Dermal Study). Tech. Rep. Series No 201. DHEW Publication No (NIH) 82-1757. Research Triangle Park, NC, 1982b

PERIN F, PERIN-ROUSSEL O, TARAS-VALERO D, MOUTON D, COVELLI V, ZAJDELA F. Inversion of genetic predisposition to carcinogenesis in liver of two lines of mice selected for resistance (Car-R) or susceptibility (Car-S) to skin carcinogenesis. *Cancer Lett* 1998, **132** : 79-88

RANDERATH K, PUTMAN KL, RANDERATH E, MASON G, KELLEY M, SAFE S. Organ-specific effects of long term feeding of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and 1,2,3,7,8-pentachlorodibenzo-*p*-dioxin on I-compounds in hepatic and renal DNA of female Sprague-Dawley rats. *Carcinogenesis* 1988, **9** : 2285-2289

RAO MS, SUBBARO V, PRASAD J, SCARPELLI D. Carcinogenicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in the Syrian golden hamster. *Carcinogenesis* 1988, **9** : 1677-1679

SCHWARZ M, BUCHMAN A, STINCHCOMBE S, KALKUHL A, BOCK KW. Ah receptor ligands and tumor promotion : survival of neoplastic cells. *Toxicol Lett* 2000, **112-113** : 69-77

STINCHCOMBE S, BUCHMANN A, BOCK KW, SCHWARZ M. Inhibition of apoptosis during 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-mediated tumour promotion in rat liver. *Carcinogenesis* 1995, **16** : 1271-1275

TARAS-VALERO D, PERIN-ROUSSEL O, PLESSIS MJ, PERIN F. Inhibition of 5,9-dimethyldibenzo[c,g]carbazole adduct formation in mouse liver by pretreatment with cytochrome P450 1A inducers *in vivo*. *Environ Mol Mutag* 1998, **32** : 314-324

TOTH K, SOMFAI-RELLE S, SUGAR J, BENEC J. Carcinogenicity testing of herbicide 2,4,5-trichlorophenoxyethanol containing dioxin and of pure dioxin in Swiss mice. *Nature* 1979, **278** : 548-549

TRITSCHER AM, CLARK GC, SEWALL C, SILLS RC, MARONPOT R, LUCIER GW. Persistence of TCDD-induced hepatic cell proliferation and growth of enzyme altered foci after chronic exposure followed by cessation of treatment in DEN initiated female rats. *Carcinogenesis* 1995, **16** : 2807-2811

VALERO D, PERIN F, PLESSIS MJ, ZAJDELA F. Sexual differences in the expression of gamma-glutamyl transpeptidase during 5,9-dimethyldibenzo[c,g]carbazole-induced hepatocarcinogenesis in mice. *Cancer Lett* 1985, **27** : 181-197

WALKER NJ, TRITSCHER AM, SILLS RC, LUCIER GW, PORTIER CJ. Hepatocarcinogenesis in female Sprague-Dawley rats following discontinuous treatment with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Toxicol Sci* 2000, **54** : 330-337

III

Effets toxiques chez l'homme

10

Évaluation de l'imprégnation humaine

Les progrès analytiques réalisés au cours des dernières décennies permettent actuellement de détecter les congénères PCDD et PCDF à des concentrations de l'ordre du pg (ppt) dans diverses matrices biologiques, dont les tissus humains (Schechter, 1998 ; Jensen, 1987). En appliquant ces méthodes de dosage, il est actuellement possible d'évaluer biologiquement l'imprégnation humaine par les dioxines (Schlatter, 1994 ; Greim et coll., 1995 ; Larsen, 1995). Le but du présent chapitre est de résumer l'ensemble des données disponibles concernant l'intérêt et les limites du dosage des dioxines dans le sang, le lait maternel ou le tissu graisseux sous-cutané ou abdominal en vue d'évaluer l'imprégnation humaine par ces substances.

La première mesure des dioxines chez l'homme fut réalisée par Robert Baughman au début des années soixante-dix (Schechter, 1998). Ce chercheur démontra la présence d'importantes concentrations (1 450 pg TEQ/g ou ppt) de 2,3,7,8-TCDD dans la fraction graisseuse du lait maternel de femmes du Sud-Viêtnam exposées à l'agent orange, un mélange de phénoxy-herbicides utilisés comme défoliant et contaminés par de la 2,3,7,8-TCDD (Baughman et Meselson, 1973). Ultérieurement, le dosage de divers congénères PCDD et PCDF dans différents tissus biologiques permit de confirmer la contamination par des dioxines des victimes de l'accident de Yusho en 1978 (Rappe, et coll., 1978) et de démontrer la présence de congénères PCDD et PCDF dans le sang de travailleurs affectés à la production de chlorophénols (Rappe et coll., 1982). C'est au début des années quatre-vingt que furent réalisées les premières mesures de 2,3,7,8-TCDD dans des échantillons de tissus adipeux, prélevés chez des vétérans de la guerre du Viêtnam considérés par les autorités américaines comme ayant été exposés à l'agent orange (Gross et coll., 1984), ainsi que chez des pompiers exposés aux dioxines (essentiellement de type PCDF) lors de l'incendie d'un transformateur contenant des PCB dans un bâtiment du gouvernement à Binghamton, New York en 1981. C'est à cette occasion également que l'on documenta pour la première fois la présence, jusque-là insoupçonnée, de dioxines dans les tissus biologiques (sang et tissu adipeux) d'un échantillon de la population générale américaine servant de groupe témoin. Ces diverses études ont clairement mis en évidence le caractère persistant de certains congénères PCDD et PCDF. Une charge corporelle

élevée en 2,3,7,8-TCDD a en effet été documentée près de trente ans après la fin de l'exposition au sein de certains groupes fortement exposés dans le cadre professionnel ou environnemental. Pour des expositions plus faibles ou impliquant des congénères moins persistants (congénères moins substitués), diverses études ont démontré que les concentrations se normalisent généralement en un laps de temps plus court compris entre quelques mois et quelques années suggérant que chaque congénère subit un métabolisme particulier.

C'est à la suite de l'incendie de Binghamton que furent introduites les bases conceptuelles permettant d'estimer la toxicité globale du mélange complexe de PCDD et de PCDF présents dans diverses matrices. Il fut en effet demandé aux autorités et aux scientifiques américains de l'époque d'établir des normes qui permettraient d'autoriser l'utilisation des bâtiments contaminés lors de l'incendie. Sur la base d'études réalisées *in vivo* et *in vitro* ainsi que d'estimations théoriques, un facteur de toxicité relative vis-à-vis de la 2,3,7,8-TCDD fut attribué à chacun des 7 congénères PCDD et aux 10 congénères PCDF. Ces facteurs d'équivalences ou TEF (*dioxin toxic equivalency factor*) sont couramment sujets à des modifications en fonction de l'évolution des connaissances de la toxicité relative de chacun des congénères. La valeur du facteur d'équivalence est comprise entre 1 pour les congénères les plus actifs ou ayant une toxicité comparable à la 2,3,7,8-TCDD et 0,0001 pour les congénères les moins actifs. L'activité biologique et/ou toxique du mélange est calculée en réalisant la somme de la concentration de chacun des congénères préalablement multipliée par son facteur d'équivalence. La somme ainsi calculée, appelée classiquement équivalent toxique ou TEQ (*toxic equivalent*) fournit une estimation de l'activité biologique dioxine du mélange. Il est important de rappeler que les congénères PCDD et PCDF non substitués en position latérale (2,3,7 et 8) et rarement retrouvés dans les milieux biologiques humains, ont un facteur d'équivalence toxique de 0 (Van den Berg et coll., 1998).

Évaluation de l'imprégnation en population générale

L'évaluation de l'imprégnation humaine aux dioxines repose classiquement sur la quantification des 17 congénères substitués en position latérale 2,3,7,8 et présents dans la fraction grasseuse de divers tissus biologiques (sang, lait maternel, graisse abdominale ou sous-cutanée). Au cours de la dernière décennie, cette méthode a permis d'établir le niveau moyen de contamination de la population générale de divers pays sur plusieurs continents et d'établir le profil des congénères PCDD et PCDF dans différents tissus.

Lait maternel

146 Les principales données permettant une comparaison de l'imprégnation par les dioxines de la population générale des divers pays européens concernent le

lait maternel. Ces données sont essentiellement issues d'une vaste étude de l'Organisation mondiale de la santé (OMS) dont la première campagne de dosages fut réalisée en 1986-1988 et la seconde en 1992-1993. Ces données sont disponibles pour un nombre limité de pays (Autriche, Belgique, Danemark, Finlande, Allemagne, Pays-Bas, Espagne, Suède et Grande-Bretagne). Indépendamment des campagnes OMS, les concentrations en dioxines dans le lait maternel ont été documentées dans le cadre d'autres études pour différents pays (France, Italie). Dans le cadre de la campagne OMS, les dosages ont été réalisés sur des pools d'échantillons et suivant un protocole standardisé autorisant diverses comparaisons (Stephens et coll., 1992). Les résultats sont repris dans le tableau 10.I. Exprimées sous formes de TEQ, les concentrations moyennes sont comprises entre 15 et 40 pg TEQ/g de matières grasses. L'analyse comparative entre les deux campagnes de dosages met clairement en évidence que les concentrations en dioxines sont généralement plus élevées au sein des échantillons issus de zones urbaines par rapport aux zones rurales. En outre, une diminution importante de l'imprégnation a été observée au cours de la période d'observation. Cette diminution a été confirmée dans le cadre d'autres études. Cette diminution est comprise entre 8 % et 10 % par an (Becher et coll., 1995 ; Lunden et coll., 1998). Les concentrations mesurées dans le lait en Europe ne diffèrent pas de celles documentées dans d'autres pays industrialisés (Japon, Canada) (Ryan et coll., 1993 ; Hashimoto et coll., 1995).

Tableau 10.I : Concentrations des dioxines dans le lait maternel en Europe

Pays	Région/Source	Echantillon	Années	Concentrations pg TEQ/g de matières grasses			Nombre	Référence
				Moy	Min	Max		
Autriche	Tulin/R	P	1988	18,6			51	OMS, 1989
	Tulin/R	P	1993	10,9			21	OMS, 1996
	Vienne/U	P	1988	17,1			54	OMS, 1989
	Vienne/U	P	1993	10,7			13	OMS, 1996
	Brixlegg/P	P	1993	14,0			13	OMS, 1996
	Brixlegg	I	1993	9,3-45,9			5	OMS, 1996
Belgique	Brabant/R	P	1988	33,7				OMS, 1989
	Brabant/R	P	1993	20,8			8	OMS, 1996
	Bruxelles/U	P	1988	38,8				OMS, 1989
	Bruxelles/U	P	1993	26,6			6	OMS, 1996
	Liège/Ind	P	1988	40,2				OMS, 1989
	Liège/Ind	P	1993	27,1			20	OMS, 1996

Dioxines dans l'environnement. Quels risques pour la santé ?

Pays	Région/Source	Echantillon	Années	Concentrations pg TEQ/g de matières grasses			Nombre	Référence
				Moy	Min	Max		
	Flandres	I	1992	34,7			9	Van Cleuvenbergen et coll., 1994
Danemark	7 villes	P	1988	17,8			42	WHO, 1989
	7 villes	P	1993	15,2			48	WHO, 1996
	7 villes	I	1993	17,1	11,9	22,5	4	WHO, 1996
Finlande	Kuopio/R	I	1987	20,1			37	Vartiainen et coll., 1997
	Kuopio/R	P	1988	15,5			31	WHO, 1989
	Kuopio/R	P	1993	12,0			24	WHO, 1996
	Kuopio/R	I	1992-1994	13,6			28	Kiviranta et coll., 1998
	Helsinki/U	P	1988	18,0			38	WHO, 1989
	Helsinki/U	P	1993	21,5			10	WHO, 1996
	Helsinki/U	I	1987	26,3			47	Vartiainen et coll., 1997
	Helsinki/U	I	1992-1994	19,9			14	Kiviranta et coll., 1998
France	Paris/U	I	1990	20,1			15	Gonzalez et coll., 1996
	8 zones	I	1998-1999	16,4	6,5	34,3	244	InVS/CAREPS, 2000
Allemagne	Est/R	I	1990-1991	23	15	30	499	Alder et coll., 1994
	Ouest/U	I	1991	30,6	5,6	87	728	Beck et coll., 1994
	Berlin/U	P	1988	32,0			40	WHO, 1989
	Berlin/U	P	1993	16,5			10	WHO, 1996
	Westphalie/Ind	P	1988	31,6			79	WHO, 1989
	Westphalie/Ind	I	1992	20,5	3,5	39	56	CLUA, 1992
	Westphalie/Ind	I	1993	20,9	5,3	37,6	78	CLUA, 1993
	Westphalie/Ind	I	1994	17,2	4,9	30,3	50	CVUA, 1994
	Westphalie/Ind	I	1995	16,1	6,0	30,3	38	CVUA, 1995
	Westphalie/Ind	I	1996	14,1	4,9	30,5	22	CVUA, 1996
	Westphalie/Ind	I	1997	12,0	9,7	16,9	9	CVUA, 1997
Italie	Pavie/R	P	1987	31			9	Schechter et coll., 1992
	Rome/U	P	1987	22			9	Schechter et coll., 1992
	Florence/R-U	P	1987	29			27	Schechter et coll., 1992
	Milan/U	P	1987	18			14	Schechter et coll., 1992
Pays-Bas	Toutes régions	I	1993	22,4	10,2	35,9	17	WHO, 1996
	R	P	1988	37,4			13	WHO, 1989
	U	P	1992	39,6			13	WHO, 1989
	Rotterdam/U	I	1992	30,2			176	Koopman et coll., 1994
Espagne	Gipuzkoa/R	P	1993	25,5			10	WHO, 1996
	Bizkaia/U	P	1993	19,4			19	WHO, 1996
	Madrid/Ind	I	1990	13,3			13	Gonzalez et coll., 1998

Pays	Région/Source	Echantillon	Années	Concentrations pg TEQ/g de matières grasses			Nombre	Référence
				Moy	Min	Max		
Suède	Tarragone/I	I	1996	11,8	5,9	17,1	15	Schumacher et coll., 1999
	Borlänge/R	I	1985-1986	20,1			10	WHO, 1989
	Gothenburg/U	I	1985-1986	22,8			10	WHO, 1989
	Sundsvall/Ind	I	1985-1986	22,6			10	WHO, 1989
	Uppsala/Incinérateur	I	1985-1986	22,4			10	WHO, 1989
	Stockholm	P	1972	43			75	Lunden et Noren, 1998
	Stockholm	P	1980	20			340	Lunden et Noren, 1998
Grande-Bretagne	Stockholm	P	1992	18			40	Lunden et Noren, 1998
	Birmingham/U	P	1988	37,0			40	WHO, 1989
	Birmingham/U	P	1993	17,9			20	WHO, 1996
	Birmingham/U	P	1993-1994	21			20	MAFF, 1996
	Glasgow/U	P	1988	29,1			40	WHO, 1989
	Glasgow/U	P	1993	15,2			23	WHO, 1996
	Glasgow/U	P	1993-1994	21			20	MAFF, 1996
	Cambridge/U	P	1993-1994	24			20	MAFF, 1996

R = régions rurales, U = région urbaine, Ind = régions industrielles, I = échantillons individuels, P = échantillons poolés.

Tableau consultable sur le site <http://www.europa.eu.int/comm/environment/dioxin/index.htm>

Sang

Par rapport au lait maternel, un nombre plus faible d'études ont évalué les concentrations sanguines en dioxines au sein de diverses populations européennes. Cela s'explique essentiellement par les difficultés analytiques que représente le dosage des dioxines dans ce milieu biologique. Un nombre limité de laboratoires sont en effet actuellement capables de réaliser ces mesures d'une façon reproductible et valide en utilisant des standards connus et une instrumentation adaptée. En outre, compte tenu de la faible teneur en graisses (0,5 %) du sérum, la quantité totale de sang requise pour réaliser le dosage des 17 congénères est généralement comprise entre 50 et 100 ml, ce qui peut constituer un facteur limitant important. Les principales données concernant le dosage des dioxines circulantes en Europe sont issues de Finlande, d'Allemagne et d'Espagne (tableau 10.II). Les plus extensives concernent sans conteste l'Allemagne où les concentrations en dioxines dans le sérum font l'objet d'un suivi régulier depuis 1988. Les concentrations relevées sont généralement comprises entre 20 et 40 pg TEQ/g de matières grasses. Ces valeurs sont très proches de celles mesurées dans le lait maternel. Une étude réalisée de 1991 à 1996 (Wittsiepe et coll., 2000) sur des échantillons de sang provenant d'une population d'hommes de 10 à 80 ans montre une diminution

Tableau 10.II : Concentrations sanguines des dioxines en Europe

Pays	Année	Effectif	Âge (ans)	Concentrations (pg TEQ/g de matières grasses)			Références
				Moy	Max	Min	
Finlande	1989-90	14	41	49	20	99	Rosenberg et coll., 1995
	1993	18	43	37	26	86	Kontsas et coll., 1998
Allemagne	1988	10	-	46,3			Päpke et coll., 1989
	1989	102	37	40,8	11,6	93,5	Päpke et coll., 1992
	1992	44	37	26,0	12,0	61,0	Päpke et coll., 1993
	1993	70	37	21,7	10,3	48,8	Päpke et coll., 1994
	1994	134	40,4	19,1	5,2	43,9	Päpke et coll., 1996
	1996	180	36,7	16,5	7,0		Päpke et coll., 1997
Espagne	1997	20	42	27,0	14,8	48,9	Schumacher et coll., 1999

des concentrations de dioxines sur la période étudiée d'environ 12 % par an et confirme l'augmentation des concentrations de dioxines en fonction de l'âge. Des concentrations très semblables en dioxines ont été documentées dans d'autres pays industrialisés (États-Unis, Japon) (Patterson et coll., 1994 ; Iida et coll., 1999a et c).

Tissu adipeux

C'est au niveau du tissu adipeux que furent historiquement réalisés les premiers dosages de dioxines dans les tissus biologiques humains. Le tissu adipeux constitue un milieu adéquat pour le dosage de substances lipophiles telles que les dioxines. Peu d'études ont toutefois utilisé cette matrice biologique afin d'évaluer l'imprégnation de la population générale. Les données disponibles concernent des dosages réalisés au niveau d'échantillons de graisse abdominale ou sous-cutanée généralement prélevés chez des personnes hospitalisées. Des concentrations moyennes en dioxines dans le tissu graisseux proches de 50 pg TEQ/g de matières grasses ont été documentées dans les années quatre-vingt en Allemagne et proches de 18,6 pg TEQ/g de matières grasses dans la graisse abdominale en Suède en 1994-1995. Plus récemment, des concentrations en dioxines moyennes de 30,9 pg TEQ/g de matières grasses ont été déterminées dans des échantillons de tissu adipeux prélevés lors d'autopsies en Espagne (Schuhmacher et coll., 1999) (tableau 10.III). Ces données confirment toutefois les observations faites au niveau du lait maternel et du sang en ce qui concerne l'imprégnation par les dioxines. Par rapport à ces deux milieux biologiques, les concentrations en dioxines dans le tissu adipeux semblent être fortement influencées par l'âge. Cela semble devoir s'expliquer par l'accumulation des dioxines dans ce tissu. Des données plus exhaustives concernant le dosage des dioxines dans 865 échantillons de tissu adipeux issus de la population générale ont été accumulées en 1987 aux États-Unis dans le cadre d'une

Tableau 10.III : Concentrations des dioxines dans le tissu adipeux

Pays	Année	Effectif	Concentrations (pg TEQ/g de matières grasses)			Références
			Moy	Max	Min	
France	1990	8	32,1			Huteau et coll., 1990
Allemagne	1990	28	50,0	25,4	107,4	Mücke et coll., 1990
		28	9,8	2,3	24,8	Mücke et coll., 1990
Espagne	1990	17	41,8	4,1	82,9	Gonzalez et coll., 1993
	1996	15	31,0	13,4	69,4	Schumacher et coll., 1999
Suède	1993-95	19	24			Hardell et coll., 1996
	1994-95	17	18,6			Hardell et coll., 1996
Etats-Unis	1987	865	32,6*			US EPA, 1991

* résultat basé sur l'analyse de 48 échantillons constitués à partir de 865 prélèvements

vaste étude conduite par l'US *Environmental Protection Agency* (US EPA, 1991) (Orban et coll., 1994).

Évaluation de l'imprégnation en milieu professionnel

Le dosage biologique des dioxines a permis d'évaluer la nature et le degré d'imprégnation par les dioxines de diverses populations de travailleurs exposés dans le cadre de diverses activités industrielles où les PCDD et PCDF interviennent comme contaminants.

Production de chlore et de chlorure de vinyle

La production de chlore par l'hydrolyse de chlorure de sodium (procédé chloralcalin) au contact d'électrodes au graphite de même que la production de chlorure de vinyle par chloration ou oxychloration d'éthylène entraînent la formation de dioxines avec un profil de congénères où dominent les dérivés PCDF (*chlorine pattern*) (Rappe et coll., 1991 ; Stringer et coll., 1995). Dans ce contexte, diverses études ont évalué le degré d'imprégnation des travailleurs affectés à ces productions. Il a été démontré que, alors qu'il n'y avait pas de différence d'imprégnation en dioxines exprimée sous forme d'équivalents toxiques par rapport au groupe contrôle, les travailleurs exposés présentaient une distribution caractéristique des congénères caractérisée par une élévation des concentrations de divers congénères PCDF hexa- ou heptachlorés (1,2,3,4,6,7,8-HpCDF, 1,2,3,4,7,8- et 1,2,3,6,7,8-HxCDF) (Hansson et coll., 1997). Cette étude confirme les observations semblables faites au sein d'une population finlandaise de travailleurs également affectée à la production de chlorure de vinyle (Vartiainen et Tuomisto, 1994). Ces données suggèrent que

l'analyse du profil des congénères permet de mettre en évidence une exposition professionnelle aux dioxines.

Production et manipulation de chlorophénols

L'imprégnation de travailleurs exposés aux dioxines lors de la production et la manipulation de chlorophénols a été évaluée dans le cadre de diverses études (Patterson et coll., 1989 ; Neuberger et coll., 1991 ; Johnson et coll., 1992 ; Päpke et coll., 1992 ; Ott et coll., 1993). Une imprégnation marquée par les dioxines (56 pg TEQ/g de matières grasses essentiellement sous forme de 2,3,7,8-TCDD et 1,2,3,7,8-PeCDD) a été mise en évidence parmi les travailleurs d'une usine de production suédoise d'acide 2,4,5-trichlorophénoxyacétique 16 à 21 ans après l'interruption des activités professionnelles par rapport à la population de référence dont l'imprégnation moyenne était de 21 pg TEQ/g de matières grasses (Littorin et coll., 1994). La détection d'une élévation du congénère 1,2,3,7,8-PeCDD au sein de cette population suggère toutefois une contamination par des dioxines issues d'autres procédés chimiques que la synthèse de 2,4,5-T. En effet, classiquement la 2,3,7,8-TCDD est l'unique contaminant de type dioxine formé lors de la synthèse du 2,4,5-trichlorophénol (TCP) et de l'acide trichlorophénoxyacétique. D'autres congénères PCDD et PCDF sont toutefois formés lors de la synthèse des autres chlorophénols (pentachlorophénol). Alors que la 2,3,7,8-TCDD prédomine dans l'agent orange, des congénères plus chlorés de type PCDD et PCDF, contenant entre 5 et 8 atomes de chlore, sont en effet retrouvés dans les chlorophénols utilisés comme fongicides et protecteurs du bois.

Scieries

Les chlorophénols ont été largement utilisés comme fongicides et protecteurs du bois. Ces produits contiennent divers contaminants dont des dioxines, essentiellement du type PCDF, plus particulièrement les congénères heptachlorés. Dans le cadre d'une étude récente, les niveaux d'imprégnation par les dioxines des travailleurs de plusieurs scieries utilisant ces fongicides (42 pg TEQ/g de matières grasses) ne différaient pas de ceux de la population générale (40 pg TEQ/g de matières grasses). Le profil des congénères trouvés chez des travailleurs professionnellement exposés était toutefois caractérisé par une élévation du 1,2,3,4,6,7,8-heptaCDF, le principal contaminant présent dans la préparation des chlorophénols utilisés (Kontsas et coll., 1998).

Industrie du papier

Le blanchiment du papier par le chlore entraîne la formation de dioxines, essentiellement de congénères tétrachlorés. Aucune différence en termes d'imprégnation par les dioxines tant en ce qui concerne les PCDD que les PCDF ne fut mise en évidence entre les travailleurs de diverses usines de

production de pâte à papier (21,1 et 18,1 pg TEQ/g de matières grasses) par rapport à la population générale (19,1 pg TEQ/g de matières grasses) (Tepper et coll., 1997). En ce qui concerne le profil des congénères, une légère augmentation des congénères hexa- et heptaCDD semble toutefois devoir être attribuée à l'exposition professionnelle. Ces résultats confirment une étude antérieure qui n'avait pas objectivé de différence d'imprégnation (Rosenberg, et coll., 1994).

Production de magnésium métallique

La production de magnésium implique diverses étapes dont des procédés de chloration et d'électrolyse qui entraînent la formation de divers composés organochlorés dont les dioxines (Oehme et coll., 1989). Selon une étude récente, les travailleurs d'une telle usine présentaient des concentrations en dioxines nettement plus élevées (60 pg TEQ/g de matières grasses) que celles du groupe contrôle (25 pg TEQ/g de matières grasses) et un profil des congénères caractérisé par une élévation marquée de divers congénères PCDF (essentiellement les dérivés hexa-, hepta- et l'octaCDF, un congénère rarement retrouvé en fortes concentrations dans les tissus biologiques). Il est intéressant de noter que de faibles concentrations de 1,2,3,4,6,8,9-HpCDF (un congénère non substitué en 2,3,7,8) furent détectées dans le sang de certains individus alors qu'il est bien établi que les congénères non substitués en position 2,3,7,8 sont très rarement retrouvés dans les tissus biologiques. L'élévation de l'OCDF documentée dans cette étude semble être assez typique de l'exposition professionnelle aux dioxines formées lors de production de magnésium. En outre, cette étude a mis en évidence que la prédominance des congénères PCDF par rapport aux PCDD augmente avec la durée d'exposition tel que suggéré par la corrélation positive entre le rapport PCDF/PCDD et le nombre d'années d'activité dans l'usine (Hansson et coll., 1995).

Métallurgie et recyclage des métaux

Les travaux de soudure et de découpe de pièces métalliques réunissent un ensemble de conditions propices à la formation de dioxines : température élevée, présence de substances organiques chlorées (telles que des PCB présents dans des peintures ou des huiles ou des PVC présents dans les gaines d'enrobage de câbles) et de métaux lourds agissant comme catalyseurs. Des concentrations élevées de penta-, hexa- et heptaCDF ont été documentées parmi les travailleurs d'une usine de recyclage de métaux par rapport à la population générale (Päpke et Ball, 1992). De même, une élévation de la charge corporelle en dioxines a été documentée parmi les travailleurs ayant plus d'un an d'activité dans une usine de recyclage et de découpe de pièces métalliques (coupeurs : 44,1 ; 25,1 pg TEQ/g de matières grasses et soudeurs : 26,6 pg TEQ/g de matières grasses) par rapport à la population générale (17,3 pg TEQ/g de matières grasses) (Menzel et coll., 1998).

Incinération de déchets ménagers

Diverses études ont évalué le degré de contamination de travailleurs d'incinérateurs plus ou moins récents aux États-Unis et en Allemagne. Ces études ont mis en évidence certaines modifications du profil des congénères sans toutefois objectiver de différence d'imprégnation estimée sur la base du TEQ (Schechter, 1991). La dernière étude n'a pas mis en évidence de différence d'imprégnation globale entre les travailleurs d'un incinérateur ancien (39,7 pg TEQ/g de matières grasses et 49,4 pg TEQ/g de matières grasses) et récent (34,3 pg TEQ/g de matières grasses) par rapport à la population générale (42,9 pg TEQ/g de matières grasses). À nouveau, le profil des congénères des travailleurs de l'incinérateur ancien montrait une élévation significative de divers congénères (octaCDD, hexa- et heptaCDF, PCDD et PCDF totaux) retrouvés en fortes concentrations dans les mâchefers et les cendres volantes (heptaCDD, octaCDD, hexaCDF, heptaCDF et octaCDF) (Schechter et coll., 1995). L'absence de différence d'imprégnation des employés d'un incinérateur récent par rapport à la population générale suggère l'efficacité des mesures antipollution même si divers facteurs confondants n'ont pas été pris en compte dans cette étude.

En résumé, même si l'exposition professionnelle est rarement responsable d'une augmentation de la charge corporelle en dioxines exprimée en TEQ, les populations exposées professionnellement présentent généralement un profil de congénères typique fonction de la nature de l'exposition. Ce profil diffère généralement de celui retrouvé au sein de la population générale.

Évaluation de l'imprégnation après exposition accidentelle

Le dosage souvent rétrospectif des dioxines a permis de mieux estimer le degré de contamination de diverses populations exposées accidentellement dans le cadre professionnel ou environnemental. Cette méthode d'évaluation de l'exposition, introduite au début des années soixante-dix, a été initialement appliquée afin d'évaluer, souvent de façon rétrospective, le degré d'imprégnation par la 2,3,7,8-TCDD de diverses populations de travailleurs exposés accidentellement lors de la fabrication d'herbicides contaminés par des dioxines (accident Boehringer, BASF). Le dosage des 17 congénères a également permis d'évaluer le degré de contamination de diverses populations d'hommes, de femmes et d'enfants accidentellement exposés dans le cadre d'accidents environnementaux (Seveso, Viêtnam, Yusho, Yu-Cheng) (tableau 10.IV)

Lors de l'accident de Seveso en 1976, la 2,3,7,8-TCDD formée au cours d'une réaction exothermique fut le principal dérivé dioxine auquel fut exposée la population. L'évaluation de l'exposition fut initialement basée sur les mesures de 2,3,7,8-TCDD dans les échantillons de sol ce qui a permis de distinguer trois zones de contamination décroissante (zones A, B et R) (Bertazzi et coll.,

Tableau 10.IV : Concentrations sanguines relevées au sein de populations exposées aux dioxines, en comparaison avec la population générale

Population	Substances dosées (dates des prélèvements)	Concentrations min-max (en pgTEQ/g de matières grasses)
Populations fortement exposées		
Seveso (Zone A) (1976)	2,3,7,8-TCDD (1976)	828-56 000 ¹
NIOSH (1951-1972)	2,3,7,8-TCDD (1987-1988)	ND-3 400 ²
Ranch Hand-Viêt Nam (1962-1971)	2,3,7,8-TCDD (1987)	ND-618 ³
Population générale		
Allemagne (1996)	PCDD, PCDF (1996)	6,1-41,5 ⁴

TCP : trichlorophénol ; ND : non détecté ; ¹ : d'après Mocarelli et coll., 1991 ; ² d'après Piacitelli et coll., 1992 ; ³ d'après Røegner et coll., 1991 ; ⁴ : d'après Wittsiepe et coll., 2000

1998). Ce n'est qu'en 1988 que furent réalisés rétrospectivement les premiers dosages de 2,3,7,8-TCDD dans des échantillons sanguins. Les concentrations les plus élevées furent documentées parmi les individus résidant à proximité de l'usine [concentration médiane peu de temps après l'accident en 1976 : 450 pg TEQ/g de matières grasses (zone A), 126 pg TEQ/g de matières grasses (zone B) et 50 pg TEQ/g de matières grasses (zone R)]. La concentration la plus élevée fut documentée dans la zone A (56 000 pg TEQ/g de matières grasses). Une élévation persistante des concentrations en 2,3,7,8-TCDD fut objectivée au sein d'un échantillon de la population de Seveso près de vingt ans après l'accident (moyenne géométrique : 53,2 pg TEQ/g de matières grasses pour la zone A, 11,0 pg TEQ/g de matières grasses pour la zone B et 4,9 pg TEQ/g de matières grasses pour la population générale ou zone non-ABR (Landi et coll., 1997, 1998 ; Needham et coll., 1999).

Lors de la guerre du Viêt Nam, l'utilisation comme défoliant, entre 1962 et 1971, de l'agent orange, un mélange de butylesters d'acide 2,4,5-trichlorophénoxyacétique (2,4,5-T) et d'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D) contaminés par des dioxines, entraîna l'exposition, essentiellement à de la 2,3,7,8-TCDD, des militaires américains et de la population générale. L'agent orange fut surtout utilisé au Sud-Viêt Nam. Diverses études rétrospectives ont tenté d'évaluer le degré d'exposition tant de la population que des anciens combattants. Les concentrations en dioxines (essentiellement de type 2,3,7,8-TCDD) mesurées au sein de la population vietnamienne dans le nord du pays au sein d'un pool de prélèvements obtenus entre 1970 et 1973 (15,3 pg TEQ/g de matières grasses) étaient inférieures à celles mesurées dans le sud (50 pg TEQ/g de matières grasses) et dans la partie centrale du pays (31,3 pg TEQ/g de matières grasses). Des concentrations en 2,3,7,8-TCDD maximales de 1 450 pg TEQ/g de matières grasses furent documentées dans des échantillons de lait maternel collectés en 1970 (Baughman et Meselson 1973 ; Schecter et coll., 1995). Parmi les anciens combattants, les niveaux de

contamination furent mesurés de façon rétrospective à plusieurs reprises (1982, 1987 et 1992) au sein d'un échantillon de près de 300 individus. Les concentrations en 2,3,7,8-TCDD (moyenne $\pm$ DS) étaient de $63,4 \pm 62,8$ pg TEQ/g de matières grasses ($n = 343$) en 1982, $51,6 \pm 62,1$ pg TEQ/g de matières grasses ($n = 343$) en 1987 et $30,5 \pm 36,2$ pg TEQ/g de matières grasses ($n = 278$) en 1992 (Michalek et coll., 1996). Rétrospectivement, on estime que certains anciens combattants ont été exposés de façon importante au point d'atteindre des concentrations sanguines en 2,3,7,8-TCDD supérieures à 600 pg TEQ/g de matières grasses. Des estimations plus importantes ont été fournies, comprises entre 636 et 5 840 pg TEQ/g de matières grasses (en considérant une demi-vie de la 2,3,7,8-TCDD de 5 ans) ou 124 à 1 112 pg TEQ/g de matières grasses (en tenant compte d'une demi-vie de 10 ans) (Schecter et coll., 1997).

Lors de l'accident de Yusho en 1968, une intoxication massive se produisit suite à la consommation par la population d'huile de riz contaminée par des PCB, des PCDF et de faibles quantités de PCDD. Le mélange de PCB (Kanechlor-400), présent dans un circuit de refroidissement, à de l'huile de riz fut à l'origine de la contamination. La mesure des divers congénères dans le tissu adipeux d'une victime confirma une imprégnation importante par les dioxines (1 025 pg TEQ/g de matières grasses), le profil des congénères étant caractérisé par une prédominance de congénères PCDF, essentiellement des congénères penta- et hexachlorés, typiques d'une contamination par des PCB. Diverses études ont évalué la nature et le degré de la contamination par la mesure de ces substances dans différents tissus biologiques. L'équivalent toxique mesuré au sein de la population de Yusho vingt ans après l'accident était compris entre 185 et 441 pg TEQ/g de matières grasses soit 3 à 14 fois supérieur à celui de la population contrôle (31-61 pg TEQ/g de matières grasses) et essentiellement dû à la présence de PCDF (penta-, hexa- et heptachlorés) (Masuda et coll., 1998). Certaines études ont évalué le degré de contamination par le dosage des dioxines au niveau du sébum (Iida et coll., 1999d).

La contamination par les dioxines a été documentée au sein de diverses cohortes de travailleurs affectés à la production de trichlorophénol et professionnellement exposés essentiellement à la 2,3,7,8-TCDD soit accidentellement, soit lors du processus de fabrication (NIOSH, $n = 253$, Pays-Bas, $n = 48$, BASF, $n = 138$, Boehringer-Ingelheim, $n = 48$). Des niveaux d'imprégnation compris entre 0 et 3 400 pg TEQ/g de matières grasses, bien supérieurs à ceux classiquement mis en évidence au sein de la population générale, furent mis en évidence. L'ensemble de ces données a été revu de façon exhaustive par le Centre international de recherche sur le cancer (IARC, 1997).

Il est désormais bien établi que les populations de travailleurs de l'industrie chimique, essentiellement exposées entre les années cinquante et soixante-dix, de même que les populations de Seveso et de Yusho ont été 100 à 1 000 plus exposées aux dioxines que ne le sont les populations soumises au bruit de fond essentiellement par apports alimentaires. En outre, l'analyse du

profil des congénères au sein de diverses populations démontre clairement que la nature des congénères présents dans les tissus biologiques dépend des circonstances d'exposition (prédominance de la 2,3,7,8-TCDD pour les population de Seveso, de PCDF pour celles de Yusho et Yu-Cheng ayant absorbé de l'huile de riz contaminée par des PCB, prédominance des PCDD par rapport aux PCDF en ce qui concerne la contamination de la population générale) (Ryan et coll., 1987).

Profils des congénères dans les tissus humains

Les profils qualitatif et quantitatif des dioxines retrouvés dans les tissus biologiques diffèrent de ceux retrouvés dans diverses matrices environnementales à plusieurs points de vue. Théoriquement, les 210 congénères PCDD et PCDF sont présents dans l'environnement (sol, cendres) suite à leur émission par diverses sources ponctuelles ou diffuses. Seuls les 17 composés substitués en position 2,3,7 et 8 (soit 7 congénères PCDD et 10 congénères PCDF) sont généralement retrouvés dans les milieux biologiques humains (Byard, 1987 ; Beck et coll., 1994 ; Furst et coll., 1994). En outre, les concentrations des 17 congénères PCDD et PCDF dans les tissus biologiques sont largement supérieures à celles mesurées dans l'environnement. La très grande stabilité chimique des 17 congénères PCDD et PCDF substitués en position 2,3,7 et 8 et le fait qu'ils sont très peu métabolisés apparaît responsable de leur bioaccumulation par les organismes vivants à partir de l'environnement et de leur biomagnification dans les chaînes trophiques. À titre d'exemple, la figure 10.1 présente le profil des 17 congénères présents dans le lait de vache, le lait humain et les émissions d'incinérateurs.

Un excès de congénères PCDF par rapport aux congénères PCDD est généralement retrouvé dans les matrices environnementales (rapport PCDF/PCDD compris entre 0,6 et 8). Le profil des congénères dans le lait maternel, le sang ou le tissu graisseux est quant à lui caractérisé par une prédominance des congénères PCDD par rapport aux PCDF (rapport PCDD/PCDF généralement proche de 8). Certains congénères tels que l'OCDD présents en proportions variables dans l'environnement (entre 15 % et 80 %) sont constamment retrouvés en fortes proportions dans les tissus biologiques humains (80 %). Le profil des congénères PCDD dans les tissus biologiques humains est en outre classiquement dominé par une augmentation progressive des concentrations des congénères en fonction de leur substitution par des atomes de chlore (OCDD > 1,2,3,4,6,7,8-heptaCDD > 1,2,3,6,7,8-hexaCDD). En ce qui concerne les congénères PCDF, les concentrations du 2,3,4,7,8-PeCDF suivies par celles des congénères hexa- et heptaCDF prédominent par rapport à celles des congénères tétra et octachlorés (Furst et coll., 1994). Compte tenu de son TEF de 0,5, le congénère 2,3,4,7,8-PeCDF peut représenter en TEQ, près de 20 % de la concentration totale de PCDD/PCDF (US EPA, 1991). Dans

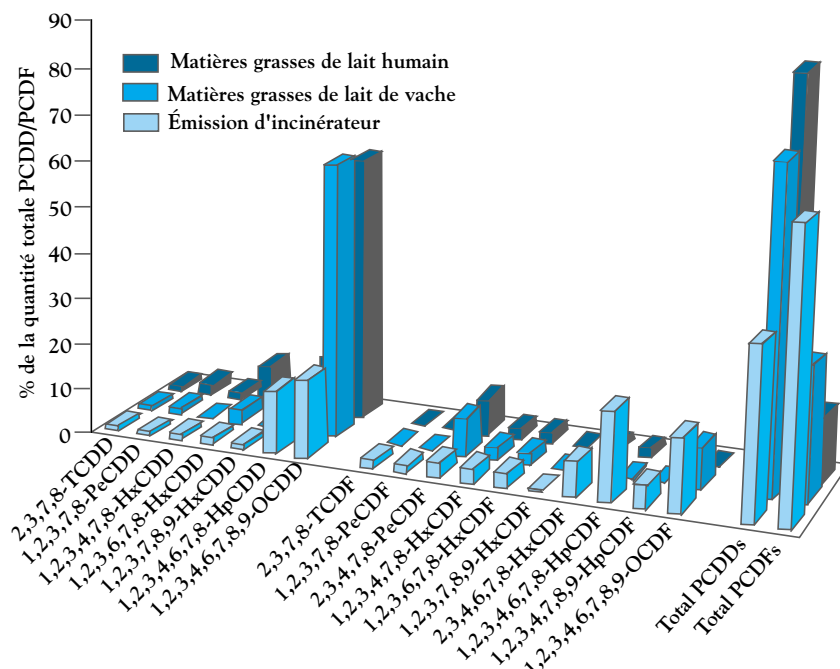


Figure 10.1 : Profils représentatifs de la distribution des congénères PCDD et PCDF dans différentes matrices

l'étude française sur les laits maternels (InVS/CAREPS, 2000), la prise en compte simultanée du TEF et de la concentration du congénère permet de dire que c'est le 2,3,4,7,8-PeCDF suivi par la 1,2,3,7,8-PeCDD, la 1,2,3,6,7,8-HxCDD et la 2,3,7,8-TCDD qui contribuent le plus à l'exposition. La 2,3,7,8-TCDD ne représente qu'environ 10 % de l'exposition exprimée par les TEQ.

Ces différences de profils entre les matrices environnementales et biologiques s'expliquent par le fait que les dioxines subissent une certaine dégradation biologique qui est fonction de la nature du congénère. Cette dégradation biologique est plus rapide pour les PCDF par rapport aux PCDD et plus lente pour les dérivés les plus chlorés par rapport aux dérivés moins chlorés (Ewers et coll., 1996a et b ; Pöpke, 1998).

Distribution des dioxines dans l'organisme

On admet généralement que les dioxines lipophiles se distribuent de façon homogène dans les tissus graisseux de l'organisme suivant un modèle à un compartiment unique. Il en est probablement ainsi pour la 2,3,7,8-TCDD (Patterson et coll., 1988 ; Leung et coll., 1990 ; Kahn et coll., 1988). Plusieurs

travaux ont toutefois bien démontré que ce modèle n'est pas complètement valide et que les concentrations mesurées au niveau de la fraction grasseuse d'un tissu ne peuvent être d'emblée extrapolées à tout l'organisme. La comparaison des concentrations respectives des PCDD et PCDF dans la fraction grasseuse de divers tissus a bien montré que les concentrations de dioxines sont plus élevées dans la fraction grasseuse du sang, intermédiaires dans celle du tissu adipeux et plus faibles dans celle du lait maternel (Schechter et coll., 1994). Ces différences sont peu marquées pour les congénères peu chlorés (tétra-, penta-) mais tout à fait apparentes pour les congénères les plus chlorés (hexa-, hepta- et octa-). Ces différences reflètent très probablement les coefficients de partition respectifs de chacun des congénères au travers des barrières biologiques qui séparent ces tissus.

Il existe en outre une séquestration hépatique des dioxines indépendante du caractère lipophile et qui reflète l'affinité des divers congénères pour le système microsomial hépatique (Beck et coll., 1994). Cette affinité pour le tissu hépatique est classiquement exprimée sur la base du rapport des concentrations des divers congénères dans la fraction grasseuse du foie par rapport aux concentrations mesurées dans le tissu adipeux. Ce rapport est généralement supérieur à 1. Il est voisin de 2 pour la plupart des congénères PCDD (tétra-, penta- et hexa-) et largement supérieur à 1 pour les congénères PCDD les plus chlorés. En ce qui concerne les PCDF, la séquestration intrahépatique est plus marquée encore, le rapport étant de 15,4 pour les congénères heptachlorés (Thoma et coll., 1990 ; Beck et coll., 1990 ; Ott et coll., 1994 ; Van den Berg et coll., 1994). Au niveau sanguin, les dioxines se répartissent différemment suivant la fraction lipidique, cellulaire et protéique. C'est ainsi que la 2,3,7,8-TCDD circulante est essentiellement liée à la fraction grasseuse alors que l'OCDD se distribue à parts égales entre la fraction lipidique et la fraction protéique (Van den Berg et coll., 1994). Malgré ces différences de répartition en fonction de la nature du congénère, il est important de souligner que les concentrations en dioxines exprimées en TEQ et par gramme de matières grasses sont très semblables pour les divers tissus (sang, lait maternel et tissu adipeux) (Ewers et coll., 1996b). En outre, les concentrations des divers congénères dans le sang sont généralement bien corrélées avec celles mesurées dans la plupart des tissus ($r > 0,7$) (Iida et coll., 1999a).

Déterminants de l'imprégnation par les dioxines au sein de la population générale

Outre l'origine géographique, divers facteurs influencent les concentrations en dioxines dans les tissus humains. Parmi ces facteurs citons les activités professionnelles, les habitudes alimentaires, l'âge, le sexe, l'allaitement maternel (nombre d'enfants et périodes d'allaitement), le poids corporel et les modifications pondérales (Päpke, 1998).

Habitudes alimentaires

Des différences tant en ce qui concerne les niveaux de contamination que le profil des congénères ont été bien documentées au sein de diverses populations consommant régulièrement du poisson et des crustacés contaminés par des dioxines. Une contamination par les dioxines (PCDD et PCDF) a été bien identifiée chez les pêcheurs de la Baltique, le niveau d'imprégnation moyen étant de 17,5 pg TEQ/g de matières grasses pour le groupe contrôle ne consommant pas de poisson, de 25,8 pg TEQ/g de matières grasses pour le groupe ayant une consommation normale de poisson (50 g/j) et de 63,5 pg TEQ/g de matières grasses pour le groupe ayant une consommation importante de poisson (plus de 100 g/j) (Svensson et coll., 1991). Le 2,3,4,7,8-pentaCDF fut identifié comme le congénère prédominant. Dans le cadre d'une autre étude, le niveau moyen de contamination par les dioxines était de 39,3 pg TEQ/g de matières grasses chez les pêcheurs ayant un apport modéré en crabes (10-38/an) issus de fjords norvégiens et contaminés par des dioxines émises par une usine de production de magnésium et de 77,9 pg TEQ/g de matières grasses parmi les pêcheurs ayant un apport important en crabes (plus de 40/an) par rapport à 11,4 pg TEQ/g de matières grasses pour le groupe témoin. Le profil des congénères dans cette étude démontrait en outre une augmentation de certains congénères PCDF (penta et hexaCDF) chez les sujets les plus exposés (Johansen et coll., 1996). Une augmentation de la charge corporelle en dioxines liée à la consommation de poissons a été récemment documentée pour une population riveraine des Grands Lacs américains (Falk et coll., 1999). L'impact de la consommation de poisson issu de mers contaminées sur l'imprégnation en dioxines a récemment été illustré par une étude finlandaise (Kirivanta et coll., 2000). Les concentrations sanguines en dioxines de 26 pêcheurs consommant du poisson de la Baltique plus de deux fois par semaine ont été mesurées en moyenne à 180 pg TEQ/g de matières grasses (valeurs comprises entre 51 et 420 pg TEQ/g de matières grasses) alors qu'elles étaient de 110 pg TEQ/g de matières grasses (30-280) pour les pêcheurs consommant du poisson moins d'une fois par semaine, et de 33 pg TEQ/g de matières grasses (12-81) pour un groupe contrôle apparié pour l'âge. Le profil des congénères était dominé par le 2,3,4,7,8-pentaCDF. Pour ces deux populations de pêcheurs, ces valeurs sont proches de celles documentées au sein de la population de la zone B de Seveso (94 pg TCDD/g de matières grasses).

Aucune différence d'imprégnation par les dioxines n'a été trouvée entre un groupe de végétariens et un groupe contrôle (Welge et coll., 1993). Ceci s'explique très probablement par un apport plus important en produits laitiers parmi les végétariens. Aucune différence en termes d'imprégnation en dioxines ne fut non plus mise en évidence au sein d'une population finlandaise consommant de l'eau fortement contaminée par des tri- et pentachlorophénols. Toutefois, les niveaux moyens d'imprégnation au sein de cette population étaient supérieurs à ceux mesurés en Espagne (en moyenne

41,7 pg TEQ/g de matières grasses ; Jimenez et coll., 1993) mais comparables à ceux mesurés au Canada (en moyenne 65,9 pg TEQ/g de matières grasses) (Lebel et coll., 1990). Ceci s'explique probablement par les habitudes alimentaires et la consommation de poissons contaminés de la Baltique (Vartiainen et coll., 1995). Des différences d'imprégnation pour certains congénères ont été récemment documentées parmi des groupes consommant généralement de façon prolongée des produits (œufs et viande bovine) contaminés par des dioxines associées à des pentachlorophénols (Goldman et coll., 2000). Dans l'étude française sur les laits maternels (InVS/CAREPS, 2000), une hausse de la consommation mensuelle de 300 g des produits de la pêche est surtout associée à une augmentation de 5 % à 6 % de certains furanes, en particulier le 2,3,7,8-TCDF ainsi que le 1,2,3,7,8-PeCDF, le 2,3,4,6,7,8-HCDF, le 1,2,3,4,7,8,9-HpCDF et l'OCDF. De manière surprenante, une augmentation de la consommation de 300 g de viande de porc mensuelle a été trouvée associée à une augmentation de 2 % à 3 % de plusieurs congénères (1,2,3,7,8-PeCDD, 1,2,3,6,7,8-HCDD et 2,3,4,7,8-PeCDF, 1,2,3,4,7,8-HCDF, 1,2,3,4,6,7,8-HpCDF). Dans cette étude, la consommation d'œufs des mères augmente les concentrations de PCDF (1,2,3,6,7,8-HCDF, 2,3,4,6,7,8-HCDF et 2,3,4,7,8-PeCDF). Enfin, la consommation de volaille est surtout associée à une élévation de 1,2,3,4,7,8,9-HpCDF et d'OCDF, et dans une moindre mesure de 1,2,3,7,8,9-HCDF et de 1,2,3,4,6,7,8-HpCDF.

Âge

La concentration en dioxines dans divers tissus augmente avec l'âge. En moyenne, les concentrations en dioxines exprimées en TEQ augmentent d'un facteur 7 entre l'âge de 10 et de 75 ans. Cette augmentation est fonction de la nature du congénère. L'élévation la plus marquée avec l'âge est observée pour le 2,3,4,7,8-pentaCDF, suivie par la 2,3,7,8-TCDD et les congénères hexachlorés de type PCDD et PCDF. Pour certains congénères PCDF, il ne semble pas exister d'augmentation des concentrations avec l'âge, ce qui suggère que ces composés sont éliminés plus rapidement (Ewers et coll., 1996b ; Wittsiepe et coll., 2000). L'augmentation avec l'âge est en moyenne de 0,4 à 0,8 pg TEQ/an (Päpke, 1998). Dans l'étude française sur les laits maternels (InVS/CAREPS, 2000), pour un écart d'âge de 5 ans, les teneurs de PCDD et PCDF sont supérieures en moyenne de 24 %.

Sexe

Il ne semble pas exister de différence significative d'imprégnation liée au sexe ou à l'origine raciale au sein d'une même population ayant des habitudes alimentaires comparables.

Poids corporel et modifications pondérales

La concentration en dioxines est fortement influencée par la masse corporelle. Une perte de poids s'accompagne d'une élévation des concentrations par redistribution au départ des réservoirs graisseux (Päpke, 1998). Une augmentation d'un facteur 14 des concentrations circulantes en dioxines a été documentée chez un individu au décours d'une perte de poids de plus de 20 kilogrammes.

Allaitement

Les concentrations en dioxines sont influencées par le nombre d'enfants nourris au sein ainsi que la durée des périodes d'allaitement (Schechter et coll., 1996a ; Vartiainen et coll., 1997 ; Kreuzer et coll., 1997 ; Abraham et coll., 1998 ; Iida et coll., 1999b et c). La diminution d'imprégnation moyenne de la mère par semaine d'allaitement est de 0,1 pg TEQ (Päpke, 1998). Une diminution de 69 % de la charge corporelle en dioxines a été documentée chez une mère allaitant des jumeaux (Schechter et coll., 1998). L'apport en dioxines de l'enfant allaité est 50 fois supérieur à celui de l'adulte, ce qui s'explique par les concentrations importantes en dioxines du lait maternel ainsi que par l'excellente biodisponibilité (près de 90 %) des dioxines présentes dans le lait maternel (Beck et coll., 1994 ; Dahl et coll., 1995 ; Abraham et coll., 1996). Chez l'enfant nourri au sein, les concentrations en dioxines sont en moyenne 10 à 15 fois supérieures à celles présentes chez l'enfant nourri artificiellement (Abraham et coll., 1996). Cette imprégnation est toutefois transitoire et représente tout au plus 5 % de la quantité totale de dioxines accumulées par l'organisme au cours de l'existence.

Sources ponctuelles

Aucune différence d'imprégnation par les dioxines n'a été objectivée au niveau sanguin parmi 9 enfants et 18 adultes ayant fréquenté des terrains de sport contaminés par des PCDD et PCDF (Ewers et coll., 1996a). Cette observation s'explique très probablement par la très faible biodisponibilité des dioxines fortement absorbées aux particules du sol. De même, aucune différence significative d'imprégnation en dioxines par rapport à la population générale n'a été mise en évidence parmi 21 personnes consommant des légumes issus de leurs jardins contaminés (PCDD et PCDF 80 ng TEQ/kg de sol) par des dioxines dans une zone industrielle. Ces données suggèrent que l'exposition aux dioxines liée à ces sources ponctuelles est mineure par rapport à l'exposition inévitable et ubiquitaire par l'alimentation (Ewers et coll., 1996a). La proximité d'un incinérateur de déchets ménagers ou d'une usine pétrochimique ne semble pas affecter les concentrations sanguines en dioxines tel que récemment montré en Espagne au sein d'un groupe de 20 personnes. Au sein de cette population, la concentration en dioxines était de

populations (Schuhmacher et coll., 1999). De même aucune différence significative en termes d'imprégnation n'a été documentée parmi 39 personnes ($17,0 \pm 7,1$ pg TEQ/g de matières grasses) résidant à proximité d'un incinérateur en Allemagne par rapport au niveau moyen de la population (Deml et coll., 1996). Aucun impact évident sur l'imprégnation en dioxines n'a été clairement démontré au sein d'un groupe de 41 femmes travaillant dans des bâtiments dont les boiseries avaient été traitées par des chlorophénols (Von Manikowsky et coll., 1998). Une imprégnation plus importante par les dioxines fut cependant documentée au sein d'une population chinoise résidant dans une zone géographique contaminée par des pentachlorophénols ($9,0-16,3$ pg TEQ/g de matières grasses) utilisés pour éradiquer la schistosomiase par rapport à une population contrôle ($4,8-6,4$ pg TEQ/g de matières grasses) (Schechter et coll., 1994, 1996b). Finalement, il n'a pas été mis en évidence de différence d'imprégnation au sein d'un groupe de 14 personnes résidant à proximité d'une usine de recyclage de métaux même si certains individus présentaient des concentrations plus élevées, probablement suite à la consommation prolongée de certains produits locaux contaminés (œufs) (Ewers et coll., 1996b).

Origine géographique

Certaines différences ont été mises en évidence en fonction de l'origine géographique. Les niveaux d'imprégnation sont en effet plus faibles dans les pays peu ou pas industrialisés (Corée, Chine, Vietnam) par rapport aux valeurs mesurées dans les pays industrialisés (Japon, Canada, Espagne, Grande-Bretagne, Allemagne). La différence d'imprégnation est particulièrement marquée pour certains congénères tels que l'OCDD (Kang et coll., 1997). Au sein d'une même zone géographique, l'imprégnation par les dioxines est généralement moins marquée dans les zones rurales par rapport aux zones industrielles (Koopman-Esseboom et coll., 1994). Des habitudes alimentaires locales (consommation de poisson) peuvent en outre influencer le degré d'imprégnation (Clench-Aas et coll., 1992 ; Vartiainen et coll., 1997 ; Gonzalez et coll., 1998 ; Schuhmacher et coll., 1999). Une étude récente (Wingfors et coll., 2000) n'a pas mis en évidence de différences de concentrations en dioxines entre deux échantillons de la population générale issus respectivement d'Espagne ($n = 35$, 55 pg TEQ/g de matières grasses en moyenne) et de Suède ($n = 28$, 47 pg TEQ/g de matières grasses). Le profil des congénères était cependant différent, caractérisé par une prédominance des congénères hepta- et octachlorés pour la population espagnole, et des congénères tétra- et pentachlorés pour la population suédoise. Ces différences sont attribuées par les auteurs de l'étude aux habitudes alimentaires différentes, notamment en ce qui concerne la consommation de poisson et la plus longue utilisation du pentachlorophénol en Espagne. Dans l'étude française sur les laits maternels (InVS/CAREPS, 2000), les mères de la région Nord se distinguaient par une concentration moyenne plus élevée de 2,3,4,7,8-PeCDF et de

1,2,3,6,7,8-HCDF. Les mères de la région Sud-Ouest présentaient des niveaux moyens les plus élevés de 1,2,3,7,8-PeCDD et de 1,2,3,6,7,8-HCDD, même après prise en compte de l'alimentation et de l'urbanisation du lieu de résidence. Les concentrations moyennes en divers congénères étaient plus élevées parmi les femmes de la région Ouest. En général, les teneurs de 2,3,7,8-TCDF dans le lait ont été retrouvées associées à l'urbanisation et à la densité d'industrialisation.

En conclusion, par comparaison à d'autres toxiques, le dosage des dioxines dans les tissus biologiques humains se heurte à de nombreuses difficultés d'ordre pratique. Citons le coût important des dosages (compris entre 6 000 et 10 000 FF pour le dosage des 17 congénères en France). S'y ajoute la nécessité de disposer d'une quantité de matières grasses suffisante. À ce point de vue, le prélèvement de tissu adipeux sous-cutané ou abdominal impose des gestes invasifs difficilement applicables dans le cadre d'études épidémiologiques. Le lait maternel aisément accessible et riche en graisses ne permet d'apprécier l'exposition que d'une fraction limitée de la population. En ce qui concerne le sang, pauvre en graisses circulantes (0,5 %), une quantité totale relativement importante comprise entre 50 et 100 ml (soit le tiers d'un don de sang à la Croix-Rouge) prélevée dans des conditions adéquates (à jeun et à distance de tout repas riche en graisses) est requise. Toutefois, les avancées dans les processus analytiques ont déjà permis de doser les dioxines dans 10 à 15 ml de sang, voire moins de 1 ml quand les teneurs sont relativement élevées. Le dosage impose d'importantes compétences analytiques. Des variations interlaboratoires pouvant atteindre 20 % à 30 % ont été observées, ce qui complique l'interprétation des résultats.

L'analyse des concentrations des dioxines dans les tissus biologiques humains et l'application du dosage des 17 congénères PCDD et PCDF en vue d'évaluer l'exposition humaine doit tenir compte de différents aspects.

Compte tenu du caractère cumulatif des dioxines, la mesure de ces substances fournit une bonne estimation de la charge corporelle, c'est-à-dire de la dose interne cumulée essentiellement par voie alimentaire dans les tissus gras au cours de toute la période de vie antérieure au prélèvement. À ce point de vue, il est important de rappeler que la charge corporelle est atteinte au bout de 5 demi-vies successives (le temps d'accumulation étant équivalent au temps d'élimination), soit après plus de 40 ans pour la majorité des congénères (demi-vie moyenne proche de 7 ans) (tableau 10.V). À ce moment, la charge corporelle correspond à l'équivalent de 5 000 doses journalières cumulées. On comprend bien qu'une exposition transitoire plus importante telle que la consommation pendant une brève durée de produits contaminés ne modifie pas de façon significative la réserve interne.

Compte tenu de la demi-vie particulièrement longue des dioxines chez l'homme, le dosage de ces substances dans les tissus biologiques permet d'apprécier à travers un dosage ponctuel l'historique de l'exposition. Cette

Tableau 10.V : Demi-vie (en années) de plusieurs congénères dioxines

	WHO-TEF	Demi-vie en années
PCDD		
2,3,7,8-TCDD	1	6-10
1,2,3,7,8-PeCDD	1	9-16
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0,1	8
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0,1	13-70
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0,1	5-9
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0,01	3-7
OCDD	0,0001	6-7
PCDF		
2,3,7,8-TCDF	0,1	0-4
1,2,3,7,8-PeCDF	0,05	0-9
2,3,4,7,8-PeCDF	0,5	5-20
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0,1	3-6
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0,1	4-6
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0,1	?
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0,1	2-6
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0,01	3-7
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0,01	3
OCDF	0,0001	0,2-2

méthode d'évaluation ne permet toutefois pas de mettre en évidence des modifications récentes du degré de contamination de la chaîne alimentaire et des apports. Pour cette raison, la réalisation de dosages dans les vecteurs importants (lait de vache, viande, poissons contaminés) apparaît tout à fait complémentaire à la réalisation de mesures chez l'homme. Le dosage des dioxines dans la filière bovine fournit, compte tenu du cycle de vie plus court et de l'élimination des dioxines dans le lait de vache, une bonne estimation de la contamination récente de l'environnement.

Divers facteurs, affectant les concentrations (ou charge corporelle) de dioxines, doivent être impérativement pris en considération dans l'interprétation des valeurs. Parmi les facteurs confondants bien étudiés, citons l'âge croissant et l'accroissement de la masse corporelle qui augmentent la dose interne, le nombre et la durée des périodes d'allaitement qui contribuent à la réduire, les habitudes alimentaires qui constituent un déterminant majeur (consommation de produits laitiers, de viande bovine, de poissons plus ou moins contaminés suivant les zones géographiques). En outre, certaines activités professionnelles peuvent modifier le profil des congénères.

En ce qui concerne la signification biologique de ce type de dosage, il est important de souligner que le lien entre la dose interne et la quantité de dioxines fixée au récepteur intracellulaire Ah (ou dose effective responsable

des effets biologiques) n'est pas établi. Ce lien est d'autant plus difficile à établir que diverses substances présentes dans l'environnement peuvent agir comme agonistes (hydrocarbures aromatiques polycycliques) ou antagonistes (polyphénols) de ce récepteur. De ce point de vue, l'application de bio-essais tels que la technique Ah-CALUX (*Ah-Receptor dependent chemical activated luciferase gene expression*), qui permettent d'apprécier le degré d'activation du récepteur Ah, apparaît tout à fait complémentaire au dosage des dioxines. De tels bio-essais apparaissent en outre très prometteurs comme méthodes de dépistage afin d'identifier les sujets ou populations plus exposés aux dioxines (et à d'autres ligands du récepteur Ah).

On considère classiquement que les dioxines se distribuent de façon homogène dans les tissus graisseux de l'organisme selon un modèle monocompartimental. Il a toutefois été bien démontré que les dioxines subissent une accumulation plus intense dans certains tissus tels que le foie (par fixation aux cytochromes P450). Cette accumulation tissulaire est fonction de la nature du congénère (en général plus marquée pour les PCDF par rapport au PCDD) et du degré de chloration. Les dioxines subissent une partition inhomogène, fonction de la nature du congénère, au travers des diverses barrières biologiques. C'est ainsi qu'on explique que malgré des niveaux très semblables, les concentrations de dioxines exprimées par gramme de graisse sont quelque peu plus élevées dans le sang, intermédiaires dans le tissu adipeux et plus faibles dans le lait maternel.

La concentration de chaque congénère intègre de multiples facteurs : quantités présentes et sort dans l'environnement, bioaccumulation dans les chaînes trophiques, biodisponibilité après absorption et transformation métabolique chez l'homme (variable en fonction du composé). L'influence combinée de ces facteurs détermine les proportions relatives de chacun des 17 congénères dans les tissus biologiques humains. Pour cette raison, le profil des congénères dans ces tissus diffère de façon plus ou moins importante de celui observé dans l'environnement et dans divers vecteurs (produits laitiers).

L'analyse des concentrations respectives des 17 congénères est une étape indispensable dans l'évaluation biologique de l'exposition aux dioxines parce qu'elle permet de contribuer à l'identification des sources de contamination. Alors que l'expression classique de l'activité biologique (et toxique) du mélange complexe des 17 congénères sous forme d'équivalent toxique (TEQ) est adéquate dans le cadre de l'évaluation des risques, cette approche n'est pas rigoureusement adéquate en termes d'appréciation de l'exposition. Cela s'explique avant tout par la discordance qui existe pour divers congénères entre le caractère cumulatif et le caractère toxique. Le meilleur exemple est fourni par l'OCDD qui constitue un composant majeur dans l'environnement et les chaînes trophiques mais dont la contribution à l'activité biologique dioxine (TEQ) dans l'environnement et les organisme vivants est très faible (Schechter et coll., 1994).

Malgré plusieurs limitations, le dosage des dioxines dans les tissus biologiques humains constitue une approche rigoureuse permettant d'évaluer le degré d'imprégnation. Plus largement appliquée à la population générale, cette approche devrait contribuer à une gestion plus rationnelle des risques liés aux dioxines en permettant d'identifier les groupes potentiellement plus exposés. C'est au sein de ces groupes plus exposés que devront être identifiées les sources d'exposition ainsi que des effets sanitaires éventuels cliniques ou infracliniques.

BIBLIOGRAPHIE

ABRAHAM K, KNOLL A, ENDE M, PÄPKE O, HELGE H. Intake, fecal excretion, and body burden of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans in breast-fed and formula-fed infants. *Pediatr Res* 1996, **40** : 671-679

ABRAHAM K, PÄPKE O, GROSS A, KORDONOURI O, WIEGAND S et coll. Time course of PCDD/PCDF/PCB concentrations in breast-feeding mothers and their infants. *Chemosphere* 1998, **37** : 1731-1741

ALDER L, BECK H, MATHAR W, PALAVINSKAS R. PCDD, PCDF, PCB and other organochlorine compounds in human milk levels and their dynamic in germany. *Organohalogen Compounds*, 1994, **21** : 39-44

BAUGHMAN RW, MESELSON M. An analytical method for detecting TCDD (dioxin) : levels of TCDD in samples from Vietnam. *Environ Health Perspect* 1973, **5** : 27-35

BECHER G, SKAARE JU, POLDER A, SLETTEN B, ROSSLAND OJ et coll. PCDDs, PCDFs, and PCBs in human milk from different parts of Norway and Lithuania. *J Toxicol Environ Health* 1995, **46** : 133-148

BECK H, DROSS A, KLEEMAN WJ, MATHAR W. PCDD and PCDF concentrations in different organs from infants. *Chemosphere* 1990, **20** : 903-910

BECK H, DROSS A, MATHAR W. PCDD and PCDF exposure and levels in humans in Germany. *Environ Health Perspect* 1994, **102** : 173-185

BERTAZZI PA, BERNUCCI I, BRAMBILLA G, CONSONNI D, PESATORI AC. The Seveso studies on early and long-term effects of dioxin exposure : a review. *Environ Health Perspect* 1998, **106** : 625-633

BYARD JL. The toxicological significance of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and related compounds in human adipose tissue. *J Toxicol Environ Health* 1987, **22** : 381-403

CLENCH-AAS J, BARTONOVA A, OEHME M, LINDSTROM G. PCDD and PCDF in human milk from Scandinavia, with special emphasis on Norway. *J Toxicol Environ Health* 1992, **37** : 73-83

CLUA (1992, 1993). Chemisches landesuntersuchungsamt NRW Münster-Jahresberichte

CVUA (1994-1997), Chemische Landes- und Staatliches Veterinäruntersuchungsamt 167

- DAHL P, LINDSTROM G, WIBERG K, RAPPE C. Absorption of polychlorinated biphenyls, dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans by breast-fed infants. *Chemosphere* 1995, **30** : 2297-2306
- DEML E, MANGELSDORF I, GREIM H. Chlorinated dibenzodioxins and dibenzofurans (PCDD/F) in blood and human milk of non occupationally exposed persons living in the vicinity of a municipal waste incinerator. *Chemosphere* 1996, **33** : 1941-1950
- EWERS U, WITTSIEPE J, SCHREY P, GATZERT U, HINZ S, CSICSAKY M. Blood PCDD/F levels in blood of residents of a former cable incineration facility. *Gesundheitswesen* 1996a, **58** : 465-469
- EWERS U, WITTSIEPE J, SCHREY P, SELENKA F. Levels of PCDD/PCDF in blood fat as indices of the PCDD/PCDF body burden in humans. *Toxicol Lett* 1996b, **88** : 327-334
- FALK C, HANRAHAN L, ANDERSON HA, KANAREK MS, DRAHEIM L et coll. Body burden levels of dioxin, furans, and PCBs among frequent consumers of Great Lakes sport fish. The Great Lakes Consortium. *Environ Res* 1999, **80** : S19-S25
- FURST P, FURST C, WILMERS K. Human milk as a bioindicator for body burden of PCDDs, PCDFs, organochlorine pesticides, and PCBs. *Environ Health Perspect* 1994, **102** : 187-193
- GOLDMAN LR, HARNLY M, FLATTERY J, PATTERSON DG JR, NEEDHAM LL. Serum polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and polychlorinated dibenzofurans among people eating contaminated home-produced eggs and beef. *Environ Health Perspect* 2000, **108** : 13-19
- GONZALEZ MJ, JIMENEZ B, HERNANDEZ LM, CAIXACH J, RIVERA J. Levels of PCDDs and PCDFs in adipose tissue from Spanish people. *Chemosphere* 1993, **27** : 97-104
- GONZALEZ MJ, JIMENEZ B, HERNANDEZ LM, GONNORD MF. Levels of PCDD and PCDF in human milk from populations in Madrid and Paris. *Bull Environ Contam Toxicol* 1996, **56** : 197-204
- GONZALEZ CA, KOGEVINAS M, HUICI A, GADEA E, LADONA M et coll. Blood levels of polychlorinated dibenzodioxins, polychlorinated dibenzofurans and polychlorinated biphenyls in the general population of a Spanish Mediterranean city [published erratum appears in *Chemosphere* 1998, **36** : 3223]. *Chemosphere* 1998, **36** : 419-426
- GREIM H, CSANADY G, FILSER JG, KREUZER P, SCHWARZ L et coll. Biomarkers as tools in human health risk assessment. *Clin Chem* 1995, **41** : 1804-1808
- GROSS ML, LAY JO JR, LYON PA, LIPPSTREU D, KANGAS N et coll. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin levels in adipose tissue of Vietnam veterans. *Environ Res* 1984, **33** : 261-268
- HANSSON M, GRIMSTAD T, RAPPE C. Occupational exposure to polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans in a magnesium production plant. *Occup Environ Med* 1995, **52** : 823-826
- HANSSON M, BARREGARD L, SALLSTEN G, SVENSSON BG, RAPPE C. Polychlorinated dibenzo-*p*-dioxin and dibenzofuran levels and patterns in polyvinylchloride and chloralkali industry workers. *Int Arch Occup Environ Health* 1997, **70** : 51-56

- HARDELL L, VAN BAVEL B, LINDSTRÖM G, FREDRIKSON M, HAGBERG H et coll. Higher concentrations of specific polychlorinated biphenyl congeners in adipose tissue from non-Hodgkin's lymphoma patients compared with controls without malignant disease. *Int J Oncol* 1996, **9** : 603-608
- HASHIMOTO S, YAMAMOTO T, YASUHARA A, MORITA M. PCDD, PCDF, planar and other PCB levels in human milk in Japan. *Chemosphere* 1995, **31** : 4067-4075
- HUTEAU B, GONNORD MF et coll. PCDD and PCDF levels in human adipose tissue in France. *Dioxin '90-Epri Seminar*, Bayreuth, Ecoinforma Press, 1990
- IARC. Polychlorinated dibenzo-*para*-dioxins and polychlorinated dibenzofurans. *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans* 1997, **69** : 665 p
- IIDA T, HIRAKAWA H, MATSUEDA T, NAGAYAMA J, NAGATA T. Polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and related compounds : correlations of levels in human tissues and in blood. *Chemosphere* 1999a, **38** : 2767-2774
- IIDA T, HIRAKAWA H, MATSUEDA T, TAKENAKA S, NAGAYAMA J. Polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and related compounds in breast milk of Japanese primiparas and multiparas. *Chemosphere* 1999b, **38** : 2461-2466
- IIDA T, HIRAKAWA H, MATSUEDA T, TAKENAKA S, NAGAYAMA J. Polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and related compounds : the blood levels of young Japanese women. *Chemosphere* 1999c, **38** : 3497-3502
- IIDA T, HIRAKAWA H, MATSUEDA T, TAKENAKA S, YU ML, GUO YL. Recent trend of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and their related compounds in the blood and sebum of Yusho and Yu Cheng patients. *Chemosphere* 1999d, **38** : 981-993
- INVS/CAREPS. Étude sur les dioxines et les furanes dans le lait maternel en France, 2000
- JENSEN AA. Polychlorobiphenyls (PCBs), polychlorodibenzo-*p*-dioxins (PCDDs) and polychlorodibenzofurans (PCDFs) in human milk, blood and adipose tissue. *Sci Total Environ* 1987, **64** : 259-293
- JIMENEZ B, HERNANDEZ L, GONZALEZ MJ, RIVERA J, ELJARRAT E, CAIXACH J. Comparison of levels of PCDDs and PCDFs in human adipose tissue and blood samples collected in Madrid, Spain. *Organohalogen Compounds* 1993, **13** : 89-91
- JOHANSEN HR, ALEXANDER J, ROSSLAND OJ, PLANTING S, LOVIK M et coll. PCDDs, PCDFs, and PCBs in human blood in relation to consumption of crabs from a contaminated Fjord area in Norway. *Environ Health Perspect* 1996, **104** : 756-764
- JOHNSON ES, PARSONS W, WEINBERG CR, SHORE DL, MATHEWS J et coll. Current serum levels of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in phenoxy acid herbicide applicators and characterization of historical levels. *J Natl Cancer Inst* 1992, **84** : 1648-1653
- KAHN PC, GOCHFELD M, NYGREN M, HANSSON M, RAPPE C et coll. Dioxins and dibenzofurans in blood and adipose tissue of Agent Orange-exposed Vietnam veterans and matched controls. *JAMA* 1988, **259** : 1661-1667
- KANG YS, MATSUDA M, KAWANO M, WAKIMOTO T, MIN BY. Organochlorine pesticides, polychlorinated biphenyls, polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans in human adipose tissue from western Kyungnam, Korea. *Chemosphere* 1997, **35** : 2107-2117

KASHIMOTO T, MIYATA H, FUKUSHIMA S, KUNITA N, OHI G, TUNG TC. PCBs, PCQs and PCDFs in blood of Yusho and Yu-Cheng patients. *Environ Health Perspectives* 1985, **59** : 73-78

KIVIRANTA H, PURKUNEN R, VARTAINEN T. Levels and trends of PCDD/Fs and PCBs in human milk in 1994 in Finland : decrease in concentration from 1987 to 1994. *Organohalogen Compounds* 1998, **38** : 121-124

KIRIVANTA H, VARTIAINEN T, VERTA M, TUOMISTO JT, TUOMISTO J. High fish-specific dioxin concentrations in Finland. *Lancet* 2000, **355** : 1883-1885

KONTSAS H, ROSENBERG C, TORNÆUS J, MUTANEN P, JAPPINEN P. Exposure of workers to 2,3,7,8-substituted polychlorinated dibenzo-*p*-dioxin (PCDD) and dibenzofuran (PCDF) compounds in sawmills previously using chlorophenol-containing antistain agents. *Arch Environ Health* 1998, **53** : 99-108

KOOPMAN-ESSEBOOM C, HUISMAN M, WEISGLAS-KUPERUS N, BOERSMA ER, DE RIDDER MA et coll. Dioxin and PCB levels in blood and human milk in relation to living areas in the Netherlands. *Chemosphere* 1994, **29** : 2327-2338

KREUZER PE, CSANADY GA, BAUR C, KESSLER W, PÄPKE O et coll. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) and congeners in infants. A toxicokinetic model of human lifetime body burden by TCDD with special emphasis on its uptake by nutrition. *Arch Toxicol* 1997, **71** : 383-400

LANDI MT, NEEDHAM LL, LUCIER G, MOCARELLI P, BERTAZZI PA, CAPORASO N. Concentrations of dioxin 20 years after Seveso. *Lancet* 1997, **349** : 1811

LANDI MT, CONSONNI D, PATTERSON DG JR, NEEDHAM LL, LUCIER G et coll. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin plasma levels in Seveso 20 years after the accident. *Environ Health Perspect* 1998, **106** : 273-277

LARSEN JC. Levels of pollutants and their metabolites : exposures to organic substances. *Toxicology* 1995, **101** : 11-27

LEBEL GL, WILLIAMS DT, BENOIT FM, GODDARD M. Polychlorinated dibenzodioxin and dibenzofurans in human adipose tissue samples from five Ontario municipalities. *Chemosphere* 1990, **21** : 1465-75

LEUNG HW, WENDLING JM, ORTH R, HILEMAN F, PAUSTENBACH DJ. Relative distribution of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in human hepatic and adipose tissues. *Toxicol Lett* 1990, **50** : 275-282

LIEM AKD, AHLBORG UG, BECK H, HASCHKE F, NYGREN M et coll. Levels of PCBs, PCDDs and PCDFs in human milk. Results from the second round of a WHO-coordinated exposure study. *Organohalogen Compounds* 1996, **30** : 268-273

LITTORIN M, HANSSON M, RAPPE C, KOGEVINAS M. Dioxins in blood from Swedish phenoxy herbicide workers. *Lancet* 1994, **344** : 611-612

LUNDEN A, NOREN K. Polychlorinated naphthalenes and other organochlorine contaminants in Swedish human milk, 1972-1992. *Arch Environ Contam Toxicol* 1998, **34** : 414-423

MAFF UK. Dioxins in human milk. Food Surveillance Information Sheet, 1996, number 88

MASTEN SA, GRASSMAN JA, YANG X, MILLER CR, SPENCER DL et coll. Mechanistically based markers of exposure and response to dioxin in occupationally exposed individuals. *Organohalogen Compounds* 1997, **34** : 80-85

MASUDA Y, KUROKI H, HARAGUCHI K, NAGAYAMA J. PCB and PCDF congeners in the blood and tissues of Yusho and Yu-Cheng patients. *Environ Health Perspectives* 1985, **59** : 53-58

MASUDA Y, SCHECTER A, PÄPKE O. Concentrations of PCBs, PCDFs and PCDDs in the blood of Yusho patients and their toxic equivalent contribution. *Chemosphere* 1998, **37** : 1773-1780

MENZEL HM, BOLM-AUDORFF U, TURCER E, BIENFAIT HG, ALBRACHT G et coll. Occupational exposure to dioxins by thermal oxygen cutting, welding and soldering of metals. *Environ Health Perspect* 1998, **106** : 715-722

MICHALEK JE, PIRKLE JL, CAUDILL SP, PATTERSON JR DG, NEEDHAM LL. Pharmacokinetics of TCDD in veterans of operation ranch hand : 10-year follow-up. *J Toxicol Env Health* 1996, **47** : 209-220

MOCARELLI P, PATTERSON DG, MAROCCHI A, NEEDHAM LL. Pilot study (phase II) for determining polychlorinated dibenzo-p-dioxin (PCDD) and polychlorinated dibenzofurans (PCDF) levels in serum of Seveso, Italy residents collected at the time of exposure : future plans. *Chemosphere* 1990, **20** : 967-994

MÜCKE W, FIEDLER H, THOMA H. PCDD/PCDF in human liver and adipose tissue : Evaluation of levels by different TEF schemes. *Organohalogen Compounds* 1990, **4** : 105-108

NEEDHAM LL, GERTHOUX PM, PATTERSON DG JR, BRAMBILLA P, SMITH SJ et coll. Exposure assessment : serum levels of TCDD in Seveso, Italy. *Environ Res* 1999, **80** : S200-S206

NEUBERGER M, LANDVOIGT W, DERNTL F. Blood levels of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in chemical workers after chloracne and in comparison groups. *Int Arch Occup Environ Health* 1991, **63** : 325-327

OEHME M, MANO S, BJERKE B. Formation of polychlorinated dibenzofurans and dibenzo-p-dioxins by production processes for magnesium and refined nickel. *Chemosphere* 1989, **18** : 1379-89

ORBAN JE, STANLEY JS, SCHWEMBERGER JG, REMMERS J. Dioxins and dibenzofurans in adipose tissue of the general US population and selected subpopulations. *Am J Public Health* 1994, **84** : 439-445

OTT MG, ZOBEL A, GERMANN C. Laboratory results for selected target organs in 138 individuals occupationally exposed to TCDD. *Chemosphere* 1994, **29** : 2423-2437

PÄPKE O, BALL M, LIS ZA, SCHEUNERT K. PCDD/PCDF in whole blood samples of unexposed persons. *Chemosphere* 1989, **19** : 941-948

PÄPKE O, BALL M, LIS A. Various PCDD/PCDF patterns in human blood resulting from different occupational exposures. *Chemosphere* 1992, **25** : 1101-1108

PÄPKE O, BALL M, LIS A. PCDD/PCDF in humans - an update of background data. *Organohalogen Compounds* 1993, **13** : 81-84

- PÄPKE O, BALL M, LIS A. PCDD/PCDF in humans - an update of background data. *Chemosphere* 1994, **29** : 2355-2360
- PÄPKE O, BALL M, LIS A, WUTHE J. PCDD/PCDFs in humans, follow-up of background data for Germany 1994, *Chemosphere* 1996, **32** : 575-582
- PÄPKE O, HERMANN T, BALL M. PCDD/PCDFs in humans, follow-up of background data for Germany, 1996. *Organohalogen Compounds* 1997, **33** : 530-534
- PÄPKE O. PCDD/PCDF : human background data for Germany, a 10-year experience. *Environ Health Perspect* 1998, **106** : 723-731
- PATTERSON DG JR, FINGERHUT MA, ROBERTS DW, NEEDHAM LL, SWEENEY MH et coll. Levels of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans in workers exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Am J Ind Med* 1989, **16** : 135-146
- PATTERSON DG JR, NEEDHAM LL, PIRKLE JL, ROBERTS DW, BAGBY J et coll. Correlation between serum and adipose tissue levels of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in 50 persons from Missouri. *Arch Environ Contam Toxicol* 1988, **17** : 139-143
- PATTERSON DG JR, TODD GD, TURNER WE, MAGGIO V, ALEXANDER LR, NEEDHAM LL. Levels of non-ortho-substituted (coplanar), mono- and di-ortho-substituted polychlorinated biphenyls, dibenzo-*p*-dioxins, and dibenzofurans in human serum and adipose tissue. *Environ Health Perspect* 1994, **102** : 195-204
- PIACITELLI LA, SWEENEY MH, PATTERSON DG et coll. Serum levels of 2,3,7,8-substituted PCDDs and PCDFs among workers exposed 2,3,7,8-TCDD contaminated chemicals. *Chemosphere* 1992, **25** : 251-254
- RAPPE C, BUSER HR, KUROKI H, MASUDA Y. Identification of polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) retained in patients with Yusho. *Chemosphere* 1978, **8** : 259-266
- RAPPE C, NYGREN M, BUSER HR, KAUPPINEN T. Occupational exposure to polychlorinated dioxins and dibenzofurans. In : *Chlorinated Dioxins and Related Compounds : Impact on the Environment*. Hutzinger O, Frei RW, Merian E, Pocchhiari eds. London : Pergamon Press, 1982 : 495-513.
- RAPPE C, NYGREN M, MARKLUND S, KELLER LO, BERGQVIST PA, HANSSON M. Assessment of human exposure to polychlorinated dibenzofurans and dioxins. *Environ Health Perspect* 1985, **60** : 303-304
- ROEGNER RH, GRUBBS WD, LUSTIK MB, BROCKMAN AS, HENDERSON SC et coll. Air Force Health Study : an epidemiologic investigation of health effects in Air Force personnel following exposure to herbicides. Serum dioxin analysis of 1987 examination results. NTIS# AD A-237-516 through AD 1991, **A** : 237-524
- ROSENBERG C, KINTSAS H, TORNSEUS J, MUTANEN P, JAPPINEN P et coll. PCDD/PCDF levels in the blood of workers in pulp and paper mill. *Organohalogen Compounds* 1994, **21** : 101-104
- ROSENBERG C, KONTASAS H, TORNAEUS J, MUTANEN P, JAPPINEN P et coll. PCDD/PCDF levels in the blood of workers at a pulp and paper mill. *Chemosphere*. 1995, **31** : 3933-3944
- RYAN JJ, SCHECHTER AS, MASUDA Y, KIKUCHI M. Comparison of PCDD and PCDFs in the tissues of yusho patients with those from the general population in Japan and China. *Chemosphere* 1987, **16** : 2017-2025

- RYAN JJ, GASIEWICZ TA, BROWN JF JR. Human body burden of polychlorinated dibenzofurans associated with toxicity based on the Yusho and Yucheng incidents. *Fundam Appl Toxicol* 1990, **15** : 722-731
- RAPPE C, KJELLER LO, KULP SE, DE WITT C, HASSELSTEN I, PALM O. Levels, profile and pattern of PCDDs and PCDFs in samples related to the production and use of chlorine. *Chemosphere* 1991, **23** : 1629-1636
- RYAN JJ, LIZOTTE R, PANOPIO LG, SHEWCHUK C, LEWIS DA, SUN WF. Polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins (PCDDs) and polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) in human milk samples collected across Canada in 1986-87. *Food Addit Contam* 1993, **10** : 419-428
- SCHECHTER AJ, MALKIN R, PAPKE O, BALL M, BRANDT-RAUF PW. Dioxin levels in blood of municipal incinerator workers. *Medical Science Research* 1991, **19** : 331-2
- SCHECHTER A, DI DOMENICO A, TURRIO-BALDASSARRI L, RYAN JJ. Dioxin and dibenzofuran levels in milk of women from four geographical regions in Italy as compared to levels in other countries. *Organohalogen Compounds* 1992, **9** : 227-230
- SCHECHTER A, JIANG K, PÄPKE O, FURST P, FURST C. Comparison of dibenzodioxin levels in blood and milk in agricultural workers and others following pentachlorophenol exposure in China. *Chemosphere* 1994, **29** : 2371-2380
- SCHECHTER A, LE CAO DAI, THUY LTB, HOANG TRONG QUYNH, DINH QUANG MINH et coll. Agent Orange and the Vietnamese : The persistence of elevated dioxin levels in human tissues. *Am J Public Health* 1995, **85** : 516-522
- SCHECHTER A, MCGEE H, STANLEY JS, BOGGESS K, BRANDT-RAUF P. Dioxins and dioxin-like chemicals in blood and semen of American Vietnam veterans from the state of Michigan. Published erratum appears in *Am J Ind Med* 1997, **31** : 370-371
- SCHECHTER A, PÄPKE O, BALL M, LIS A, BRANDT-RAUF P. Dioxin concentrations in the blood of workers at municipal waste incinerators. *Occup Environ Med* 1995, **52** : 385-387
- SCHECHTER A, PÄPKE O, LIS A, BALL M, RYAN JJ et coll. Decrease in milk and blood dioxin levels over two years in a mother nursing twins : estimates of decreased maternal and increased infant dioxin body burden from nursing. *Chemosphere* 1996a, **32** : 543-549
- SCHECHTER A, RYAN JJ, MASUDA Y, BRANDT-RAUF P, CONSTABLE J et coll. Chlorinated and brominated dioxins and dibenzofurans in human tissue following exposure. *Environ Health Perspect* 1994, **102** : 135-147
- SCHECHTER A, RYAN JJ, PÄPKE O. Decrease in levels and body burden of dioxins, dibenzofurans, PCBS, DDE, and HCB in blood and milk in a mother nursing twins over a thirty-eight month period. *Chemosphere* 1998, **37** : 1807-1816
- SCHECHTER A. A selective historical review of congener-specific human tissue measurements as sensitive and specific biomarkers of exposure to dioxins and related compounds. *Environ Health Perspect* 1998, **106** : 737-742
- SCHECHTER AJ, LI L, KE J, FURST P, FURST C, PÄPKE O. Pesticide application and increased dioxin body burden in male and female agricultural workers in China. *J Occup Environ Med* 1996b, **38** : 906-911
- SCHLATTER C. Chlorinated dibenzo-*p*-dioxins and -furans : problems in analysis of biomarkers. *Clin Chem* 1994, **40** : 1405-1408

SCHUHMACHER M, DOMINGO JL, LLOBET JM, KIRIVANTA H, VARTIAINEN T. Concentrations in milk of non-occupationally exposed women living in southern Catalonia, Spain. *Chemosphere*, 1999, **38** : 995-1004

SCHUHMACHER M, DOMINGO JL, LLOBET JM, LINDSTROM G, WINGFORS H. Dioxin and dibenzofuran concentrations in blood of a general population from Tarragona, Spain. *Chemosphere* 1999, **38** : 1123-1133

SCHUHMACHER M, DOMINGO JL, LLOBET JM, LINDSTRÖM G, WINGFORS H. Dioxin and dibenzofuran concentrations in adipose tissue of a general population from Tarragona, Spain. *Chemosphere* 1999, **38** : 2475-2487

STEPHENS RD, RAPPE C, HAYWARD DG, NYGREN M, STARTIN J et coll. World Health Organization international intercalibration study on dioxins and furans in human milk and blood. *Anal Chem* 1992, **64** : 3109-3117

SVENSSON BG, NILSSON A, HANSSON M, RAPPE C, AKESSON B, SKERFVING S. Exposure to dioxins and dibenzofurans through the consumption of fish. *N Engl J Med* 1991, **324** : 8-12

TEPPER A, BURT S, PIACITELLI L, PATTERSON DG JR. Serum levels of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans in pulp and paper mill workers. *Chemosphere* 1997, **34** : 1587-1603

THOMA H, MUCKE W, KAUERT G. Comparison of the polychlorinated dibenzo-*p*-dioxin and dibenzofuran in human tissue and human liver. *Chemosphere* 1990, **20** : 433-442

TUINSTRA LGM, HULSMAN M, BOERSMA ER. The Dutch PCB/dioxin study : contents of dioxins, planar and other PCBs in human milk from the Rotterdam and Groningen area. *Chemosphere* 1994, **29** : 2267-2277

US Environmental Protection Agency. Chlorinated dioxins and furans in the general US population : NHATS FY87 results, Washington, DC : Office of Toxic Substances. 1991, EPA-560/5-91-003

VAN CLEUVENBERGEN R, WEVERS M, SCHOETERS J, DE FRE R. Dioxins (PCDD and PCDF) in human milk from Flanders, Belgium : concentration levels and congener profile. *Organohalogen Compounds* 1994, **20** : 215-220

VAN DEN BERG M, BIRNBAUM L, BOSVELD ATC, BRUNSTROM B, COOK P et coll. Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife. *Environ Health Perspect* 1998, **106** : 775-792

VAN DEN BERG M, DE JONGH J, POIGER H, OLSON JR. The toxicokinetics and metabolism of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins (PCDDs) and dibenzofurans (PCDFs) and their relevance for toxicity. *Crit Rev Toxicol* 1994, **24** : 1-74

VARTIAINEN T, TUOMISTO J. Jäteliikkeen aiheuttaman terveysriskin sekä ympäristövaikutusten arviointi (in Finnish). National Public Health Institute, Kupio, Finland, 1994

VARTIAINEN T, LAMPI P, TUOMISTO J T, TUOMISTO J. Polychlorodibenzo-*p*-Dioxin and Polychlorodibenzofuran Concentrations in human fat samples in a village after pollution of drinking water with chlorophenols. *Chemosphere* 1995, **30** : 1429-1438

VARTIAINEN T, SAARIKOSKI S, JAAKKOLA JJ, TUOMISTO J. PCDD, PCDF, and PCB concentrations in human milk from two areas in Finland. *Chemosphere* 1997, **34** : 2571-2583

VERGER P, CORDIER S, THUY LT, BARD D, DAI LC et coll. Correlation between dioxin levels in adipose tissue and estimated exposure to Agent Orange in south Vietnamese residents. *Environ Res* 1994, **65** : 226-242

VON MANIKOWSKY S, SAGUNSKI H, PÄPKE O, FABIG KR, NEUS H et coll. PCDD/PCDF indoor exposure in day-care centers and PCDD/PCDF blood concentrations of female employees. *Environ Health Perspect* 1998, **106** : 707-714

WELGE P, WITTSIEPE J, SCHREY P, EWERS U, EXNER M, SELENKA F. PCDD/F-levels in human blood of vegetarians compared to those of non-vegetarians. *Organohalogen Compounds* 1993, **13** : 13-17

WINGFORS H, LINDSTRÖM G, VAN BAVEL B, SCHUHMACHER M, HARDELL L. Multivariate data evaluation of PCB and dioxin profiles in the general population in Sweden and Spain. *Chemosphere* 2000, **40** : 1083-1088

WITTSIEPE J, SCHREY P, EWERS U, SELENKA F, WILHELM m. Decrease of PCDD/F levels in human blood from Germany over the past ten years. *Chemosphere* 2000, **40** : 1103-1109

WITTSIEPE J, SCHREY P, EWERS U, SELENKAF, WILHELM M. Decrease of PCDD/F levels in human blood from Germany over the past ten years (1989-1998). *Chemosphere* 2000, **40** : 1103-1109

World Health Organisation, Regional Office for Europe. Levels of PCB, PCDD and PCDF in breast milk : results of WHO-coordinated interlaboratory quality control studies and analytical field studies. Environmental health series 1989, n° 34, PUBL FADL Publishers, Copenhagen on behalf of the WHO Regional Office for Europe

World Health Organisation, Regional Office for Europe. Levels of PCB, PCDD and PCDF in breast milk : results of WHO-coordinated exposure studies. Environmental health series 1996, n° 3, Copenhagen on behalf of the WHO Regional Office for Europe

World Health Organisation, WHO Executive Summary Assessment of the health risk of dioxins : re-evaluation of the tolerable daily intake (TDI). WHO consultation - May 25-29 1998 Geneva Switzerland WHO European centre for the environment and health. International Programme on chemical safety.

11

Imprégnation de la population française

Les études d'imprégnation des populations françaises par les dioxines (PCDD ou PCDF) et composés voisins ont un double intérêt. Elles permettent d'une part de suivre l'évolution de l'imprégnation au cours du temps, ce qui offre l'avantage de pouvoir juger de l'efficacité des politiques de réduction des émissions. D'autre part, ces études devraient aussi permettre l'évaluation quantitative du risque en utilisant une autre approche que celle des expositions. L'approche par imprégnation pourrait être plus pertinente s'il est vrai que la métrologie la plus adéquate pour l'évaluation du risque est la charge corporelle, peut-être plus précisément estimée à partir de données d'imprégnation. Pour répondre à ces deux objectifs, suivi de l'imprégnation et évaluation quantitative du risque, il serait nécessaire de disposer d'échantillons représentatifs de la population. Le coût des analyses est l'un des principaux obstacles à la réalisation d'enquêtes représentatives. On dispose à ce stade de données préliminaires provenant du dosage de différents matériaux biologiques, le lait maternel et les tissus adipeux, qu'il s'agisse de graisse abdominale pariétale ou épiploïque ou de lipomes. Il n'existe pas à notre connaissance de données sur la concentration de PCDD ou de PCDF dans le sang de populations françaises.

Lait maternel

Une étude préliminaire de faisabilité analytique, à titre d'exploration, a été menée en 1989 sur 15 échantillons individuels de lait provenant de mères allaitantes de la région parisienne. Les échantillons ont été sélectionnés en raison d'une contamination bactérienne les rendant impropres à la consommation. La valeur moyenne en dioxines était de 20,1 pg TEQ/g de matières grasses (Gonzales et coll., 1996).

En 1998, le magazine *Que Choisir ?* a fait doser les dioxines dans le lait de 15 femmes habitant neuf départements différents. Sept de ces femmes étaient primipares. Les données sur l'âge, la corpulence, la durée de résidence, le moment du recueil des échantillons au cours de l'allaitement n'étaient pas précisées. Les taux de PCDD/PCDF étaient compris entre 14,6 à 35,2 pg TEQ/g de matières grasses, avec une moyenne de 21,2 (Sokolsky, 1998).

L'Institut de veille sanitaire (InVS) et le Centre Rhône-Alpes d'épidémiologie et de prévention sanitaire (CAREPS) ont réalisé une étude d'imprégnation du lait maternel par les dioxines et composés voisins à la demande de l'Agence de l'environnement et de la maîtrise de l'énergie (ADEME) et du ministère chargé de la Santé. Cette enquête descriptive transversale, réalisée en 1998-1999, a porté sur des femmes allaitantes faisant don de lait à un lactarium français. Les mères volontaires devaient satisfaire aux critères de sélection suivants :

- mère primipare, *a priori* en bonne santé ;
- âgée de moins de 35 ans ;
- période d'allaitement de la 4^e à la 8^e semaine après l'accouchement ;
- sans grossesse multiple (pas de jumeaux) ;
- avec allaitement exclusif ;
- résidence au même endroit depuis au moins 5 ans (le critère a été supprimé par la suite) ;
- non-utilisation de coquilles pour recueillir le lait ;
- pas de stérilisation du tire-lait avec des pastilles de chlore.

Pour chaque femme éligible au terme de l'entretien initial effectué par le personnel du lactarium, un échantillon de lait a été recueilli et analysé. Les lactariums ont donc été regroupés en fonction de leur proximité selon un découpage en 8 grandes régions telles qu'elles sont définies par l'INSEE (zones d'études et d'aménagement du territoire). De façon à ne pas imposer un surcroît de travail trop important pour certains petits lactariums, le nombre d'échantillons de lait à recueillir a été déterminé en fonction de l'activité du lactarium (nombre de donneuses par an).

Le nombre de sujets nécessaires par grande région a été défini en tenant compte des objectifs descriptifs et explicatifs de l'étude sur la base de valeurs moyennes attendues, selon les données de la littérature, se situant entre 15 et 25 pg TEQ/g avec un écart type de 7,5 pg TEQ/g de graisse. Finalement, un minimum de 30 échantillons par région a été retenu, soit 244 analyses au total.

Les résultats de cette étude ont été communiqués le 30 juin 2000 lors d'une conférence de presse à Paris, et sont présentés dans le tableau 11.I. Les teneurs en PCDD et PCDF des laits maternels sont en moyenne égales à 16,4 pg TEQ/g de matières grasses, et varient de 6,5 à 34,3 pg TEQ/g de matières grasses. La moyenne est comparable, voire inférieure, à celle des deux études citées ci-dessus. Les résultats ont été exprimés en I-TEQ selon la nomenclature OTAN, afin d'être comparés avec les résultats précédemment acquis en Europe. L'expression des résultats selon la nomenclature OMS (proposée en 1997) augmente d'environ 10 % à 20 % les résultats obtenus et conduit à une valeur moyenne de 19,6 pg TEQ/g de matières grasses.

178 Les résultats sont également comparés avec les résultats de l'étude de l'OMS (1996) menée en 1993 dans différents pays européens.

Tableau 11.I : Résultats de l'étude d'imprégnation du lait maternel en France (InVS/CAREPS, 2000)

	TEQ PCDD/F (pg TEQ/g de matières grasses)
Moyenne arithmétique	16,43
Moyenne géométrique	15,65
Médiane	15,79
Écart type	5,08
Minimum	6,50
Maximum	34,33

Tableau 11.II : Teneurs en PCDD/PCDF des laits maternels en Europe (OMS, 1996)

Pays	Année	Teneur (pg TEQ/g de matières grasses) ¹ (min-max)
Allemagne	1993	16,5
Autriche	1993	10,7-14,0
Belgique	1993	20,8-27,1
Danemark	1993	15,2
Espagne	1993	19,4-25,5
Finlande	1993	12,0-21,5
France*	1998-99	16,5 (6,5-34,3)
Grande-Bretagne	1993-94	17,9
Pays-Bas*	1992-93	22,4 (10,0-35,9)

¹: données OMS (1996), sauf France (InVS et CAREPS, 2000); *: mesures effectuées sur échantillons individuels – dans les autres cas, les mesures ont été effectuées sur un ou plusieurs pools

On peut constater à l'examen des tableaux 11.I et 11.II que la moyenne des échantillons français est comparable à celle des autres pays industrialisés. Malgré des conditions en principe similaires d'inclusion des femmes donneuses, il est difficile de tirer des conclusions plus fermes des différences apparentes de valeur numérique, les conditions de recueil des échantillons, sur une base géographique notamment, étant très imprécises. Dans la campagne OMS, les dosages ont été effectués sur des échantillons poolés. On sait par ailleurs que les concentrations de dioxines dans le lait maternel ont baissé en Europe d'environ 20 % à 50 % entre 1988 et 1993.

Tissus graisseux

Une étude pilote a été réalisée sur 6 patients des deux sexes âgés de 54 à 87 ans et résidant en région parisienne (Huteau et coll., 1990). Au cours d'interventions de chirurgie abdominale réglée, des échantillons de graisse abdominale

(pariétale et épiploïque) ont été prélevés. La masse de ces échantillons était relativement faible, de 1 à 12 g, ce qui explique probablement le nombre important d'échantillons négatifs pour le dosage de l'un ou l'autre des congénères. Le calcul du TEQ à partir des données présentées dans la publication donne une moyenne arithmétique d'imprégnation de la graisse abdominale à 81,4 pg TEQ/g de matières grasses chez ces sujets relativement âgés.

Ces valeurs sont à comparer à celles observées sur un pool d'échantillons similaires et recueillis dans les mêmes années dans d'autres pays (tableau 11.III).

Tableau 11.III : Concentrations moyennes de dioxines et composés voisins dans des tissus adipeux recueillis dans des pays industrialisés dans les années quatre-vingt (d'après Schecter, 1994)

	Etats-Unis	Allemagne	Japon	Canada
pg TEQ/g MG	24	69	38	36

MG : matières grasses

Arfi (1999) a conduit une étude sur la teneur en dioxine de lipomes bénins chez 13 adultes de 29 à 93 ans dont 8 hommes. Ces lipomes ont fait l'objet d'une exérèse dans trois hôpitaux de la région parisienne. Les concentrations en dioxines et composés voisins étaient en moyenne de 34,8 pg TEQ/g de matières grasses (étendue 18-77 pg TEQ/g de matières grasses).

En conclusion, l'étude réalisée en France par l'InVS et l'ADEME concernant les teneurs en PCDD/PCDF dans le lait maternel, est actuellement la meilleure étude disponible sur l'imprégnation des populations françaises (et sans doute la meilleure également au plan international), car elle porte sur des effectifs importants, répartis sur l'ensemble du territoire français. Cependant, cette étude ne concerne qu'une fraction particulière de la population, les femmes allaitantes volontaires pour participer à l'étude. Ses résultats sont importants comme base pour un suivi de l'évolution de l'imprégnation des populations françaises par les PCDD et PCDF. Des répliques de ce travail seront nécessaires dans ce but, au moins pour ce qui concerne sa partie descriptive. Il sera sans doute possible d'envisager une méthodologie simplifiée et moins coûteuse. En ce qui concerne les comparaisons des données françaises avec les autres pays, les conclusions sont difficiles à tirer, même s'il apparaît que les résultats français pourraient se situer dans la moyenne supérieure européenne en raison de la baisse probable attendue dans les prochaines publications européennes. Pour les autres pays, les données de la littérature sont rarement explicites quant aux conditions de sélection des échantillons. Ceux-ci sont de plus généralement poolés et portent sur un petit nombre de sujets. Il suffit donc d'avoir inclus dans l'étude un ou plusieurs sujets dont

l'imprégnation est très éloignée de la moyenne pour biaiser considérablement dans un sens ou dans l'autre le résultat de l'analyse. De plus, les âges des sujets sont rarement documentés. Or les concentrations de PCDD/PCDF tendent à augmenter avec l'âge. D'autre part, les imprégnations tendent à diminuer dans les pays industrialisés (aux alentours de 50 % depuis le début des années quatre-vingt) (WHO, 1996). Enfin, il semble exister des différences régionales d'imprégnation. L'existence de données sur l'histoire résidentielle des sujets donneurs est donc importante. Un autre facteur qu'il convient de prendre en compte est la variabilité interlaboratoires des dosages, qui demeure non négligeable puisqu'elle semble être aux alentours de 20-30 %. Les résultats d'analyses d'échantillons portant sur un même tissu biologique doivent donc être interprétés en tenant compte de tous ces éléments. En particulier, l'examen comparatif des niveaux observés dans les pays les plus industrialisés (tableau 11.III) permet difficilement de conclure à des différences réelles d'imprégnation.

BIBLIOGRAPHIE

ARFI C. Contribution à l'évaluation de l'exposition aux dioxines de la population générale : étude de faisabilité du dosage des dioxines dans des lipomes et mise en corrélation avec l'exposition alimentaire. Laboratoire d'Hygiène et de Santé Publique, UFR de Pharmacie. Paris, 1999, université de Paris-V-René-Descartes : 44

GONZALES MJ, JIMENEZ B, HERNANDEZ LM, GONNORD MF. Levels of PCDD, PCDF in human milk from populations in Madrid and Paris. *Bull Environ Contamin Toxicol* 1996, **56** : 197-204

HUTEAU B, GONNORD MF et coll. PCDD and PCDF levels in human adipose tissue in France. *Dioxin '90-EPRI Seminar*, Bayreuth, Ecoinforma Press, 1990

INVS/CAREPS. Étude sur les dioxines et les furanes dans le lait maternel en France, 2000

SCHecter A. Exposure assessment. Measurement of dioxins and related chemicals in human tissues. *Dioxins and health*. A. Schecter. New-York, Plenum Press, 1994 : 449-485

SOKOLSKY C. Lait maternel et dioxines, les preuves de la contamination. *Que choisir ?* 1998, **350** : 15-17

WHO (World Health Organisation). *Levels of PCBs, PCDDs and PCDFs in human milk*. Second round of WHO-coordinated exposure study, WHO European Centre for Environment and Health, 1996

12

Cancérogénicité

Les études épidémiologiques les plus informatives sur les dioxines et le cancer ont été principalement réalisées chez des travailleurs fabriquant des phénoxy-herbicides et des chlorophénols contaminés avec des dioxines, et dans des populations exposées à un accident industriel (exemple de Seveso en 1976). Elles concernent également des travaux sur les cohortes de personnels militaires de l'armée américaine au Viêtnam exposées lors de l'épandage d'herbicides. Le tableau 12.I rassemble les principales cohortes de populations fortement exposées.

Tableau 12.I : Cohortes de populations fortement exposées

Cohortes	Caractéristiques
NIOSH	États-Unis, 12 usines
IARC	Internationale, 10 pays, 20 cohortes
Allemande	Allemagne, 4 usines
BASF	Allemagne, 1 usine
Boehringer	Allemagne, 1 usine
Hollandaise	Pays-Bas, 2 usines
Seveso	Italie, population de Seveso
US Air Force Ranch Hand	États-Unis, anciens combattants du Viêtnam

Un effort considérable a été fait pour caractériser l'exposition de ces populations, qui le sont souvent à des niveaux 100 à 1 000 fois plus élevés que la population générale. Ce chapitre se réfère largement à la revue sur la cancérogénicité des dioxines réalisée par le Centre international de recherche sur le cancer (IARC, 1997).

Incidence de cancers et mortalité dans les cohortes industrielles

Les populations considérées dans ces études de cohortes par les différents auteurs se recoupent assez souvent.

Usines américaines

L'étude sur la cohorte de douze usines américaines a été réalisée par le NIOSH (Fingerhut, 1991 ; Steenland et coll., 1999). La cohorte comprend 5 172 hommes et inclut vraisemblablement la plupart des travailleurs ayant été potentiellement exposés aux États-Unis à la 2,3,7,8-TCDD au cours de la fabrication de produits chimiques (principalement trichlorophénol, TCP et acide 2,4,5-trichlorophénoxyacétique, 2,4,5-T). Les niveaux sériques de 2,3,7,8-TCDD, mesurés en 1987 chez 253 membres de la cohorte dans deux usines, se situaient autour de 233 pg TEQ/g de matières grasses, en comparaison avec le taux de 7 pg TEQ/g de matières grasses mesuré dans un groupe de 79 travailleurs non exposés. Ces niveaux augmentaient à 418 pg TEQ/g chez 119 travailleurs exposés pendant plus d'un an (Fingerhut et coll., 1991). Une extrapolation à la date à laquelle ces travailleurs furent employés, en prenant une demi-vie de 7,1 années, indiquait un taux moyen sérique à cette époque de 2 000 pg TEQ/g de matières grasses (niveau le plus élevé : 32 000 pg TEQ/g). L'actualisation la plus récente du suivi de cette cohorte évalue la mortalité jusqu'en 1993 (Steenland et coll., 1999). Pour ce suivi, la cohorte a été restreinte à 3 538 travailleurs de huit usines avec un historique professionnel détaillé. Une matrice d'exposition a été appliquée pour estimer le degré d'exposition à la 2,3,7,8-TCDD pour l'ensemble de la cohorte. Le SMR (*standardized mortality ratio*) pour tous cancers confondus était de 1,13 (intervalle de confiance à 95 % :

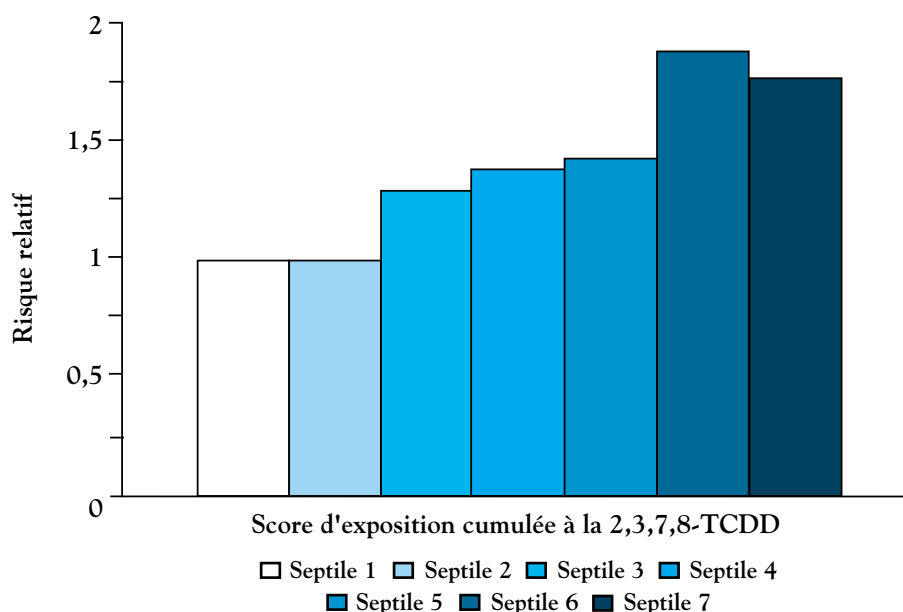


Figure 12.1 : Mortalité tous cancers en fonction du score d'exposition cumulée à la 2,3,7,8-TCDD (intervalle de temps de 15 ans). Cohorte du NIOSH, États-Unis (d'après Steenland et coll., 1999)

1,02-1,25). Une corrélation, positive, linéaire, statistiquement significative, a été mise en évidence entre l'exposition et la mortalité pour tous cancers confondus et pour le cancer du poumon (figure 12.1).

Le SMR tous cancers confondus pour le groupe le plus exposé était de 1,60 (intervalle de confiance à 95 % : 1,15-1,82). L'excès de risque de cancer était limité aux travailleurs les plus exposés, avec des expositions qui avaient dû probablement être 100 à 1 000 fois plus élevées que celles de la population générale et similaires aux niveaux de 2,3,7,8-TCDD utilisés dans les études animales.

Cohorte de l'accident industriel en Allemagne

Dans l'accident survenu en 1953 dans l'unité de production BASF de TCP, à Ludwigshafen (Allemagne), le nombre total d'employés ayant été impliqués directement dans la production ou dans les activités subséquentes de nettoyage, de réparation ou de maintenance a été évalué à 243 hommes et 4 femmes (Zober et coll., 1990 ; Ott et Zober, 1996). Des dosages sériques de 2,3,7,8-TCDD ont été obtenus pour 138 membres de la cohorte (Ott et coll., 1993). La moyenne géométrique des niveaux de 2,3,7,8-TCDD était de 15,4 parties par trillion (ppt) (écart : < 1-553 ppt). Des estimations basées sur des modèles de doses cumulées de 2,3,7,8-TCDD ($\mu\text{g/kg}$) ont été effectuées pour chaque sujet pour la durée de l'exposition. Les concentrations moyennes de 2,3,7,8-TCDD étaient de 38 ppt pour le sous-groupe sans chloracné, 421 ppt pour le sous-groupe avec chloracné modérée et 1 008 ppt pour le sous-groupe avec chloracné sévère. La cohorte a été suivie pour la mortalité et l'incidence de cancer jusqu'en 1992. La mortalité par cancer augmentait avec les niveaux d'exposition (figure 12.2).

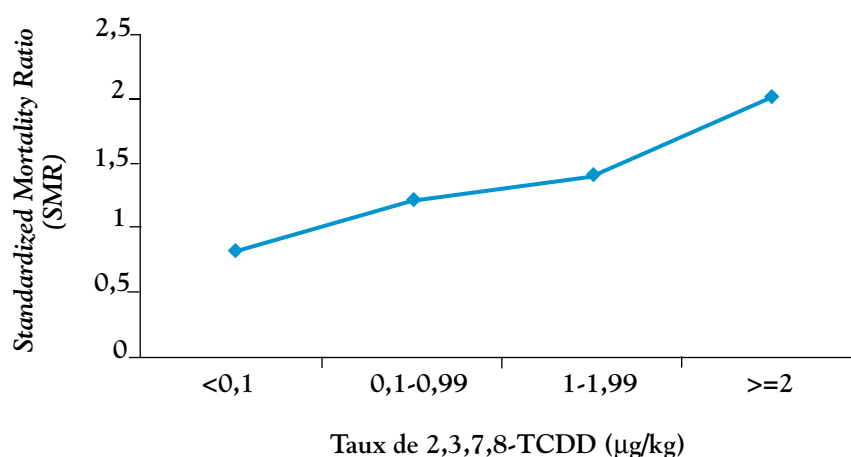


Figure 12.2 : Mortalité tous cancers en fonction de l'exposition à la 2,3,7,8-TCDD. Cohorte BASF, Allemagne (d'après Ott et Zober, 1996)

Les cancers digestifs et respiratoires tendaient également à augmenter avec les niveaux d'exposition. Une analyse montrait une relation positive entre l'exposition à la 2,3,7,8-TCDD et l'incidence tous cancers confondus chez les fumeurs mais pas chez les non-fumeurs.

Autres usines en Allemagne

Becher et coll. (1996) rapportent la mortalité chez 2 479 travailleurs, employés dans quatre usines allemandes produisant des phénoxy herbicides et des chlorophénols, en contact avec ces substances et leurs contaminants, PCDD (comprenant souvent de la 2,3,7,8-TCDD) et PCDF. Cette étude n'inclut pas la cohorte de l'accident BASF (Zober et coll., 1990). En revanche, elle concerne les travailleurs de l'usine Boehringer-Ingelheim à Hambourg : les résultats pour cette dernière usine ont également été rapportés séparément dans plusieurs études (Manz et coll., 1991 ; Nagel et coll., 1994 ; Flesch-Janys et coll., 1995). Les concentrations sanguines de 2,3,7,8-TCDD ont été mesurées chez les travailleurs de 3 des 4 usines (Kogevinas et coll., 1997). Dans la cohorte entière, on observait une augmentation de mortalité tous cancers combinés (tableau 12.II).

Tableau 12.II : Mortalité par cancers dans la cohorte allemande

	Nombre de décès	SMR*	IC 95 %**
Tous cancers confondus	138	1,2	1,0-1,4
Cancers de la bouche et du pharynx	9	3,0	1,4-5,6
Cancer du poumon	47	1,4	0,9-2,9
Lymphomes non hodgkiniens	6	3,3	1,2-7,1

* *standardized mortality ratio* ; ** intervalle de confiance

Dans l'usine chimique Boehringer-Ingelheim, une éclosion de chloracné en 1954 a abouti à l'arrêt de la production de TCP et 2,4,5-T. En 1957, la production a été reprise en utilisant un nouveau procédé qui réduisait la formation de 2,3,7,8-TCDD. L'état sanitaire de tous les employés présents dans l'usine pendant au moins 3 mois entre le 1^{er} janvier 1952 et le 31 décembre 1984 (1 184 hommes et 399 femmes) a été exploré jusqu'en 1989 (Manz et coll., 1991). Les causes de décès ont été extraites des dossiers médicaux ou, quand elles n'étaient pas indiquées, des certificats de décès. Les concentrations de 2,3,7,8-TCDD ont été mesurées chez les travailleurs de divers départements de production, principalement après la fermeture de l'usine en 1984. Chez les hommes, la mortalité tous cancers confondus était augmentée en comparaison de celle de la population générale (93 décès ; SMR 1,2 ; IC à 95 % : 1,0-1,5). L'augmentation la plus élevée était retrouvée parmi les employés embauchés avant 1954 (qui étaient les plus exposés à la 2,3,7,8-TCDD, selon l'histoire de l'usine et les dosages sériques subséquents). La mortalité

chez les femmes dans la cohorte a été étudiée par Nagel et coll. (1994). La mortalité par cancer du sein était plus élevée que celle attendue (10 cas ; SMR 2,4 ; IC à 95 % : 1,1-4,4) et augmentait avec la durée du travail. La mortalité de 1 189 hommes a été étudiée jusqu'en 1992 (Flesch-Janys et coll., 1995). La concentration de chaque congénère PCDD/PCDF dans le tissu adipeux ou le sang a été déterminée dans un échantillon de 190 travailleurs. À l'aide d'un modèle monocompartimental avec une cinétique de premier ordre, un niveau de fin d'exposition fut calculé pour chacun des travailleurs employés dans ces départements. Pour la cohorte entière, le niveau moyen estimé de 2,3,7,8-TCDD était de 141,4 pg TEQ/g de matières grasses (médiane, 38,2 pg TEQ/g). Une exposition à d'autres cancérigènes (comme le sulfate de diméthyle) et le benzène avait eu lieu dans certains départements. La mortalité totale était élevée dans toutes les catégories et montrait une augmentation significative ($p = 0,01$) avec l'augmentation des niveaux d'exposition (figure 12.3). Aucun résultat sur des cancers spécifiques n'a été rapporté.

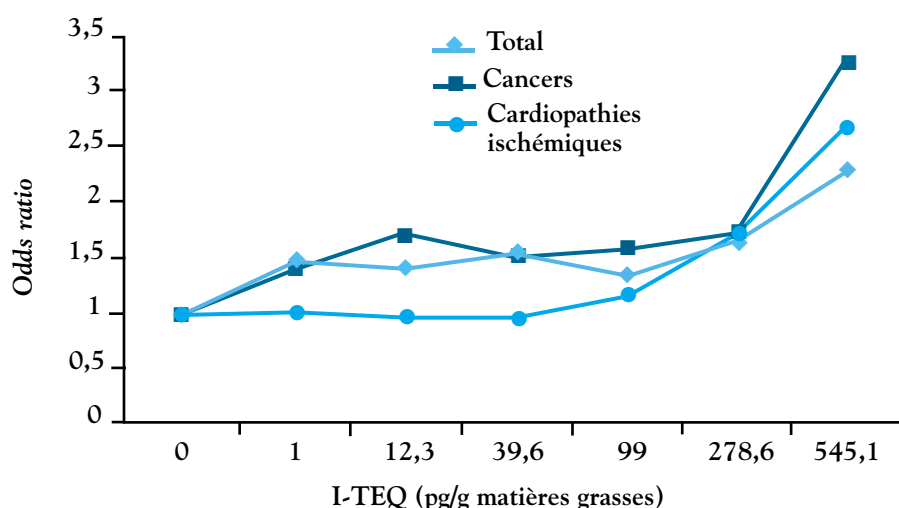


Figure 12.3 : Mortalité toutes causes, tous cancers, et par cardiopathies ischémiques en fonction de l'exposition aux dioxines (PCDD/PCDF). Cohorte Boehringer, Allemagne (d'après Flesch-Janys et coll., 1995)

Usines hollandaises

La mortalité a été étudiée aux Pays-Bas dans deux cohortes de travailleurs employés entre 1955 et 1986 dans la synthèse et la formulation de phénoxy herbicides et de chlorophénols (Bueno de Mesquita et coll., 1993). Dans l'une des usines (A), où le 2,4,5-T et ses dérivés représentait la principale production, un accident en 1963 a provoqué une libération de PCDD, incluant de la

2,3,7,8-TCDD. Dans l'usine B, la production incluait l'acide 4-chloro-2-méthyl-phénoxyacétique (MCPA), l'acide 4-chloro-2-méthyl-phénoxypropionique (MCP) et l'acide 2,4 dichlorophénoxyacétique (2,4-D). L'étude comprenait 2 074 travailleurs mâles des deux usines (963 exposés aux phénoxy-herbicides et 1 111 non exposés). De plus, 145 travailleurs probablement exposés à la 2,3,7,8-TCDD durant l'accident industriel et les opérations de nettoyage ont été inclus. L'étude a été ensuite étendue dans le temps (1955-1991) et la taille de l'échantillon a été élargie (2 298 sujets dont 191 femmes) (Hooiveld et coll., 1998). L'évaluation de l'exposition fut basée sur l'historique des emplois et sur des niveaux sériques de 2,3,7,8-TCDD modélisés, mesurés en 1993 dans une sous-catégorie de 31 exposés survivants (concentration moyenne 53 pg TEQ/g de matières grasses ; écart 1,9-194) et 16 membres non exposés de la cohorte (concentration moyenne 8 pg TEQ/g de matières grasses). Quatorze sujets exposés durant l'accident de l'usine A en 1963 avaient les niveaux les plus élevés (concentration moyenne 96 pg TEQ/g de matières grasses ; écart 15,8-194). Dans cette usine, toutes les causes de mortalité (139 observés ; SMR 1,3 ; IC à 95 % : 1,1-1,5) et la mortalité tous cancers (51 observés ; SMR 1,5 ; IC à 95 % : 1,1-1,9) étaient significativement augmentées. Des excès de cancers spécifiques étaient observés pour la vessie (4 observés ; SMR 3,7 ; IC à 95 % : 1,0-9,5), le cancer du rein (4 observés ; SMR 4,1 ; IC à 95 % : 1,1-10,4) et les lymphomes non hodgkiniens (3 observés ; SMR 3,8 ; IC à 95 % : 0,8-1,0). Si les travailleurs étaient subdivisés en trois catégories (basse, moyenne et haute exposition) en accord avec des niveaux sériques de 2,3,7,8-TCDD prédits selon des modèles, les risques relatifs pour toutes les causes, tous les cancers et le cancer du poumon étaient

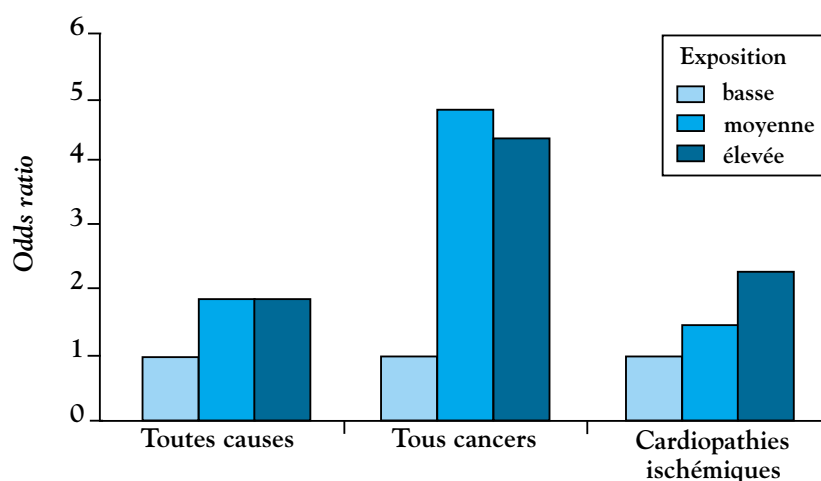


Figure 12.4 : Mortalité toutes causes, tous cancers et mortalité par cardiopathies ischémiques en fonction du modèle prédictif d'exposition à la 2,3,7,8-TCDD. Cohorte hollandaise (Hooiveld et coll., 1998)

significativement plus élevés dans les catégories moyennes et élevées, et étaient les plus élevés dans la catégorie la plus exposée (figure 12.4).

Étude multipays de l'IARC

Une cohorte internationale de travailleurs exposés aux phénoxy-herbicides et aux chlorophénols a été constituée par le Centre international de recherche sur le cancer (Saracci et coll., 1991). Elle comprenait 16 863 hommes et 1 527 femmes employés dans la production ou dans la pulvérisation, issus de 20 cohortes provenant de 10 pays. La cohorte internationale de l'IARC a été actualisée et élargie avec les résultats de Fingerhut et coll. (1991), de Becher et coll. (1996) et de Kogevinas et coll. (1997). Les suivis différaient selon les usines, jusqu'en 1991-1992 pour la plupart des usines européennes, et jusqu'en 1987 pour les usines américaines. Les niveaux courants de 2,3,7,8-TCDD, mesurés chez 574 travailleurs de 10 sociétés dans 7 pays, allaient de 3 à 389 pg TEQ/g de matières grasses. Parmi les travailleurs exposés à la 2,3,7,8-TCDD ou à des PCDD plus chlorés, la mortalité était élevée pour les sarcomes des tissus mous (6 décès ; SMR 2,0 ; IC à 95 % : 0,8-4,4). La mortalité tous cancers confondus (710 décès ; SMR 1,1 ; IC à 95 % : 1,0-1,2), les lymphomes non hodgkiniens (24 décès ; SMR 1,3 ; IC à 95 % : 0,9-2,1) et les cancers du poumon (225 décès ; SMR 1,1 ; IC à 95 % : 1,0-1,3) était légèrement élevée. Les risques pour tous les cancers combinés, pour les sarcomes des tissus mous et les lymphomes augmentaient en fonction du temps depuis l'exposition initiale (tableau 12.III). Dans une comparaison directe entre les travailleurs exposés aux PCDD hautement chlorés et ceux exposés aux produits plus faiblement ou non chlorés, un risque de 1,3 pour tous les cancers confondus (IC à 95 % : 1,0-1,8) fut retrouvé. Cette étude représente globalement la cohorte la plus importante de travailleurs exposés à la 2,3,7,8-TCDD.

Tableau 12.III : Mortalité par cancers dans la cohorte internationale IARC

	Nombre de décès	SMR*	IC 95 %**
Tous cancers confondus	710	1,1	1,0-1,2
Sarcomes de tissus mous	6	2,0	0,8-4,4
Lymphomes non hodgkiniens	24	1,3	0,9-2,1
Cancers du poumon	225	1,1	1,0-1,3

* *standardized mortality ratio* ; ** intervalle de confiance

Deux études cas-contrôle sur les sarcomes des tissus mous (11 cas incidents, 55 contrôles) et sur les lymphomes non hodgkiniens (32 cas incidents, 158 contrôles) ont été conduites par Kogevinas et coll. (1995) au sein de la cohorte de l'IARC (Saracci et coll., 1991). Un comité de trois hygiénistes industriels a estimé les expositions à 21 substances chimiques ou mélanges. Un score d'exposition cumulée a été calculé pour chaque sujet et chaque

substance, sur la base d'un niveau estimé et de la durée d'exposition (en années). Un excès de risque pour les sarcomes des tissus mous était associé avec une exposition à n'importe quel phénoxy-herbicide (*odds ratio* 10,3 ; IC à 95 % : 1,2-91,0). Les sarcomes des tissus mous étaient aussi associés avec une exposition à la 2,3,7,8-TCDD (*odds ratio* 5,2 ; IC à 95 % : 0,9-32,0). L'*odds ratio* entre lymphomes non hodgkiniens et exposition à la 2,3,7,8-TCDD était de 1,9 (IC à 95 % : 0,7-5,1). Une augmentation du risque était observée pour une exposition cumulée à la 2,3,7,8-TCDD (figure 12.5). Alors que Saracci et coll. (1991) ont étudié les hommes dans la cohorte de l'IARC, 701 femmes ont été étudiées par Kogevinas et coll. (1993) quant à l'incidence de cancers et la mortalité. Parmi les 169 femmes probablement exposées à la 2,3,7,8-TCDD, un excès d'incidence était observé pour tous les cancers combinés (9 cas ; *standardized incidence ratio* (SIR) 2,2 ; IC à 95 % : 1,02-4,2). Il y avait un cas de cancer du sein (SIR 0,9 ; IC à 95 % : 0,0-4,8).

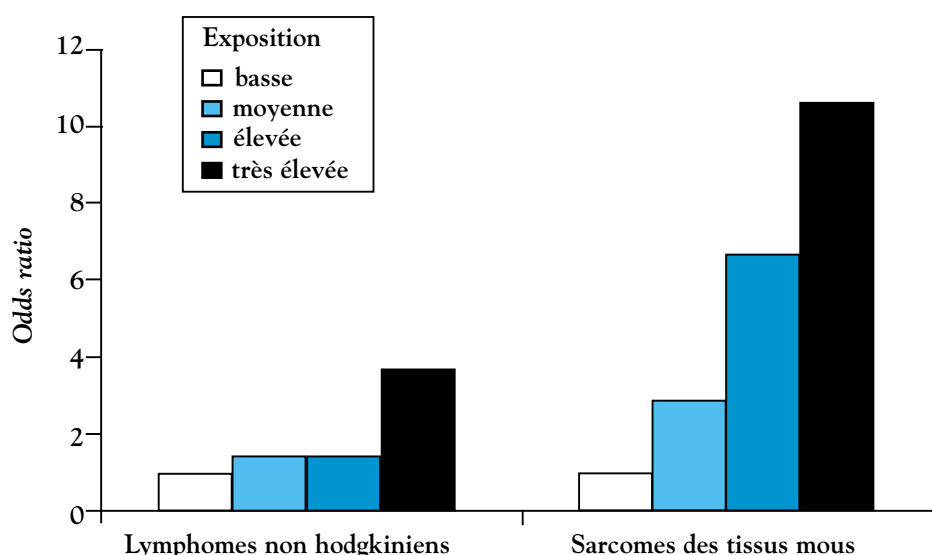


Figure 12.5 : Risque pour les lymphomes non hodgkiniens et les sarcomes des tissus mous. Cohorte de l'IARC (Étude cas-contrôle emboîtée). Matrice d'exposition à la 2,3,7,8-TCDD (d'après Kogevinas, 1995)

Incidence de cancers et mortalité dans la population de Seveso

La mortalité et l'incidence de cancers dans la population de Seveso exposée à l'accident industriel ont été étudiées. La zone contaminée fut subdivisée en

3 zones d'exposition (A, B et R) en fonction des niveaux moyens de 2,3,7,8-TCDD mesurés dans les échantillons de sol. En 1976, les niveaux de 2,3,7,8-TCDD chez 19 sujets de la zone A sélectionnés variaient de 828 ppt à 56 000 ppt. Les niveaux sériques de 2,3,7,8-TCDD ont été mesurés vingt ans après l'accident (Landi et coll., 1997) sur des résidents choisis au hasard dans la zone la plus contaminée (zone A, 7 sujets, moyenne géométrique = 53,2 ppt), dans la zone moins contaminée (zone B, 55 sujets, 11 ppt) et dans la zone non contaminée (zone non ABR, 59 sujets, 4,9 ppt). La population de 11 villes entourant la zone contaminée fut choisie comme référence. La mortalité et l'incidence de cancers pour la période 1976-1986 ont déjà été rapportées (Bertazzi et coll., 1989, 1993). Dans la période 1976-1991, il y avait 750 sujets en zone A et 16 décès par cancer, 5 000 sujets en zone B et 152 décès par cancer et 30 000 sujets en zone R et 1 008 décès par cancer. La mortalité toutes causes et la mortalité tous cancers ne différaient pas significativement de celles attendues dans chacune des zones contaminées.

La mortalité par cancer gastro-intestinal était augmentée. Les femmes avaient un risque relatif pour tous les cancers digestifs combinés de 1,5 (5 décès ; IC à 95 % : 0,5-3,5) dans la zone A. Dans la zone B, il y avait également un excès de risque pour les cancers digestifs dix ans après l'accident. Les femmes avaient une mortalité augmentée par cancer de l'estomac (RR = 2,4, IC à 95 % : 0,8-5,7) et les hommes avaient une mortalité augmentée par cancer du rectum (RR = 6,2, IC à 95 % : 1,7-15,9).

La mortalité due à diverses hémopathies malignes était augmentée. Les risques les plus élevés étaient observés en zone B pour la leucémie chez les hommes (RR = 3,1, IC à 95 % : 1,3-6,4), le myélome chez les femmes (RR = 6,6, IC à 95 % : 1,8-16,8) et la maladie de Hodgkin pour les deux sexes (RR = 3,3, IC à 95 % : 0,4-11,9 chez les hommes et RR = 6,5, IC à 95 % : 0,7-23,5 chez les femmes). Les sarcomes des tissus mous étaient élevés seulement chez les hommes en zone R (RR = 2,1, IC à 95 % : 0,6-5,4).

Il n'y avait pas d'augmentation de la mortalité par les principaux cancers (respiratoires chez les hommes et cancers du sein chez les femmes). Les résultats du suivi sur quinze ans de l'incidence de cancer et sur vingt ans de la mortalité ont été rapportés récemment (Bertazzi et coll., 1999). Il n'y avait globalement pas d'augmentation du risque de cancer, bien qu'une augmentation du risque de cancer ait été observée durant les cinq dernières années du suivi. La mortalité et l'incidence de cancer des systèmes hématopoïétique et lymphatique étaient plus élevées en zones A et B (RR = 1,8, $p < 0,001$) dans les deux sexes. En zones A et B, la mortalité par cancer hépatobiliaire augmentait chez les femmes, alors que la mortalité par cancer pulmonaire et rectal augmentait chez les hommes.

L'incidence de cancer chez des sujets de 0 à 19 ans a été analysée séparément (Pesatori et coll., 1993). Étant donné le petit nombre de résultats, les trois zones contaminées et les 2 sexes furent groupés ensemble. Dix-sept cas de cancers ont été observés (RR 1,2, IC à 95 % : 0,7-2,1). Deux cancers de

l'ovaire furent observés, alors qu'aucun cas n'était attendu. Deux cancers de la thyroïde chez des filles donnèrent un risque relatif de 4,6 (IC à 95 % : 0,6-32,7). Les cancers hématopoïétiques et lymphatiques étaient augmentés (9 cas ; RR 1,6, IC à 95 % : 0,7-3,4), particulièrement les lymphomes hodgkiniens (3 cas ; RR 2,0, IC à 95 % : 0,5-7,6) et les leucémies myéloïdes (3 cas ; RR 2,7, IC à 95 % : 0,7-11,4).

Études chez les pulvérisateurs de pesticides et herbicides

Les études chez le personnel de l'US Air Force ayant appliqué l'agent orange et les nombreuses études cas-contrôle effectuées, dans certaines communautés, sur les sarcomes des tissus mous, les lymphomes malins et autres cancers, de même que les études sur des sujets exposés à des mélanges non déterminés de pesticides et herbicides ou à des herbicides non contaminés par des PCDD, n'ont pas fait l'objet de revues. Les résultats disponibles (par exemple Axelson et coll., 1980 ; Hardell et coll., 1981 ; Blair et coll., 1983 ; Coggon et coll., 1986 ; Michalek et coll., 1990 ; Lynge 1993) indiquent des niveaux de 2,3,7,8-TCDD inférieurs (et le plus souvent très inférieurs) à ceux des travailleurs industriels et de la population de Seveso. Dans les études cas-contrôle suédoises (Nygren et coll., 1986), le niveau moyen chez 13 sujets exposés était de 2 pg TEQ/g de matières grasses, alors que chez 18 sujets non exposés, il était de 3 pg TEQ/g de matières grasses. Dans une étude concernant les pulvérisateurs commerciaux les plus lourdement exposés en Nouvelle-Zélande (Smith et coll. 1992), les niveaux de 2,3,7,8-TCDD chez les pulvérisateurs ayant cinq à dix ans de pratique étaient voisins du bruit de fond. Des niveaux plus élevés de 2,3,7,8-TCDD ont été retrouvés chez des pulvérisateurs, employés avant 1960, ayant une durée moyenne de pulvérisation du 2,4,5-T de seize ans (53 ppt). Des valeurs plus basses ont été observées chez des pulvérisateurs commerciaux en Australie (Johnson et coll., 1992) et chez les pulvérisateurs de la cohorte Ranch Hand (pulvérisateurs de phénoxy-herbicides) de l'armée américaine au Viêtnam (Ketchum et coll., 1999). Les niveaux de 2,3,7,8-TCDD chez les autres anciens combattants américains au Viêtnam étaient voisins du bruit de fond.

Une étude cas-contrôle sur le cancer du foie a été faite à Hanoi, au Viêtnam. Une augmentation de risque pour le carcinome hépatocellulaire (OR 8,8, IC à 95 % : 1,9-4,1) a été observée parmi les sujets ayant servi dans l'armée au Sud-Viêtnam pendant dix ans ou plus durant la période de pulvérisation de l'agent orange par l'armée américaine (Cordier et coll., 1993).

En conclusion, des excès de risque faibles pour tous les cancers combinés ont été trouvés dans toutes les études de cohortes industrielles où l'évaluation de l'exposition était correcte (tableau 12.IV). L'excès de risque était de l'ordre de 40 %, vingt ans après la première exposition. À Seveso, le risque global de

cancer n'est pas augmenté mais tendait à augmenter dans les cinq dernières années du suivi. Dans toutes les cohortes industrielles étudiées, le risque augmentait en fonction de l'augmentation de l'exposition. Les risques pour certains cancers spécifiques (lymphomes, myélomes, sarcomes des tissus mous, cancers du poumon et du foie) étaient augmentés dans certaines de ces études, mais globalement, les résultats ne sont pas cohérents entre les études et il ne semble pas exister d'effet sur un cancer particulier.

Tableau 12.IV : Mortalité pour cause de cancer dans les cohortes fortement exposées aux PCDD/PCDF

Références	Effectif	Nombre de décès	SMR* (95 % CI)
Cohorte internationale IARC** (Kogevinas et coll., 1997)	13 831	394	1,2 (1,1-1,3)
Cohorte NIOSH (Steenland et coll., 1999)	5 142	40	1,6 (1,2-1,8)
Cohorte allemande (Becher et coll., 1996)	1 279	105	1,3 (1,0-1,5)
Cohorte hollandaise (Hooiveld et coll., 1998)	549	51	1,5 (1,1-1,9)
Cohorte BASF (Ott et Zober, 1996)	113	18	1,9 (1,1-3,0)

* *standardized mortality ratio* ; ** 20 ans après la première exposition

En étudiant les résultats sur le risque de cancer d'après les études épidémiologiques les plus informatives, quelques points doivent être notés : il existe très peu de précédents de cancérogènes affectant le risque pour tous les cancers sans un clair excès pour un cancer particulier ; les excès de risque sont statistiquement hautement significatifs, un effet du hasard peut donc être exclu ; les études sont prospectives et ont été bien faites.

Néanmoins, l'évaluation de ces résultats doit être prudente étant donné que les risques globaux ne sont pas très élevés et que la plus forte évidence vient des populations exposées en milieu industriel, c'est-à-dire de sujets ayant des niveaux d'exposition 100 ou 1 000 fois plus élevés que la population générale. Pour extrapoler ces résultats, il est nécessaire de faire des modélisations et de supposer que les effets sont analogues à doses élevées et doses faibles. La difficulté est de quantifier le risque associé à l'exposition de la population générale à de très faibles doses.

BIBLIOGRAPHIE

AXELSON O, SUNDELL L, ANDERSSON K, EDLING C, HOGSTEDT C, KLING H. Herbicide exposure and tumor mortality. An updated epidemiologic investigation on Swedish railroad workers. *Scan J Work Environ Health* 1980, 6 : 73-79

- BECHER H, FLESCHE-JANYS D, KAUPPINEN T, KOGEVINAS M, STEINDORF K et coll. Cancer mortality in German male workers exposed to phenoxy herbicides and dioxins. *Cancer Causes Control* 1996, **7** : 312-321
- BERTAZZI PA, ZOCCHETTI C, PESATORI AC, GUERCILENA S, SANARICO M. Ten years mortality study of the population involved in the Seveso incident in 1976. *Am J Epidemiol* 1989, **129** : 1187-1200
- BERTAZZI PA, PESATORI AC, CONSONNI D, TIRONI A, LANDI MT, ZOCCHETTI C. Cancer incidence in a population accidentally exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*para*-dioxin. *Epidemiology* 1993, **4** : 398-406
- BERTAZZI PA, ZOCCHETTI C, GUERCILENA S, CONSONNI D, TIRONI A et coll. Dioxin exposure and cancer risk : a 15-year mortality study after the "Seveso Accident". *Epidemiology* 1997, **8** : 646-652
- BERTAZZI PA, PESATORI AC et coll. Book of abstracts, the 15th International scientific meeting of the International epidemiologic association. August 31-September 4, 1999, Florence, Italy
- BLAIR A, GRAUMAN DJ, LUBIN JH, FRAUMENI JF JR. Lung cancer and other causes of death among licensed pesticide applicators. *JNCI* 1983, **71** : 31-37
- BUENO DE MESQUITA BH, DOORNBOS G, DEIRDRE VAN DER AM, KOGEVINAS M, WINKEL-MANN R. Occupational exposure to phenoxy herbicides and chlorophenols and cancer mortality in the Netherlands. *Am J Ind Med* 1993, **23** : 289-300
- COGGON D, PANNETT B, WINTER P. Mortality and incidence of cancer at four factories making phenoxy herbicides. *Br J Ind Med* 1991, **48** : 173-178
- COGGON D, PANNETT B, WINTER PD, ACHESON ED, BONSALL J. Mortality of workers exposed to 2 methyl-4 chlorophenoxyacetic acid. *Scand J Work Environ Health* 1986, **12** : 448-454
- CORDIER S, LE TB, VERGER P, BARD D, LE CD, LAROUZE B, DAZZA MC, HOANG TQ, ABENHAIM L. Viral infections and chemical exposures as risk factors for hepatocellular carcinoma in Vietnam. *Int J Cancer* 1993, **55** : 196-201
- FINGERHUT M, HALPERIN W, MARLOW D et coll. Mortality among U.S. workers employed in the production of chemicals contaminated with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD). *Niosh Final Report PB91125971*. Springfield, Va. : National Technical Information Service, 1990
- FINGERHUT MA, HALPERIN WE, MARLOW DA, PIACITELLI LA, HONCHAR PA et coll. Cancer mortality in workers exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *N Engl J Med* 1991, **324** : 212-218
- FLESCHE-JANYS D, BERGER J, KONIETZKO J, GURN P, MANZ A et coll. Exposure to polychlorinated dioxins and furans (PCDD/F) and mortality in a cohort of workers from a herbicide producing plant in Hamburg, FRG. *Am J Epidemiol* 1995, **142** : 1165-1175
- FLESCHE-JANYS D, BERGER J, KONIETZKO J, GURN P, MANZ A et coll. Erratum. *Am J Epidemiol* 1996, **144** : 716
- HARDELL L, ERIKSSON M, LENNER P, LUNGREN E. Malignant lymphoma and exposure to chemicals, especially organic solvents, chlorophenols and phenoxy acids : a case-control study. *Br J Cancer* 1981, **43** : 169-176

HOOIVELD, M, HEEDERIK, DJJ, KOGEVINAS, M, BOFFETTA, P, NEEDHAM, LL et coll. Second follow-up of a Dutch cohort occupationally exposed to phenoxy herbicides, chlorophenols, and contaminants. *Am J Epidemiol* 1998, **147** : 891-901

IARC. Polychlorinated dibenzo-*para*-dioxins and polychlorinated dibenzofurans. *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans* 1997, **69** : 665 p

JOHNSON ES, PARSONS W, WEINBERG CR, SHORE DL, MATTHEWS J et coll. Current serum levels of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in phenoxy acid herbicide applicators and characterization of historical levels. *J Natl Cancer Inst* 1992, **84** : 1648-1653

KAUPPINEN T, KOGEVINAS M, JOHNSON ES, SARACCI R, BERTAZZI PA et coll. Chemical exposure in manufacture of chlorophenoxy herbicides and chlorophenols, and in spraying of phenoxy herbicides. *Am J Ind Med* 1993, **23** : 903-920

KETCHUM NS, MICHALEK JE, BURTON JE. Serum dioxin and cancer in veterans of operation Ranch Hand. *Am J Epidemiol* 1999, **149** : 630-639

KOGEVINAS M, BECHER H, BENN T, BERTAZZI PA, BOFFETTA P et coll. Cancer mortality in workers exposed to phenoxy herbicides, chlorophenols and dioxins. An expanded and updated international cohort study. *Am J Epidemiol* 1997, **145** : 1061-1075

KOGEVINAS M, KAUPPINEN T, WINKELMANN R, BECHER H, BERTAZZI PA et coll. Soft tissue sarcoma and non-Hodgkin's lymphoma in workers exposed to chlorophenoxy herbicides, chlorophenols and dioxins. Two nested case-control studies. *Epidemiology* 1995, **6** : 396-402

KOGEVINAS M, SARACCI R, WINKELMANN R, JOHNSON ES, BERTAZZI PA et coll. Cancer incidence and mortality in women occupationally exposed to chlorophenoxy herbicides, chlorophenols and dioxins. *Cancer Causes Control* 1993, **4** : 547-553

LANDI MT, NEEDHAM LL, LUCIER G, MOCARELLI P, BERTAZZI PA et coll. Concentrations of dioxin 20 years after Seveso. *Lancet* 1997, **349** : 1811

LYNGE E. Cancer in phenoxy herbicide manufacturing workers in Denmark, 1947-1987 - an update. *Cancer Causes Control* 1993, **4** : 261-272

MANZ A, BERGER J, DWYER JH, FLESCH-JANYS D, NAGEL S, WALTSGOTT H. Cancer mortality among workers in chemical plant contaminated with dioxin. *Lancet* 1991, **338** : 959-964

MICHALEK JE, WOLFE WH, MINER JC. Health status of Air Force veterans occupationally exposed to herbicides in Vietnam II. Mortality. *JAMA* 1990, **264** : 1832-1836

NAGEL S, BERGER J, FLESCH-JANYS D, MANZ A, OLLROGE I. Mortality and cancer mortality in a cohort of female workers of a herbicide producing plant exposed to polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and furans. *Inform Biomet Epidemiol Med Biol* 1994, **25** : 32-38

NYGREN M, RAPPE C, LINDSTRÖM G, HANSSON M, BERGQVIST PA et coll. Identification of 2,3,7,8-substituted polychlorinated dioxins and dibenzofurans in environmental and human samples. In : *Chlorinated dioxins and dibenzofuranes in perspective*. RAPPE C, CHOUDHARY G & KEITH LH eds., Chelsea, MI, Lewis publishers, pp 17-34

OTT MG, MESSERER P, ZOBEL A. Assessment of past occupational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin using blood lipid analyses. *Int Arch Occup Environ Health* 1993, **65** : 1-8

OTT MG, ZOBEL A. Cause specific mortality and cancer incidence among employees exposed to 2,3,7,8-TCDD after a 1953 reactor accident. *Occup Environ Med* 1996, **53** : 606-612

PESATORI AC, CONSONNI D, TIRONI A, ZOCCHETTI C, FINI A, BERTAZZI PA. Cancer in a young population in a dioxin-contaminated area. *Int J Epidemiology* 1993, **22** : 1010-1013

SARACCI R, KOGEVINAS M, BERTAZZI PA, BUENO DE MESQUITA BH, COGGON D et coll. Cancer mortality in workers exposed to chlorophenoxy herbicides and chlorophenols. *Lancet* 1991, **338** : 1027-1032

SMITH AH, PATTERSON DG JR, WARNER ML, MACKENZIE R, NEEDHAM LL. Serum 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin levels of New Zealand pesticide applicators and their implication for cancer hypotheses. *J Natl Cancer Inst* 1992, **84** : 104-108

STEENLAND K, PIACITELLI L, DEDDENS J, FINGERHUT M, CHANG LI. Cancer, heart disease and diabetes in workers exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *J Natl Cancer Inst* 1999, **91** : 779-86

ZOBEL A, MESSERER P, HUBER P. Thirty-four-year mortality follow-up of BASF employees exposed to 2,3,7,8-TCDD after the 1953 accident. *Int Arch Occup Environ Health* 1990, **62** : 139-157

13

Effets autres que le cancer

L'exposition à la 2,3,7,8-TCDD chez l'homme est associée à de nombreux effets autres que le cancer. Toutefois, la majorité des études épidémiologiques disponibles se focalise sur la mortalité par cancer et n'est pas conçue pour évaluer la morbidité, comme par exemple les effets neuropsychologiques, ni des effets transitoires comme des modifications au niveau des hormones de la reproduction. Une évidence épidémiologique existe seulement pour quelques-uns de ces effets et, à l'inverse des évidences expérimentales, les résultats des études épidémiologiques ne sont pas cohérents pour la plupart des effets autres que le cancer.

La preuve chez l'homme n'est actuellement avérée que pour les effets dermatologiques et les augmentations transitoires des enzymes hépatiques, tandis que les évidences sont de plus en plus nombreuses en faveur d'une association entre l'exposition aux dioxines et les maladies cardiovasculaires. Les preuves concernant les effets majeurs autres que le cancer sont résumées dans le tableau 13.I.

Les études épidémiologiques les plus informatives sont celles qui étudient des groupes professionnellement exposés, particulièrement ceux impliqués dans la fabrication des chlorophénols et phénoxy-herbicides, les résidents de Seveso et aussi la cohorte Ranch Hand qui comprend les pulvérisateurs de l'agent orange au Vietnam.

Chloracné et autres atteintes dermatologiques

La chloracné est l'effet dermatologique le plus largement reconnu de l'exposition à la 2,3,7,8-TCDD. La chloracné a été notée chez plusieurs travailleurs dans tous les accidents industriels rapportés dans des installations de production de trichlorophénol (TCP). La chloracné a également été rapportée parmi les travailleurs impliqués dans la production journalière de produits contaminés par la 2,3,7,8-TCDD (Suskind et coll., 1984), tels que les phénoxy-herbicides, et chez trois techniciens de laboratoire exposés à de la 2,3,7,8-TCDD pure. Chez les sujets exposés durant l'accident de Seveso (Bertazzi et coll., 1998), une chloracné fut diagnostiquée chez 193 (0,6 %) des résidents de Seveso, la plupart étant des enfants (tableau 13.II).

Tableau 13.I : Preuve épidémiologique sur les effets autres que le cancer de l'exposition à la 2,3,7,8-TCDD

Effet	Preuve épidémiologique
Effets dermatologiques (chloracné)	Association prouvée
Effets gastro-intestinaux et enzymes hépatiques	Augmentations transitoires des enzymes hépatiques prouvée
Maladies cardio-vasculaires et modifications des taux de lipides	Association dans la plupart des études « doses élevées » Effet dose-réponse dans quelques études.
Diabète	Globalement, résultats contradictoires. Risques augmentés à Seveso et dans la cohorte Ranch Hand (morbidité)
Effets hormonaux/reproduction	Résultats contradictoires concernant les hormones de la reproduction. Modifications du <i>sex-ratio</i> chez les couples les plus exposés (augmentation des naissances de filles)
Fonction thyroïdienne	Différences rapportées pour les taux de T4, TSH, TBG et T3. Résultats contradictoires.
Effets neuropsychiques	Résultats contradictoires. Effets rapportés dans les cohortes Ranch Hand et Seveso (polyneuropathies, anomalies de coordination). Pas d'association avec la dépression.
Système respiratoire	Pas d'évidence solide. Effets irritants et volume expiratoire forcé (FVC) diminué dans quelques études.
Système rénal	Pas d'anomalie rénale ou vésicale majeure observée

Tableau 13.II : Distribution des cas de chloracné diagnostiqués chez des enfants de 3 à 14 ans sur une période de 8 mois après l'accident de Seveso (d'après Bertazzi et coll., 1998)

Zone de contamination	Effectif	Cas de chloracné	Prévalence (%)
A	214	42	19,6
Max ¹	54	26	48,1
B	1 468	8	0,5
R	8 680	63	0,7
Référence	48 263	51	0,1

¹ Partie de la zone A la plus proche de l'usine

On ne sait pas si les enfants étaient plus susceptibles ou s'ils ont été plus exposés à la dioxine. Dans les populations étudiées où l'exposition à la 2,3,7,8-TCDD était déterminée, la chloracné n'a pas été diagnostiquée chez le personnel de l'opération Ranch Hand, ni parmi les sujets accidentellement exposés dans le Missouri qui ont toutefois été examinés 10 ans après l'exposition.

La chloracné a persisté plusieurs années après l'exposition chez quelques travailleurs dans des usines allemandes ou américaines. Chez les résidents de Seveso, la chloracné a disparu après cessation de l'exposition, malgré des

niveaux sériques de 2,3,7,8-TCDD, mesurés dans l'année qui a suivi l'accident, allant de 820 à 56 000 pg TEQ/g.

Bien que la chloracné soit associée avec des niveaux élevés d'exposition à la 2,3,7,8-TCDD, il n'existe pas de correspondance directe entre exposition et survenue d'une chloracné. Les sujets ayant une chloracné sévère ont une exposition moyenne plus élevée que ceux présentant une chloracné moyenne ou ceux sans chloracné. Ceci est clairement mis en évidence chez les travailleurs exposés durant l'accident de l'usine BASF : Zober et coll. (1997) ont ainsi effectué le rapprochement entre les concentrations moyennes en 2,3,7,8-TCDD, calculées sur la base d'une concentration moyenne en lipides sanguins, et la présence de chloracné (figure 13.1). Cependant une absence de chloracné n'est pas synonyme de non-exposition, et la présence de chloracné ne correspond pas forcément à une exposition très élevée.

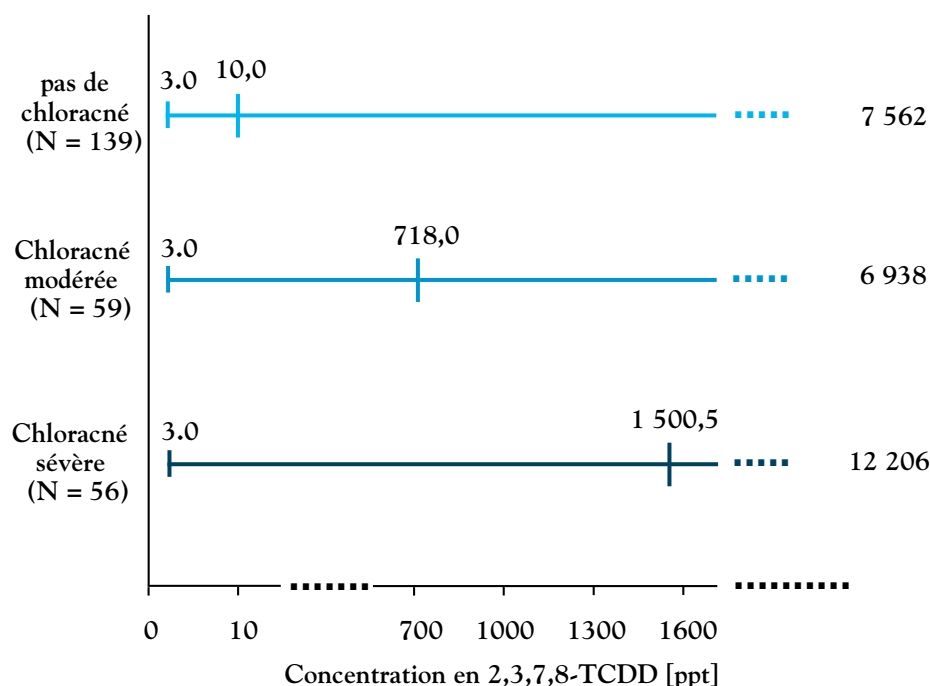


Figure 13.1 : Concentrations moyennes en 2,3,7,8-TCDD (ppt : partie par trillion) et chloracné chez 254 employés de la cohorte de l'accident BASF en 1953 (d'après Zober et coll., 1997)

D'autres effets dermatologiques divers ont été décrits chez les sujets exposés à la 2,3,7,8-TCDD, irritation oculaire, conjonctivite, blépharite, kystes palpébraux, hyperpigmentation et hirsutisme. Ces observations ont été rapportées moins souvent que la chloracné.

Effets gastro-intestinaux et effets sur les enzymes hépatiques

Une augmentation de la taille du foie a été rapportée chez des travailleurs de deux usines de production de TCP aux États-Unis et en Tchécoslovaquie ainsi que, de façon transitoire, chez 5 des 22 résidents de Seveso ayant une chloracné sévère (Reggiani, 1980). Aucune hépatomégalie ne fut pourtant observée dans d'autres études sur des populations de travailleurs ou dans la cohorte Ranch Hand.

Des taux augmentés de gamma glutamyl transférase (γ GT ou GGT) ont été observés chez les enfants de Seveso, peu après l'accident, mais ces niveaux ont diminué durant les cinq années qui ont suivi (Mocarelli et coll., 1986). Des taux élevés de γ GT ont été observés de manière persistante chez des travailleurs impliqués dans la production de trichlorophénol, et ce dans diverses usines. Des taux significativement élevés ont été notés chez des pulvérisateurs de la cohorte Ranch Hand (Roegner et coll., 1991).

Des taux élevés d'alanine-aminotransférase (ALAT) et d'aspartate-aminotransférase (ASAT) sériques sont probablement des effets transitoires de l'exposition aiguë. Aucune élévation n'a été retrouvée dans les études sur des sujets 10 à 30 ans après leur exposition. Aucune de ces études rapportant des élévations d'ALAT ou d'ASAT n'a montré d'évidence clinique de maladie hépatique dans les études de populations.

Des taux augmentés d'acide D-glucarique ont été retrouvés chez les adultes et les enfants de Seveso en 1976 (Ideo et coll., 1985). En 1981, ces taux étaient normaux. Aucune élévation n'a été retrouvée dans la cohorte Ranch Hand.

Deux études ont examiné le métabolisme des porphyrines. Une étude sur les travailleurs impliqués dans la production de TCP (Bleiberg et coll., 1964) avait rapporté une porphyrie cutanée tardive chez 11 des 29 sujets ayant une chloracné. Dans l'étude américaine du NIOSH, aucune association entre exposition à la 2,3,7,8-TCDD et prévalence de la porphyrie cutanée tardive ne fut retrouvée (Calvert et coll., 1994).

Effets neuropsychiques

Il existe de nombreux cas rapportés associant une exposition aiguë ou chronique à la 2,3,7,8-TCDD à la présence de maux de tête, d'insomnie, de nervosité, d'irritabilité, de dépression, d'anxiété, de perte de libido, d'encéphalopathie. Certains rapports décrivent des symptômes persistants. Quelques épisodes pathologiques ont été décrits chez des sujets de la cohorte Ranch Hand (anomalies de la coordination), chez des travailleurs de l'usine IC-MESA à Seveso (polyneuropathies des membres inférieurs) et chez les résidents de Seveso (prévalence de neuropathies) (Pocchiari et coll., 1979 ; Fillipini et coll., 1981 ; Roegner et coll., 1991). Aucune association n'a été

retrouvée entre exposition à la 2,3,7,8-TCDD et dépression dans l'étude du NIOSH et dans l'étude Ranch Hand (Roegner et coll., 1991 ; Alderfer et coll., 1992).

Fonction thyroïdienne

La perturbation de la fonction thyroïdienne a été associée à une exposition aux dioxines dans certaines cohortes de travailleurs exposés et dans l'étude Ranch Hand, mais les résultats n'étaient pas statistiquement significatifs, ni cohérents entre les études. Dans une usine de production de TCP, il n'y avait pas de différence significative pour la thyroxine (T4) et la *thyroxine binding protein* (TBG) entre les travailleurs exposés et non exposés (Suskind et coll., 1984). Dans la cohorte de l'accident de BASF, les taux de TBG et de T4 étaient corrélés positivement avec les niveaux de 2,3,7,8-TCDD (Ott et coll., 1994). Dans la cohorte du NIOSH, les différences entre exposés et non-exposés n'étaient pas statistiquement significatives, bien que l'index de thyroxine libre et la T4 étaient élevés chez les travailleurs de la production de TCP (Calvert et coll., 1999). Dans la cohorte Ranch Hand, une faible élévation des niveaux de TSH était associée avec l'exposition à la 2,3,7,8-TCDD, bien que les résultats ne soient pas statistiquement significatifs (Grubbs et coll., 1995).

Hormones de la reproduction

Des taux diminués de testostérone et augmentés de gonadotrophines ont été retrouvés chez des travailleurs de la cohorte du NIOSH impliqués dans la production de TCP, et présentant des niveaux élevés de 2,3,7,8-TCDD (Egeland et coll., 1994) (figure 13.2).

Aucune association n'a été retrouvée dans la cohorte Ranch Hand (Henriksen et coll., 1996).

Une modification du *sex ratio* à la naissance, avec un excès d'enfants de sexe féminin par rapport au sexe masculin (tableau 13.III), a été décrite pour la période 1977-1984 dans la zone de Seveso la plus contaminée (Mocarelli et coll., 1996).

Ceci était particulièrement évident pour les couples où les deux parents avaient été très exposés à la 2,3,7,8-TCDD. Cette observation a été récemment confirmée par une étude portant sur 239 hommes et 296 femmes de Seveso (Mocarelli et coll., 2000). Une probabilité augmentée de naissance d'enfants de sexe féminin ($p = 0,008$) était associée au taux sanguin de 2,3,7,8-TCDD des pères. Cet effet était observé pour des concentrations inférieures à 20 pg TEQ/g de poids corporel. Les pères âgés de moins de 19 ans

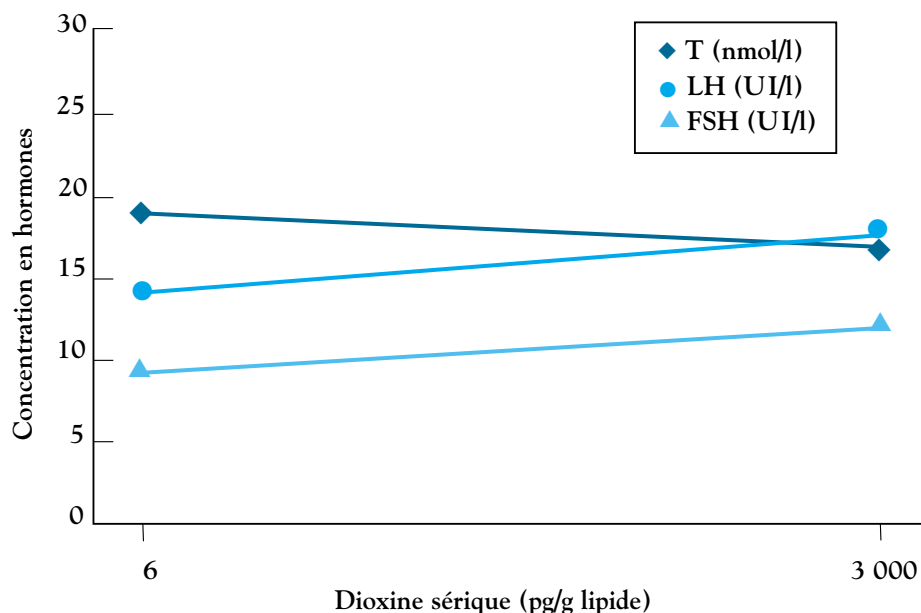


Figure 13.2 : Concentrations totales estimées en testostérone (T), en hormone lutéinisante (LH) et en hormone folliculostimulante (FSH) en fonction de la concentration sérique en dioxines chez des travailleurs du New Jersey et du Missouri en 1987 (d'après Egeland et coll., 1994)

Tableau 13.III : Distribution du sexe des enfants nés dans la Zone A à Seveso (d'avril 1977 à décembre 1984) en fonction du taux de 2,3,7,8-TCDD (ppt) mesurés chez les parents en 1976 (d'après Mocarelli et coll., 1996)

Taux en TCDD en 1976 (ppt)				
Famille	Père	Mère	Mâle	Femelle
1	2 340,0	960,0	0	1
2	1 490,0	485,0	0	2
3	1 420,0	463,0	0	1
4	509,0	257,0	0	1
5	444,0	126,0	0	2
6	436,0	434,0	0	1
7	208,0	245,0	0	1
8	176,0	238,0	0	1
9	104,0	1 650,0	0	2
10	65,4	26,6	1	0
11	55,1	27,6	1	0
12	29,6	36,5	1	0
13	29,3	ND	1	1

lors de l'exposition ont engendré significativement plus de filles que de garçons (*sex ratio* : 0,38, IC à 95 % : 0,30-0,48). Ce phénomène biologique n'a pas reçu d'explication jusqu'à présent. Ces résultats n'ont pas été retrouvés dans les études comparables effectuées sur l'exposition à d'autres dioxines ou à des PCB (Michalek et coll., 1998 ; Rogan et coll., 1999). Les populations dans ces études ont toutefois eu une exposition à la 2,3,7,8-TCDD beaucoup plus basse qu'à Seveso. Il n'existe pas d'études épidémiologiques ayant évalué l'association entre l'exposition à la 2,3,7,8-TCDD et l'endométriose. Il a été souligné (Bois et coll., 1994) que l'exposition des femmes à Seveso était comparable aux doses induisant expérimentalement une endométriose chez les singes rhésus (Rier et coll., 1993).

Effets cardiovasculaires et taux en lipides sanguins

Dans les cohortes de l'accident BASF et du NIOSH, il n'y avait pas de relation entre les taux de cholestérol total ou de HDL et LDL et l'augmentation des niveaux de 2,3,7,8-TCDD (Ott et coll., 1994 ; Calvert et coll., 1996). De même, les résultats étaient négatifs chez les résidents de Seveso (Mocarelli et coll., 1986 ; Assenato et coll., 1989). En revanche, un lien positif entre le niveau de 2,3,7,8-TCDD sérique et le cholestérol total a été retrouvé dans la cohorte Ranch Hand (Roegner et coll., 1991). Cette association n'était pas aussi forte dans un suivi postérieur (Grubbs et coll., 1995).

Chez les travailleurs exposés de la cohorte du NIOSH et de l'accident BASF, on ne retrouvait pas ou très peu de différences avec les non-exposés (Ott et coll., 1994 ; Calvert et coll., 1996), de même à Seveso (Mocarelli et coll., 1986 ; Assenato et coll., 1989). Les niveaux de 2,3,7,8-TCDD étaient constamment associés aux taux de triglycérides dans la cohorte Ranch Hand (Roegner et coll., 1991 ; Grubbs et coll., 1995).

Maladies cardiovasculaires

Récemment, l'exposition aux dioxines a été associée à un excès de maladies cardiovasculaires. Un excès de mortalité par maladie coronarienne a été retrouvé dans plusieurs cohortes industrielles (tableau 13.IV), et dans la zone très exposée de Seveso. L'étude de la cohorte Ranch Hand a donné des résultats essentiellement négatifs avec un excès de risque seulement chez les personnels ayant eu une exposition à la 2,3,7,8-TCDD estimée la plus haute. Aucun excès de risque n'a été retrouvé dans une étude de morbidité cardiovasculaire dans une sous-population de la cohorte du NIOSH (Flesch-Janys et coll., 1995 ; Hooiveld et coll., 1998 ; Michalek et coll., 1998 ; Pesatori et coll., 1998 ; Vena et coll., 1998 ; Steeland et coll., 1999).

Un excès de risque de maladies cardiovasculaires a été observé avec l'augmentation de l'exposition dans la cohorte de production hollandaise et la cohorte

Tableau 13.IV : Mortalité par maladie coronarienne dans les cohortes de populations très exposées

Cohorte (référence)	SMR (95 % CI)
BASF (Ott et Zober, 1996)	0,6 (0,2-1,3)
IARC (Vena et coll., 1998)	1,7 (1,2-2,3)
Hollandaise (Hooiveld et coll., 1998)	1,9 (0,9-3,6)
Boehringer (Flesch-Janys et coll., 1995)	1,4 (0,7-2,8)
Ranch Hand (Michalek et coll., 1998)	1,5 (1,0-2,2)
NIOSH (Steenland et coll., 1999)	1,8 (1,1-2,9)
Seveso (suivi sur 15 ans, Pesatori et coll., 1996)	1,6 (1,2-2,5)

SMR : *standardized mortality ratio*

Boehringer. Dans la cohorte du NIOSH, on retrouvait un faible excès de mortalité par maladie cardiaque en rapport avec une exposition plus élevée (Steenland et coll., 1999).

Diabète

Des taux moyens de glucose plus élevés ont été retrouvés chez les sujets exposés à la 2,3,7,8-TCDD par rapport aux non exposés dans l'étude du NIOSH (Calvert et coll., 1999), dans l'étude Ranch Hand (Henriksen et coll., 1997) et dans la cohorte de l'accident BASF lors de l'étude, mais pas en se basant sur les concentrations estimées lors de la dernière exposition (Ott et coll., 1994). Aucune association n'a été retrouvée chez les travailleurs de Nitro exposés au 2,4,5-T, en Virginie (Suskind et coll., 1984).

Dans la cohorte Ranch Hand (Henriksen et coll., 1997), la prévalence du diabète et l'utilisation de traitements antidiabétiques par voie orale étaient augmentées chez les personnels exposés (concentration sérique moyenne en dioxines 12,2 [0-617,8] pg TEQ/g de matières grasses) par comparaison au groupe contrôle (concentration sérique moyenne en dioxines 4,0 [0-10] pg TEQ/g de matières grasses) (figure 13.3), alors que le laps de temps de la première manifestation du diabète diminuait avec l'exposition aux dioxines.

Parmi les travailleurs américains impliqués dans la production de TCP (une partie de la cohorte du NIOSH), la prévalence du diabète n'était pas significativement différente entre les travailleurs et les sujets non exposés, et il n'y avait pas de relation positive entre prévalence du diabète et concentration de 2,3,7,8-TCDD. Mais un diabète était retrouvé chez 6 travailleurs sur 10 (60 %) ayant des concentrations sériques de 2,3,7,8-TCDD supérieures à 1 500 pg TEQ/g de matières grasses (Calvert et coll., 1999).

La mortalité due au diabète était augmentée parmi les travailleurs exposés à la 2,3,7,8-TCDD. Dans la cohorte du NIOSH (Steenland et coll., 1999), la mortalité due au diabète (quelle que soit la mention inscrite sur le certificat de décès) montrait une tendance négative dans la relation dose-réponse.

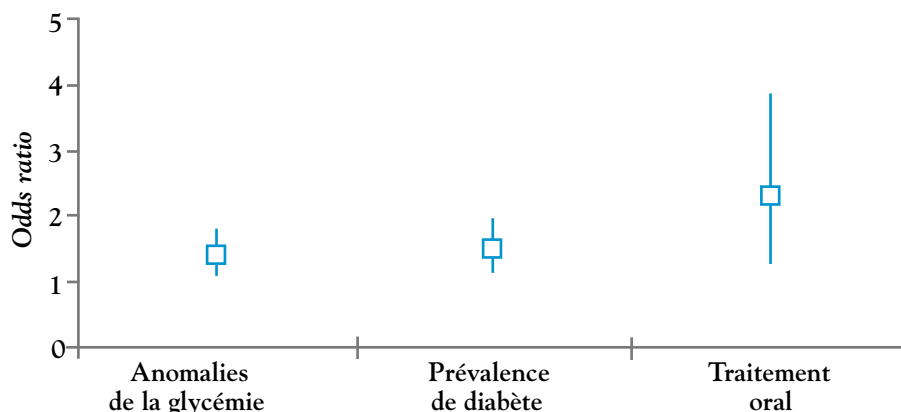


Figure 13.3 : Prévalence de diabète chez les anciens combattants de l'opération Ranch Hand (odds ratios et intervalle de confiance à 95 %) (d'après Henriksen et coll., 1997)

En conclusion, les seules preuves existant aujourd'hui quant à une association entre l'exposition aux dioxines et les effets observés autres que le cancer concernent les manifestations dermatologiques (chloracné) et hépatiques (augmentation transitoire des taux sériques d'enzymes hépatiques). Des évidences s'accumulent en faveur d'une association avec les maladies cardiovasculaires : des études de cohortes indiquent un excès de risque pour la mortalité par maladie coronarienne.

BIBLIOGRAPHIE

- ALDERFER R, SWEENEY M, FINGERHUT M, HORNUNG R, WILLE K, FIDLER A. Measures of depressed mood in workers exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Chemosphere* 1992, **25** : 247-250
- ASSENATO G, CERVINO D, EMMET E, LONGO, G, MERLO F. Follow-up on subjects who developed chloracne following 2,3,7,8-TCDD exposure of Seveso. *Am J Ind Med* 1989, **16** : 119-125
- BERTAZZI PA, PESATORI AC, ZOCCHETTI C. Seveso Dioxin : an example of environmental medicine. *Epidemiologic data as guidelines for health programming G Ital Med Lav Ergon (Italy)* 1998, **20** : 194-196
- BLEIBERG J, WALLEN M, BRODKIN R, APPLEBAUM IL. Industrially acquired porphyria. *Arch Dermatol* 1964, **89** : 793-797
- BOIS FY, ESKENAZI B. Possible risk of endometriosis for Seveso, Italy, residents : an assessment of exposure to dioxin. *Env Health Persp* 1994, **102** : 476-477
- CALVERT GM, SWEENEY MH, DEDDENS J, WALL DK. An evaluation of diabetes mellitus, serum glucose, and thyroid function among US workers exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Occup Environ Med* 1999, **56** : 270-276

CALVERT GM, SWEENEY MH, FINGERHUT MA, HORNUNG RW, HALPERIN WE. Evaluation of porphyria cutanea tarda in US workers exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Am J Ind Med (US)* 1994, **25** : 559-571

CALVERT GM, WILLE KK, SWEENEY MH, FINGERHUT MA, HALPERIN WE. Evaluation of serum lipid concentrations among US workers exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Arch Environ Health* 1996, **51** : 100-107

EGELAND GM, SWEENEY MH, FINGERHUT MA, WILLE KK, SCHNORR TM, HALPERIN WE. Total serum testosterone and gonadotropins in workers exposed to dioxin. *Am J Epidemiol* 1994, **139** : 272-281

FILIPPINI G, BORDO B, CRENNNA P, MASSETTO N, MUSICCO M, BOERI R. Relationship between clinical and electrophysiological findings and indicators of heavy exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-dioxin. *Scand J Work Environ Health* 1981, **7** : 257-262

FLESCH-JANYNS D, BERGER J, GURN P, MANZ A, NAGEL S, WALTSGOTT H, DWYER JH. Exposure to polychlorinated dioxins and furans (PCDD/F) and mortality in a cohort of workers from a herbicide-producing plant in Hamburg, Federal Republic of Germany. *Am J Epidemiol* 1995, **142** : 1165-1167

GRUBBS WD, WOLFE WH, MICHALEK JE, WILLIAMS DE, LUSTIK BM et coll. Air Force Health Study : An epidemiologic investigation of health effects in Air Force personnel following exposure to herbicides. *Report number* 1995, **AL-TR** : 920107

HENRIKSEN GL, KETCHUM NS, MICHALEK JE, SWABY JA. Serum dioxin and diabetes mellitus in veterans of Operation Ranch Hand. *Epidemiology* 1997, **8** : 252-258

HENRIKSEN GL, MICHALEK JE, SWABY JA, RAHE AJ. Serum dioxin, testosterone, and gonadotropins in veterans of Operation Ranch Hand. *Epidemiology* 1996, **7** : 352-357

HOOVELD M, HEEDERIK DJJ, KOGEVINAS M, BOFFETTA P, NEEDHAM LL et coll. Second follow-up of a Dutch cohort occupationally exposed to phenoxy herbicides, chlorophenols, and contaminants. *Am J Epidemiol* 1998, **147** : 891-901

IDEO G, BALLATI G, BELLOBUNO A, BISSANTI L. Urinary D-glucaric excretion in the Seveso area, polluted by tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (2,3,7,8-TCDD) : five years of experience. *Environ Health Perspect* 1985, **60** : 151-157

MICHALEK JE, RAHE A, BOYLE C. Paternal dioxin and the sex of children fathered by veterans of Operation Ranch Hand. *Epidemiology* 1998, **9** : 474-475

MICHALEK JE, RAHE AJ, BOYLE CA. Paternal dioxin, preterm birth, intrauterine growth retardation and infant death. *Epidemiology* 1998, **9** : 161-167

MOCARELLI P, GERTHOUX PM, FERRARI E, PATTERSON DG JR, KIESZAK SM and coll. Paternal concentration of dioxin and sex ratio of offspring. *Lancet* 2000, **355** : 1858-1863

MOCARELLI P, BRAMBILLA P, GERTHOUX PM, PATTERON DG, NEEDHAM LL. Change in sex ratio with exposure to dioxin. *Lancet* 1996, **348** : 349

MOCARELLI P, MAROCCHI A, BRAMBILLA P, GERTHOUX PM, YOUNG DS, MANTEL N. Clinical laboratory manifestations of exposure to dioxin in children. A six year study of the effects of an environmental disaster near Seveso, Italy. *JAMA* 1986, **256** : 2687-2695

OTT MG, ZOBBER A, GERMANN C. Laboratory results for selected target organs in 138 individuals occupationally exposed to 2,3,7,8-TCDD. *Chemosphere* 1994, **29** : 2423-2437

PESATORI AC, ZOCCHETTI C, GUERCILENA S, CONSONNI D, TURRINI D, BERTAZZI PA. Dioxin exposure and non-malignant health effects : a mortality study. *Occup Environ Med* 1998, **55** : 126-31

POCCHIARI F, SILVANO V, ZAMPIERI A, ZAMPIERI A. Human health effects from accidental release of tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (2,3,7,8-TCDD) at Seveso, Italy. *Ann NY Acad Sci* 1979, **77** : 311-320

REGGIANI G. Acute human exposure to 2,3,7,8-TCDD in Seveso, Italy. *J Toxicol Environ Health* 1980, **6** : 27-43

RIER SE, MARTIN DC, BOWMAN RE, DMOWSKI WP, BECKER JL. Endometriosis in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) following chronic exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Fundam Appl Toxicol* 1993, **21** : 433-441

ROEGNER RH, GRUBBS WD, LUSTIK MB, BROCKMAN AS, HENDERSON SC et coll. Air Force Health Study : an epidemiologic investigation of health effects in Air Force personnel following exposure to herbicides. Serum dioxin analysis of 1987 examination results. NTIS# AD A-237-516 through AD 1991, **A** : 237-524

ROGAN WJ, GLADEN BC, GUO YL, HSU CC. Sex ratio after exposure to dioxin-like chemicals in Taiwan. *Lancet* 1999, **353** : 206-207

STEENLAND K, PIACITELLI L, DEDDENS J, FINGERHUT M, ING CHANG L. Cancer, heart disease and diabetes in workers exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *J Natl Cancer Inst* 1999, **91** : 779-786

SUSKIND RR, HERTZBERG VS. Human health effects of 2,4,5-T and its toxic contaminants. *JAMA* 1984, **251** : 2372-2380

VENA J, BOFFETTA P, BECHER H, BENN T, BUENO-DE-MESQUITA HB et coll. Exposure to dioxin and non-neoplastic mortality in the expanded IARC international cohort study of phenoxy herbicide and chlorophenol production workers and sprayers. *Environ Health Perspect* 1998, **106** : 645-53

ZOBBER A, MESSERER P, OTT MG. BASF studies : Epidemiological and clinical investigations on dioxin-exposed chemical workers. *Teratog Carcinog Mutagen* 1997, **17** : 249-256

14

Effets sur la reproduction et le développement

La question des effets des hydrocarbures aromatiques polycycliques halogénés (HAPH) en santé reproductive humaine est apparue il y a 35 ans, sans doute à la suite des effets possibles de l'agent orange durant la guerre du Vietnam. Par la suite plusieurs grandes catastrophes environnementales sont venues remettre la question au premier plan : contamination de l'huile de riz par des PCB au Japon (Yusho, 1968) et à Taïwan (Yu-Cheng, 1979), accident de Seveso (1976). D'autres accidents, moins spectaculaires, ont tout de même touché une population globale.

Ces cinq événements ont atteint non seulement les travailleurs mais aussi une partie de la population générale, y compris les sujets en âge de procréer. Les effets potentiels sur la fertilité, la tératogenèse, ont donc été évoqués et discutés maintes fois au cours des 35 dernières années.

Un des problèmes de l'épidémiologie environnementale concerne la mesure de l'exposition qui est toujours extrêmement difficile, voire aléatoire. Au laboratoire on peut choisir non seulement la substance utilisée : PCDD, PCDF, PCB, mais aussi la dose et la manière de l'administrer. En exposition humaine, qu'il s'agisse de grande catastrophe, d'environnements particulièrement pollués ou même d'environnements apparemment peu pollués, on se trouve le plus souvent en présence d'une exposition multiple dans laquelle une substance sera majoritaire : 2,3,7,8-TCDD à Seveso, PCDF dans les accidents de Yusho et Yu-Cheng, et pour laquelle il est difficile de considérer qu'il s'agit d'une exposition uniquement aux dioxines ou aux PCB.

S'ajoute à cela une certaine tendance à radicaliser les attitudes, particulièrement dans le domaine de l'épidémiologie de la mère et de l'enfant. Comme dans la plupart des domaines de l'épidémiologie humaine ayant trait aux HAPH, les données sont peu concordantes. Certaines montrent des effets très inquiétants, d'autres ne mettent pas en évidence d'effet significatif.

Comportement sexuel et fertilité

Il n'y a pas de données à proprement parler sur le comportement sexuel des humains en rapport avec les taux environnementaux de PCDD et PCDF ou

autre HAPH. Les données expérimentales chez l'animal montrent une diminution de l'activité sexuelle (Chung et Clemens, 1999).

En ce qui concerne la fertilité féminine, Mendola et coll. (1997) ont mis en évidence une corrélation inverse entre la consommation de poisson du lac Ontario et la durée du cycle menstruel. Bien entendu, il s'agit ici d'une corrélation avec la consommation de poisson et non pas d'une corrélation directe avec des taux de PCB ou de PCDD et PCDF. Pour la fertilité masculine le sujet a été très largement étudié et on trouve de nombreuses revues de la littérature (Eskenazi et coll., 1995 ; IARC, 1997 ; Longnecker et coll., 1997 ; Brouwer et coll., 1999). À la suite de la guerre du Viêtnam, des études chez les anciens combattants suggéraient une diminution de la fertilité masculine. Dans une étude comparative entre les anciens combattants du Viêtnam et les anciens combattants d'autres personnels de l'armée américaine, DeStefano et coll. (1989) mettent en évidence des anomalies du sperme seulement chez les anciens combattants du Viêtnam. En ce qui concerne les expositions industrielles, Sweeney et coll. (1997) rapportent, sur une étude de suivi des ouvriers exposés à la 2,3,7,8-TCDD, une perturbation significative des taux de testostérone.

Une manière d'intégrer à la fois les paramètres de fertilité masculine et de fertilité féminine est d'étudier le délai nécessaire pour concevoir qui correspond au laps de temps entre l'arrêt de la contraception et la survenue de la grossesse. Plusieurs enquêtes utilisant ce paramètre ont été réalisées en rapport avec la pollution de l'eau : population des grands lacs américains et population des pêcheurs suédois. Un questionnaire rétrospectif a été envoyé à 2 977 épouses et compagnes de pêcheurs à la ligne appartenant à la cohorte des pêcheurs à la ligne de l'État de New York (Buck et coll., 1997, 1999). Il y a eu 1 234 grossesses et aucune relation entre la consommation paternelle de poisson pêché dans le lac Ontario et le délai nécessaire pour concevoir n'a été observée. Dans une deuxième étude prospective, sous forme d'enquêtes répétées, il n'y avait pas de relation entre la consommation paternelle de poisson et le délai nécessaire à concevoir. Ces résultats sont différents de ceux retrouvés par Axmon et coll. (1998) dans la population de la Baltique. Dans un questionnaire rétrospectif adressé à 399 épouses de pêcheurs suédois de la Baltique et à 992 femmes de pêcheurs de la côte Ouest, la probabilité d'être enceinte dans l'année était significativement diminuée pour les épouses des pêcheurs de la Baltique, OR = 0,66 [IC 95 %, 0,49-0,89].

Par ailleurs, l'endométriose, affection dans laquelle du tissu endométrial s'installe dans des sites qui ne lui sont pas propres : ovaires, cavité péritonéale, vessie, muscles..., est une importante cause de stérilité. En expérimentation animale, chez les rongeurs, mais aussi chez le grand singe, les dioxines ont été incriminées comme agent inducteur (Gibbons, 1993). Plus récemment, des données humaines montrent des taux de dioxine augmentés dans les cas d'endométriose (Mayani et coll., 1997). Les résultats de l'étude menée au sein de la cohorte de Seveso (*Seveso women's health study*) sont en cours d'analyse

(Eskenazi et coll., 2000). En expérimentation *in vitro* sur du tissu humain endométrial normal et du tissu d'endométriose, une augmentation du récepteur Ah et des CYP1A2 a été observée dans les tissus d'endométriose (Bulun et coll., 2000)

Durée de gestation et poids de naissance

Il existe des arguments théoriques en faveur d'un effet direct des PCDD et PCDF ou des PCB sur la durée de la gestation. En effet les dioxines sont des antioestrogènes, ce qui logiquement pourrait influencer la durée de la grossesse. Toutefois, le peu d'études qui se sont intéressées à ce problème ne donnent pas d'arguments en faveur de cette hypothèse. Okey et coll. (1997) ont étudié des placentas de grossesses normales et de grossesses d'accouchements prématurés et ne trouvent aucune différence dans les concentrations de récepteur AhR. Dans une étude cas-témoins à New York, on a comparé les taux de PCB et de DDE (dichlorodiphényldichloroéthylène) dans le sang de cordon chez 20 femmes ayant eu un accouchement spontané avant terme et chez 20 femmes ayant accouché à terme entre 1990 et 1993. Aucune différence n'a pu être mise en évidence entre les deux groupes (Berkowitz et coll., 1996). La seule étude qui suggère un effet possible sur l'accouchement avant terme concerne les épouses des anciens combattants de l'opération Ranch Hand ayant été les plus exposés. On trouve effectivement une augmentation modeste du risque relatif d'accouchements avant terme (RR = 1,3 ; IC 95 % 0,8-2,3), mais le risque relatif est également augmenté dans le groupe témoin d'anciens combattants (RR = 1,4 ; IC 95 % 0,9-2,3) suggérant que l'augmentation de risque n'est pas liée au taux de dioxines paternel (Michalek et coll., 1998).

Concernant l'effet des HAPH sur le poids de naissance, l'intoxication de Yusho était associée à une importante augmentation des enfants de faible poids. Des observations analogues ont été décrites après l'incident de Times Beach au Missouri en 1971 (plusieurs manèges pour chevaux et des routes en terre battue avaient été arrosés avec un mélange de boues d'épuration contenant de la 2,3,7,8-TCDD et d'huiles usagées). Dans une étude cas-témoins comparant 402 naissances dans la région contaminée et 804 naissances d'un groupe témoin de mères non exposées, une diminution du poids de naissance a été notée dans la région contaminée (OR = 1,59 ; IC 95 % 0,89-2,81) (Stockbauer et coll., 1988). Chez des ouvrières fabriquant des condensateurs, on a observé une corrélation inverse entre les taux de PCB maternels et le poids de l'enfant (Taylor, 1989). Dans cette étude, les auteurs suggèrent un effet à la fois sur le poids de l'enfant et la durée de grossesse.

Concernant les retards de croissance, plusieurs cohortes (cohorte de Caroline du Nord, cohorte du Michigan, deux cohortes aux Pays-Bas, cohorte finlandaise) ont été étudiées dans lesquelles les taux de PCB ont été mesurés au

cordon et les enfants classés dans des quartiles ou des quintiles selon leurs taux de PCB. En Finlande, Vartiainen (1998) trouve une corrélation inverse entre le poids de naissance et les taux de PCDD/PCDF mais pas avec les PCB. Dans la cohorte de Caroline du Nord, on n'a pas observé d'effet sur le poids (Rogan et coll., 1986). Dans la cohorte du Michigan, les auteurs indiquent une diminution du poids de naissance de 160 à 190 grammes (Fein et coll., 1984) en relation avec l'exposition aux PCB. Des résultats similaires ont été trouvés dans la cohorte des Pays-Bas (Patandin et coll., 1998) où l'on retrouve également une diminution de la taille et du périmètre crâniens en rapport avec l'exposition *in utero* aux PCB.

Des études ont essayé de corréler la taille, le poids et le périmètre crânien des enfants avec les taux potentiels de dioxines ou d'autres HAPH. En Suède, chez les pêcheurs de la Baltique pour lesquels on observait une diminution de la fertilité, on retrouvait également une augmentation significative du risque d'avoir des enfants de moins de 3 kg (OR = 1,44 ; IC 95 % 1,18-1,76) (Rylander et coll., 1995). Dans une deuxième étude, Rylander (1998) a dosé dans le sang le 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphényle (CB-153) comme marqueur des PCB chez les mères de 57 enfants de petit poids de naissance (1,5-2,750 kg) et chez 135 témoins (poids de naissance : 3,250-4,5 kg). Au-delà d'un seuil de CB-153 de 300 ng TEQ/g de matières grasses la probabilité d'avoir un enfant de faible poids était multipliée par 2 (OR = 2,1 ; IC 95 % 1,0-4,7). Cette validation par le taux de CB-153 de l'exposition estimée sur le type de poisson consommé par les mères, confirme que les HAPH sont bien l'agent causal. Les études au Kazakhstan, région très fortement polluée sont sans doute plus discutables sur le plan épidémiologique puisqu'il s'agit de cas hospitalisés et non d'une population réellement étudiée sur base géographique. Toutefois, ces études montrent des indices de masse corporelle (IMC) inversement corrélés aux PCB ainsi que des retards de maturation pubertaire (Mazhitova et coll., 1998).

Il semble donc exister une corrélation entre la consommation par la mère d'HAPH et une diminution du poids de naissance de l'enfant. Une question importante reste ouverte, s'agit-il d'une diminution de poids avec récupération ou, comme dans les cas d'alcoolémie fœtale d'un retard de croissance sans récupération ?

Tératogénèse et fausse couche

Il semble que les dioxines n'induisent pas une tératogénicité spécifique. Dans une étude de tératologie comparée entre les poissons, les oiseaux et les mammifères on peut observer des lésions qui sont espèces dépendantes. Chez

le poisson, on trouve une « maladie du sac bleu », chez les oiseaux apparaissent des malformations structurelles et chez les mammifères également quelques malformations structurelles mais essentiellement une toxicité du développement. Certains auteurs parlent d'un syndrome de dysplasie ectodermique (Peterson et coll., 1993).

En épidémiologie humaine on ne retrouve pas de malformation spécifiquement induite par les dioxines ou les PCB : comme pour la survenue de cancers, tout tend à démontrer que les dioxines ont une action qui est non spécifique. Un quart des enfants nés après les catastrophes de Yusho et de Yu-Cheng de 1968 et de 1979 présentaient une hyper-pigmentation des gencives, de la peau, des ongles et des dents. Ils présentaient aussi un déficit auditif et un retard mental sévère. Ces atteintes ont été qualifiées « d'anomalies globales de l'ectoderme ». On peut se demander s'il ne s'agit pas d'un effet de déformation plutôt que d'un effet réellement tératogène qui implique la non-formation d'un organe qui aurait dû se former normalement.

En ce qui concerne les effets tératogènes des dioxines et des PCB on peut se référer à quatre revues récentes (Birnbaum, 1995 ; Jacobson et Jacobson, 1996 ; Longnecker et coll., 1997 ; Bard, 1999 communication personnelle). L'existence d'anomalies n'est pas formellement démontrée, toutefois il semble y avoir une tendance à une augmentation du nombre de cardiopathies congénitales (Correa-Vilalsenor et coll., 1991 ; Garry et coll., 1996) et de spina bifida (Erickson et coll., 1984 ; Centers for disease control, 1989 ; Wolfe et coll., 1994). Il faut encore noter que les malformations congénitales ne semblent pas avoir augmenté après l'accident de Seveso en 1976. Mais cette observation doit être nuancée par le fait que les femmes ont à l'époque subi une forte pression pour avorter.

En ce qui concerne les expositions industrielles, Dimich-Ward et coll. (1996) rapportent que dans des scieries en Colombie-Britannique où les travailleurs sont exposés au chlorophénate, sur 19 675 naissances on note une augmentation des cataractes congénitales, des anencéphales, des spina bifida et des malformations ano-génito-urinaires. On ne sait pas s'il s'agit d'une tératogénèse spécifique au chlorophénate. Une autre publication qui concerne le syndrome cryptophtalmique isolé mérite d'être citée. Il s'agit d'une malformation rare dans laquelle les yeux sont normalement formés mais la peau du visage s'étend sans discontinuer du front aux joues. Cette malformation semble extrêmement rare. Elle a été décrite pour la première fois en 1832 et depuis, moins de 100 cas ont été décrits dans la littérature. Six cas de ce syndrome ont été rapportés au Sud-Viêtnam dans les régions où a été utilisé l'agent orange (Coulon et coll., 1994). Au Viêtnam, dans les régions où les forces américaines ont répandu de grandes quantités d'agent orange, un nombre plus important de cas de malformations que le nombre attendu, serait observé : à la maternité de Hô-Chi-Minh Ville, plus de 2 % des nouveau-nés ont des malformations, pour la plupart létales (Pham, 1999).

En ce qui concerne les fausses couches, peu de données sont disponibles. A Seveso on n'a pas pu mettre en évidence une augmentation du nombre des fausses couches. Le seul argument en faveur d'un effet de ces substances sur l'apparition de fausses couches spontanées est une étude cas-témoins dans laquelle le Fenclor 54 a été dosé comme marqueur des PCB dans le sang de 120 femmes hospitalisées pour fausses couches spontanées et de 120 femmes à terme constituant le groupe témoin. Les taux d'hexachlorobenzène et de dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT) qui avaient aussi été dosés ne montraient pas de différence significative. En revanche, il y avait une augmentation significative des taux de PCB chez les femmes ayant fait des fausses couches (Gerhard et coll., 1998).

D'après les données disponibles en population, et contrairement à l'expérimentation animale, les dioxines et les autres dérivés se présentent plutôt comme ayant des effets inducteurs de malformations au stade tardif de l'embryogenèse (bec de lièvre, anomalies dentaires) mais pas comme des substances entraînant des fausses couches précoces.

Sex-ratio et gémellité

A la suite de l'accident de Seveso il a été suggéré que des modifications importantes dans le sex-ratio pourraient être dues à l'intoxication par la dioxine. En effet, on a noté pour la région la plus exposée, dans les neuf mois qui ont suivi l'accident, 48 naissances de filles pour 26 de garçons (Mocarelli et coll., 1996). Dans un article plus récent (Mocarelli et coll., 2000), les auteurs comparent les *sex-ratio* observés en fonction des niveaux de 2,3,7,8-TCDD sanguins, de l'âge à l'exposition et du sexe des géniteurs, à l'attendu de 0,514. Pour l'ensemble de la population étudiée, le *sex-ratio* ne différait pas de la valeur attendue. Cependant, lorsque le père ou les deux parents avaient une concentration sanguine en 2,3,7,8-TCDD supérieure à 15 pg TEQ/g de matières grasses, le *sex-ratio* était significativement différent de l'attendu avec une tendance à donner naissance à plus de filles. Cette tendance dépend de la seule concentration sanguine en 2,3,7,8-TCDD paternelle et son ampleur est fonction de celle-ci. Par ailleurs, cet effet ne se manifeste que chez les sujets âgés de moins de 19 ans au moment de l'exposition et il perdure pour les conceptions survenant 15 ans après l'exposition. La question est de savoir si l'effet observé est bien le résultat de hauts niveaux d'imprégnation au moment de la puberté avec un effet très prolongé comme le suggèrent ces données. Quant au mécanisme, les auteurs évoquent un rapport avec la durée de transit des spermatozoïdes dans l'épididyme, elle-même sous l'influence des hormones sexuelles.

214 Un nombre important de contaminants et de polluants possédant des effets œstrogéniques ou anti-androgéniques ou d'autres activités hormonales, il

paraît donc raisonnable de surveiller le *sex-ratio* après un incident aigu de pollution par les dioxines (Toppari et Skakkebaek, 1998).

Il a été également suggéré qu'il y aurait une augmentation de la gémellité lorsque les taux de HAPH sont anormalement élevés. Les données sur ce point sont actuellement contradictoires : à Anvers, à proximité d'un incinérateur, on observe une augmentation statistique de la gémellité (Aelvoet et coll., 1999) ; en Finlande, une augmentation significative de la gémellité est observée à proximité d'un incinérateur mais pas d'un autre (Vartiainen et coll., 1998). On peut se demander dans quelle mesure le fait d'habiter près d'un incinérateur n'augmente pas l'inquiétude des parents lorsqu'ils ne conçoivent pas rapidement et n'entraîne pas l'utilisation de médicaments susceptibles d'induire une gémellité. Seule une enquête approfondie permettrait de savoir avec certitude si les incinérateurs ou l'inquiétude parentale sont en cause.

Autres anomalies cliniques des enfants exposés *in utero* ou durant la lactation

Trois types d'anomalies cliniques ont été rapportés ou suggérés chez les enfants exposés à des taux élevés de dioxines *in utero* ou par la lactation : susceptibilité accrue aux infections, atopie et anomalies dentaires au niveau des dents de lait. Les arguments énoncés sont parfois indirects et il convient d'analyser chacune des anomalies séparément.

Pour la susceptibilité accrue aux infections, les données ne sont pas très convaincantes. Les parents des enfants de Yusho et de Yu-Cheng ayant rapporté une fréquence élevée d'épisodes infectieux, une étude cas-témoins a été réalisée : 29 enfants de Yu-Cheng et 22 témoins ont été évalués 6 ans après l'intoxication *in utero*. Seuls les épisodes grippaux au cours des 6 derniers mois ont été augmentés. Les auteurs suggèrent que cette augmentation pourrait être liée plutôt à un effet de type allergique qu'à une diminution de la capacité à lutter contre les infections (Yu, 1998).

En ce qui concerne l'atopie, jusqu'en 1994, on enseignait classiquement que l'allaitement maternel protégeait de l'atopie : pour éviter cette atteinte il était recommandé de nourrir les enfants au lait maternel pendant au moins six mois. En 1994, Kay et coll. étudient une population recrutée en médecine générale pour laquelle ils montrent d'une part une augmentation importante de l'atopie qui atteint 20 % de la population et une absence d'effet protecteur de l'allaitement maternel. Cette étude a eu lieu dans la région de Sheffield au Royaume-Uni, région sans doute relativement polluée. Une étude finlandaise a confirmé que, dans certains cas, l'atopie s'améliorait avec l'arrêt de l'allaitement maternel (Goldman, 1999). Nakamura et coll. (1999) vont jusqu'à suggérer que les taux de dioxines dans le lait maternel pourraient être responsables de l'atopie.

Le troisième aspect clinique est celui de l'atteinte des dents de lait. Dans deux études en Finlande une association entre la durée de l'allaitement maternel et l'apparition de défauts dentaires, a pu être clairement mise en évidence (Alaluusua, 1996). Il s'agit d'abord d'une étude cas-témoins dans laquelle 40 enfants ayant une minéralisation défectueuse de leurs premières molaires de lait ont été comparés avec 40 témoins. La durée moyenne de l'allaitement chez les enfants ayant une déminéralisation était de 9 mois alors qu'elle n'était que de 6 mois chez les témoins. Plus l'allaitement était long plus les anomalies étaient importantes. Une deuxième étude concerne une cohorte de 97 enfants dont les mères avaient été encouragées à les nourrir très longtemps au sein. Parmi ces 97 enfants, 24 avaient des défauts de minéralisation. Tous avaient été nourris pendant plus de 8 mois. Comme pour l'atopie, il n'y a pas eu de dosage des niveaux de dioxines ou de PCB chez les enfants atteints. Toutefois les travaux expérimentaux suggèrent que les dioxines puissent être incriminées. Les auteurs de cette étude concluent néanmoins que la contamination de l'enfant par les dioxines *in utero* présente un risque réel alors que la contamination par le lait serait tout à fait bénigne. Les mêmes auteurs (Alaluusua et coll., 1999) ont étudié la dentition de 102 enfants âgés de 6 ou 7 ans, et qui avaient été nourris au sein pendant une période moyenne de 10,5 mois. Les concentrations de PCDD, de PCDF et de PCB ont été dosées dans des échantillons conservés du lait maternel des mères. Des défauts de la dentition apparaissaient plus souvent et étaient plus sévères chez les enfants exposés aux taux les plus élevés de dioxines ; la relation était moins évidente avec les taux de PCB. Les défauts de minéralisation des dents pourraient, selon les auteurs, donner des indications sur l'exposition des enfants aux dioxines.

Autres anomalies biologiques des enfants exposés

Les anomalies biologiques des enfants exposés concernent : la thyroïde, les tests immunitaires, la coagulation.

Pour la thyroïde un nombre important de publications montrent une augmentation de la TSH et/ou une diminution de la triiodothyronine (T3) et de la thyroxine (T4) en rapport avec une atteinte intra-utérine (Pluim et coll., 1993 ; Feeley, 1995 ; Longnecker et coll., 2000) ou durant la lactation (Nagayama et coll., 1998). Ces derniers auteurs ont dosé les PCDD, les PCB coplanaires et les PCDF dans le lait maternel de 36 enfants. Ils ont simultanément dosé la T3 et la T4 dans le sang des enfants et trouvé une corrélation négative entre le taux estimé en TEQ de ces toxiques dans le lait maternel et les niveaux de T3 et de T4 dans le sang des nourrissons allaités. Les anomalies thyroïdiennes en relation avec les expositions aux HAPH se retrouvent d'ailleurs chez l'adulte. Il a été suggéré que les atteintes neuro-comportementales soient en fait directement en relation avec l'atteinte thyroïdienne (Hauser et coll., 1998).

En ce qui concerne l'immunité, l'éventualité d'une plus grande sensibilité aux infections chez les enfants de Yu-Cheng a déjà été évoquée. Quelques publications suggèrent une perturbation de certains marqueurs biologiques de l'immunité lorsque les enfants ont été exposés *in utero* même à des doses environnementales. Deux études canadiennes chez le grand singe montrent une perturbation des tests immunologiques chez les jeunes singes. Dans une première étude, les singes ont été exposés à des taux environnementaux *in utero* (Arnold et coll., 1995), dans la deuxième étude les jeunes singes ont été exposés durant la lactation à des doses environnementales de PCB. Dans les deux études, une réduction des immunoglobulines M et G ainsi qu'une réduction des niveaux des HLA-DR de surface sont retrouvées (Arnold et coll., 1999).

Chez l'enfant exposé *in utero* ou par le lait maternel, des anomalies ont été rapportées dans deux séries d'études. Dans une cohorte inuit, on a observé chez les enfants dont les mères avaient les taux les plus élevés de PCB et de dioxines dans le lait maternel, une diminution du rapport des lymphocytes CD4/CD8 (Dewailly et coll., 1993). Dans la cohorte hollandaise on a également rapporté les mêmes anomalies chez les enfants les plus exposés : augmentation des lymphocytes CD8 et des TcR $\gamma\delta$ et TcR $\alpha\beta$ (Weisglas-Kuperus, 1998).

Pour les anomalies de la coagulation, 32 enfants ont été étudiés dans la cohorte hollandaise. Au moment de la naissance, aucune corrélation entre les taux de PCB et de vitamine K n'a été mise en évidence. En revanche, à l'âge de 11 semaines, une forte corrélation inverse entre les taux de vitamine K et de 2,3,7,8-TCDF a été retrouvée. Les auteurs s'interrogent sur le rôle éventuel des PCDF environnementaux dans l'augmentation de la fréquence de la maladie hémorragique tardive du nourrisson observée durant les dernières décennies (Pluim et coll., 1994).

Atteinte neuro-comportementale

Concernant l'atteinte neuro-comportementale, la plus grande partie de la littérature a trait aux PCB et non aux dioxines.

Les enfants de Yusho et de Yu-Cheng, victimes d'une intoxication sévère, présentaient un retard mental vrai. Dans les deux cohortes environnementales des États-Unis, les effets les plus importants se retrouvent chez les sujets ayant les charges corporelles les plus élevées, au-dessus du 96^e centile dans la cohorte de Caroline du Nord et du 89^e centile dans la cohorte des Grands Lacs (Jacobson et Jacobson, 1996). Les effets diffèrent d'une étude à l'autre. Dans la cohorte de Caroline du Nord, seul le test de Brazeltone est perturbé. Dans la cohorte des Grands Lacs non seulement le test de Brazeltone mais aussi les tests de mémoire et les tests cognitifs sont anormaux. Pour la cohorte des Grands Lacs, les enfants ont été suivis jusqu'à l'âge de 11 ans. A l'âge de

11 ans, les anomalies persistent notamment en ce qui concerne l'apprentissage numérique. Dans l'étude aux Pays-Bas (Patandin et coll., 1998, 1999) la méthodologie suivante a été adoptée. Deux cohortes ont en fait été formées : une cohorte à Rotterdam dans une zone polluée et une cohorte à Groningen dans une région rurale. Ces deux cohortes représentent environ 200 enfants. Pour chacune des cohortes, on a constitué deux sous-groupes quantitativement égaux : le premier sous-groupe comprenant les femmes désireuses d'allaiter le plus longtemps possible et l'autre, les femmes désireuses de donner le biberon d'emblée. Les femmes désireuses de donner le biberon recevaient une

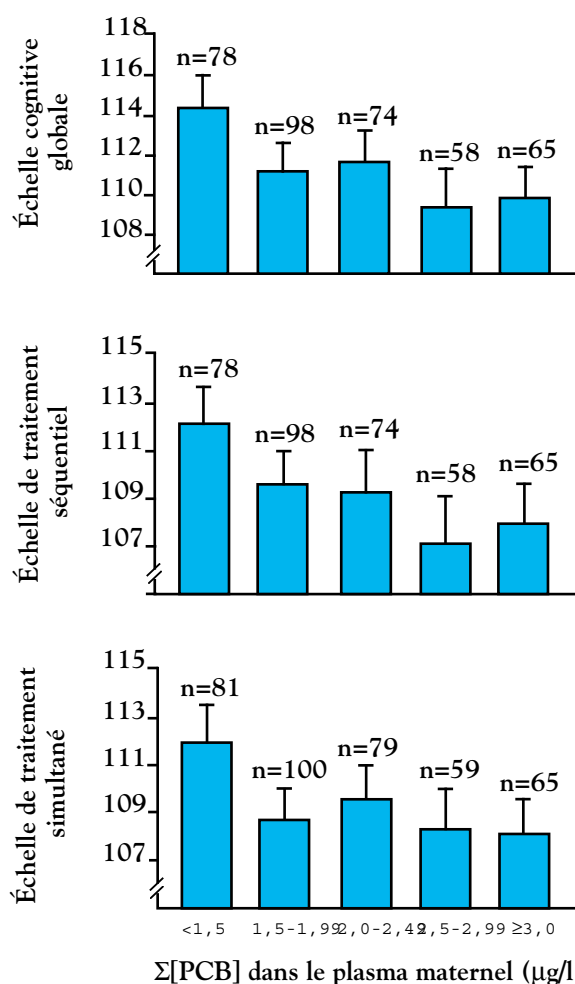


Figure 14.1 : Évaluation du développement cognitif et comportemental des enfants aux Pays-Bas en fonction des concentrations plasmatiques maternelles en PCB (d'après Patandin et coll., 1999)

alimentation gratuite pour leur bébé. Il y a donc un biais de sélection important dans les deux groupes qu'il sera difficile d'ajuster par la suite. À 3 mois, le développement neurologique, cognitif et comportemental était inversement proportionnel aux taux de PCB au cordon. À 42 mois, après ajustement, le développement cognitif et comportemental restait inversement corrélé avec les taux de PCB au cordon (figure 14.1), alors que les taux de PCB et de dioxines dans le lait maternel ne semblaient pas influencer sur le développement cognitif.

Dans d'autres études, les effets neuro-comportementaux liés à l'allaitement maternel et aux taux de dioxines dans le lait ne sont pas clairs. Globalement, les enfants nourris au sein ont de meilleures performances que les enfants nourris au biberon. Toutefois, parmi les enfants allaités, ceux dont les mères ont les taux les plus élevés de dioxines ont de moins bonnes performances (Ilse et coll., 1996). Par ailleurs, l'ajustement montre un phénomène inhabituel. Les femmes les plus contaminées par les PCB sont aussi celles qui appartiennent aux milieux socio-économiques les plus élevés, qui ont les meilleurs niveaux d'éducation, qui fument le moins et qui ont le meilleur score d'intelligence verbale. Ceci est un effet tout à fait paradoxal. Dans l'étude des effets néfastes du tabac, de l'alcool, du plomb..., le gradient social va toujours dans le même sens que l'exposition à l'agent nocif. La réalité de l'atteinte neuro-comportementale liée aux PCB à des doses environnementales est confirmée par le fait que, comme pour les anomalies immunitaires, l'expérimentation chez le grand singe montre des perturbations similaires (Rice, 1997a et b).

Lactation

Les taux de dioxines dans le lait maternel ont été étudiés depuis plus de 30 ans et sont en diminution régulière depuis environ 15 ans. Lors de la dernière enquête européenne de l'OMS en 1993, les taux de PCDD/PCDF en Europe de l'Ouest variaient de 12 à 27 pg TEQ/g de matières grasses. Par ailleurs, dans une étude récente, Gladen et coll. (1999) observent des taux du même ordre de grandeur dans un pays aussi fortement industrialisé que l'Ukraine. En France, l'étude récente sur les laits maternels (InVS/CAREPS, 2000) indique un taux moyen de 16,4 pg TEQ/g de matières grasses. Quels que soient les pays où les études ont été faites, les taux de dioxines des enfants nourris au sein sont deux fois plus élevés que ceux des enfants nourris au biberon et ces taux restent élevés bien au-delà de la puberté (figure 14.2). L'apport journalier pour un nourrisson de 5 kg consommant quotidiennement 700 ml de lait contenant 3 % de matières grasses est d'environ 70 pg TEQ/kg de poids corporel. Si cette dose quotidienne est absorbée pendant une période d'allaitement de 6 mois, elle représente moins de 4 % de la dose totale absorbée au cours d'une vie (exposition quotidienne entre 1 et 3 pg TEQ/kg de poids corporel).

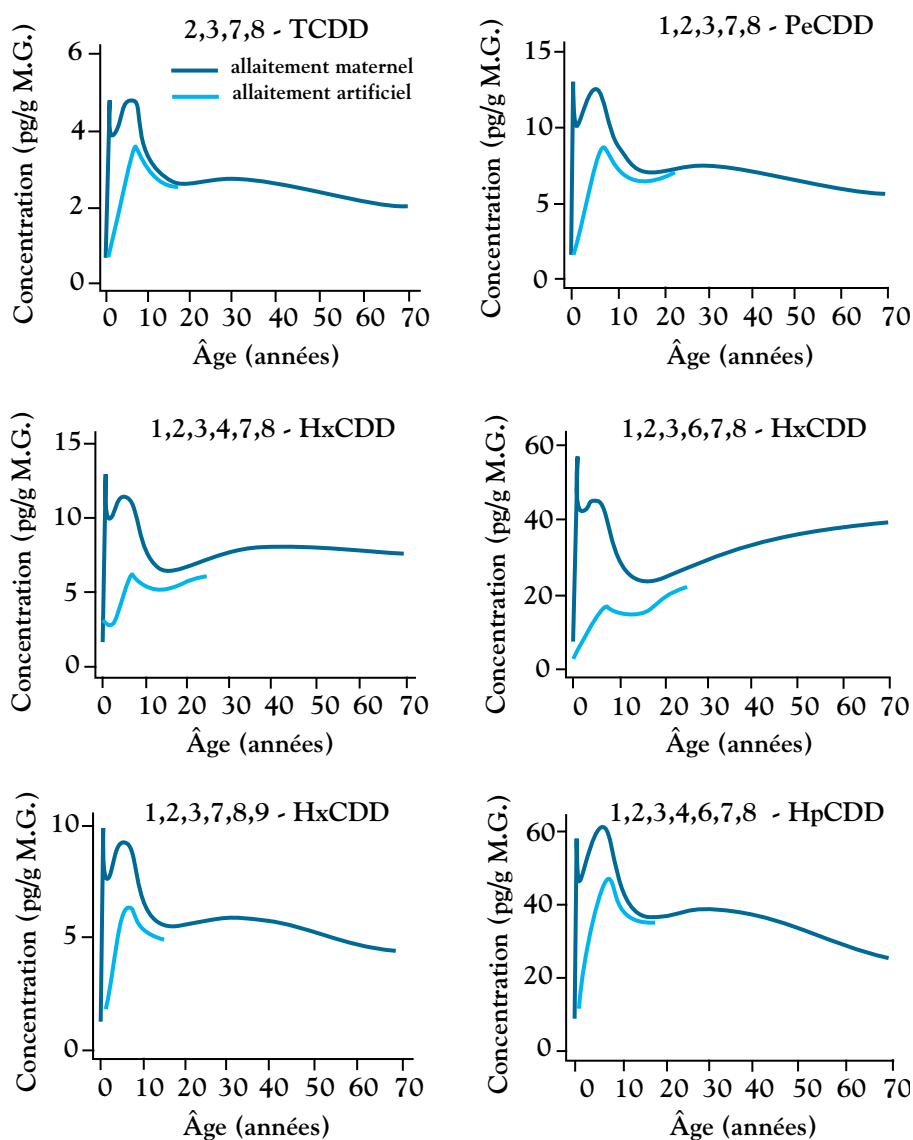


Figure 14.2 : Concentration en PCDD dans les graisses chez l'homme, de la naissance à 70 ans (M.G. : matières grasses) (d'après Liem et Theelen, 1997)

Les éventuelles anomalies liées aux dioxines lactationnelles ont été discutées plus haut (aspects neuro-comportementaux, tests thyroïdiens et formation des dents molaires de lait).

A l'heure actuelle, la recommandation est de ne pas décourager l'allaitement maternel en raison des taux de dioxines et de PCB. Mais le fait que ces

substances passent chez l'enfant par le lait de la mère doit être une motivation supplémentaire pour diminuer les taux environnementaux.

Les taux néonataux de dioxines varient en fonction de divers paramètres : l'alimentation maternelle, la classe socio-économique, l'âge maternel. Une mère de 40 ans a des taux 2,7 fois plus élevés que ceux d'une mère de 20 ans (Lackmann et coll., 1996). L'âge gestationnel au moment de la naissance est aussi un déterminant important des taux néonataux. Lackmann et coll. ont montré que, chez un enfant qui naissait deux semaines après terme, les taux de dioxines au cordon étaient de 150 % à 240 % ceux d'un enfant né deux semaines avant le terme.

Les périodes cumulées d'allaitement maternel antérieur sont négativement associées aux concentrations des composés organiques polychlorés (Albers et coll., 1996). Ainsi, une troisième pare donne 30 % de dioxines en moins qu'une primipare et une dixième pare donne 90 % de dioxines en moins. L'âge maternel joue en sens inverse, plus la femme est âgée plus sa charge corporelle en dioxines est élevée et plus elle délivre de dioxines à son enfant. Le tabagisme joue un rôle modeste. Le mode d'alimentation est important, mais une étude hollandaise a montré qu'il ne sert pas à grand-chose de modifier les habitudes alimentaires d'une femme lorsqu'elle allaite, sa charge corporelle en dioxines étant déjà largement constituée (Koppe, 1995).

En conclusion, les taux environnementaux de PCB et sans doute de dioxines paraissent liés à des effets indésirables. Ces effets semblent plus marqués en ce qui concerne le fœtus, l'atteinte neuro-comportementale fœtale pouvant être préoccupante. La probabilité que l'agent causal soit réellement les dioxines et/ou les PCB est grande : elle est essentiellement fonction de la force de l'association, de la relation dose-effet existante et de l'analogie avec l'expérimentation chez le grand singe. Cependant, toutes les études ne sont pas cohérentes entre elles, et la possibilité du rôle de co-contaminants doit être explorée.

Un point mérite sans doute réflexion. Pourquoi l'exposition par le lait serait-elle peu nocive alors que l'exposition intra-utérine le serait fortement ? On peut émettre quatre hypothèses : les données actuelles sont partiellement fausses, soit parce que l'effet intra-utérin est moindre que ce que l'on pense, soit parce qu'il est dû à d'autres substances, soit parce qu'il y a un effet de la lactation, même si on ne l'a pas encore mis en évidence ; du fait de l'allaitement maternel, la mère fournit à son bébé une stimulation qui favorise son développement. L'ajustement sur la classe sociale n'ayant pas été fait correctement, cet effet d'hyperstimulation de la mère allaitante masque les effets éventuels des PCDD présents dans le lait maternel ; le lait contient une substance qui corrigerait l'effet dioxine ; le fœtus est plus vulnérable que le nouveau-né et une exposition à des taux environnementaux, acceptables chez

l'adulte, entraîne des anomalies au long terme chez le fœtus. Quelques résultats indiquent que chez les enfants allaités, le développement est très légèrement moins bon chez les enfants les plus exposés *in utero* aux dioxines et/ou aux PCB, et ce de façon transitoire. Deux nouvelles études sur les aspects neuro-comportementaux sont en cours dans le cadre d'un projet européen, l'une en Allemagne, l'autre aux Îles Féroé, qui devraient donner de précieuses indications.

Enfin, il faut rappeler que les taux environnementaux de dioxines sont en décroissance. Toutefois, bien que l'on ait cessé de fabriquer les PCB, des stocks très importants sont encore présents sur la planète et il n'y a pas, à l'heure actuelle, de politique précise pour essayer de gérer ces stocks. La probabilité d'un nouvel accident comme celui survenu en Belgique reste grande. Il paraît donc important de mettre en place, sans doute au niveau européen, des systèmes sentinelles qui mesureraient soigneusement non seulement les taux de dioxines et de PCB dans le lait maternel et dans le sang de cordon, mais aussi les marqueurs faiblement perturbés tels que les tests thyroïdiens, les tests immunitaires et éventuellement les anomalies des molaires de lait.

BIBLIOGRAPHIE

- AELVOET W. Perceived excess of congenital anomalies and unperceived excess of multiple births in the neighbourhood of two refuse waste incinerators in the conurbation of Antwerp. Communication au Groupe de contact Épidémiologie périnatale du Fonds de la recherche scientifique médicale, janvier 1999, Bruxelles
- ALALUUSUA S, LUKINMAA PL, KOSKIMIES M, PIRINEN S, HOLTTA P et coll. Developmental dental defects associated with long breast feeding. *Eur J Oral Sci* 1996, **104** : 493-497
- ALBERS JM, KREIS IA, LIEM AK, VAN ZOONEN P. Factors that influence the level of contamination of human milk with poly-chlorinated organic compounds. *Arch Environ Contam Toxicol* 1996, **30** : 285-291
- ARNOLD DL, BRYCE F, MCGUIRE PF, STAPLEY R, TANNER JR et coll. Toxicological consequences of aroclor 1 254 ingestion by female rhesus (*Macaca mulatta*) monkeys. Part 2. Reproduction and infant findings. *Food Chem Toxicol* 1995, **33** : 457-474.
- ARNOLD DL, BRYCE F, MES J, TRYPHONAS H, HAYWARD S, MALCOLM S. Toxicological consequences of feeding PCB congeners to infant rhesus (*Macaca mulatta*) and cynomolgus (*Macaca fascicularis*) monkeys. *Food Chem Toxicol* 1999, **37** : 153-167.
- AXMON P, STRÖMBERG ULR, HAGMAR L. Time to pregnancy and miscarriage in women with high dietary intake of fish contaminated with persistent organochlorine compounds. In : Johansson N, Bergman A, Broman D, Håkansson H, Jansson B, Klasson-Wehler E, et coll., editors. *18th Symposium on halogenated environmental organic pollutants* ; 1998 ; Stockholm (Sweden) : Swedish Environmental Protection Agency, Stockholm (Sweden) ; 1998, p 227-230
- BERKOWITZ GS, LAPINSKI RH, WOLFF MS. The role of DDE and polychlorinated biphenyl levels in preterm birth. *Arch Environ Contam Toxicol* 1996, **30** : 139-41

BIRNBAUM LS. Developmental effects of dioxins and related endocrine disrupting chemicals. *Toxicol Lett* 1995, **82-83** : 743-750

BROUWER A, LONGNECKER MP, BIRNBAUM LS, COGLIANO J, KOSTYNIAC P et coll. Characterization of potential endocrine-related health effects at low-dose levels of exposure to PCBs. *Environ Health Perspect* 1999, **107** : 639-49

BUCK GM, MENDOLA P, VENA JE, SEVER LE, KOSTYNIAC P et coll. Paternal Lake Ontario fish consumption and risk of conception delay, New York State Angler Cohort. *Environ Res* 1999, **80** : S13-S18

BUCK GM, SEVER LE, MENDOLA P, ZIELEZNY M, VENA JE. Consumption of contaminated sport fish from Lake Ontario and time-to-pregnancy. New York State Angler Cohort. *Am J Epidemiol* 1997, **146** : 949-954

BULUN SE, ZEITOUN KM, KILIC G. Expression of dioxin-related transactivating factors and target genes in human eutopic endometrial and endometriotic tissues. *Am J Obstet Gynecol* 2000, **182** : 767-75

CENTERS FOR DISEASE CONTROL. *Health status of Vietnam veterans. Vietnam experience study*. Atlanta : US DHHS 1, synopsis

CHUNG YW, CLEMENS LG. Effects of perinatal exposure to polychlorinated biphenyls on development of female sexual behavior. *Bull Environ Contam Toxicol* 1999, **62** : 664-670

CORREA-VILLASENOR A, FERENEZ C, BOUGHAM JA, NEILL CA. Baltimore-Washington infant study group. Total anomalous pulmonary venous return : familial and environmental factors. *Teratology* 1991, **44** : 415-428

COULON P, LAN PT, ADENIS JP, VERIN P. Bilateral complete cryptophthalmos. Illustration with a case. Review of the literature. *J Fr Ophthalmol* 1994, **17** : 505-512

DESTEFANO F, ANNEST JL, KRESNOW MJ, SCHRADER SM, KATZ DF. Semen characteristics of Vietnam veterans. *Reprod-Toxicol* 1989, **3** : 165-173

DEWAILLY E, AYOTTE P, BRUNEAU S, LALIBERTE C, MUIR DC, NORSTROM RJ. Inuit exposure to organochlorines through the aquatic food chain in arctic Quebec. *Environ Health Perspect* 1993, **101** : 618-20.

DIMICH-WARD H, HERTZMAN C, TESCHKE R. Reproductive effects of paternal exposure to chlorophenolate wood preservatives in the sawmill industry. *Scand J work Environ Health* 1996, **22** : 267-273

ERICKSON JD, MILINARE J, MCCLAIN PW, FITCH TG, JAMES LM et coll. Vietnam veterans' risks for fathering babies with birth defects. *JAMA* 1984, **252** : 903-912

ESKENAZI B, KIMMEL G. Workshop on perinatal exposure to dioxin-like compounds. II. Reproductive effects. *Environ Health Perspect* 1995, **103** : 143-145

ESKENAZI B, MOCARELLI P, WARNER M, SAMUELS S, VERCELLINI P et coll. Seveso women's health study : a study of the effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on reproductive health. *Chemosphere* 2000, **40** : 1247-1253

FEELEY MM. Workshop on perinatal exposure to dioxin-like compounds. III. Endocrine effects. *Environ Health Perspect* 1995, **103** Suppl 2 : 147-150.

- FEIN GG, JACOBSON JL, JACOBSON SW, SCHWARTZ PM, DOWLER JK. Prenatal exposure to polychlorinated biphenyls : effects on birth size and gestational age. *J Pediatr* 1984, **105** : 315-320
- GARRY VF, SCHREINEMACHERS D, HARKINS ME, GRIFFITH J. Pesticide applicers, biocides and birth defects in rural Minnesota. *Environ Health Perspect* 1996, **104** : 394-399
- GERHARD I, DANIEL V, LINK S, MONGA B, RUNNEBAUM B. Chlorinated hydrocarbons in women with repeated miscarriages. *Environ Health Perspect* 1998, **106** : 675-681.
- GIBBONS A. Dioxin tied to endometriosis. *Science* 1993, **262** : 1373
- GLADEN BC, SCHECTER AJ, PÄPKE O, SHKYRYAK-NYZHNYK ZA, HRYHORCZUK DO, LITTLE RE. Polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins, polychlorinated dibenzofurans, and coplanar polychlorinated biphenyls in breast milk from two cities in Ukraine. *J Toxicol Environ Health* 1999, **58** : 119-127
- GOLDMAN AS. Association of atopic diseases with breast-feeding : food allergens, fatty acids, and evolution. *J Pediatr* 1999, **13** : 5-7
- HAUSER P, MCMILLIN JM, BHATARA VS. Resistance to thyroid hormone : implications for neurodevelopmental research on the effects of thyroid hormone disruptors. *Toxicol Ind Health* 1998, **14** : 85-101.
- IARC. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. polychlorinated Dibenzo-*para*- dioxins and polychlorinated dibenzofurans. *IARC Lyon France* 1997, **69**
- ILSEN A, BRIET JM, KOPPE JG, PLUIM HJ, OOSTING J. Signs of enhanced neuromotor maturation in children due to perinatal load with background levels of dioxins. Follow-up until age 2 years and 7 months. *Chemosphere* 1996, **33** : 1317-1326
- INVS/CAREPS. Étude sur les dioxines et les furanes dans le lait maternel en France, 2000
- JACOBSON JL, JACOBSON SW. Intellectual impairment in children exposed to polychlorinated biphenyls *in utero*. *New Eng J Med* 1996, **335** : 783-789
- KAY J, GAWKRODGER DJ, MORTIMER MJ, JARON AG. The prevalence of childhood atopic eczema in a general population. *J Am Acad Dermatol* 1994, **30** : 35-39
- KOPPE JG. Nutrition and breast-feeding. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1995, **61** : 73-78
- LACKMANN GM, GOEN T, TOLLINER U, SCHALLER KH, ANGERER J. PCBs and HCB in serum of full-term German neonates. *Lancet* 1996, **348** : 1035
- LIEM AKD, THEELEN RMC. Dioxins : chemical analysis, exposure and risk assessment. PhD thesis, University of Utrecht and RIVM 1997, 178-215
- LONGNECKER MP, GLADEN BC, PATTERSON DG JR, ROGAN WJ. Polychlorinated biphenyl (PCB) exposure in relation to thyroid hormone levels in neonates. *Epidemiology* 2000, **11** : 249-54
- LONGNECKER MP, ROGAN WJ, LUCIER G. The human health effects of DDT (dichlorodiphenyltrichloroethane) and PCBs (polychlorinated biphenyls) and an overview of organochlorines in public health. *Annu Rev Public Health* 1997, **18** : 211-244
- MAYANI A, BAREL S, SOBACK S, ALMAGOR M. Dioxin concentrations in women with endometriosis. *Hum Reprod* 1997, **12** : 373-5

MAZHITOVA Z, JENSEN S, RITZEN M, ZETTERSTROM R. Chlorinated contaminants, growth and thyroid function in schoolchildren from the Aral Sea region in Kazakhstan. *Acta Paediatr* 1998, **87** : 991-995

MENDOLA P, BUCK GM, SEVER LE, ZIELEZNY M, VENA JE. Consumption of PCB-contaminated freshwater fish and shortened menstrual cycle length. *Am J Epidemiol* 1997, **146** : 955-960

MICHALEK JE, RAHE AJ, BOYLE CA. Paternal dioxin, preterm birth, intrauterine growth retardation, and infant death. *Epidemiology* 1998, **9** : 161-167

MOCARELLI P, BRAMBILLA P, GERTHOUX PM. Change in sex ratio with exposure to dioxin [letter]. *Lancet* 1996, **348** : 409

MOCARELLI P, GERTHOUX PM, FERRARI E, PATTERSON DG JR, KIESZAK SM et coll. Paternal concentrations of dioxin and sex ratio of offspring. *Lancet* 2000, **355** : 1858-63

MOCARELLI P, GERTHOUX PM, FERRARI E, PATTERSON DG JR, KIESZAK SM and coll. Paternal concentration of dioxin and sex ratio of offspring. *Lancet* 2000, **355** : 1858-1863

NAGAYAMA J, OKAMURA K, IIDA T, HIRAKAWA H, MATSUEDA T et coll. Postnatal exposure to chlorinated dioxins and related chemicals on thyroid hormone status in Japanese breast-fed infants. *Chemospher*. 1998, **37** : 1789-1793.

NAKAMURA Y, OKI I, TANIHARA S, OJIMA T, KUWANO T et coll. Relationship between breast milk and atopic dermatitis in children. *Nippon Koshu Eisei Zasshi* 1999, **46** : 298-303

OKEY AB, GIANNONE JV, SMART W, WONG JM, MANCHESTER DK et coll. Binding of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin to AH receptor in placentas from normal *versus* abnormal pregnancy outcomes. *Chemosphere* 1997, **34** : 1535-1547

PATANDIN S, KOOPMAN-ESSEBOOM C, DE RIDDER MA, WEISGLAS-KUPERUS N, SAUER PJ. Effects of environmental exposure to polychlorinated biphenyls and dioxins on birth size and growth in Dutch children. *Pediatr Res* 1998, **44** : 538-545.

PATANDIN S, LANTING CI, MULDER PGH, BOERSMA ER, SAUER PJJ, WEISGLAS-KUPERUS N. Effects of environmental exposure to polychlorinated biphenyls and dioxins on cognitive abilities in Dutch children at 42 months of age. *J Pediatr* 1999, **134** : 33-41

PETERSON RE, THEOBALD HM, KIMMEL GL. Developmental and reproductive toxicity of dioxins and related compounds : cross-species comparisons. *Crit Rev Toxicol* 1993, **23** : 283-335

PHAM QT. Poulets puis porcs belges et agent orange au Viêt Nam. Toxicité des dioxines et responsabilité des hommes. *L'actualité chimique* 1999, **dec** : 3-6

PLUIM HJ, DE VIJLDER JJ, OLIE K, KOK JH, VULSMA T et coll. Effects of pre- and postnatal exposure to chlorinated dioxins and furans on human neonatal thyroid hormone concentrations. *Environ Health Perspect* 1993, **101** : 504-508.

PLUIM HJ, VAN DER SLIKKE JW, OLIE K, VAN VELZEN MJM, KOPPE JG. Dioxins and vitamin K status of the newborn. *J Environ Sci Health* 1994, **A29** : 793-802

- RICE DC, HAYWARD S. Effects of postnatal exposure to a PCB mixture in monkeys on nonspatial discrimination reversal and delayed alternation performance. *Neurotoxicology* 1997b, **18** : 479-494.
- RICE DC. Effect of postnatal exposure to a PCB mixture in monkeys on multiple fixed interval-fixed ratio performance. *Neurotoxicol Teratol* 1997a, **19** : 429-434.
- ROGAN WJ, GLADEN BC, MCKINNEY JD, CARRERAS N, HARDY P et coll. Neonatal effects of transplacental exposure to PCBs and DDE. *J Pediatr* 1986, **109** : 335-341.
- RYLANDER L, STROMBERG U, DYREMARK E, OSTMAN C, NILSSON-EHLE P, HAGMAR L. polychlorinated biphenyls in blood plasma among Swedish female fish consumers in relation to low birth weight. *Am J Epidemiol* 1998, **147** : 493-502
- RYLANDER L, STROMBERG U, HAGMAR L. Decreased birthweight among infants born to women with a high dietary intake of fish contaminated with persistent organochlorine compounds. *Scand J Work Environ Health* 1995, **21** : 368-375.
- STOCKBAUER JW, HOFFMANN RE, SCHRAMM WF, EDMONDS LD. Reproductive outcomes of mothers with potential exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Am J Epidemiol* 1988, **128** : 410-419
- SUNAHARA GI, NELSON KG, WONG TK, LUCIER GW. Decreased human birth weights after *in utero* exposure to PCBs and PCDFs are associated with decreased placental EGF-stimulated receptor autophosphorylation capacity. *Mol Pharmacol* 1987, **32** : 572-578
- SWEENEY H, CALVERT GM, EGELAND GA, FINGERHUT MA, HALPERIN WE, PIACITELLI LA. Review and update of the results of the NIOSH medical study of workers exposed to chemicals contaminated with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzodioxin. *Teratog Carcinog Mutagen* 1997-98, **17** : 241-247
- TAYLOR PR, STELMA JM, LAWRENCE CE. The relation of polychlorinated biphenyls to birth weight and gestational age in the offspring of occupationally exposed mothers. *Am J Epidemiol* 1989, **129** : 395-406
- TOPPARI J, SKAKKEBAEK NE. sexual differentiation and environmental endocrine disrupters. *Baillieres Clin Endocrinol Meta* 1998, **12** : 143-156
- VARTIAINEN T, JAAKKOLA JJ, SAARIKOSKI S, TUOMISTO J. Birth weight and sex of children and the correlation to the body burden of PCDDs/PCDFs and PCBs of the mother. *Environ Health Perspect* 1998, **106** : 61-66
- WEISGLAS-KUPERUS N. Neurodevelopmental, immunological and endocrinological indices of perinatal human exposure to PCBs and dioxins. *Chemosphere* 1998, **37** : 1845-1853
- WOLFE WH, MICHALEK JE, MINER JC, RAHE AJ, MOORE CA et coll. Paternal serum dioxin and reproductive outcomes among veterans of operation Ranch Hand. *Epidemiology* 1994, **6** : 16-22
- YU ML, HSIN JW, HSU CC, CHAN WC, GUO YL. the immunologic evaluation of the Yucheng children. *Chemosphere* 1998, **37** : 1855-1865

IV

Mécanismes d'action

15

Cascade moléculaire impliquant le récepteur Ah

Après la découverte par Poland en 1976 du récepteur Ah (Poland et coll., 1976), il fut progressivement établi une corrélation entre l'affinité d'un ligand pour AhR, l'induction des CYP1A hépatiques (modèle décrit ci-dessous) et la sévérité de la toxicité aiguë du ligand (Poland et coll., 1982). Ces résultats privilégient une fonction de « chef d'orchestre » de AhR dans le contrôle des effets toxiques des dioxines. Cependant, on observe des discordances manifestes avec cette théorie généralement acceptée :

- le 3-méthylchloranthrène (3-MC) administré à la souris durant 20 jours produit un tableau pathologique différent de celui de la 2,3,7,8-TCDD, alors que leurs affinités respectives pour AhR sont semblables ;
- des paramètres pharmacologiques (capacité de liaison, affinité, liaison à l'ADN) des AhR de hamster, de rat et de cobaye sont d'ordres comparables, mais la DL50 entre ces espèces diffère d'un facteur 5 000 ;
- les souches de rat Wistar H/W et Long Evans, respectivement résistantes et sensibles à la 2,3,7,8-TCDD (Pohjanvirta et Tuomisto, 1987 ; Pohjanvirta et coll., 1988), présentent des récepteurs d'affinités comparables. Une étude génétique, conduite avec ces deux souches, conclut à l'implication additionnelle d'un ou deux gènes dans la médiation de la toxicité de la 2,3,7,8-TCDD. En plus du rôle prépondérant d'AhR, l'implication de cofacteur(s) conjoint(s) est probable. Des effets supplémentaires de la 2,3,7,8-TCDD, indépendants de AhR, sont proposés : altérations de l'homéostasie de la vitamine A, des œstrogènes, de la peroxydation lipidique, atteinte du tissu adipeux brun, modulation d'expression du TNF (*Tumor necrosis factor*) ou de PEPCK (*Phosphoenolpyruvate carboxykinase*) (Neubert et coll., 1997).

Récepteur Ah

Le récepteur AhR constitue un déterminant essentiel de la médiation, à l'échelle moléculaire, de la toxicité des dioxines. Son ADN complémentaire, connu depuis 1992, révèle des domaines de forte homologie avec les protéines Per (*Period*) et Sim (*Single-Minded*) de *Drosophila melanogaster*. Ce motif

« PAS » (PER-AhR-SIM), caractérise les membres d'une nouvelle superfamille de protéines incluant Arnt (*AhR nuclear translocator*), partenaire d'hétérodimérisation de AhR. Comme les récepteurs nucléaires, les protéines PAS sont actives dans le noyau, se dimérisent, se fixent à l'ADN et régulent la transcription. Des originalités les distinguent (présence des segments PAS et b-HLH (*basic-Helix/Loop/Helix*), absence de doigt à atome de zinc), qui confèrent son originalité à la classe des récepteurs PAS. Quarante-deux membres sont identifiés dans des espèces variées (homme, lapin, rat, souris, truite, drosophile, *Cenorhabditis elegans*, l'ascomycète *Neurospora crassa* ou certaines algues). Ces protéines participent, dans les espèces simples, à des fonctions ancestrales de différenciation cellulaire servant à l'organogenèse et à l'établissement des rythmes circadiens. Avec l'évolution, leurs implications ont gagné en complexité et sont très imparfaitement connues.

Le domaine PAS, dans la phylogénie, apparaît associé à deux fonctions qui ont un lien évolutif : percevoir la lumière et appréhender le temps. Chez *Neurospora crassa* et la drosophile, des protéines PAS gouvernent l'expression rythmique de gènes cibles. Le segment PAS de *white collar-2* (*Neurospora*) est à 45 % identique à une moitié d'un photorécepteur procaryote, PYP (*Photoactive yellow protein*), et est similaire à un domaine répété des gènes de phytochromes végétaux (MESPHY). Considérant le rôle de ce motif peptidique dans la fonction de protéines d'horloge variées, son identification dans une variété étendue d'espèces est probable (Crosthwaite et coll., 1997).

Domaines fonctionnels

AhR et Arnt ont des architectures similaires. En région amino-terminale sont situés les motifs PAS et b-HBH. Ce dernier, commun à d'autres facteurs transcriptionnels (MyoD/E2A, Myc/Max, USF, E47...) reconnaît, sous forme dimérique et grâce au segment basique, des séquences nucléotidiques, boîtes E (5'-CANNTG-3'). Le fragment HLH assure une fonction d'interface entre les partenaires de dimérisation. L'hétérodimère AhR-Arnt identifie des séquences « XRE » (*Xenobiotic Responsive Element*) (5'-TNGCGTG(A/C)-3') où le motif CGTG est crucial. En identifiant la demi-boîte E « GTG », Arnt s'y lie par le résidu T. AhR, doté de deux segments basiques (acides aminés 9-20 et 27-39), interagit avec la région 5' du XRE qui diffère d'une boîte E (Fukunaga et Hankinson, 1996). Les domaines HBH et PAS d'AhR et d'Arnt participent à la fixation à l'ADN et à la dimérisation. Le domaine PAS regroupe deux motifs imparfaitement répétés, PAS A et PAS B. Dans AhR le segment C-terminal de PAS médie deux fonctions : la fixation du ligand et l'interaction avec la protéine chaperon hsp90. En position C-terminale d'AhR et d'Arnt, un segment riche en glutamine gère la fonction de transactivation génique (Jain et coll., 1994).

Le promoteur du gène d'AhR (11 exons) ne contient ni « TATA box » ni « CCAAT box ». On y retrouve des sites de fixation du facteur Sp1, un site AP-1, une boîte E et un CRE (*cAMP response element*). Ces sites semblent

impliqués dans l'expression tissulaire différencielle du récepteur (Schmidt et coll., 1993), comparable chez le rat, la souris et l'homme. L'expression d'Ahr, considérable dans le poumon, est modérée dans le foie et le rein et plus faible dans le cœur, la rate et le muscle squelettique. Arnt s'exprime à niveau constant dans ces tissus.

Activation de AhR, ligands et activateurs

En plus des activateurs d'Ahr déjà mentionnés, on peut citer certains flavonoïdes (benzo-naphto-flavone) ainsi que le 3-indole carbinol, présent dans les crucifères (choux, luzerne). Des molécules variées opèrent la transduction du signal sans être capables de déplacer la 2,3,7,8-TCDD du récepteur : benzimidazoles antiulcéreux inhibiteurs de la pompe à protons (oméprazole, lanzoprazole) ou anthelminthiques (thiabendazole), oxo-caroténoïdes non provitamines A comme la canthaxanthine, utilisée comme additif alimentaire en pisciculture pour pigmenter la chair des salmonidés (Gradelet et coll., 1997). Aucun ligand endogène d'Ahr n'a été formellement identifié. Des produits de photo-oxydation cutanée (UV) du tryptophane constituent des candidats plausibles pour cette fonction (Rannug et coll., 1995), la bilirubine et la lipoxine A4 sont généralement évoquées.

Voie de signalisation, cofacteurs

En absence de ligand, AhR est présent sous forme quiescente, complexé à hsp90, dans le cytosol (Pratt, 1997). La protéine chaperon agit sur les segments b-HLH et PAS (site de 191 acides aminés) pour préserver la capacité d'interaction avec l'ADN, la fonctionnalité du site de fixation du ligand et la capacité d'hétérodimérisation avec Arnt (Coumailleau et coll., 1995 ; Antonsson et coll., 1995). L'ancrage du ligand désunit AhR et hsp90. À l'instar du complexe observé avec le récepteur aux glucocorticoïdes, AhR est aussi complexé à des protéines. Ce sont des immunophilines, AIP (*AhR-interacting protein*), ARA9 (*Ah-receptor activated*) et XAP2 (*Hepatitis B virus X-associated protein 2*) (Carver et Bradfield, 1997 ; Ma et Whitlock, 1997 ; Meyer et coll., 1998) qui présentent une homologie avec les protéines FKBP d'interaction avec les immunomodulateurs FK506 et rapamicine. L'association d'AIP au complexe cytosolique serait labile. Le domaine de fixation du ligand d'Ahr est rendu fonctionnel par phosphorylation d'un résidu tyrosine. Sous sa forme activée AhR engage une hétérodimérisation nucléaire avec Arnt (ou Arnt2). En les phosphorylant, la protéine kinase C exerce un contrôle fonctionnel (Berghard et coll., 1993). Le complexe, suivant la reconnaissance spécifique d'un motif XRE, exerce une transactivation génique durant laquelle AhR coopère avec Sp1 et Arnt avec CBP/p300 et/ou Sp1 (Kobayashi et coll., 1996, 1997).

Signalisation *via* Ah : impact des phosphorylations

AhR et Arnt sont des phosphoprotéines. L'origine et les conséquences des modifications post-traductionnelles qu'elles subissent ont été particulièrement étudiées à partir de 1992. Du nombre conséquent de travaux publiés sur le sujet, on peut déduire un ensemble d'observations synthétiques et cohérentes qui identifient des sites primordiaux d'inter-relations entre « signalisation par AhR » et contrôle moléculaire des phosphorylations protéiques. En marge des résultats consensuels, subsiste un nombre appréciable d'études produites en exemplaire unique ou controversées qui rend délicate la synthèse globale de la littérature sur le sujet. Ces discordances sont justifiées, d'une part, par l'introduction progressive de sondes pharmacochimiques à l'efficacité et la spécificité croissantes (inhibiteurs et activateurs de kinases et de phosphatases) et, d'autre part, à l'usage de modèles cellulaires et *in vivo* variés. Pour ces raisons, de fréquentes discordances méthodologiques de détail compliquent ou rendent inappropriées des comparaisons d'études.

Sérine/thréonine phosphorylations : rôles de la protéine kinase C et de phosphatases

L'usage d'un inhibiteur polyvalent des protéines kinases, l'indole carbazole staurosporine sur une lignée d'hépatome de rat a révélé une diminution de la concentration cellulaire en AhR sans perturbation des capacités fonctionnelles du récepteur et une diminution de l'induction de CYP1A1, induite par la 2,3,7,8-TCDD (Singh et Perdew, 1993). Utilisant des procédures relativement spécifiques d'activation ou, au contraire, d'inhibition de l'activité de la protéine kinase C (PKC), il a été formellement établi qu'elle est indispensable à la transduction du signal par AhR (Carrier et coll., 1992 ; Berghard et coll., 1993 ; Schafer et coll., 1993 ; Long et coll., 1998). Des études de déphosphorylation suggèrent que la phosphorylation d'AhR est importante pour sa fixation à l'ADN alors que la phosphorylation d'Arnt influencerait sur sa capacité de dimérisation (Berghard et coll., 1993). Sans dénier un rôle prépondérant à la PKC, d'autres auteurs, ne lui reconnaissent aucune influence sur l'étape de fixation d'AhR à l'ADN (Schafer et coll., 1993). Des travaux plus récents, utilisant des lignées cellulaires et des inhibiteurs spécifiques de PKC différents, confirment que l'action de la PKC dans cette voie moléculaire ne concerne pas l'étape de fixation du complexe à l'ADN (XRE) et n'affecte pas la concentration intracellulaire d'AhR (Long et coll., 1998). Une hypothèse proposée est le contrôle conjoint, par la PKC, du recrutement et/ou de la fonctionnalité de coactivateurs participant au complexe transcriptionnel.

Les effets de sérine/thréonine phosphatases ont été étudiés. Des inhibiteurs de phosphatases (calcineurine A, acide okadaïque, cyclosporine A), qui affectent principalement les protéines phosphatases 1 et 2A, augmentent substantiellement la transcription induite par la 2,3,7,8-TCDD, sans toutefois modifier le niveau de la transcription basale des gènes impliqués dans cette voie moléculaire. Il apparaît que des sérine/thréonine phosphatases, sans moduler la

fixation du complexe au XRE, sont néanmoins capables d'entraver la capacité transcriptionnelle du dimère AhR-Arnt, lors d'étapes postérieures à sa fixation à l'ADN (Li et Dougherty, 1997).

Rôles des tyrosine-kinases : fonction alternative d'Ahr

L'implication de la fonction tyrosine-kinase, étudiée en utilisant des inhibiteurs comme la génistéine lors d'expositions *in vitro* de cellules à la 2,3,7,8-TCDD, n'est pas clairement élucidée. Des résultats contradictoires subsistent. Selon certains auteurs, l'inhibition des activités tyrosine-kinases est sans effet sur l'induction de CYP1A1 par la 2,3,7,8-TCDD (Backlund et coll., 1997) alors qu'elle avait été antérieurement rapportée comme inhibitrice d'une manière rapide et réversible en affectant le domaine de fixation du ligand de AhR (Gradin et coll., 1994).

Un second lien très intéressant entre activités tyrosine-kinases et récepteur Ah relève d'un effet alternatif de la 2,3,7,8-TCDD sur le récepteur. Il a été rapporté à plusieurs reprises que la 2,3,7,8-TCDD produisait, *in vivo* et *in vitro* et sur des fractions cellulaires, une augmentation rapide des activités tyrosine-kinases qui apparaît dépendante de la présence d'Ahr (Enan et Matsumura, 1995). Cet effet persiste dans des extraits dépourvus de noyau ; il apparaît donc indépendant de l'activité transcriptionnelle d'Ahr (Enan et coll., 1994). Plusieurs équipes ont formellement démontré l'association physique de la protéine tyrosine-kinase *c-src* (pp60^{src}) au complexe cytosolique AhR-Hsp90 et l'activation de cette activité tyrosine-kinase lors de l'exposition à la 2,3,7,8-TCDD, même dans des extraits cellulaires (Enan et Matsumura, 1996 ; Blankenship et Matsumura, 1997 ; Köhle et coll., 1999). En complément, il a été prouvé récemment que l'exposition à la 2,3,7,8-TCDD produit la dissociation de *c-src* du complexe cytosolique, son activation et sa translocation membranaire où elle est capable de procéder à la phosphorylation du récepteur à l'EGF (Köhle et coll., 1999). En présence de gel d'anamycine, qui dissocie le complexe cytosolique, cet effet de la 2,3,7,8-TCDD n'est plus observé, de même qu'il n'est plus retrouvé dans la lignée murine hétérozygote pour la déficience en *c-src*, exposée à la 2,3,7,8-TCDD (Matsumura et Matsumura, 1997). Clairement, les souris exprimant des taux réduits de *c-src* présentent, qualitativement et quantitativement, une toxicité réduite à la 2,3,7,8-TCDD. Cependant, les voies transcriptionnelles de médiation de la toxicité de la 2,3,7,8-TCDD demeurent inchangées chez ces animaux. Considérant qu'une voie primordiale de signalisation nucléaire par *c-src* dépend de *ras* par l'intermédiaire d'AP-1 (*c-src*, EGF-R, *ras*, p42/p44MAPK, phosphorylation Elk1 (Ser 383), induction de *c-fos*) une équipe a étudié la toxicité de la 2,3,7,8-TCDD chez des souris déficientes en *c-fos*. En l'absence de l'effecteur final de la cascade initiée par *c-src*, comme en absence de *c-src*, la 2,3,7,8-TCDD voit une partie de ses effets toxiques oblitérés (atrophie thymique, perte pondérale, involution du tissu adipeux) ; les autres effets toxiques sont présents (Enan et coll., 1998). Ces résultats indiquent que la toxicité *in vivo* de la 2,3,7,8-TCDD, imputable à l'activation de *c-src*, est en partie, médiée par

l'induction de *c-fos*. L'ensemble de ces observations ouvre donc une voie alternative de la toxicité de la 2,3,7,8-TCDD qui offre une corrélation satisfaisante avec l'ensemble des données de la littérature sur le sujet.

Répresseur d'AhR

Une boucle de rétrocontrôle d'activation de AhR a été décrite en 1999 (Mimura et coll., 1999). Au plan moléculaire, elle fait intervenir une protéine originale baptisée *AhR-Repressor* (AhRR) (2103 pb, 701 aa). L'analyse de la séquence de son ADNc, initialement isolé de l'intestin grêle murin, révèle que son plus haut degré d'identité est observé avec la zone des segments b-HLH et PAS-A de AhR. Le segment PAS-B, impliqué dans la fixation des ligands et l'interaction avec les protéines chaperons (Hsp90) est absent dans AhRR. La région carboxyterminale d'AhRR diffère considérablement de celle d'AhR. On la considère généralement comme le siège de la fonction de transactivation génique. Localisé dans le noyau, le répresseur AhRR interagit spontanément avec Arnt, le partenaire usuel d'hétérodimérisation de AhR, d'une façon indépendante de la présence d'un ligand d'AhR dans l'environnement réactionnel. Logiquement, AhRR ne s'associe pas à Hsp90. Lors d'essais *in vitro* utilisant la séquence cible XRE, l'hétérodimère AhRR-Arnt n'a montré aucune capacité de modulation d'expression génique. En revanche, dans des conditions expérimentales comparables, AhRR est capable de réduire de manière dose dépendante l'activation transcriptionnelle associée à l'activation d'AhR. Cette fonction de répression compétitive s'exercerait à deux niveaux : compétition entre AhR et AhRR pour le recrutement d'Arnt ainsi que compétition entre complexes AhR-Arnt et AhRR-Arnt pour la fixation aux sites XRE des gènes cibles (figure 15.1). Les 150 acides aminés carboxyterminaux se révèlent cruciaux pour la fonction de répression d'AhRR. Deux sites XRE fonctionnels sont présents dans la région 5' régulatrice du gène d'AhRR. De ce fait, l'expression du répresseur est stimulée par toute activation d'AhR, définissant en conséquence une véritable boucle d'autorégulation négative de la voie moléculaire de signalisation de la 2,3,7,8-TCDD. L'expression murine des messagers d'AhRR est faible dans tous les tissus examinés, mais son induction (3-méthylcholanthrène) est la plus marquée dans le cœur et dans le poumon, alors que dans le thymus, le foie le rein et l'intestin elle est moins forte. Thymus et foie sont justement deux organes particulièrement sensibles aux effets délétères de la 2,3,7,8-TCDD.

Ces travaux sont évocateurs d'un lien potentiel entre la susceptibilité spécifique d'un organe à la 2,3,7,8-TCDD et son niveau d'expression locale d'AhRR. Cette hypothèse devrait faire l'objet d'investigations plus poussées dans un futur proche. De surcroît, il sera très intéressant de connaître les degrés comparés d'expression constitutive d'AhRR entre différentes lignées de rongeurs, des primates non humains et l'homme dans une perspective d'étude de

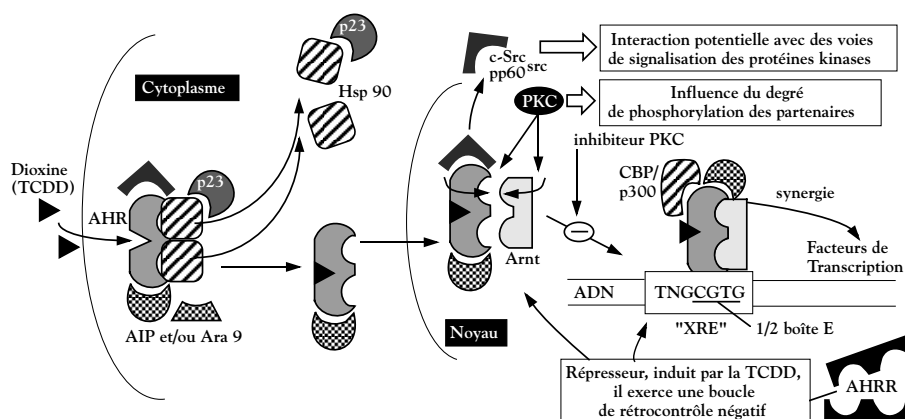


Figure 15.1 : Cascade moléculaire impliquant le récepteur Ah (aryl hydrocarbon) (d'après Pineau, communication personnelle)

Hsp : protéines de choc thermique ; *AIP* : *AhR interacting protein* ; *Ara 9* : *Ah receptor associated protein* ; *Arnt* : *AHR nuclear translocator* ; *src* : *sarc* ; *PKC* : protéine kinase C ; *CBP* : *CREBP (cAMP response element-binding protein)* ; *XRE* : *xenobiotic responsive element* ; *AHRR* : forme tronquée de *AhR* à fonction de répresseur

L'origine des différences interspécies de sensibilité à la 2,3,7,8-TCDD. Ces travaux sont très récents et pâtissent de sous-exploitation. Cependant, ils éclairent d'un jour nouveau des observations restées sans explication. Plusieurs équipes ont démontré que l'effet inducteur de CYP1A1, obtenu *in vitro* par les activateurs d'Ahr, est exacerbé par l'exposition des cellules à un inhibiteur de la synthèse protéique (cycloheximide) (Israel et coll., 1985 ; Daujat et coll., 1996). L'origine de cette superinduction a été attribuée à un déficit de synthèse d'un répresseur naturel demeuré inconnu à cette date. L'identification d'AHRR apporte le lien moléculaire attendu qui permet l'harmonisation rationnelle théorique de toutes les données observées.

Gènes cibles d'Ahr

On distingue la population des gènes dont la régulation par AhR est démontrée et ceux pour lesquels on a seulement observé la présence d'un ou plusieurs XRE en région régulatrice. Parmi les premiers, on retrouve de nombreux gènes hépatiques du métabolisme des xénobiotiques (phases I et II) (CYP1A1 -1A2 -1B1, NAD(P)H-ménadione oxydoréductase, UDP glucuronosyl transférase, glutathion transférase, aldéhydes déshydrogénases) ainsi que l'inhibiteur 2 de l'activateur du plasminogène, l'interleukine 1 β (IL1 β), le *transforming growth factor* (TGF α , β 2), le récepteur aux œstrogènes et les protooncogènes *c-jun* et *c-fos*. On a identifié des séquences XRE, particulièrement chez la souris, dans de nombreux gènes de cytokines (IL-2 -3 -5 -6 -10, TGF β 1, interféron γ).

Notre connaissance des gènes cibles d'Ahr concerne probablement une portion limitée de leur ensemble. Elle n'explique pas la totalité des manifestations toxiques observées, dont la compréhension nécessite l'identification de cibles, par exemple en analysant le transcriptome par nanométhode dans une variété d'espèces et de tissus.

Pharmacogénétique d'Ahr et Arnt chez le rongeur de laboratoire

La sensibilité interespèces à la 2,3,7,8-TCDD est remarquablement contrastée comme le reflètent les DL_{50} observées chez le cochon d'Inde (1 $\mu\text{g/kg}$), le hamster (1 000 $\mu\text{g/kg}$) ou le rat Han Wistar (9 600 $\mu\text{g/kg}$). Cependant, c'est au sein d'une même espèce que peuvent être conduites des études pertinentes pour disséquer les bases génétiques de la sensibilité à la 2,3,7,8-TCDD. Le modèle animal historiquement le mieux documenté est la souris, cependant, les avancées les plus importantes dans ce domaine ont été réalisées ces dernières années en étudiant la pharmacogénétique du rat en relation à sa sensibilité à la 2,3,7,8-TCDD.

Il est établi que pour les lignées consanguines de souris C57BL/6 et DBA/2 la sensibilité à la 2,3,7,8-TCDD (pour la majeure partie des effets incluant la létalité) possède un support génétique : le locus Ah. La dose de 2,3,7,8-TCDD nécessaire pour observer, chez la souris DBA/2, les manifestations toxiques obtenues chez la souris C57BL/6 est d'un ordre de 10 à 20 fois supérieure (Poland et Glover, 1980 ; Chapman et Schiller, 1985). Dans la souche DBA/2, deux paramètres concourent à la moindre sensibilité à la 2,3,7,8-TCDD : Ahr est exprimé plus faiblement et son affinité vis-à-vis de la 2,3,7,8-TCDD est considérablement réduite (Okey, et coll., 1989). L'origine moléculaire de la différence de sensibilité à la 2,3,7,8-TCDD des récepteurs des deux lignées est une transition d'acide aminé (Ala³⁷⁵ → Val), observée dans le domaine de fixation du ligand d'Ahr de la souche DBA/2 (Poland et coll., 1994 ; Ema et coll., 1994). Cette différence de sensibilité d'un facteur de 10 à 20 fois a été très utile dans la conduite d'études portant sur les différents congénères de PCDD et PCDF.

Cependant, la découverte et la caractérisation d'un nouveau modèle animal de sensibilité différentielle à la 2,3,7,8-TCDD semblent extrêmement prometteuses. Plusieurs études ont été conduites pour apprécier, selon des critères différents (létalité, manifestations toxiques, induction hépatique de CYP1A1), la sensibilité de diverses souches de rat. La synthèse de ces résultats révèle leur bon degré de cohérence : aux extrémités des différents classements se situent les souches « Long Evans » (LE) et « Han Wistar » (HW). Les premiers, (LE) avec une DL_{50} de 10 $\mu\text{g/kg}$ se révèlent pratiquement 1000 fois plus sensibles que les seconds (DL_{50} de 9 600 $\mu\text{g/kg}$) aux effets de toxicité aiguë de la 2,3,7,8-TCDD. Outre le facteur de différence de sensibilité, le

caractère remarquable du modèle réside dans la persistance, à des niveaux comparables dans les deux souches, d'une réponse d'induction hépatique du CYP1A et de certains autres effets biochimiques. L'évaluation comparée de ces modèles révèle une masse molaire anormalement faible d'Ahr chez le rat LE (98kDa/106kDa) associée à une expression trois fois plus basse du partenaire de dimérisation Arnt (Pohjanvirta et coll., 1999). Une étude génétique, conduite par croisements itératifs et caractérisation phénotypique des souches LE et HW, a permis d'établir que la transmission de la résistance à la toxicité aiguë de la 2,3,7,8-TCDD est de nature bi-allélique. La transmission homozygote de l'allèle « Ahr^{hw} » à une souche sensible, confère une totale absence de létalité jusqu'à une dose minimum de 2 000 µg/kg de 2,3,7,8-TCDD. Par ailleurs, un second gène (« B ») a été détecté mais non caractérisé ; il est responsable de la transmission d'une résistance de moindre amplitude et semble impliqué dans le contrôle de l'élévation des taux circulants de bilirubine en réponse à l'administration de 2,3,7,8-TCDD. Il est surprenant de constater que la distribution de ces allèles est sans effet sur la réponse inductive de CYP1A1 (Tuomisto et coll., 1999). L'origine moléculaire de la taille réduite d'Ahr dans la souche HW a été élucidée. Il s'agit d'une mutation ponctuelle du premier nucléotide de l'intron 10 qui engendre une modification d'épissage du messenger. La délétion peptidique qui en résulte affecte le segment C-terminal dans le domaine de transactivation. Une transition peptidique (Val497-Ala), dans une région variable de la protéine (exon 10) a également été détectée (Pohjanvirta et coll., 1998). En complément, une étude conduite sur huit souches de rats les a classées en catégories faibles et forts répondeurs à la 2,3,7,8-TCDD. Les forts répondeurs présentent une surexpression (X4) du messenger d'Ahr. Il a été simultanément identifié dans toutes les souches l'existence conjointe de deux messenger d'Arnt, dont l'un est tronqué (45 pb) dans le segment basique du domaine b-HLH. Les souches les plus sensibles à la 2,3,7,8-TCDD sont celles qui expriment la plus forte proportion de messenger Arnt intègre (Jana et coll., 1998). On observe donc que les travaux récents, conduits chez le rat, ouvrent de nouveaux horizons de recherche, applicables à l'homme, pour l'étude des bases moléculaires de la sensibilité à la 2,3,7,8-TCDD.

Rôle du récepteur AhR en physiopathologie

Les données de pharmacogénétique d'Ahr chez le rongeur autorisent un doute légitime relatif à sa responsabilité dans la médiation des effets toxiques de la 2,3,7,8-TCDD. Deux questions sont déterminantes dans ce contexte. Ahr médie-t-il toute ou partie de la toxicité de la 2,3,7,8-TCDD ? Des voies de signalisation toxique, indépendantes du récepteur, peuvent être considérées. En association avec l'existence d'un ligand endogène, existe-t-il un rôle physiologique pour Ahr ?

Dans le premier modèle considéré, la drosophile ss « *spineless-aristapedia* », homologue d'Ahr, exerce une fonction déterminante dans l'organogenèse (antenne et patte) (Duncan et coll., 1998) et la régulation d'expression génique (bab : « bric à brac »). Un régulateur de l'expression de ss a été identifié. C'est Dll (« *Distal-less* »), un déterminant majeur de différenciation des appendices de la face ventrale qui n'a pas d'homologue identifié dans une autre espèce.

Dans le second modèle, la souris, l'application de la technologie d'inactivation génique en lignée murine transgénique par recombinaison homologue en cellule ES a permis des avancées considérables en physiologie et toxicologie d'Ahr *in vivo*. Trois laboratoires ont travaillé en parallèle sur des projets d'inactivation de gènes « *gene knock out* » d'Ahr extrêmement voisins techniquement. Les fruits de leurs travaux ont été publiés en 1996 (Fernandez-Salguero et coll., 1996 ; Schmidt et coll., 1996) et en 1997 (Mimura et coll., 1997). Cet échelonnement des publications, en révélant graduellement aux équipes concurrentes les observations de leurs compétiteurs et en les contraignant à produire des résultats originaux et complémentaires, a permis d'optimiser l'exploitation de ces modèles animaux. Chacune de ces trois publications initiales est complémentaire des deux autres et de manière très intéressante on observe un corpus de résultats concordants qui valident définitivement un nombre appréciable de fonctions d'Ahr.

Il est utile de comparer les conditions expérimentales des trois projets. Les trois invalidations portent sur la région aminoterminal de la protéine (portion codante de l'exon 1 pour Fernandez et Mimura, exon 2 pour Schmidt), les cellules ES sont d'origine génétique 129SV dans les trois cas et le génotype a été transféré sur fond génétique C57BL/6. Ces concordances méthodologiques garantissent la justesse des comparaisons de résultats opérées entre ces travaux. L'analyse comparée de ces trois phénotypes d'inactivation du gène Ahr révèle plusieurs points de convergence. Le foie, qui présente une hypoplasie persistante (25 % à 50 %) associée à une fibrose périportale, est une cible privilégiée de la déficience. Cette fibrose avait été initialement jugée contestable par certains experts (McDonnell et coll., 1996), mais mentionnée dans les trois lignées invalidées, elle s'impose comme un signe constant qui résulte de la déficience. Dans un cas une stéatose périnatale régressive est observée. La croissance pondérale est ralentie et la maturité sexuelle différée de quelques semaines. Un phénotype splénique est décrit dans deux cas, mais les observations détaillées sont discordantes : hypocellularité avant six semaines dans un cas, hypercellularité après six semaines dans un autre. Dans les trois lignées déficientes les animaux sont réfractaires à l'induction des messagers de gènes cibles (CYP1A, Ugt1*06, aldéhyde déhydrogénase) par la 2,3,7,8-TCDD, les hydrocarbures aromatiques polycycliques (Foussat et coll., 1998) ou la canthaxantine (Gradelet et coll., 1997). De surcroît, l'expression constitutive hépatique amoindrie de ces gènes suggère l'absence d'effet d'un

activateur endogène qui existerait constitutivement chez la souris. La 2,3,7,8-TCDD (2 mg/kg) n'a plus de manifestations toxiques hépatique et splénique chez la souris déficiente (Fernandez-Salguero et coll., 1996). Ce modèle animal a permis à une équipe de disséquer l'origine cytologique des manifestations toxiques de la 2,3,7,8-TCDD dans le foie. Selon les auteurs, l'expression parenchymateuse d'Ahr (hépatocytaire) serait responsable des manifestations nécrotiques alors que son expression dans les cellules hématopoïétiques de l'organe serait responsable des manifestations inflammatoires du tableau clinique (Thurmond et coll., 1999).

Des caractères phénotypiques divergents ont été notés (Lahvis et Bradfiel, 1998). Fernandez-Salguero relève une anomalie de l'histologie splénique, une diminution réversible du nombre des splénocytes (minimum vers 15-20 jours) ainsi que des hyperplasies et fibroses variées (cœur, estomac, rectum, peau) associées à des infections opportunistes, une mortalité considérable (40 % à 5 semaines) (Andreola et coll., 1997 ; Gonzalez et Fernandez-Salguero, 1998). Schmidt, sur fond génétique identique (C57BL/6J) observe la persistance d'une stéatose et une hématopoïèse hépatiques jusqu'à 3 semaines et fait état d'une viabilité préservée (Schmidt et coll., 1996). Ce dernier point est particulièrement polémique. Les effets de l'invalidation d'Ahr sur la viabilité de la souris ont été caractérisés de manière convaincante par une équipe spécialisée qui a utilisé la lignée de Fernandez (Abbot et coll., 1999). La lignée déficiente générée par les travaux de Schmidt (distribuée par Jackson Laboratories, États-Unis) nous semble également affligée de rendements de reproduction médiocres, contrairement aux indications initiales de cette équipe (observation rapportée par l'auteur).

Publiant la dernière, l'équipe de Fujii-Kuriyama a concentré ses efforts sur un aspect crucial des effets de la 2,3,7,8-TCDD qui n'avait pas été considéré dans les deux premières études : le caractère tératogène de la 2,3,7,8-TCDD. Des femelles gestantes, de type sauvage ou déficientes en Ahr, ont été exposées à la 2,3,7,8-TCDD (40 µg/kg *per os*, 12,5 jours de gestation). L'examen des fœtus de type sauvage révèle la survenue de malformations du palais et du rein aux fréquences respectives de 100 % et 91 %. Ces deux malformations ont une incidence de 0 % chez les fœtus déficients en Ahr. Les auteurs établissent la nature indispensable d'Ahr dans la manifestation des effets tératogènes de la 2,3,7,8-TCDD chez la souris (Mimura et coll., 1997). On retiendra, de plus, que l'expérimentation conduite chez des souris hétérozygotes pour la mutation révèle une discordance d'incidence de survenue de fente palatine et d'hydronéphrose (respectivement 28 % et 89 %). Cette observation suggère que les modalités de l'implication d'Ahr dans les effets tératogènes de la 2,3,7,8-TCDD diffèrent suivant le tissu embryonnaire considéré : palais ou rein. En plaçant un gène rapporteur sous le contrôle du promoteur d'Ahr dans une lignée murine transgénique il a été possible d'observer les sites embryonnaires d'expression d'Ahr. En plus des expressions logiques dans les tissus non mésenchymateux du rein et dans les tissus du palais, une expression a été

détectée au niveau des fentes branchiales, de la protubérance nasale, du maxillaire supérieur et de certains territoires neurologiques. Par une approche identique, on a également identifié une expression constitutive et une induction du gène rapporteur, au jour 13 de la gestation de la souris, au niveau des ébauches génitales (Willey et coll., 1998). Il reste à documenter le rôle potentiel d'Ahr sur ces dernières zones qui ne présentent pas de signature tératogène connue en réponse à une exposition à la 2,3,7,8-TCDD.

La synergie d'action tératogène (fissure palatine) de l'acide rétinoïque et de la 2,3,7,8-TCDD révèle une intéressante convergence de voies de signalisation. On sait que les rétinoïdes contrebalancent les effets carcinogéniques *in vitro* d'hydrocarbures polycycliques aromatiques (Hong et Lotau, 1993 ; Lorick et coll., 1998) et que les symptômes d'une exposition aux PCDF ressemblent à ceux d'une déficience en vitamine A (Kimbrough, 1974). Les souris déficientes en AhR ont une perturbation de l'homéostasie de l'acide rétinoïque dont la concentration hépatique est triplée (acide rétinoïque, rétinol, rétinyl palmitate). Simultanément, on constate une diminution de 65 % du métabolisme de l'acide rétinoïque dans cette lignée. Cependant, le niveau hépatique du cytochrome P450 RAI (4-hydroxylation de l'acide rétinoïque) n'est pas modifié chez ces animaux. On observe, en revanche la diminution considérable du niveau de l'expression constitutive hépatique de CYP1A2 et de l'aldéhyde déshydrogénase ADH1/ADH2 (métabolisme du rétinaldéhyde). CYP1A2 n'est pas réputé participer à l'homéostasie des rétinoïdes. Les gènes de l'aldéhyde déshydrogénase n'étant pas induits directement par les activateurs d'Ahr, il est suggéré que leur rétrocontrôle négatif interviendrait indirectement par une boucle d'autorégulation engagée par l'élévation locale de la concentration en acide rétinoïque (Andreola et coll., 1997). Un défaut, non élucidé, du métabolisme dégradatif de l'acide rétinoïque expliquerait ces taux élevés dont les conséquences biologiques concrètes (augmentation de la transglutaminase II, du *transforming growth factor* β peuvent concourir à la survenue du tableau anatomopathologique hépatique observé pour la déficience en AhR (Andreola et coll., 1997).

Les sites de fixation d'Ahr, identifiés dans de nombreux promoteurs (récepteur aux œstrogènes, TGF β ...) suggèrent un rôle pivot de communication entre des voies de signalisation moléculaire variées pour médier les effets toxiques de la 2,3,7,8-TCDD. Cependant il subsiste, pour des doses élevées de 2,3,7,8-TCDD, une toxicité résiduelle indépendante de l'expression du récepteur qui n'est que succinctement décrite (Fernandez-Salguero et coll., 1996). À la dose de 2 mg/kg/j de 2,3,7,8-TCDD, on observe toujours chez la souris déficiente en AhR la survenue d'images apoptotiques hépatiques disséminées, modérément abondantes. Il serait intéressant de poursuivre les investigations afin de caractériser cette toxicité de la 2,3,7,8-TCDD, à très forte dose, qui emprunte une voie de signalisation indépendante d'Ahr.

Enfin, d'intéressantes observations, relatives à une fonction physiologique d'Ahr, ont été réalisées en utilisant des lignées de fibroblastes embryonnaires

murins spontanément immortalisés qui dérivent de la souche murine déficiente en AhR (« Fernandez »). Les fibroblastes déficients ont une sénescence plus précoce et une immortalisation considérablement différée. Ordinairement, la 2,3,7,8-TCDD s'oppose à la différenciation adipocytaire hormono-induite de ces cellules. En absence d'AhR, l'effet n'est plus observé. Ce résultat place AhR en position déterminante dans le contrôle de l'expression préadipocytaire de PPAR γ , la différenciation adipocytaire et le contrôle de l'arrêt du cycle cellulaire (Alexander et coll., 1998)

Rôle de la protéine Arnt en physiopathologie

Chez la drosophile, Tango (Tgo), une protéine orthologue de Arnt forme des hétérodimères avec les protéines Sim et Trh (*Trachealess*), connues pour contrôler respectivement l'embryogenèse du système nerveux central et celle du système respiratoire. Les mutations de Tgo produisent des effets représentant la somme des déficiences décrites pour les mutations de Sim et Thr (Sonnenfeld et coll., 1997).

Arnt (Arnt, Arnt2), partenaire d'hétérodimérisation de AhR, est un acteur déterminant de médiation de la toxicité de la 2,3,7,8-TCDD. L'invalidation du seul gène Arnt conduit à un phénotype murin léthal à mi-gestation, sans caractéristique commune avec l'invalidation d'AhR qui oblitère sélectivement la voie de signalisation « AhR-Arnt ». Dans les tissus en développement, l'hypoxie et l'hypoglycémie locales recruterait le facteur Arnt pour stimuler l'expression de facteurs angiogéniques (VEGF, *tissue factor*) ; la déficience en Arnt entraîne une vascularisation insuffisante du sac vitellin et de l'embryon (Maltepe et coll., 1997). L'expression d'Arnt2 ne peut pallier la déficience en Arnt.

En résumé, les différences notables des phénotypes d'invalidation (drosophile/souris) suggèrent que le motif fonctionnel b-HBH-PAS, bien que conservé dans la phylogénie, a acquis une variété de potentialités. Il convient donc d'observer une indispensable précaution dans l'établissement d'extrapolations fonctionnelles basées sur l'étude d'une protéine PAS dans des espèces différentes. Considérant les différences génétiques et fonctionnelles entre AhR murin et humain, il serait profitable d'introduire l'expression d'AhR humain sur un fond génétique murin déficient. Dans une espèce sensible, où les signes de toxicité de la 2,3,7,8-TCDD sont patents, l'étude du comportement du récepteur humain serait enrichissant.

En conclusion, le caractère indispensable du récepteur Ah dans la médiation de certains effets de la 2,3,7,8-TCDD est désormais acquis grâce aux travaux récents ayant abouti à la création indépendante de trois lignées murines d'invalidation du gène du récepteur Ah. En l'absence de ce gène, on n'observe

pas les manifestations classiquement décrites (hépatotoxicité, cancers, malformations).

La structure du récepteur Ah est apparentée aux récepteurs nucléaires à domaine PAS (Per-AhR-Sim) qui interagissent avec l'ADN, au niveau de séquences reconnues dans la région régulatrice des gènes qu'ils transactivent. L'activation du récepteur Ah par un ligand comme la 2,3,7,8-TCDD conduit à une cascade d'événements qui aboutissent à l'induction de la transcription de gènes cibles. Les séquences reconnues sont présentes dans un nombre considérable de gènes qui ne sont pas tous identifiés.

BIBLIOGRAPHIE

ABBOTT BD, SCHMID JE, PITT JA, BUCKALEW AR, WOOD CR et coll. Adverse reproductive outcomes in the transgenic Ah receptor-deficient mouse. *Toxicol Appl Pharmacol* 1999 ; **155** : 62-70

ALEXANDER DL, GANEM LG, FERNANDEZ-SALGUERO P, GONZALEZ FJ, JEFEOATE CR. Aryl-hydrocarbon receptor is an inhibitory regulator of lipid synthesis and of commitment to adipogenesis. *J Cell Sci* 1998, **111** : 3311-3322

ANDREOLA F, FERNANDEZ-SALGUERO PM, CHIANTORE MV, PETKOVICH MP, GONZALEZ FJ, DE LUCA LM. Aryl hydrocarbon receptor knockout mice (AhR - / -) exhibit liver retinoid accumulation and reduced retinoic acid metabolism. *Cancer Res* 1997, **57** : 2835-2838

ANTONSSON C, WHITELAW ML, MCGUIRE J, GUSTAFSSON JA, POELLINGER L. Distinct roles of the molecular chaperone hsp90 in modulating dioxin receptor function via the basic helix-loop-helix and PAS domains. *Mol Cell Biol* 1995, **15** : 756-765

BACKLUND M, JOHANSSON I, MKRTCHIAN S, INGELMAN-SUNDBERG M. Signal transduction-mediated activation of the aryl hydrocarbon receptor in rat hepatoma H4IIE cells. *J Biol Chem* 1997, **272** : 31755-31763

BERGHARD A, GRADIN K, PONGRATZ I, WHITELAW M, POELLINGER L. Cross-coupling of signal transduction pathways : the dioxin receptor mediates induction of cytochrome P-450IA1 expression via a protein kinase C-dependent mechanism. *Mol Cell Biol* 1993, **13** : 677-689

BLANKENSHIP A, MATSUMURA F. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-induced activation of a protein tyrosine kinase, pp60src, in murine hepatic cytosol using a cell-free system. *Mol Pharmacol* 1997, **52** : 667-675

CARRIER F, OWENS RA, NEBERT DW, PUGA G. Dioxin-dependent activation of murine Cyp1a-1 gene transcription requires protein kinase C-dependent phosphorylation A. *Mol Cell Biol* 1992, **12** : 1856-1863

CARVER LA, BRADFIELD CA. Ligand-dependent interaction of the aryl hydrocarbon receptor with a novel immunophilin homolog *in vivo*. *J Biol Chem* 1997, **272** : 11452-11456

CHAPMAN DE, SCHILLER CM. Dose-related effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) in C57BL/6J and DBA/2J mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 1985, **78** : 147-157

- COUMAILLEAU P, POELLINGER L, GUSTAFSSON JA, WHITELAW ML. Definition of a minimal domain of the dioxin receptor that is associated with Hsp90 and maintains wild type ligand binding affinity and specificity. *J Biol Chem* 1995, **270** : 25291-25300
- CROSTHWAITE SK, DUNLAP JC, LOROS JJ. Neurospora wc-1 and wc-2 : transcription, photoresponses, and the origins of circadian rhythmicity. *Science* 1997, **276** : 763-769
- DAUJAT M, CHARRASSE S, FABRE I, LESCA P, JOUNAIDI Y et coll. Induction of CYP1A1 gene by benzimidazole derivatives during Caco-2 cell differentiation. Evidence for an aryl-hydrocarbon receptor-mediated mechanism. *Eur J Biochem* 1996, **237** : 642-652
- DUNCAN SA, NAVAS MA, DUFORT D, ROSSANT J, STOFFEL M. Regulation of a transcription factor network required for differentiation and metabolism. *Science* 1998, **281** : 692-6955
- EMA M, OHE N, SUZUKI M, MIMURA J, SOGAWA K et coll. Dioxin binding activities of polymorphic forms of mouse and human arylhydrocarbon receptors. *J Biol Chem* 1994, **269** : 27337-27343
- ENAN E, MATSUMURA F. Significance of TCDD-induced changes in protein phosphorylation in the adipocyte of male guinea pigs. *J Biochem Toxicol* 1994, **9** : 159-170
- ENAN E, MATSUMURA F. Evidence for a second pathway in the action mechanism of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD). Significance of Ah-receptor mediated activation of protein kinase under cell-free conditions. *Biochem Pharmacol* 1995, **49** : 249-261
- ENAN E, MATSUMURA F. Identification of c-Src as the integral component of the cytosolic Ah receptor complex, transducing the signal of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) through the protein phosphorylation pathway. *Biochem Pharmacol* 1996, **52** : 1599-1612
- ENAN E, DUNLAP DY, MATSUMURA F. Use of c-Src and c-Fos knockout mice for the studies on the role of c-Src kinase signaling in the expression of toxicity of TCDD. *J Biochem Mol Toxicol* 1998, **12** : 263-274
- FERNANDEZ-SALGUERO P, PINEAU T, HIBERT DM, MCPHAIL T, LEE ST et coll. Immune system impairment and hepatic fibrosis in mice lacking the dioxin-binding Ah receptor. *Science* 1995, **268** : 722-726
- FERNANDEZ-SALGUERO P, HILBERT DM, RUDIKOFF S, WARD JM, GONZALEZ FJ. Aryl-hydrocarbon receptor-deficient mice are resistant to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-induced toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 1996, **140** : 173-179
- FOUSSAT J, COSTET P, GALTIER P, PINEAU T, LESCA P. The 4S benzo(a)pyrene-binding protein is not a transcriptional activator of *Cyp1a1* gene in Ah receptor-deficient (AhR-/-) transgenic mice. *Arch Biochem Biophys* 1998, **349** : 349-355
- FUKUNAGA BN, HANKINSON O. Identification of a novel domain in the aryl hydrocarbon receptor required for DNA binding. *J Biol Chem* 1996, **271** : 3743-37499
- GONZALEZ FJ, FERNANDEZ-SALGUERO P. The aryl hydrocarbon receptor : studies using the AhR-null mice. *Drug Metab Dispos* 1998, **26** : 1194-1198
- GRADELET S, ASTORG P, PINEAU T, CANIVENC MC, SIESS MH et coll. Ah receptor-dependent CYP1A induction by two carotenoids, canthaxanthin and beta-apo-8'-carotenal, with no affinity for the TCDD binding site. *Biochem Pharmacol* 1997, **54** : 307-315

- GRADIN K, WHITELAW ML, TOFTGARD R, POELLINGER L, BERGHARD A. A tyrosine kinase-dependent pathway regulates ligand-dependent activation of the dioxin receptor in human keratinocytes. *J Biol Chem* 1994, **269** : 23800-23807
- HONG WK, LOTAU R. *Retinoids in oncology*. New York : Marcel Dekker, 1993
- ISRAEL DI, ESTOLANO MG, GALCAZZI DR, WHITLOCK J. Superinduction of cytochrome P1-450 gene transcription by inhibition of protein synthesis in wild type and variant mouse hepatoma cells. *J Biol Chem* 1985, **260** : 5648-5643
- JAIN S, DOLWICK KM, SCHMIDT JV, BRADFIELD CA. Potent transactivation domains of the Ah receptor and the Ah receptor nuclear translocator map to their carboxyl termini. *J Biol Chem* 1994, **269** : 31518-31524
- JANA NR, SARKAR S, YONEMOTO J, TOHYAMA C, SONE H. Strain differences in cytochrome P4501A1 gene expression caused by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in the rat liver : role of the aryl hydrocarbon receptor and its nuclear translocator. *Biochem Biophys Res Commun* 1998, **248** : 554-558
- KIMBROUGH RD. The toxicity of polychlorinated polycyclic compounds and related chemicals. *Crit Rev Toxicol* 1974, **2** : 445-498
- KOBAYASHI A, SOGAWA K, FUJII-KURIYAMA Y. Cooperative interaction between AhR-.Arnt and Sp1 for the drug-inducible expression of CYP1A1 gene. *J Biol Chem* 1996, **271** : 12310-12316
- KOBAYASHI A, NUMAYAMA-TSURUTA K, SOGAWA K, FUJII-KURIYAMA Y. CBP/p300 functions as a possible transcriptional coactivator of Ah receptor nuclear translocator (Arnt). *J Biochem* 1997, **122** : 703-710
- KOHLE C, GSCHAIDMEIER H, LAUTH D, TOPELL S, ZITZER H, BOCK KW. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD)-mediated membrane translocation of c-Src protein kinase in liver WB-F344 cells. *Arch Toxicol* 1999, **73** : 152-158
- LAHVIS GP, BRADFIELD CA. AhR null alleles : distinctive or different ? *Biochem Pharmacol* 1998, **56** : 781-787
- LI SY, DOUGHERTY JJ. Inhibitors of serine/threonine-specific protein phosphatases stimulate transcription by the Ah receptor/Arnt dimer by affecting a step subsequent to XRE binding. *Arch Biochem Biophys* 1997, **340** : 73-82
- LONG WP, PRAY-GRANT M, TSAI JC, PERDEW GH. Protein kinase C activity is required for aryl hydrocarbon receptor pathway-mediated signal transduction. *Mol Pharmacol* 1998, **53** : 691-700
- LORICK KL, TOSCANO DL, TOSCANO JR WA. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin alters retinoic acid receptor function in human keratinocytes. *Biochem Biophys Res Comm* 1998, **243** : 749-752
- MA Q, WHITLOCK JP JR. A novel cytoplasmic protein that interacts with the Ah receptor, contains tetratricopeptide repeat motifs, and augments the transcriptional response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *J Biol Chem* 1997, **272** : 8878-8884
- MALTEPE E, SCHMIDT JV, BAUNOCH D, BRADFIELD CA, SIMON MC. Abnormal angiogenesis and responses to glucose and oxygen deprivation in mice lacking the protein ARNT. *Nature* 1997, **386** : 403-407

- MATSUMURA F, ENAN E, DUNLAP DY, PINKERTON KE, PEAKE J. Altered *in vivo* toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) in C-SRC deficient mice. *Biochem Pharmacol* 1997, **53** : 1397-404
- MCDONNELL WM, CHENSUE SW, ASKAGI FK, MOSELEY RH. Hepatic fibrosis in AhR-/- mice *Science* 1996, **271** : 224
- MEYER BK, PRAY-GRANT MG, VANDEN HEUVEL JP, PERDEW GH. Hepatitis B virus protein 2 is a subunit of an unliganded aryl hydrocarbon receptor core complex and exhibits transcriptional enhancer activity. *Mol Cell Biol* 1998, **18** : 978-988
- MIMURA J, YAMASHITA K, NAKAMURA K, MORITA M, TAKAGI TN et coll. Loss of teratogenic response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) in mice lacking the Ah (dioxin) receptor. *Genes Cells* 1997, **2** : 645-654
- MIMURA J, EMA M, SOGAWA K, FUJII-KURIYAMA Y. Identification of a novel mechanism of regulation of Ah (dioxin) receptor function. *Genes Dev* 1999, **13** : 20-25
- NEUBERT D. Reflections on the assessment of the toxicity of « dioxins » for humans using data from experimental and epidemiological studies. *Teratog Carcinog Mutagen* 1997, **17** : 157-215
- OKEY AB, VELLA LM, HARPER PA. Detection and characterization of a low affinity form of cytosolic Ah receptor in livers of mice nonresponsive to induction of cytochrome P1-450 by 3-methylcholanthrene. *Mol Pharmacol* 1989, **35** : 823-830
- POHJANVIRTA R, TUOMISTO J. Han/Wistar rats are exceptionnally resistant to TCDD. *Arch Toxicol* 1987, **11** : 344-347
- POHJANVIRTA R, JUVONEN R, KÄRENLAMPI S, RAUNIO H, TUOMISTO J. Hepatic Ah receptor levels and the effect of 2,3,7,8-tetrachloro dibenzo-*p*-dioxin (TCDD) on hepatic microsomal monooxygenase activities in a TCDD-susceptible and -resistant rat strain. *Toxicol Appl Pharmacol* 1988, **92** : 131-140
- POHJANVIRTA R, WONG JMY, LI W, HARPER PA, TUOMISTO J, OKEY AB. Point mutation in intron sequence causes altered carboxyl-terminal structure in the aryl hydrocarbon receptor of the most 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-resistant rat strain. *Mol Pharmacol* 1998, **54** : 86-93
- POHJANVIRTA R, VILUKSELA M, TUOMISTO JT, UNKILA M, KARASINSKA J et coll. Physicochemical differences in the AH receptors of the most TCDD-susceptible and the most TCDD-resistant rat strains. *Toxicol Appl Pharmacol* 1999, **155** : 82-95
- POLAND A, GLOVER E, KENDE AS. Stereospecific high affinity binding of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin by hepatic cytosol. Evidence that the binding species is receptor for induction of aryl hydrocarbon hydroxylase. *J Biol Chem* 1976, **251** : 4936-4946
- POLAND A, GLOVER E. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin : segregation of toxicity with the Ah locus. *Mol Pharmacol* 1980, **17** : 86-94
- POLAND A, KNUTSON JC. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons : examination of the mechanism of toxicity. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1982, **22** : 517-554
- POLAND A, PALEN D, GLOVER E. Analysis of the four alleles of the murine aryl hydrocarbon receptor. *Mol Pharmacol* 1994, **46** : 915-921

- PRATT WB. The role of the hsp90-based chaperone system in signal transduction by nuclear receptors and receptors signaling *via* MAP kinase. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1997, **37** : 297-326
- RANNUG U, RANNUG A, SJOBERG U, LI H, WESTERHOLM R, BERGMAN J. Structure elucidation of two tryptophan-derived, high affinity Ah receptor ligands. *Chem Biol* 1995, **2** : 841-8455
- SCHAFER MW, MADHUKAR BV, SWANSON HI, TULLIS K, DENISON MS. Protein kinase C is not involved in Ah receptor transformation and DNA binding. *Arch Biochem Biophys* 1993, **307** : 267-271
- SCHMIDT JV, CARVER LA, BRADFIELD CA. Molecular characterization of the murine AhR gene. Organization, promoter analysis, and chromosomal assignment. *J Biol Chem* 1993, **268** : 22203-22209
- SCHMIDT JV, SU GH, REDDY JK, SIMON MC, BRADFIELD CA. Characterization of a murine AhR null allele : involvement of the Ah receptor in hepatic growth and development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996, **93** : 6731-6736
- SINGH SS, PERDEW GH. Alterations in the Ah receptor level after staurosporine treatment. *Arch Biochem Biophys* 1993, **305** : 170-175
- SONNENFELD M, WARD M, NYSTROM G, MOSHER J, STAHL S, CREWS S. The *Drosophila* tango gene encodes a bHLH-PAS protein that is orthologous to mammalian Arnt and controls CNS midline and tracheal development. *Development* 1997, **124** : 4571-4582
- THURMOND TS, SILVERSTONE AE, BAGGS RB, QUIMBY FW, STAPLES JE, GASIEWICZ TA. A chimeric aryl hydrocarbon receptor knockout mouse model indicates that aryl hydrocarbon receptor activation in hematopoietic cells contributes to the hepatic lesions induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Toxicol Appl Pharmacol* 1999, **158** : 33-40
- TUOMISTO JT, VILUKSELA M, POHJANVIRTA R, TUOMISTO J. The Ah receptor and a novel gene determine acute toxic responses to TCDD : segregation of the resistant alleles to different rat lines. *Toxicol Appl Pharmacol* 1999, **155** : 71-81
- WILLEY JJ, TRIPP BR, BAGGS RB, GASIEWICZ TA. Aryl hydrocarbon receptor activation in genital tubercle, palate and other embryonic tissues in 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-responsive *lacZ* mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 1998, **151** : 33-44

16

Induction des cytochromes P450 : stress oxydant et susceptibilité individuelle

Le texte qui suit analyse plusieurs aspects des effets de la dioxine liés à l'induction des cytochromes P450 (CYP). Il traite les questions suivantes : quelle est la part du stress oxydant dans les effets de la dioxine ? Par quels mécanismes ce stress est-il provoqué et quelle est l'implication des cytochromes P450 et de leur régulation ? Quelles sont les conséquences de l'induction des cytochromes P450 sur l'interaction entre la dioxine et d'autres substances (xénobiotiques ou endogènes) ? Quelles sont les conséquences en termes de susceptibilité individuelle des polymorphismes génétiques de ces enzymes ?

Dioxines et stress oxydant

Les mécanismes de la toxicité des dioxines ont fait l'objet de nombreux travaux. Un des mécanismes les plus étudiés et qui semble peu contesté par les différents chercheurs dans le domaine est le déclenchement d'un stress oxydant. Cette notion est importante dans la mesure où les effets toxiques du stress oxydant sont bien connus. Il est vrai que ces effets sont assez généraux et peu spécifiques d'un organe. Mais les études épidémiologiques suggèrent aussi que la toxicité de la dioxine est assez peu spécifique : pathologie cutanée, cancers de nature différente, pathologie cardiovasculaire et métabolique... La piste du stress oxydant comme médiateur d'une partie de la toxicité de la dioxine est donc crédible et mérite d'être poursuivie.

Expérimentalement, le stress oxydant provoqué par la dioxine a été mesuré de plusieurs manières : mesure directe des espèces réactives de l'oxygène, de marqueurs de peroxydation lipidique et de formation de 8-hydroxy-guanine. Même si certains de ces tests sont difficiles à mettre en œuvre, ils révèlent l'existence d'un stress oxydant qui se traduit par des lésions des lipides et de l'ADN. Le stress oxydant a été observé chez l'animal entier et dans des cellules en culture d'origine animale (Alsharif et coll., 1994 ; Hassoun et coll., 1996 ; Shertzer et coll., 1998 ; Morel et Barouki, 1999). En ce qui concerne les

travaux chez l'homme, un stress oxydant a bien été observé dans des lignées de cellules humaines en culture traitées par la dioxine (Morel et coll., 1999). Ceci ne suffit pas à établir la réalité de ce stress *in vivo* et des travaux ayant pour objectif la mise en évidence des marqueurs de peroxydation lipidique (MDA) ou d'atteinte de l'ADN (8-hydroxyguanine) devraient être encouragés chez l'homme.

S'il est bien établi que la dioxine provoque un stress oxydant dont les conséquences sont compatibles avec la toxicité de ce polluant, il est encore difficile d'établir la part exacte de ce stress dans les effets de la dioxine. Certaines expériences *in vivo* suggèrent que l'utilisation de composés antiradicalaires comme la vitamine E s'oppose à certaines manifestations de la toxicité générale et fœtale de la dioxine mais pas à l'apparition de malformations comme la fente palatine (Wolfe et Marquard, 1996 ; Hassoun et coll., 1997). Dans des expériences sur des cellules en culture, des anti-oxydants sont capables d'inhiber certains effets géniques de la dioxine (Morel et Barouki, 1998). L'altération oxydative de l'ADN après un traitement par la dioxine devrait conduire à l'apparition de mutations. Cette possibilité serait en contradiction avec le rôle de promoteur pur de cancérogenèse attribué à la dioxine dans les modèles animaux. Il est possible que le système de réparation soit suffisant pour éviter l'apparition de mutations. À ce jour, la détermination du rôle exact du stress oxydant dans les effets de la dioxine nécessite des travaux supplémentaires dans différents modèles *ex vivo* et *in vivo*.

Rôle des CYP dans le stress oxydant provoqué par la dioxine

Les mécanismes par lesquels la dioxine provoque un stress oxydant peuvent être multiples. La dioxine provoque une élévation des cytokines inflammatoires qui sont capables de provoquer un stress oxydant. L'induction des cytochromes P450 (CYP) est une autre piste intéressante qui sera analysée ici. La dioxine induit trois CYP de la famille 1 : le CYP1A1, le CYP1A2 et le CYP1B1 (Nebert et coll., 1990 ; Whitlock, 1999). Le CYP1A1 est en réalité le prototype du gène inductible par la dioxine. Les mécanismes moléculaires de cette induction sont à présent bien connus. Or il est établi que les mono-oxygénases produisent au cours de leur cycle catalytique des espèces réactives de l'oxygène (Perret et Pompon, 1998). Ceci a été démontré pour le CYP1A1. Il n'existe pas de souris invalidées pour le gène du CYP1A1 pour confirmer l'hypothèse du rôle du stress oxydant dans les effets de la dioxine. En revanche, il existe des cellules en culture possédant une activité CYP1A1 très faible et dans lesquelles certains effets géniques de la dioxine dépendant du stress oxydant sont absents (Nebert et coll., 1990 ; Yao et coll., 1995). Des travaux, faits sur les souris dont le gène du CYP1A2 a été invalidé, indiquent que ce cytochrome ne joue pas un rôle critique dans le stress oxydant provoqué par la

dioxine (Slezak et coll., 1999). À l'examen de ces données, il semble intéressant de développer des modèles expérimentaux où la contribution du CYP1A1 et du stress oxydant dans les effets généraux de la dioxine puissent être précisément évalués. Ces modèles peuvent être soit des modèles animaux soit des modèles de cellules humaines en culture.

Comme tout système biologiquement important et susceptible d'engendrer des métabolites réactifs, l'expression du CYP1A1 est contrôlée de plusieurs manières. Le gène du CYP1A1 est induit par le récepteur Ah lorsque ce dernier est activé par un ligand comme la dioxine. Mais il existe aussi une régulation négative de ce gène. Plusieurs cytokines inflammatoires ont un effet répresseur décrit par différents laboratoires (Abdel-Razzak et coll., 1993 ; Morgan, 1997 ; Morel et Barouki, 1998). De plus, le stress oxydant réprime l'expression de ce gène par un mécanisme faisant intervenir le facteur transcriptionnel *Nuclear factor I* (NFI) (Morel et Barouki, 1999). Ce facteur est inactivé par le stress oxydant par un mécanisme impliquant une cystéine (Morel et coll., communication personnelle). Ces observations ont conduit au modèle d'autorégulation suivant : l'eau oxygénée produite par l'activité enzymatique du CYP1A1 inhibe l'activité du facteur transcriptionnel NFI et réprime ainsi le promoteur du gène (Morel et Barouki, 1999). Il existe ainsi un rétrocontrôle de l'expression du gène par l'activité de la protéine. Ceci vise à éviter une induction excessive du CYP. La figure 16.1 illustre cette autorégulation en prenant le benzo[a]pyrène (BP) comme substrat et inducteur.

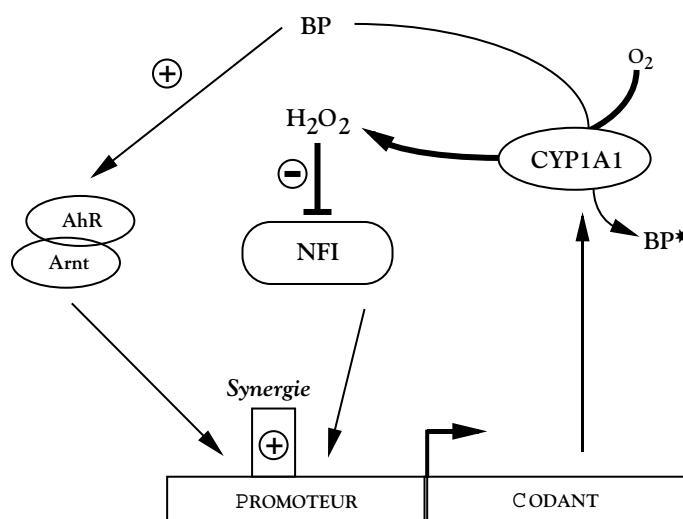


Figure 16.1 : Schéma de l'autorégulation du cytochrome P450 A1 (CYP1A1) faisant intervenir l'H₂O₂ produite par l'enzyme

BP : benzo[a]pyrène ; NFI : facteur nucléaire I ; Arnt : AHR nuclear translocator

En plus des enzymes de métabolisme des xénobiotiques de phase I comme les CYP, la dioxine induit l'expression des enzymes de la phase II comme la GST1 (glutathion S-transférase 1), la NQO1 (NAD(P)H-quinone oxydoréductase 1)... Contrairement aux CYP, ces enzymes sont aussi inductibles par le stress oxydant et participent à la lutte contre ce stress (Nebert et coll., 2000) (figure 16.2). De plus elles jouent un rôle dans la détoxification de certains métabolites réactifs générés par le CYP1A1. L'exemple du métabolisme du benzo[a]pyrène a été très étudié en raison de son importance dans la cancérogenèse pulmonaire. De ces études, deux points importants ressortent : l'équilibre entre les activités des enzymes de phase I et celles de phase II est essentiel pour la détoxification et les effets de la dioxine peuvent modifier le métabolisme d'autres composés ; il est donc nécessaire d'envisager les interactions entre la dioxine et d'autres substances, par exemple en cas de tabagisme.

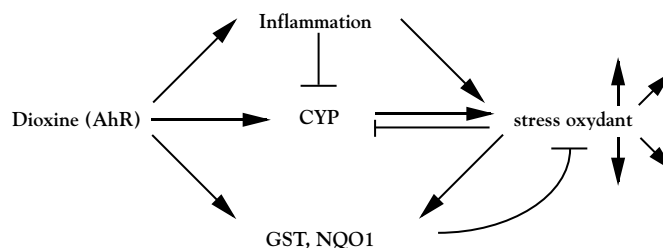


Figure 16.2 : Schéma des régulations et des effets des enzymes de phase I (CYP), et des enzymes des phase II GST (glutathion S-transférase) et NQO (NAD(P)H-quinone oxydoréductase)

Effets de l'induction des CYP sur le métabolisme des xénobiotiques et des stéroïdes

Comme nous l'avons mentionné ci-dessus, l'induction des CYP et d'autres enzymes du métabolisme des xénobiotiques modifie le métabolisme de substances comme le benzo[a]pyrène retrouvé en particulier dans la fumée de tabac. Il est bien connu que certains métabolites oxygénés du benzo[a]pyrène sont produits par le CYP1A1 et sont susceptibles de former des adduits à l'ADN. Ils rendent compte de la toxicité de ce composé et de sa cancérogénicité. Comme le montre la figure 16.3, le métabolisme du benzo[a]pyrène aboutit à la formation du dérivé diol époxyde très toxique (Gautier et coll., 1996). À chaque étape de ce métabolisme, une enzyme de la phase II est capable de détoxifier le benzo[a]pyrène en le transformant en un composé plus hydrophile peu réactif. Ceci illustre bien l'importance de l'équilibre entre les enzymes de phase I et ceux de phase II pour la détoxification des xénobiotiques. De plus, ceci montre que le CYP1A1, qui est essentiellement une

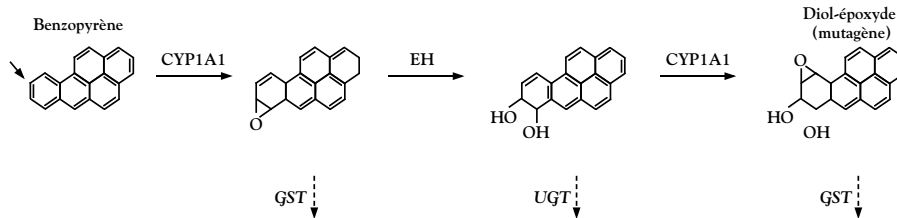


Figure 16.3 : Schéma du métabolisme du benzopyrène

EH : époxyde hydrolase ; GST : glutathion S-transférase ; UGT : UDP-glucuronosyl transférase

enzyme de détoxication, peut dans certaines conditions engendrer des composés toxiques (métabolites réactifs ou espèces réactives de l'oxygène).

L'induction de cytochromes P450 par la dioxine modifie le métabolisme de composés endogènes. L'œstradiol est métabolisé par plusieurs cytochromes P450, entre autres le CYP1A1 et le CYP1B1. Ces deux CYP sont inducibles par la dioxine, mais métabolisent l'œstradiol différemment (figure 16.4). Le premier l'hydroxyle principalement en position 2 alors que le deuxième l'hydroxyle principalement en position 4. Or ce dernier composé est toxique alors que le premier ne l'est pas (Spink et coll., 1992 ; Gautier et coll., 1996 ; Spink et coll., 1997 ; Taioli et coll., 1999). Le rapport entre ces deux cytochromes est donc un déterminant important de la toxicité de l'œstradiol, notamment dans la glande mammaire où cette hormone est impliquée dans le processus cancéreux (Safe, 1998). Or, ces deux cytochromes peuvent avoir par ailleurs des régulations différentes et donc le rapport de leurs activités peut varier en fonction de situations physiologiques, pharmacologiques ou génétiques (Spink et coll., 1997). Plus généralement, l'induction des CYP par la dioxine peut participer aux effets antiœstrogéniques de ce composé.

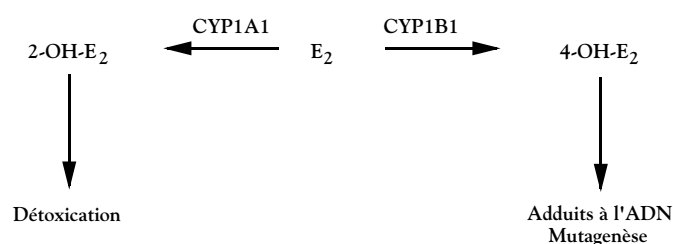


Figure 16.4 : Schéma simplifié du métabolisme de l'œstradiol (E_2) par les cytochromes P450 (CYP)

Susceptibilité individuelle d'origine génétique : la « xénogénétique »

Un des aspects essentiels de la toxicité des xénobiotiques est la notion de susceptibilité individuelle. Une susceptibilité différente des individus peut être due à un profil génétique particulier, par exemple dans les gènes du métabolisme des xénobiotiques et les gènes régulateurs. Cette susceptibilité individuelle est étudiée pour les médicaments et a permis l'émergence d'une nouvelle discipline, la pharmacogénétique (Ingelman-Sundberg et coll., 1999). Le même phénomène peut être évoqué pour les polluants comme la dioxine ou d'autres xénobiotiques dans le cadre plus large de la « xénogénétique ». De telles études commencent juste à être réalisées dans le but de comprendre les effets de la dioxine chez l'homme. Par ailleurs, des travaux ont été réalisés pour tenter de corréler l'expression de gènes du métabolisme des xénobiotiques ou leurs polymorphismes et l'apparition de cancers chez l'homme.

Parmi les gènes étudiés, le CYP1A1 présente un intérêt évident en raison de son induction par la dioxine. Il est difficile de doser le taux basal du CYP1A1 et de son ARNm qui est très faible. En revanche, le taux induit dans des lymphocytes humains maintenus en culture est parfaitement dosable. Il apparaît que ce taux présente une grande hétérogénéité interindividuelle. Les individus peuvent être classés un peu artificiellement en trois catégories : fortement, moyennement ou faiblement inductibles. Une corrélation a été trouvée entre le niveau induit et l'apparition de cancers pulmonaires (Kiyohara et coll., 1998). Des polymorphismes génétiques ont été décrits pour ce gène et plusieurs auteurs ont trouvé des corrélations entre certains polymorphismes et le cancer broncho-pulmonaire (Kawajiri et coll., 1990 ; Hayashi et coll., 1991 ; Lemarchand et coll., 1998 ; Taioli et coll., 1999). Ces résultats obtenus au Japon n'ont pu être reproduits ailleurs, mais les fréquences alléliques diffèrent selon les pays et l'ethnie (Hirvonen et coll., 1992 ; Wedlund et coll., 1994). L'impact clinique de ces polymorphismes doit encore être confirmé. Les travaux sur le CYP1A2 montrent la présence de polymorphismes dans la région promotrice qui pourraient expliquer la variabilité de l'expression de ce gène mais ceci reste très discuté (Nakajima et coll., 1999 ; Sachse et coll., 1999). Il n'y a pas de corrélation établie avec des pathologies. Le tableau 16.I résume les connaissances actuelles sur les polymorphismes des CYP1A1 et CYP1A2 et leurs conséquences supposées.

En ce qui concerne le gène du CYP1B1, des mutations ont été observées et certaines ont été corrélées d'une part avec le métabolisme des œstrogènes, ce qui n'est pas surprenant au vu de l'activité de cette enzyme (Bailey et coll., 1998), et d'autre part, avec l'incidence du glaucome (Plasilova et coll., 1999). L'expression et l'activité des différentes formes de ce gène méritent d'être plus

Tableau 16.1 : Principaux polymorphismes des gènes *CYP1A1* et *CYP1A2* (d'après Ingelman-Sundberg, 1999 et <http://www.imm.ki.se/CYPalleles>)

Allèle	Mutation	Fréquence allélique	Incidences
CYP1A1 1C	– 3 229 G > A		(étude en cours)
CYP1A1 2A (<i>MspI</i> +)	3 801 T > C (3' UTR)	Caucasiens : 10 % Japonais : 26 % (homoz. : 11 % hétéroz. : 40 %) Afro-Américains : 17 %	Associé au cancer du poumon à petites cellules (Le Marchand, 1998) Activité hydroxylase accrue Associé aux cancers du poumon chez les japonais (Hayashi, 1991) Associé à l'adénocarcinome pulmonaire
CYP1A1 2B	2 455 a > G 3801 T > C		
CYP1A1 2C (<i>exon 7</i>)	2 455 a > G (Ile462 Val)	Japonais : 20 %	N'affecte pas l'activité enzymatique (<i>in vitro</i>) Associé au polymorphisme <i>MspI</i> (Japonais) (Wedlund, 1994) Associé au cancer du sein chez les Caucasiennes (Taioli, 1999)
CYP1A1 4	2 453 C > A (Thr461 Asn)	Asiatiques : 21 % Caucasiens : 5 %	Non relié aux cancers du poumon
CYP1A2 1C	– 3 858 G > A	Japonais : 23 %	Activité enzymatique diminuée
CYP1A2 1F	– 164 C > A	Caucasiens : 32 %	Inductibilité du gène plus élevée

En ce qui concerne le récepteur Ah, des travaux de Micka et coll. semblent indiquer une corrélation entre l'inductibilité du CYP1A1 chez l'homme et le locus génétique du récepteur Ah (Micka et coll., 1997). Par ailleurs, il a été montré que ce gène présente un polymorphisme Arg/Lys au niveau du codon 554 (10 % chez les Caucasiens et 46 % chez les Japonais). Cependant, à ce jour, il n'y a pas de preuve de corrélation de ce polymorphisme avec une pathologie cancéreuse (Kawajiri et coll., 1995).

Une étude très récente a tenté de corréler le polymorphisme 554 du AhR avec la sévérité de la chloracné chez des travailleurs contaminés par la dioxine (BASE, Allemagne, 1993), mais aucune corrélation n'a été mise en évidence (Wanner et coll., 1999). Cependant, ce travail souffre de nombreux biais ainsi que du faible effectif. En fait, de nombreux travailleurs exposés étaient décédés et n'ont pu être inclus. Il s'agit néanmoins du premier travail à notre connaissance évaluant les aspects génétiques de la susceptibilité à une contamination par la dioxine sur le lieu du travail. Le fait que les résultats soient négatifs ne devrait pas empêcher d'autres travaux sur le sujet.

Enfin, comme le métabolisme des xénobiotiques comprend un ensemble d'enzymes dont les effets sont complémentaires, les polymorphismes d'autres gènes devraient être aussi étudiés, en particulier ceux des enzymes de la phase II comme les GST. Au vu des exemples métaboliques décrits ci-dessus, on peut s'attendre à ce qu'une combinaison de polymorphismes dans différents gènes

d'une voie métabolique puisse se traduire par une variabilité interindividuelle de la toxicité des xénobiotiques.

En conclusion, l'analyse de ces travaux conduit aux réflexions et aux propositions suivantes :

- obtenir une meilleure définition expérimentale de la part du stress oxydant dans les effets de la dioxine (modèles animaux ou cellules humaines) ;
- évaluer l'existence d'un stress oxydant chez des personnes contaminées : mesure des MDA sériques, 8 OH-G dans l'ADN lymphocytaire...

En thérapeutique, on peut suggérer l'utilisation éventuelle des anti-oxydants en cas de contamination comme la *N*-acétylcystéine, la vitamine E, l'ascorbate...

L'analyse des fréquences alléliques des gènes CYP, des enzymes de la phase II (en particulier GST) et du AhR pourrait être envisagée dans les populations exposées avec ou sans effets secondaires.

BIBLIOGRAPHIE

ABDEL-RAZZAK ZP, LOYER A, FAUTREL JC, GAUTIER L, CORCOS B et coll. Cytokines down-regulate expression of major cytochrome P-450 enzymes in adult human hepatocytes in primary culture. *Mol Pharmacol* 1993, **44** : 707-715

ALSHARIF NZ, LAWSON T, STOHS SJ. Oxidative stress induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin is mediated by the aryl hydrocarbon (Ah) receptor complex. *Toxicology* 1994, **92** : 39-51

BAILEY LR, ROODI N, DUPONT WD, PARL FF. Association of cytochrome P450 1B1 (CYP1B1) polymorphism with steroid receptor status in breast cancer [erratum in *Cancer Res* 1999, **59** : 1388]. *Cancer Res* 1998, **58** : 5038-5041

GAUTIER JC, LECCEUR S, COSME J, PERRET A, URBAN P et coll. Contribution of human cytochrome P450 to benzo[a]pyrene and benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol metabolism, as predicted from heterologous expression in yeast. *Pharmacogenetics* 1996, **6** : 489-499

HASSOUN EA, STOHS SJ. TCDD, endrin and lindane induced oxidative stress in fetal and placental tissues of C57BL/6J and DBA/2J mice. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 1996, **115** : 11-18

HASSOUN EA, WALTER AC, ALSHARIF NZ, STOHS SJ. Modulation of TCDD-induced fetotoxicity and oxidative stress in embryonic and placental tissues of C57BL/6J mice by vitamin E succinate and ellagic acid. *Toxicology* 1997, **124** : 27-37

HAYASHI S, WATANABE J, NAKACHI K, KAWAJIRI K. Genetic linkage of lung cancer-associated MspI polymorphisms with amino acid replacement in the heme binding region of the human cytochrome P450IA1 gene. *J Biochem* 1991, **110** : 407-411

HIRVONEN A, HUSGAFVEL-PURSIAINEN K, KARJALAINEN A, ANTTILA S, VAINIO H. Point-mutational MspI and Ile-Val polymorphisms closely linked in the CYP1A1 gene : lack of association with susceptibility to lung cancer in a Finnish study population. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1992, **1** : 485-489

INGELMAN-SUNDBERG M, OSCARSON M, MCLELLAN RA. Polymorphic human cytochrome P450 enzymes : an opportunity for individualized drug treatment. *Trends Pharmacol Sci* 1999, **20** : 342-349

KAWAJIRI K, NAKACHI K, IMAI K, YOSHII A, SHINODA N, WATANABE J. Identification of genetically high risk individuals to lung cancer by DNA polymorphisms of the cytochrome P450IA1 gene. *FEBS Lett* 1990, **263** : 131-133

KAWAJIRI K, WATANABE J, EGUCHI H, NAKACHI K, KIOHARA C, HAYASHI S. Polymorphisms of human Ah receptor gene are not involved in lung cancer. *Pharmacogenetics* 1995, **5** : 151-158

KIOHARA C, NAKANISHI Y, INUTSUKA S, TAKAYAMA K, HARA N et coll. The relationship between CYP1A1 aryl hydrocarbon hydroxylase activity and lung cancer in a Japanese population. *Pharmacogenetics* 1998, **8** : 315-323

LEMARCHAND L, SIVARAMAN L, PIERCE L, SEIFRIED A, LUM A et coll. Associations of CYP1A1, GSTM1 and CYP2E1 polymorphisms with lung cancer suggest cell type specificities to tobacco carcinogens. *Cancer Res* 1998, **58** : 4858-4863

MICKA J, MILATOVICH A, MENON A, GRABOWSKI GA, PUGA A, NEBERT DW. Human Ah receptor (AHR) gene : localization to 7p15 and suggestive correlation of polymorphism with CYP1A1 inducibility. *Pharmacogenetics* 1997, **7** : 95-101

MOREL Y, BAROUKI R. Down-regulation of cytochrome P450 1A1 gene promoter by oxidative stress. Critical contribution of nuclear factor 1. *J Biol Chem* 1998, **273** : 26969-26976

MOREL Y, BAROUKI R. Repression of gene expression by oxidative stress. *Biochem J* 1999, **342** : 481-496

MOREL Y, MERMOD N, BAROUKI R. An autoregulatory loop controlling cyp1a1 gene expression : Role of H(2)O(2) and NFI. *Mol Cell Biol* 1999, **19** : 6825-6832

MORGAN ET. Regulation of cytochromes P450 during inflammation and infection. *Drug Metab Rev* 1997, **29** : 1129-1188

NAKAJIMA M, YOKOI T, MIZUTANI M, KINOSHITA M, FUNAYAMA M, KAMATAKI T. Genetic polymorphism in the 5'-flanking region of human CYP1A2 gene : effect on the CYP1A2 inducibility in humans. *J Biochem* 1999, **125** : 803-808

NEBERT DW, PETERSEN DD, FORNACE AJ JR. Cellular responses to oxidative stress : the [Ah] gene battery as a paradigm. *Environ Health Perspect* 1990, **88** : 13-25

NEBERT DW, ROE AL, DIETER MZ, SOLIS WA, YANG Y, DALTON TP. Role of the aromatic hydrocarbon receptor and [Ah] gene battery in the oxidative stress response, cell cycle control, and apoptosis. *Biochem Pharmacol* 2000, **59** : 65-85

PARK JY, SHIGENA MK, AMES BN. Induction of cytochrome P4501A1 by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin or indolo(3,2-*b*)carbazole is associated with oxidative DNA damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996, **93** : 2322-2327

PERRET A, POMPON D. Electron shuttle between membrane-bound cytochrome P450 3A4 and b5 rules uncoupling mechanisms. *Biochemistry* 1998, **37** : 11412-11424

PLASILOVA M, STOILOV I, SARFARAZI M, KADASI L, FERA KOVA E, FERA K V. Identification of a single ancestral CYP1B1 mutation in Slovak Gypsies (Roms) affected with primary congenital glaucoma. *J Med Genet* 1999, **36** : 290-294

SACHSE C, BROCKMOLLER J, BAUER S, ROOTS I. Functional significance of a C→a polymorphism in intron 1 of the cytochrome P450 CYP1A2 gene tested with caffeine. *Br J Clin Pharmacol* 1999, **47** : 445-449

SAFE SH. Interactions between hormones and chemicals in breast cancer. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1998, **38** : 121-158

SHERTZER HG, NEBERT DW, PUGA A, ARY M, SONNTAG D, DIXON K et coll. Dioxin causes a sustained oxidative stress response in the mouse. *Biochem Biophys Res Commun* 1998, **253** : 44-48

SLEZAK BP, DILIBERTO JJ, BIRNBAUM LS. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-mediated oxidative stress in CYP1A2 knockout (CYP1A2^{-/-}) mice. *Biochem Biophys Res Commun* 1999, **264** : 376-379

SPINK DC, EUGSTER HP, LINCOLN DW, SCHUETZ JD, SCHUETZ EG et coll. 17 beta-estradiol hydroxylation catalyzed by human cytochrome P450 1A1 : a comparison of the activities induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*- dioxin in MCF-7 cells with those from heterologous expression of the cDNA. *Arch Biochem Biophys* 1992, **293** : 342-348

SPINK DC, SPINK BC, CAO JQ, GIERTHY JF, HAYES CL et coll. Induction of cytochrome P450 1B1 and catechol estrogen metabolism in ACHN human renal adenocarcinoma cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1997, **62** : 223-232

STOHS SJ, HASSAN MQ, MURRAY WJ. Lipid peroxidation as a possible cause of TCDD toxicity. *Biochem Biophys Res Commun* 1983, **111** : 854-859

TAIOLI E, BRADLOW HL, GARBERS SV, SEPKOVIC DW, OSBORNE MP et coll. Role of estradiol metabolism and CYP1A1 polymorphisms in breast cancer risk. *Cancer Detect Prev* 1999, **23** : 232-237

WANNER RZA, ABRAHAM K, KLEFFE J, HENZ BM, WITTIG B. Polymorphism at codon 554 of the human Ah receptor : different allelic frequencies in Caucasians and Japanese and no correlation with severity of TCDD induced chloracne in chemical workers. *Pharmacogenetics* 1999, **9** : 777-780

WEDLUND PJ, KIMURA S, GONZALEZ FJ, NEBERT DW. 1462V mutation in the human CYP1A1 gene : lack of correlation with either the Msp I 1.9 kb (M2) allele or CYP1A1 inducibility in a three- generation family of East Mediterranean descent. *Pharmacogenetics* 1994, **4** : 21-26

WHITLOCK JJ. Induction of cytochrome P450 1A1. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1999, **39** : 103-125

WOLFLE D, MARQUARDT H. Antioxidants inhibit the enhancement of malignant cell transformation induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Carcinogenesis* 1996, **17** : 1273-1278

YAO Y, HOFFER A, CHANG CY, PUGA A. Dioxin activates HIV-1 gene expression by an oxidative stress pathway requiring a functional cytochrome P450 CYP1A1 enzyme. *Environ Health Perspect* 1995, **103** : 366-371

17

Perturbations endocriniennes : nouveaux gènes cibles

Les hydrocarbures halogénés, polyaromatiques, les biphényles polychlorés (PCB), les polychlorodibenzodioxines dont la 2,3,7,8 tétrachlorodibenzo-*p*-dioxine (TCDD) et tous les composés industriels ou polluants qui lient le récepteur des arylhydrocarbures (AhR, également connu sous le nom de récepteur de la dioxine) sont des toxiques environnementaux (Okey et coll., 1994). Ils seront désignés ici par le terme de ligands AhR. Ils ont récemment reçu beaucoup d'attention du fait de leur résistance à la dégradation et de leur longue demi-vie (4 à 12 ans) dans les graisses du corps humain. Le benzo[a]pyrene (BaP) et les hydrocarbures polyaromatiques sont présents dans la fumée de cigarette, certaines émanations industrielles et les gaz d'échappement. Ces ligands AhR sont potentiellement plus importants que la 2,3,7,8 tétrachlorodibenzo-*p*-dioxine (TCDD) en termes d'exposition des populations, mais leur affinité pour le récepteur est inférieure. Cependant, aucun de ces ligands AhR ne peut être considéré comme physiologique, et le ligand naturel du récepteur AhR reste inconnu.

Le concept de la perturbation endocrine consiste en l'exposition à des molécules capables d'imiter ou de bloquer les hormones naturelles pendant des étapes cruciales de la vie *in utero* et du développement. Cela peut conduire à des troubles de la physiologie hormonale. Les expériences de laboratoire sur les animaux et un certain nombre d'études épidémiologiques ont validé ce modèle. Les questions qui se posent réellement sont : « Quel est l'impact réel de la perturbation endocrine sur la population humaine ? Doit-on rechercher des signes aigus ou des signes chroniques ? Peut-on agir et/ou traiter préventivement ? »

Waller et coll. (1996) décrivent bien la multitude de molécules disparates qui peuvent intervenir dans la perturbation endocrine. Rien qu'en considérant le récepteur AhR, qui n'est qu'un élément du problème, on compte environ 250 ligands dont 75 dioxines. Colborn et coll. (1993) ont récemment colligé de nombreuses études sur les perturbations endocrines et développementales de la faune qui pourraient être associées aux ligands AhR mais aussi aux pesticides organochlorés.

La pénétration dans l'organisme des dioxines est essentiellement intestinale, le passage des barrières physiologiques placentaire et hémato-méningée ayant

fait comparativement l'objet de moins d'études. Funseth et Ilback (1994) notent que les infections à coxsackie virus qui lèsent la barrière hémato-méningée augmentent la pénétration des dioxines dans le cerveau. Bachour et coll. (1998) rapportent que le cerveau capte proportionnellement moins de dioxines que les autres organes en dépit de sa composition riche en lipides, suggérant que la barrière hémato-méningée intacte s'oppose au passage des dioxines.

Le placenta contient des récepteurs AhR (Manchester et coll., 1987). Un passage important des dioxines et PCB à travers le placenta a été montré aussi bien chez le singe marmouset (Hagenmeier et coll., 1990) que chez les rongeurs (Nau et Bass, 1981).

Perturbations des hormones gonadotropes

Avant même tout effet antagoniste direct, les dioxines perturbent la sphère endocrine en perturbant la stéroïdogenèse. Cela se produit tout au début, au niveau de la distribution du cholestérol. La dioxine s'oppose à l'induction de la synthèse du cortisol par l'hormone corticotrope (ACTH) en bloquant l'afflux de cholestérol vers les mitochondries, ce qui fait baisser l'activité du cytochrome CYP 450 (DiBartolomeis et coll., 1986). Chez le rat, un certain nombre d'enzymes de la synthèse des androgènes testiculaires diminuent (en activité) sous l'influence de la 2,3,7,8-TCDD (Cooke et coll., 1998).

Effets sur la spermatogenèse

Une littérature très volumineuse fait état de nombreux effets pathogènes des dioxines et des PCB sur le tractus génital mâle, essentiellement chez le rat. Il est admis par la plupart des auteurs que les dioxines et les PCB exercent des effets négatifs sur l'ensemble de l'axe hypothalamo-hypophyso-testiculaire et jusqu'à la stéroïdogenèse leydigienne. Ces études se contentent le plus souvent de techniques descriptives portant sur l'induction de CYP1A1 (l'enzyme d'hydrolyse des arylhydrocarbures), l'histomorphologie, la spermatogenèse et/ou la mesure des taux d'hormones circulantes mais ne proposent pas de mécanisme (Mably et coll., 1992 ; Johnson et coll., 1994 ; Cooke et coll., 1998 ; Roman et Peterson, 1998 ; Roman et coll., 1998a ; Roman et coll., 1998b).

Carlsen et coll. (1999) ont repris 61 études de spermatogrammes humains publiées entre 1938 et 1991. L'analyse mathématique de ces données montre une diminution régulière du nombre de spermatozoïdes (de $113 \cdot 10^6$ à $66 \cdot 10^6$ /ml) et de la production de sperme pendant cette période. Ces résultats font l'objet d'une controverse car ils diffèrent en fonction des paramètres retenus pour l'analyse, certaines études qui font intervenir des paramètres démographiques et géographiques n'observent aucune diminution (Saidi et

coll., 1999). Il en est de même pour l'incidence croissante de l'hypospadias et de la cryptorchidie chez les enfants, qui fluctue considérablement. Pour Henriksen et coll. (1997), l'examen des anciens combattants du Viêt Nam ne décèle aucune anomalie des taux circulants de testostérone et de gonadotrophines tandis que d'autres études portant sur des cohortes d'ouvriers exposés confirment les effets des dioxines sur l'axe hypophyso-testiculaire observés chez le rat (Egeland et coll., 1994).

S'il est permis au vu de ces résultats de proposer un impact général des molécules xénoœstrogènes, antiandrogènes (dichlorodiphényldichloroéthylène ou DDE) et des autres perturbateurs, dont les ligands AhR, sur la reproduction masculine, la situation est plus difficile à cerner dans le cas des dioxines qui se présentent comme des inhibiteurs de toutes les hormones stéroïdes, et particulièrement des œstrogènes et androgènes.

Effets sur l'hormone lutéinisante (LH)

L'essentiel des travaux se compose d'études des effets de la 2,3,7,8-TCDD sur les cellules de la granulosa humaine en culture et d'études *in vivo* sur le rat. Les études sur cellules de granulosa concernent la stéroïdogénèse, la voie des enzymes MAP kinases, la protéine kinase A, la prolifération cellulaire et le transport du glucose. Toutes ces voies sont inhibées par la 2,3,7,8-TCDD qui se présente comme un inhibiteur pléiotropique de la prolifération de ces cellules (Enan et coll., 1996a et b). Un effet proapoptotique a aussi été rapporté (Heimler et coll., 1998).

Il a été montré que la 2,3,7,8-TCDD bloque l'ovulation chez le rat : après stimulation avec des hormones gonadotropes provenant de juments gravides (PMSG), les ovules restent trappés dans les follicules qui ne s'ouvrent pas, et un grand nombre de follicules sont manquants (Gao et coll., 1999). La 2,3,7,8-TCDD diminue la sensibilité de la LH aux mécanismes de feed-back (Mably et coll., 1992) et paradoxalement augmente la LH et la FSH circulantes (Li et coll., 1997), ou ne les augmente pas (Chaffin et coll., 1997).

Sachant que l'interleukine 1-bêta apparaît très nettement impliquée dans l'ovulation (Adashi, 1998) et que cette cytokine est régulée efficacement par la dioxine, il serait intéressant d'étudier les effets de la 2,3,7,8-TCDD sur l'axe hypophyso-ovarien par ce biais. L'interleukine 1-bêta agit en synergie avec la LH pour l'ouverture du follicule : les observations de Gao et coll. (1999) soutiennent fortement l'intérêt d'une telle approche. Aucune étude n'a été faite dans ce sens.

Effets sur les œstrogènes

Aucune étude sérieuse ne corrèle l'exposition aux dioxines et PCB au cancer du sein, au contraire, ceux-ci apparaissent moins nombreux dans la zone de Seveso que dans le reste de l'Italie (Bertazzi et coll., 1998). Ceci n'est pas

surprenant dans la mesure où les dioxines sont essentiellement des antioestrogènes (Safe, 1995). Il convient de dissocier les effets antioestrogènes par interférence entre les récepteurs et les effets dus aux sites de fixation (iDREs) des récepteurs sur certains gènes. La plupart de ces travaux ont été exécutés par le groupe de Safe dans la lignée de cancer du sein humain MCF-7. Dans les effets directs, on trouve la répression de la transcription du récepteur de la prolactine (Lu et coll., 1996) et de la progestérone (Harper et coll., 1994) ; la répression de l'expression de la cathepsine D par inhibition de l'interaction récepteur des œstrogènes (ER)/facteur de transcription Sp1 (Krishnan et coll., 1995) et la répression de l'activateur tissulaire du plasminogène (Gierthy et coll., 1987). Dans ce dernier cas, l'effet est spécifique à la 2,3,7,8-TCDD et n'est pas reproduit par les PCB ni par les dibenzofuranes.

Dans les effets liés aux iDRE on trouve l'inhibition de l'induction de pS2 (Gillesby et coll., 1997) et de *c-fos* par l'œstradiol (Astroff et coll., 1991 ; Safe et coll., 1998).

En outre, la 2,3,7,8-TCDD diminue la quantité de ER dans les cellules MCF-7, mais ce n'est pas un effet transcriptionnel (Gierthy et coll., 1996).

Effets sur les progestagènes

Rier et coll. (1993) rapportent qu'un traitement par la 2,3,7,8-TCDD à long terme (4 ans) a produit une endométriose massive chez plus de la moitié des macaques. Ceci fut observé 10 ans après l'arrêt du traitement lors du sacrifice des animaux. Ce même effet est observé chez le rat et la souris (Cummings et Metcalf, 1995). Dans l'espèce humaine, seules les études de Koninkcx et coll. (1994) et de Mayani et coll. (1997) suggèrent un impact de polluants tels que les dioxines sur l'endométriose mais d'autres études sont en cours. Cependant, Ahlborg et coll. (1995) récusent tout lien entre 2,3,7,8-TCDD et endométriose humaine. Par ailleurs, l'étude de Matorras et coll. (1995) révèle une corrélation négative entre le tabac et l'endométriose dans une cohorte espagnole, qui semble liée aux effets antioestrogéniques. Le même effet négatif a été observé chez des souris traitées conjointement par la 2,3,7,8-TCDD et l'œstradiol (Yang et Foster, 1997).

Sur le plan expérimental, Kuil et coll. (1998) rapportent que les effets transcriptionnels de la 2,3,7,8-TCDD sont inhibés par la progestérone, mais sans réciproque. Toutefois, un travail récent sur l'expression des métallo-protéases matricielles dans un modèle expérimental d'endométriose humaine confirme l'existence d'un effet antiprogestérone de la 2,3,7,8-TCDD (Bruner-Tran et coll., 1999).

Perturbations des systèmes neuroendocriniens

Quelques études font état, chez le rat, d'une induction du métabolisme de la sérotonine par la 2,3,7,8-TCDD, sans montrer de signe clinique particulier (Unkila et coll., 1994). Il en est de même pour la mélatonine (Linden et coll., 1991). L'intérêt de ces travaux réside dans l'exploration des liens mal connus entre le syndrome de mort subite du nouveau-né, la mélatonine et le tabac (Maurizi, 1997) ainsi que dans le rôle anti-oxydant de la mélatonine (Reiter et coll., 1997).

La dioxine pénètre dans le cerveau et y induit CYP1A1, l'enzyme d'hydrolyse des arylhydrocarbures. Des études de biodisponibilité montrent que le cerveau ne reçoit qu'une faible part de la charge corporelle en ligands du récepteur AhR (Bachour et coll., 1998). Cela peut être dû à l'efficacité de la barrière hémato-méningée. Or celle-ci est très détériorée par l'accumulation des dépôts amyloïdes lors de la maladie d'Alzheimer conduisant à une perméabilité accrue qui pourrait augmenter la pénétration des ligands AhR et aggraver la maladie.

Les radicaux libres et les phénomènes inflammatoires sont en effet considérés comme essentiels dans le développement des neuropathies dégénératives amyloïdes (maladie d'Alzheimer). Un travail récemment effectué avec le resveratrol a montré que l'activation des mécanismes inflammatoires se fait par l'interleukine-1 β (IL-1 β) et par la production accrue de radicaux libres (ROS) sous l'influence des ligands du récepteur AhR. La dioxine induit l'interleukine-1 β et le facteur de croissance tumorale TGF- β 2 au niveau transcriptionnel (TC) et/ou post-transcriptionnel (post-TC).

Le récepteur AhR module l'interaction du facteur de transcription NF-kappaB avec l'ADN en jouant sur son mécanisme d'activation (Gollapudi et coll., 1996) ou en interagissant directement (Tian et coll., 1999). Sans rentrer dans la controverse sur le rôle bénéfique ou aggravant de NF-KappaB dans les maladies neurodégénératives, il est clair que ce mécanisme soulève la question des ligands AhR dans les maladies neurovégétatives. La littérature actuelle ne contient aucun travail dans ce sens.

Autres systèmes hormonaux perturbés

Le récepteur AhR interagit avec le facteur de transcription Sp1 (Wang et coll., 1998), le corépresseur SMRT (*silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor*) (Nguyen et coll., 1999) et le système intégrateur cAMP Responsive Element Binding Protein (CREBP)/P300 (Kobayashi et coll., 1997). Ces facteurs étant des composés ubiquitaires et généraux de la régulation des gènes, il est évident que le récepteur AhR est susceptible de perturber un grand nombre de régulations lorsqu'il est activé par les ligands issus de la pollution industrielle.

Le récepteur AhR partage son translocateur nucléaire avec HIF-1 (hypoxia inducible factor) alpha, la protéine de réponse à l'hypoxie. Dans ce dernier cas, HIF-1 alpha peut séquestrer l'ARNT (*AhR nuclear translocator*) au détriment du récepteur AhR mais pas l'inverse. Il semble donc peu probable que les ligands AhR puissent perturber la réponse à l'hypoxie.

Les ligands du récepteur AhR sont connus pour stimuler la réplication des virus. Notamment, les ligands du récepteur AhR activent l'expression du VIH-1 directement par interaction avec un site de liaison à l'ADN spécifique (DRE ou *Dioxin responsive element*) présent dans la séquence du VIH-1 ainsi que par l'activation du facteur NF-kappaB (Yao et coll., 1995 ; Gollapudi et coll., 1996).

Effets sur l'ostéoporose

De nombreuses données épidémiologiques montrent que le tabagisme est un facteur de risque de l'ostéoporose chez l'homme comme chez la femme (Francheschi et coll., 1996 ; Kiel et coll., 1996). Ceci est confirmé par la relation proportionnelle quantitative qui existe entre le tabagisme et la diminution de la densité osseuse (Hopper et Seeman, 1994 ; Egger et coll., 1996 ; Grisso et coll., 1997) et par la corrélation entre le tabagisme et le risque de fractures (Johansson et Mellstrom, 1996 ; Grisso et coll., 1997). Cependant, la relation entre le tabagisme et l'ostéoporose n'est pas explicitée. L'hypothèse admise est que les ligands AhR présents dans le tabac pourraient exercer un effet négatif sur l'os de trois façons : un effet antioestrogénique ; un effet toxique sur l'os puisque le tissu osseux contient des récepteurs AhR (Abbott, 1995) ; un effet toxique sur la fonction ovarienne car les femmes qui fument font une ménopause plus précoce de 1 à 4 ans que celles ne fumant pas. Des expériences sur des souris démontrent un effet toxique direct du benzo[a]pyrène et des autres ligands du récepteur AhR sur les oocytes (Miller et coll., 1992).

Effets sur le système immunitaire

Le système immunitaire est capable de reconnaître les cellules malignes comme des hôtes étrangers à l'organisme et de les attaquer. Par ailleurs, l'augmentation des cancers chez les patients immunodéprimés fait l'objet d'une vaste littérature. Ces faits suggèrent l'importance du système immunitaire dans la protection de l'organisme contre la tumorigenèse. Les ligands du récepteur AhR comme la dioxine sont de puissants immunosuppresseurs (Kerkvliet, 1995) et sont tumorigènes chez les rongeurs. À la suite de l'immunosuppression par les ligands du récepteur AhR, on observe une diminution de la résistance aux agents infectieux (Burleson et coll., 1996). Les ligands du récepteur AhR peuvent induire l'immunosuppression par de nombreux mécanismes : inhibition de la maturation des thymocytes fœtaux (Blaylock et coll., 1992), involution thymique (De Heer et coll., 1994) altération des lymphocytes ou diminution de leur viabilité (Yoo et coll., 1997) suppression de

l'activité des cellules T et B (Karras et Holsapple, 1994 ; Masten and Shiverick, 1996 ; Gehrs et coll., 1997), suppression de l'activité des cellules « tueuses » (Yang et coll., 1994), apoptose des cellules immunocompétentes (Kamath et coll., 1997), modulation de l'expression des cytokines (Yin et coll., 1994 ; Fan et coll., 1997) et/ou modification de la transcription de gènes cibles spécifiques du système immunitaire comme CD19 (Fan et coll., 1997), ou la cytokine TC-1 (Kerkvliet et coll., 1996). Le rôle des ligands AhR dans l'immunosuppression est soutenu par la présence du récepteur AhR, de ARNT ainsi que du gène inductible CYP1A1/AHH dans les lymphocytes (Masten and Shiverick, 1996).

Effets sur le diabète

Une relation entre les dioxines et le diabète existerait selon Bertazzi et coll. (1998) qui rapportent un « excès de cas » de diabète dans la population de Seveso ; une relation également retrouvée par les études américaines de Henriksen et coll. (1997) sur les anciens combattants du Viêtnam, et de Vena et coll. (1998) sur des travailleurs exposés. Inversement, l'étude de Steenland et coll. (1999) ne trouve pas de corrélation entre la dioxine et le diabète dans une cohorte américaine d'ouvriers exposés. Il est à noter que le transport du glucose est fortement inhibé par les dioxines dans le tissu adipeux des rats et des souris (Enan et Matsumura, 1994).

Effets sur la vitamine A

Les ligands du récepteur AhR sont de puissants inducteurs de l'acné chlorique (ou chloracné) (Suskind, 1985). Cette éruption acnéiforme s'observe à la suite d'une altération des processus de différenciation des cellules basales des glandes sébacées et des kératinocytes. Dans tous les accidents industriels où ces composés ont été impliqués (Allemagne, 1953 ; États-Unis, 1964 ; Japon, 1968 ; Italie, 1976 ; Chine, 1977-1979), l'acné chlorique fut considéré comme le symptôme spécifique majeur de l'intoxication (Suskind, 1985) et fut observé chez la majorité des personnes exposées. Une interférence de la dioxine avec le mécanisme d'action du récepteur de l'acide rétinoïque (dérivé oxydé de la vitamine A) a été proposée par Berkers et coll. (1995). Ces cellules expriment des taux croissants du récepteur AhR durant leur différenciation (Wanner et coll., 1996). De plus, les ligands du récepteur AhR augmentent la différenciation terminale des kératinocytes (Berkers et coll., 1995). Il est très probable que les ligands du récepteur AhR modifient l'expression de certains gènes dans la peau.

Effets sur les hormones thyroïdiennes

De par leur analogie structurale avec les hormones thyroïdiennes, les PCB ont de multiples impacts sur les voies de régulation de ces hormones, que ce soit au

niveau des mécanismes de transport, des récepteurs nucléaires, ou au niveau du métabolisme énergétique mitochondrial (Sher et coll., 1998). Les hydroxy-PCB les plus aptes à imiter les hormones thyroïdiennes ont des K_i voisins de 20-50 μM pour le récepteur T3, contre 10 nM pour l'hormone naturelle, alors qu'ils sont équivalents à la T3 pour lier la protéine de transport transthyrétine (Cheek et coll., 1999). On peut donc supposer que l'essentiel de leurs effets aura lieu au niveau de la perturbation du transport des hormones thyroïdiennes. La 2,3,7,8-TCDD inhibe l'activité désiodinase chez le rat (Eltom et coll., 1992).

Effets sur le cycle cellulaire et la prolifération des cellules

Des effets des ligands du récepteur AhR sur les protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire ont été décrits chez le rat. La 2,3,7,8-TCDD induit p27kip (Kolluri et coll., 1999), réprime p21waf (Enan et coll., 1998). Une étude de Riniger et coll. (1997) montre au contraire que chez la souris, p53, Rb et p21 sont augmentées par la 2,3,7,8-TCDD. De nombreuses kinases sont aussi perturbées (Enan et coll., 1998). Une perturbation du cycle cellulaire a été montrée chez la souris où le gène du récepteur AhR a été invalidé (Weiss et coll., 1996). Il existe des éléments de réponse potentiels (DRE) dans les promoteurs de la protéine p53 et de la p21 (waf1). De même, un certain nombre d'inhibiteurs du récepteur AhR ont des effets sur le cycle cellulaire (Reiners et coll., 1999).

Les dioxines ont de multiples impacts, généralement inhibiteurs, sur l'expression de facteurs de croissance comme les TGF (pour revue Safe, 1995). Les travaux soulignent le lien entre la prolifération cellulaire et les dioxines, le plus souvent de façon obscure et contradictoire. On notera un effet réciproque : *in vitro* le TGF bêta 1 inhibe l'induction de CYP1A1 par la dioxine dans une lignée humaine de cancer du poumon (Vogel et coll., 1994).

Effets sur le système cardiovasculaire

Les dioxines modulent de façon différentielle l'expression d'un panel de facteurs inflammatoires : interleukine 1-bêta, *nitric oxyde synthase* inductible, PGH2 synthase, cyclooxygénase 2, TNF alpha, TGF alpha, TGF bêta 3 (Yin et coll., 1994 ; Lee et coll., 1996 ; Charles et coll., 1997), et stimulent le cytochrome CYP1A1 qui induit une augmentation de la production de radicaux libres capables de provoquer des lésions membranaires dans les cellules endothéliales. Cette enzyme agit sur la peroxydation des lipides et conduit à leur hyperaccumulation dans les cellules favorisant l'athérogenèse. Un effet semblable est rencontré avec le tabagisme : la fumée de cigarette contient des PCDD dont la 2,3,7,8-TCDD et des PAH, dont le benzo[a]pyrène (BaP) (Bilimoria et Ecobichon, 1980). Les PCB présentent aussi ces effets (Toborek et coll., 1995).

Les plus récentes revues sur la perturbation endocrine font maintenant systématiquement mention du tabagisme (Sharara et coll., 1998). L'intoxication quotidienne par la dioxine seule est équivalente à 4,3 pg/kg de poids corporel pour 20 cigarettes (Muto and Takizawa, 1989). Chez le grand fumeur, la charge due à l'ensemble des ligands AhR peut aller jusqu'à 0,05 mg/kg. Tous ces composés présents dans la fumée de cigarette sont capables d'induire l'expression de CYP1A1/AHH dans les poumons (Bartsch et coll., 1992), le placenta (Gurtoo et coll., 1983), les reins (Bilimoria and Ecobichon, 1980), les ovaires (Mattison and Thorgeirsson, 1978) et les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins (Toborek et coll., 1995). L'induction de CYP1A1/AHH et des autres enzymes de la phase I conduit à la production de radicaux libres qui provoquent des lésions oxydatives sur l'ADN (Park et coll., 1998). Outre les cancers (pour revue, voir Boyle, 1997), le tabagisme a été mis en cause directement dans l'occurrence de l'ischémie cardiaque, la principale cause de mortalité dans le monde occidental (Boyle, 1997).

Dans le système cardiovasculaire, les ligands du récepteur AhR peuvent présenter des propriétés athérogènes en perturbant les fonctions des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins. Ces ligands induisent CYP1A1/AHH dans les cellules endothéliales de porc avec une DE50 (dose induisant 50 % du phénomène) de 180 nM pour le BaP et 0,015 nM pour la 2,3,7,8-TCDD (Stegeman et coll., 1995). La stimulation de ces enzymes de phase I provoque une augmentation de la production de ROS (Park et coll., 1998) capable de provoquer des lésions membranaires dans les cellules endothéliales et la peroxydation des lipides. Les LDL (lipoprotéines de faible poids moléculaire) oxydées formées par ce mécanisme font l'objet d'une endocytose non régulée par un récepteur « éboueur » qui conduit à une suraccumulation dans les cellules endothéliales, et à la formation de cellules spumeuses (Steinberg et coll., 1989). Cette situation contraste avec l'endocytose normale des LDL par le récepteur des LDL qui est étroitement régulée. Outre les ligands du récepteur AhR, l'acide arachidonique et les eicosanoïdes vasoactifs sont aussi des substrats pour CYP1A1/AHH. Il a été proposé que c'est entre autres par la perturbation du métabolisme de l'acide arachidonique que les ligands du récepteur AhR pourraient être athérogènes (Rifkind et coll., 1990). Toborek et coll. (1995) ont aussi montré que ces ligands peuvent léser les cellules endothéliales et modifier leur perméabilité, ce qui pourrait conduire à une incorporation accrue de déchets des cholestérol-lipoprotéines dans la paroi artérielle conduisant à la formation d'athérome, et à la perturbation de l'expression des enzymes de la synthèse du cholestérol et de la stéroïdogenèse. Dans le cas des PCB, cet effet n'est observé qu'avec les ligands qui lient le récepteur AhR et qui induisent CYP1A1. De plus, ces mêmes PCB augmentent le stress oxydatif et la peroxydation des lipides dans les cellules endothéliales en culture, phénomène qui a été corrélé dans le temps avec l'induction de CYP1A1 ; ceci pourrait expliquer le mécanisme des lésions cellulaires. Ainsi l'athérogenèse induite par les ligands AhR pourrait être due à l'induction de CYP1A1 par ces composés.

Le taux bas des maladies cardiovasculaires en France comparé à celui des autres pays occidentaux, en dépit de facteurs de risque comparables, a été baptisé le « paradoxe français » (Renaud et De Lorgeril, 1992). La consommation particulière de vin en France a conduit à l'hypothèse que le vin contiendrait des facteurs cardioprotecteurs. Le vin (rouge) contient des polyphénols dont le resvératrol. Cette phytoalexine antifongique existe en configuration *cis/trans* dans une variété de plantes spermatophytes dont la vigne. Le resvératrol a été considéré comme cardioprotecteur pour ses effets sur les lipides et ses propriétés antioxydantes. Le resvératrol est un antagoniste compétitif du récepteur AhR (Casper et coll., 1999). Le resvératrol est capable de bloquer les effets des ligands AhR sur l'induction des gènes cibles, tels que CYP1A1, le promoteur du virus VIH-1 et l'interleukine 1- β . L'inhibition de l'expression du gène de CYP1A1 par le resvératrol a été également rapportée (Ciolino et coll., 1998 ; Ciolino et Yeh, 1999) mais sans observer la liaison de l'antagoniste au récepteur AhR. L'hypothèse que les effets cardioprotecteurs du resvératrol soient médiés par l'inhibition du récepteur AhR au niveau des cellules vasculaires pourrait être retenue. Le resvératrol permettrait peut-être de prévenir les effets toxiques des ligands du récepteur AhR.

Mécanismes d'action du récepteur AhR

Le récepteur AhR est présent dans le cytoplasme des cellules de vertébrés (Okey et coll., 1994). Une fois formé, le complexe ligand/AhR est transporté ensuite dans le noyau en s'associant avec une protéine nucléaire, le « translocateur » (ARNT). Dans le noyau, ce complexe régule l'expression de certains gènes en se liant à l'ADN au niveau de séquences définies, les « éléments de réponse à la dioxine » (DRE). Ces éléments sont localisés dans les gènes sensibles comme les cytochromes P-450 CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1 dénommés gènes de phase I, et d'autres comme la glutathion S-transférase Ya ou la NAD(P)H-quinone-oxydoréductase, qui sont des enzymes détoxifiantes dites de phase II. CYP1A1 est impliquée dans le métabolisme des hydrocarbures polycycliques, souvent pour conduire à des composés plus cancérigènes. Ces métabolismes oxydatifs résultent de l'augmentation de la production de radicaux libres oxygénés (ROS) qui provoquent des lésions oxydatives de l'ADN pouvant induire la cancérogenèse (Park et coll., 1998).

Fonctions et antifonctions

La partie C-terminale du récepteur AhR contient plusieurs régions transactivatrices dont une principale. En plus, il a été mis en évidence une fonction de répression de la transcription dans la même région (Whitelaw et coll., 1994). On peut penser que, selon la conformation induite par un ligand donné, l'une ou l'autre des activités est prépondérante. L'équilibre entre ces fonctions n'est pas exploré. Il est peut-être à la base de l'observation de Vanden Heuvel et

coll. (1994) qui rapportent que, selon les gènes cibles, la concentration de ligand nécessaire à l'activation varie.

Sites et antisites

En recherchant des gènes cibles potentiels du AhR possédant des sites DRE pour relier ce mécanisme au concept de perturbation endocrinienne, le groupe de Stephen Safe a découvert qu'il existe deux types de sites : des DRE « classiques » et des DRE « inhibiteurs » (iDRE) (Safe et coll., 1998). Ces derniers confèrent une répression liée à la dioxine, mesurée après une transfection cellulaire par l'expression du gène « rapporteur » CAT (chloramphénicol acétyl transférase) inséré dans une construction plasmidique sous leur contrôle. Ces sites, qui médient une activité répressive de la dioxine sur le gène qui les contient, sont des DREs dont les adénines extrêmes sont l'une et/ou l'autre mutées en cytidines. Souvent, une seule est remplacée, c'est alors presque toujours celle en 3' :

T/A N G C G T G A/G G/C A	DRE
C N G G C G T G A/G G/C C	iDRE

De nombreux gènes des systèmes endocriniens contiennent ce genre de site (ER, PS2, PR, c-fos, enzymes clés des prostaglandines et des lipides...). Ils sont souvent associés à des DRE positifs, comme c'est le cas pour CYP1A1. Leur fonctionnalité n'a été démontrée que pour c-fos (Duan et coll., 1999) et pS2 (Safe et coll., 1998).

Batteries de gènes cibles des ligands du récepteur AhR

Lai et coll. (1996) ont publié une première série de gènes contenant des DRE et pouvant donc être régulés par les ligands du récepteur AhR. Les tableaux 17.I et 17.II en présentent une autre série.

Ces gènes contenant des séquences répressives iDREs dans leurs région régulatrices ne sont pas nécessairement connus pour être régulés d'une manière ou d'une autre par le récepteur AhR. Ils constituent les pistes à suivre lors de futures études visant à délimiter la sphère d'influence de ce système de régulation.

En conclusion, si l'on prend soin de séparer les perturbateurs endocriniens en classes pharmacologiques claires, on s'aperçoit que les dioxines, antioestrogènes, doivent être distinguées des innombrables xénoestrogènes de l'industrie des pesticides.

La découverte de sites répresseurs sur l'ADN, en plus des sites activateurs déjà connus, relance la nécessité de découvrir l'hormone physiologique du récepteur AhR et d'établir la carte de l'impact sur le génome.

Tableau 17.I : Gènes contenant des DRE dans leurs régions régulatrices

Gène	Ref. Genbank	Nombre de sites	Localisation	Commentaires
Enzymes				
NOS3 endothéliale	AF032908	4	Promoteur	
Cyclooxygénase 2	AF044206	3	Promoteur	
PG H Synthase	U44805	1	Promoteur	
PG endoperoxide synthase	M31812 D64068	1	Promoteur	
FMO 3	AL021026	4	Promoteur, 5'UTR	
Leukotriène A4 hydrolase	U27275	2	Promoteur	Aldostérone
Stéroïde 18-hydroxylase	D10170	3	Promoteur	
5-Lipoxygénase	M38191	5	Promoteur, Cds	
Protéines impliquées en neuropathologie				
Préséniline-1	AF029701	5	Promoteur	Alzheimer
STM2	NM000347	8	Promoteur	Alzheimer familial
S100-bêta	M59486	3	Promoteur	Alzheimer
Tau	L47238	2	Promoteur	Alzheimer
Protéine amyloïde	HUMAPPBO1	4	Promoteur	Alzheimer
Neuropeptide Y	L47169	2	Promoteur	Hypothalamus
Orexine	AF118885	7	Promoteur	Hypothalamus
Cycle cellulaire, oncogènes				
PCNA	J05614	1	Promoteur	Cycle cellulaire
p53	U94788	2	Prom. Int.	Cycle cellulaire
p21 waf1	HSU24170	8	Promoteur	Cycle cellulaire
CDC6	AB010492	8	Promoteur	Cycle cellulaire
PRb110	M27845	1	Promoteur	Cycle cellulaire
c-Ha-Ras	M30539	7	Promoteur	Transduction, cancer
Interleukines, chimiokines				
IL1-RA	U65590	4	Introns	
RANTES	S64885	1	Promoteur	
CD40 ligand	D31793	1	Promoteur	
IL-1 récepteur 1	AF054830	1	Cds	
IL-1 récepteur 2	X59770	1	Cds	
IL-8 récepteur a	U11870	3	Promoteur	
IL-8 récepteur b	U11866	1	Promoteur	
NF Kappa B p65	L01459	2	Promoteur	
NF Kappa B p50	S57113	1	Promoteur	
I kappa B alpha	U08468	2	Promoteur	
Récepteurs, transporteurs				
glutamate, slc1a1	AF143773	4	Promoteur	
Glucocorticoid receptor	U10430	8	Promoteur	
Thyroid hormone receptor	S37458	2	Promoteur	

Cds : séquence codante ; UTR : région non traduite ; Prom. Int. : promoteur interne

Enfin, la découverte relativement récente de liens, encore peu nombreux, entre dioxines et maladies cardiovasculaires vient confirmer la nécessité du renouvellement des approches expérimentales et cliniques.

Tableau 17.II : Gènes humains contenant des séquences répressives iDREs dans leurs région régulatrices

Gènes	Réf Genbank	Nombre de sites	Localisation	Commentaires
Sphère endocrine				
MDR1	HSMDR1		Gène	Pompe membranaire
PS2		1	Promoteur	Cancer du sein
Récepteur progestérone		1	Promoteur	Gestation
Hormone <i>insulin-like</i>	HSLILH			Cellules Leydig
Récepteur aux androgènes	HUMHARA		Promoteur	
TNF-alpha	A20255			
TNF récepteur 1	HUMTNFR1		Gène	
Stéroïde 5a-réductase		1	Gène	
Stérol <i>carrier</i> protéine X		1	Gène	
Divers				
Transglutaminase	U13920	3	Promoteur	
MHC-HLA-DQ-alpha	...		Promoteurs	Nombreux allèles
Peptide natriurétique C	HUMCNPA			
Thrombine récepteur F2	HSU36755		Promoteur	
MUC2	HSU68061	1	Promoteur	
Protéine rein polykystique	HUMPKD1gEn		Promoteur	
Glut4	X58489	6	Promoteur	Transport glucose
EXT2	HSMEXT11		Promoteur	Exostose multiple
STM2	HSU50871			Alzheimer
Oncogènes, cycle cellulaire				
BRCA1	HUMBRCA1		Gène	Suppresseur tumeur
Blym1	HUMBLYM1	1	Promoteur	
ERCC2	HUMXPDG1			
c-fos		1	Promoteur	AP-1
P53	HSP53G		Gène	Suppresseur tumeur
p21 waf1	HSU24170	8	Promoteur	Cycle cellulaire

BIBLIOGRAPHIE

ABBOTT BD. Review of the Interaction between TCDD and Glucocorticoids in Embryonic Palate. *Toxicology* 1995, **105** : 365-373

ADASHI EY. The potential role of interleukin-1 in the ovulatory process : an evolving hypothesis. *Mol Cell Endocrinol* 1998, **140** : 77-81

AHLBORG UG, LIPWORTH L, TITUS-ERNSTOFF L, HSIEH CC, HANBERG A et coll. Organochlorine compounds in relation to breast cancer, endometrial cancer, and endometriosis : an assessment of the biological and epidemiological evidence. *Crit Rev Toxicol* 1995, **25** : 463-531

- ASTROFF B, ELDRIDGE B, SAFE S. Inhibition of the 17 beta-estradiol-induced and constitutive expression of the cellular protooncogene c-fos by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) in the female rat uterus. *Toxicol Lett* 1991, **56** : 305-315
- BACHOUR G, FAILING K, GEORGII S, ELMADFA I, BRUNN H. Species and organ dependence of PCB contamination in fish, foxes, roe deer, and humans. *Arch Environ Contam Toxicol* 1998, **35** : 666-673
- BARTSCH H, PETRUZZELLI S, DE FLORA S, HIETANEN E, CAMUS AM et coll. Carcinogen metabolism in human lung tissues and the effect of tobacco smoking : results from a case-control multicenter study on lung cancer patients. *Environ Health Perspect* 1992, **98** : 119-124
- BERKERS JA, HASSING I, SPENKELINK B, BROUWER A, BLAAUBOER BJ. Interactive effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and retinoids on proliferation and differentiation in cultured human keratinocytes : quantification of cross-linked envelope formation. *Arch Toxicol* 1995, **69** : 368-378
- BERTAZZI PA, BERNUCCI I, BRAMBILLA G, CONSONNI D, PESATORI AC. The Seveso studies on early and long-term effects of dioxin exposure : a review. *Environ Health Perspect* 1998, **106** : 625-633
- BILIMORIA MH, ECOBICHON DJ. Responses of rodent hepatic, renal and pulmonary aryl hydrocarbon hydroxylase following exposure to cigarette smoke. *Toxicology* 1980, **15** : 83-89
- BLAYLOCK BL, HOLLADAY SD, COMMENT CE, HEINDEL JJ, LUSTER MI. Exposure to tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) alters fetal thymocyte maturation. *Toxicol Appl Pharmacol* 1992, **112** : 207-213
- BOYLE P. Cancer, cigarette smoking and premature death in Europe : a review including the Recommendations of European Cancer Experts Consensus Meeting, Helsinki, October 1996. *Lung Cancer* 1997, **17** : 1-60
- BRUNER-TRAN KL, RIER SE, EISENBERG E, OSTEN KG. The Potential Role of Environmental Toxins in the Pathophysiology of Endometriosis. *Gynecol Obstet Invest* 1999, **48** : 45-56
- BURLESON GR, LEBREC H, YANG YG, IBANES JD, PENNINGTON KN, BIRNBAUM LS. Effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) on influenza virus host resistance in mice. *Fundam Appl Toxicol* 1996, **29** : 40-47
- CARLSEN E, GIWERCMAN A, KEIDING N, SKAKKEBAEK NE. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *Br Med J* 1992, **305** : 609-613
- CASPER RF, QUESNE M, ROGERS IM, SHIROTA T, JOLIVET A et coll. Resveratrol has antagonist activity on the aryl hydrocarbon receptor : implications for prevention of dioxin toxicity. *Mol Pharmacol* 1999, **56** : 784-790
- CHAFFIN CL, TREWIN AL, WATANABE G, TAYA K, HUTZ RJ. Alterations to the pituitary-gonadal axis in the peripubertal female rat exposed *in utero* and through lactation to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Biol Reprod* 1997, **56** : 1498-1502

CHARLES GD, SHIVERICK KT. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin increases mRNA levels for interleukin-1beta, urokinase plasminogen activator, and tumor necrosis factor-alpha in human uterine endometrial adenocarcinoma RL95-2 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1997, **238** : 338-342

CHEEK AO, KOW K, CHEN J, MCLACHLAN JA. Potential mechanisms of thyroid disruption in humans : interaction of organochlorine compounds with thyroid receptor, transthyretin, and thyroid-binding globulin. *Environ Health Perspect* 1999, **107** : 273-278

CIOLINO HP, DASCHNER PJ, WANG TT, YEH GC. Effect of curcumin on the aryl hydrocarbon receptor and cytochrome P450 1A1 in MCF-7 human breast carcinoma cells. *Biochem Pharmacol* 1998, **56** : 197-206

CIOLINO HP, YEH GC. The flavonoid galangin is an inhibitor of CYP1A1 activity and an agonist/antagonist of the aryl hydrocarbon receptor. *Br J Cancer* 1999, **79** : 1340-1346

COLBORN T, VOM SAAL FS, SOTO AM. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ Health Perspect* 1993, **101** : 378-384

COOKE GM, PRICE CA, OKO RJ. Effects of *in utero* and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) on serum androgens and steroidogenic enzyme activities in the male rat reproductive tract. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1998, **67** : 347-354

CUMMINGS AM, METCALF JL. Induction of endometriosis in mice : a new model sensitive to estrogen. *Reprod Toxicol* 1995, **9** : 233-238

DE HEER C, VERLAAN AP, PENNINKS AH, VOS JG, SCHUURMAN HJ, VAN LOVEREN H. Time course of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD)-induced thymic atrophy in the Wistar rat. *Toxicol Appl Pharmacol* 1994, **128** : 97-104

DIBARTOLOMEIS MJ, WILLIAMS C, JEFCOATE CR. Inhibition of ACTH action on cultured bovine adrenal cortical cells by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin through a redistribution of cholesterol. *J Biol Chem* 1986, **261** : 4432-4437

DUAN R, PORTER W, SAMUDIO I, VYHLIDAL C, KLABDE M, SAFE S. Transcriptional activation of c-fos protooncogene by 17beta-estradiol : mechanism of aryl hydrocarbon receptor-mediated inhibition. *Mol Endocrinol* 1999, **13** : 1511-1521

EGELAND GM, SWEENEY MH, FINGERHUT MA, WILLE KK, SCHNORR TM, HALPERIN WE. Total serum testosterone and gonadotropins in workers exposed to dioxin. *Am J Epidemiol* 1994, **139** : 272-281

EGGER P, DUGGLEBY S, HOBBS R, FALL C, COOPER C. Cigarette smoking and bone mineral density in the elderly. *J Epidemiol Community Health* 1996, **50** : 47-50

ELTOM SE, BABISH JG, FERGUSON DC. The interaction of L-triiodothyronine and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin on Ah-receptor-mediated hepatic Phase I and Phase II enzymes and iodothyronine 5'-deiodinase in thyroidectomized rats. *Toxicol Lett* 1992, **61** : 125-139

ENAN E, MATSUMURA F. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD)-induced changes in glucose transporting activity in guinea pigs, mice, and rats *in vivo* and *in vitro*. *J Biochem Toxicol* 1994, **9** : 97-106

ENAN E, LASLEY B, STEWART D, OVERSTREET J, VANDEVOORT CA. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) modulates function of human luteinizing granulosa cells *via* cAMP signaling and early reduction of glucose transporting activity. *Reprod Toxicol* 1996a, **10** : 191-198

ENAN E, MORAN F, VANDEVOORT CA, STEWART DR, OVERSTREET JW, LASLEY BL. Mechanism of toxic action of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) in cultured human luteinized granulosa cells. *Reprod Toxicol* 1996b, **10** : 497-508

ENAN E, EL-SABEAWY F, SCOTT M, OVERSTREET J, LASLEY B. Alterations in the growth factor signal transduction pathways and modulators of the cell cycle in endocervical cells from macaques exposed to TCDD. *Toxicol Appl Pharmacol* 1998 **151** : 283-293

FAN F, YAN B, WOOD G, VILUKSELA M, ROZMAN KK. Cytokines (IL-1 β and TNF α) in relation to biochemical and immunological effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) in rats. *Toxicology* 1997, **116** : 9-16

FLESCH-JANYNS D, BECHER H, GURN P, JUNG D, KONIETZKO J et coll. Elimination of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans in occupationally exposed persons. *J Toxicol Environ Health* 1996, **47** : 363-378

FRANCESCHI S, SCHINELLA D, BIDOLI E, DAL MASO L, LA VECCHIA C et coll. The influence of body size, smoking, and diet on bone density in pre- and postmenopausal women. *Epidemiology* 1996, **7** : 411-414

FUNSETH E, ILBACK NG. Coxsackievirus B3 infection alters the uptake of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin into various tissues of the mouse. *Toxicology* 1994, **90** : 29-38

GAO X, SON DS, TERRANOVA PF, ROZMAN KK. Toxic equivalency factors of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins in an ovulation model : validation of the toxic equivalency concept for one aspect of endocrine disruption. *Toxicol Appl Pharmacol* 1999, **157** : 107-116

GEHRS BC, RIDDLE MM, WILLIAMS WC, SMIALOWICZ RJ. Alterations in the developing immune system of the F344 rat after perinatal exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin : I [correction of II]. Effects on the fetus and the neonate. *Toxicology* 1997, **122** : 219-228

GIERTHY JF, LINCOLN DW, GILLESPIE MB, SEEGER JI, MARTINEZ HL et coll. Suppression of estrogen-regulated extracellular tissue plasminogen activator activity of MCF-7 cells by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Cancer Res* 1987, **47** : 6198-6203

GIERTHY JF, SPINK BC, FIGGE HL, PENTECOST BT, SPINK DC. Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin, 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate and 17 β -estradiol on estrogen receptor regulation in MCF-7 human breast cancer cells. *J Cell Biochem* 1996, **60** : 173-184

GILLESBY BE, STANOSTEFANO M, PORTER W, SAFE S, WU ZF, ZACHAREWSKI TR. Identification of a motif within the 5' regulatory region of pS2 which is responsible for AP-1 binding and TCDD-mediated suppression. *Biochemistry* 1997, **36** : 6080-6089

GOLLAPUDI S, KIM CH, PATEL A, SINDHU R, GUPTA S. Dioxin activates human immunodeficiency virus-1 expression in chronically infected promonocytic U1 cells by enhancing NF- κ B activity and production of tumor necrosis factor- α . *Biochem Biophys Res Commun* 1996, **226** : 889-894

- GRISSE JA, KELSEY JL, O'BRIEN LA, MILES CG, SIDNEY S et coll. Risk factors for hip fracture in men. Hip Fracture Study Group. *Am J Epidemiol* 1997, **145** : 786-793
- GURTOO HL, WILLIAMS CJ, GOTTLIEB K, MULHERN AI, CABALLES L et coll. Population distribution of placental benzo(a)pyrene metabolism in smokers. *Int J Cancer* 1983, **31** : 29-37
- HAGENMAIER H, WIESMULLER T, GOLOR G, KROWKE R, HELGE H, NEUBERT D. Transfer of various polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans (PCDDs and PCDFs) via placenta and through milk in a marmoset monkey [published erratum appears in *Arch Toxicol* 1991, **65** : 262]. *Arch Toxicol* 1990, **64** : 601-615
- HARPER N, WANG X, LIU H, SAFE S. Inhibition of estrogen-induced progesterone receptor in MCF-7 human breast cancer cells by aryl hydrocarbon (Ah) receptor agonists. *Mol Cell Endocrinol* 1994, **104** : 47-55
- HEIMLER I, RAWLINS RG, OWEN H, HUTZ RJ. Dioxin perturbs, in a dose- and time-dependent fashion, steroid secretion, and induces apoptosis of human luteinized granulosa cells. *Endocrinology* 1998, **139** : 4373-4379
- HENRIKSEN GL, KETCHUM NS, MICHALEK JE, SWABY JA. Serum dioxin and diabetes mellitus in veterans of Operation Ranch Hand. *Epidemiology* 1997, **8** : 252-258
- HOPPER JL, SEEMAN E. The bone density of female twins discordant for tobacco use. *N Engl J Med* 1994, **330** : 387-392
- JOHANSSON C, MELLSTROM D. An earlier fracture as a risk factor for new fracture and its association with smoking and menopausal age in women. *Maturitas* 1996, **24** : 97-106
- JOHNSON L, WILKER CE, SAFE SH, SCOTT B, DEAN DD, WHITE PH. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin reduces the number, size, and organelle content of Leydig cells in adult rat testes. *Toxicology* 1994, **89** : 49-65
- KAMATH AB, XU H, NAGARKATTI PS, NAGARKATTI M. Evidence for the induction of apoptosis in thymocytes by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin *in vivo*. *Toxicol Appl Pharmacol* 1997, **142** : 367-377
- KARRAS JG, HOLSAPPLE MP. Inhibition of calcium-dependent B cell activation by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Toxicol Appl Pharmacol* 1994, **125** : 264-270
- KERKVLIT NI. Immunological effects of chlorinated dibenzo-*p*-dioxins. *Environ Health Perspect* 1995, **103** : 47-53
- KERKVLIT NI, BAECHER-STEPPAN L, SHEPHERD DM, OUGHTON JA, VORDERSTRASSE B et coll. Inhibition of TC-1 cytokine production, effector cytotoxic T lymphocyte development and alloantibody production by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *J Immunol* 1996, **157** : 2310-2319
- KIEL DP, ZHANG Y, HANNAN MT, ANDERSON JJ, BARON JA, FELSON DT. The effect of smoking at different life stages on bone mineral density in elderly men and women. *Osteoporos Int* 1996, **6** : 240-248
- KOBAYASHI A, NUMAYAMA-TSURUTA K, SOGAWA K, FUJII-KURIYAMA Y. CBP/p300 functions as a possible transcriptional coactivator of Ah receptor nuclear translocator (Arnt). *J Biochem* 1997, **122** : 703-710

- KOLLURI SK, WEISS C, KOFF A, GOTTLICHER M. p27(Kip1) induction and inhibition of proliferation by the intracellular Ah receptor in developing thymus and hepatoma cells. *Genes Dev* 1999, **13** : 1742-1753
- KONINCKX PR, BRAET P, KENNEDY SH, BARLOW DH. Dioxin pollution and endometriosis in Belgium. *Hum Reprod* 1994, **9** : 1001-1002
- KRISHNAN V, PORTER W, SANTOSTEFANO M, WANG X, SAFE S. Molecular mechanism of inhibition of estrogen-induced cathepsin D gene expression by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) in MCF-7 cells. *Mol Cell Biol* 1995, **15** : 6710-6719
- KUIL CW, BROUWER A, VAN DER SAAG PT, VAN DER BURG B. Interference between progesterone and dioxin signal transduction pathways. Different mechanisms are involved in repression by the progesterone receptor A and B isoforms. *J Biol Chem* 1998, **273** : 8829-8834
- LAI ZW, PINEAU T, ESSER C. Identification of Dioxin-Responsive Elements (Dres) in the 5' regions of Putative Dioxin-Inducible Genes. *Chem Biol Inter* 1996, **100** : 97-112
- LEE DC, BARLOW KD, GAIDO KW. The actions of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin on transforming growth factor-beta2 promoter activity are localized to the TATA box binding region and controlled through a tyrosine kinase-dependent pathway. *Toxicol Appl Pharmacol* 1996, **137** : 90-99
- LI X, JOHNSON DC, ROZMAN KK. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) increases release of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone from the pituitary of immature female rats *in vivo* and *in vitro*. *Toxicol Appl Pharmacol* 1997, **142** : 264-269
- LINDEN J, POHJANVIRTA R, RAHKO T, TUOMISTO J. TCDD decreases rapidly and persistently serum melatonin concentration without morphologically affecting the pineal gland in TCDD-resistant Han/Wistar rats. *Pharmacol Toxicol* 1991, **69** : 427-432
- LU YF, SUN G, WANG X, SAFE S. Inhibition of prolactin receptor gene expression by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in MCF-7 human breast cancer cells. *Arch Biochem Biophys* 1996, **332** : 35-40
- MABLY TA, MOORE RW, PETERSON RE. *In utero* and lactational exposure of male rats to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. 1. Effects on androgenic status. *Toxicol Appl Pharmacol* 1992, **114** : 97-107
- MANCHESTER DK, GORDON SK, GOLAS CL, ROBERTS EA, OKEY AB. Ah receptor in human placenta : stabilization by molybdate and characterization of binding of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin, 3-methylcholanthrene, and benzo(a)pyrene. *Cancer Res* 1987, **47** : 4861-4868
- MASTEN SA, SHIVERICK KT. Characterization of the aryl hydrocarbon receptor complex in human B lymphocytes : evidence for a distinct nuclear DNA-binding form. *Arch Biochem Biophys* 1996, **336** : 297-308
- MATORRAS R, RODRIGUEZ F, PIJOAN JI, RAMON O, GUTIERREZ DE TERAN G et coll. Epidemiology of endometriosis in infertile women. *Fertil Steril* 1995, **63** : 34-38
- MATTISON DR, THORGEIRSSON SS. Smoking and industrial pollution, and their effects on menopause and ovarian cancer. *Lancet* 1978, **1** : 187-188

- MATTISON DR. The effects of smoking on fertility from gametogenesis to implantation. *Environ Res* 1982, **28** : 410-433
- MAURIZI CP. Could exogenous melatonin prevent sudden infant death syndrome ? *Med Hypotheses* 1997, **49** : 425-427
- MAYANI A, BAREL S, SOBACK S, ALMAGOR M. Dioxin concentrations in women with endometriosis. *Hum Reprod* 1997, **12** : 373-375
- MILLER MM, PLOWCHALK DR, WEITZMAN GA, LONDON SN, MATTISON DR. The effect of benzo(a)pyrene on murine ovarian and corpora lutea volumes. *Am J Obstet Gynecol* 1992, **166** : 1535-1541
- MOLLER H, JORGENSEN N, FORMAN D. Trends in incidence of testicular cancer in boys and adolescent men. *Int J Cancer* 1995, **61** : 761-764
- MUTO H, TAKIZAWA Y. Dioxins in cigarette smoke. *Arch Environ Health* 1989, **44** : 171-174
- NAU H, BASS R. Transfer of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) to the mouse embryo and fetus. *Toxicology* 1981, **20** : 299-308
- NGUYEN TA, HOIVIK D, LEE JE, SAFE S. Interactions of nuclear receptor coactivator/corepressor proteins with the aryl hydrocarbon receptor complex. *Arch Biochem Biophys* 1999, **367** : 250-257
- OKEY AB, RIDDICK DS, HARPER PA. Molecular biology of the aromatic hydrocarbon (dioxin) receptor. *Trends Pharmacol Sci* 1994, **15** : 226-232
- PARK R, KIM DH, KIM MS, SO HS, CHUNG HT et coll. Association of Shc, Cbl, Grb2, and Sos following treatment with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in primary rat hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1998, **253** : 577-581
- REINERS JJ JR, CLIFT R, MATHIEU P. Suppression of cell cycle progression by flavonoids : dependence on the aryl hydrocarbon receptor. *Carcinogenesis* 1999, **20** : 1561-1566
- REITER RJ, CARNEIRO RC, OH CS. Melatonin in relation to cellular antioxidative defense mechanisms. *Horm Metab Res* 1997, **29** : 363-372
- RENAUD S, DE LORGERIL M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet* 1992, **339** : 1523-1526
- RIER SE, MARTIN DC, BOWMAN RE, DMOWSKI WP, BECKER JL. Endometriosis in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) following chronic exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Fundam Appl Toxicol* 1993, **21** : 433-441
- RIFKIND AB, GANNON M, GROSS SS. Arachidonic acid metabolism by dioxin-induced cytochrome P-450 : a new hypothesis on the role of P-450 in dioxin toxicity. *Biochem Biophys Res Commun* 1990, **172** : 1180-1188
- RININGER JA, STOFFREGEN DA, BABISH JG. Murine hepatic p53, RB, and CDK inhibitory protein expression following acute 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) exposure. *Chemosphere* 1997, **34** : 1557-1568
- ROMAN BL, PETERSON RE. *In utero* and lactational exposure of the male rat to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin impairs prostate development. 1. Effects on gene expression. *Toxicol Appl Pharmacol* 1998, **150** : 240-253

- ROMAN BL, TIMMS BG, PRINS GS, PETERSON RE. *In utero* and lactational exposure of the male rat to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin impairs prostate development. 2. Effects on growth and cytodifferentiation. *Toxicol Appl Pharmacol* 1998a, **150** : 254-270
- ROMAN BL, POLLENZ RS, PETERSON RE. Responsiveness of the adult male rat reproductive tract to 2,3,7,8- tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin exposure : Ah receptor and ARNT expression, CYP1A1 induction, and Ah receptor down-regulation. *Toxicol Appl Pharmacol* 1998b **150** : 228-239
- SAFE S, KRISHNAN V. Cellular and molecular biology of aryl hydrocarbon (Ah) receptor- mediated gene expression. *Arch Toxicol Suppl* 1995, **17** : 99-115
- SAFE SH. Modulation of gene expression and endocrine response pathways by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and related compounds. *Pharmacol Ther* 1995, **67** : 247-281
- SAFE S, WANG F, PORTER W, DUAN R, MCDUGAL A. Ah receptor agonists as endocrine disruptors : antiestrogenic activity and mechanisms. *Toxicol Lett* 1998, **102-103** : 343-347
- SAIDI JA, CHANG DT, GOLUBOFF ET, BAGIELLA E, OLSEN G, FISCH H. Declining sperm counts in the United States ? A critical review. *J Urol* 1999, **161** : 460-462
- SHARARA FI, SEIFER DB, FLAWS JA. Environmental toxicants and female reproduction. *Fertil Steril* 1998, **70** : 613-622
- SHER ES, XU XM, ADAMS PM, CRAFT CM, STEIN SA. The effects of thyroid hormone level and action in developing brain : are these targets for the actions of polychlorinated biphenyls and dioxins ? *Toxicol Ind Health* 1998, **14** : 121-158
- STEENLAND K, PIACITELLI L, DEDDENS J, FINGERHUT M, CHANG LI. Cancer, heart disease, and diabetes in workers exposed to 2,3,7,8- tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *J Natl Cancer Inst* 1999, **91** : 779-786
- STEGEMAN JJ, HAHN ME, WEISBROD R, WOODIN BR, JOY JS et coll. Induction of cytochrome P4501A1 by aryl hydrocarbon receptor agonists in porcine aorta endothelial cells in culture and cytochrome P4501A1 activity in intact cells. *Mol Pharmacol* 1995, **47** : 296-306
- STEINBERG D, PARTHASARATHY S, CAREW TE, KHOO JC, WITZTUM JL. Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* 1989, **320** : 915-924
- SUSKIND RR. Chloracne, « the hallmark of dioxin intoxication ». *Scand J Work Environ Health* 1985, **11** : 165-171
- TIAN Y, KE S, DENISON MS, RABSON AB, GALLO MA. Ah receptor and NF-kappaB interactions, a potential mechanism for dioxin toxicity. *J Biol Chem* 1999, **274** : 510-515
- TOBOREK M, BARGER SW, MATTSON MP, ESPANDIARI P, ROBERTSON LW, HENNIG B. Exposure to polychlorinated biphenyls causes endothelial cell dysfunction. *J Biochem Toxicol* 1995, **10** : 219-226
- UNKILA M, POHJANVIRTA R, MACDONALD E, TUOMISTO J. Characterization of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-induced brain serotonin metabolism in the rat. *Eur J Pharmacol* 1994, **270** : 157-166

- VANDEN HEUVEL JP, CLARK GC, KOHN MC, TRITSCHER AM, GREENLEE WF et coll. Dioxin-responsive genes : examination of dose-response relationships using quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Cancer Res* 1994, **54** : 62-68
- VENA J, BOFFETTA P, BECHER H, BENN T, BUENO-DE-MESQUITA HB et coll. Exposure to dioxin and nonneoplastic mortality in the expanded IARC international cohort study of phenoxy herbicide and chlorophenol production workers and sprayers. *Environ Health Perspect* 1998 **106** : 645-653
- VOGEL C, DOHR O, ABEL J. Transforming growth factor-beta 1 inhibits TCDD-induced cytochrome P450IA1 expression in human lung cancer A549 cells. *Arch Toxicol* 1994, **68** : 303-307
- WALLER CL, OPREA TI, CHAE K, PARK HK, KORACH KS et coll. Ligand-based identification of environmental estrogens. *Chem Res Toxicol* 1996, **9** : 1240-1248
- WANG F, HOIVIK D, POLLENZ R, SAFE S. Functional and physical interactions between the estrogen receptor Sp1 and nuclear aryl hydrocarbon receptor complexes. *Nucleic Acids Res* 1998, **26** : 3044-3052
- WANNER R, PANTELEYEV A, HENZ BM, ROSENBAACH T. Retinoic acid affects the expression rate of the differentiation-related genes aryl hydrocarbon receptor, ARNT and keratin 4 in proliferative keratinocytes only. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Disease* 1996, **1317** : 105-111
- WEISS C, KOLLURI SK, KIEFER F, GOTTLICHER M. Complementation of Ah receptor deficiency in hepatoma cells : negative feedback regulation and cell cycle control by the Ah receptor. *Exp Cell Res* 1996, **226** : 154-163
- WHITELAW ML, GUSTAFSSON JA, POELLINGER L. Identification of transactivation and repression functions of the dioxin receptor and its basic helix-loop-helix/PAS partner factor Arnt : inducible *versus* constitutive modes of regulation. *Mol Cell Biol* 1994, **14** : 8343-8355
- YANG YG, LEBREC H, BURLESON GR. Effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) on pulmonary influenza virus titer and natural killer (NK) activity in rats. *Fundam Appl Toxicol* 1994, **23** : 125-131
- YANG JZ, FOSTER WG. Continuous exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin inhibits the growth of surgically induced endometriosis in the ovariectomized mouse treated with high dose estradiol. *Toxicol Ind Health*, 1997 **13** : 15-25
- YAO Y, HOFFER A, CHANG CY, PUGA A. Dioxin activates HIV-1 gene expression by an oxidative stress pathway requiring a functional cytochrome P450 CYP1A1 enzyme. *Environ Health Perspect* 1995, **103** : 366-371
- YIN H, LI Y, SUTTER TR. Dioxin-enhanced expression of interleukin-1 beta in human epidermal keratinocytes : potential role in the modulation of immune and inflammatory responses. *Exp Clin Immunogenet* 1994, **11** : 128-135
- YOO BS, JUNG KH, HANA SB, KIM HM. Apoptosis-mediated immunotoxicity of polychlorinated biphenyls (PCBs) in murine splenocytes. *Toxicol Lett* 1997, **91** : 83-89
- ZACHAREWSKI TR, BONDY KL, MCDONELL P, WU ZF. Antiestrogenic effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin on 17 beta-estradiol-induced pS2 expression. *Cancer Res* 1994, **54** : 2707-2713

V

Évaluation des risques

18

Toxicocinétique/toxicodynamie

La toxicocinétique des dioxines a fait l'objet d'une revue par l'IARC (1997) qui a servi de point de départ à ce chapitre. Le lecteur est convié à s'y reporter pour plus de détails. Nous insisterons ici davantage sur les modèles mathématiques qui ont été proposés pour offrir une vue synthétique de cette question et permettre diverses extrapolations utiles à l'évaluation des risques de toxicité de ces produits.

Les dioxines ont un comportement toxicocinétique similaire dans les organismes animaux et humains (chez ces derniers les données concernent à peu près exclusivement la 2,3,7,8-TCDD). Les différences toxicocinétiques entre dioxines et entre espèces semblent provenir surtout d'affinités plus ou moins fortes pour les graisses et de vitesses différentes de métabolisme.

Absorption

L'absorption des dioxines dépend de la voie d'exposition. Elle est limitée par la taille moléculaire et la solubilité dans les graisses du congénère considéré. Elle est par exemple diminuée de moitié, environ, pour les octachlorés par rapport aux tétrachlorés (Van den Berg et coll., 1994). La solubilité des dioxines dans le véhicule d'administration ou leur adsorption sur des matrices environnementales peuvent aussi fortement moduler leur biodisponibilité.

Chez l'adulte ou l'enfant, environ 90 % des doses ingérées sont absorbées. À travers la peau, la 2,3,7,8-TCDD est faiblement absorbée (le millième environ d'une dose appliquée sur la peau est absorbé par heure). Des expositions par inhalation n'ont pas été rapportées, mais il est probable que l'absorption serait complète dans ce cas.

Chez les animaux, l'absorption après ingestion varie entre 40 % (poissons) et 90 % (mammifères). Certaines différences observées entre études sont probablement liées au vecteur d'administration. Les autres voies d'administration (intraveineuse, intrapéritonéale, pulmonaire...) sont efficaces, sauf la voie intramusculaire. L'âge ne semble pas affecter l'absorption intestinale de la 2,3,7,8-TCDD chez le rat.

A

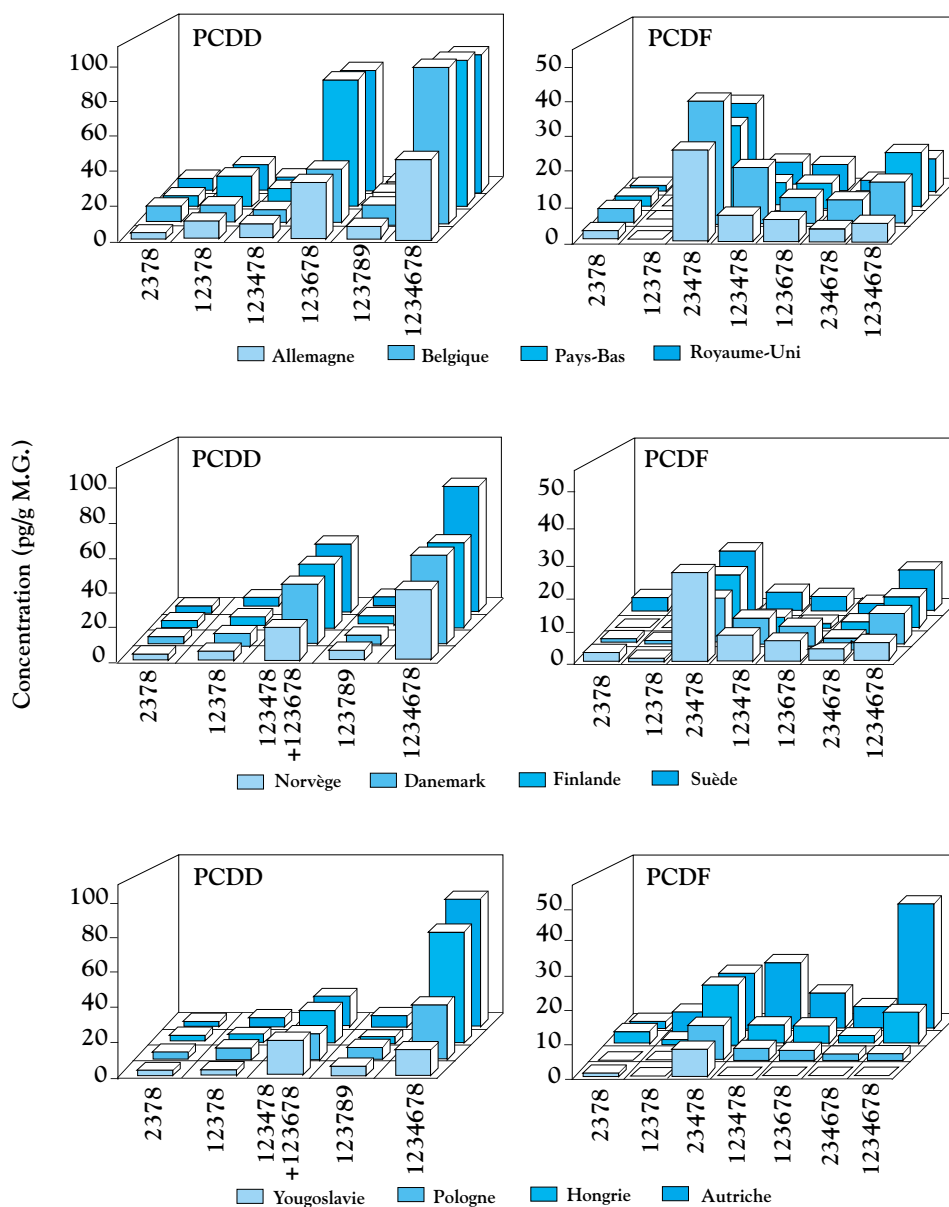
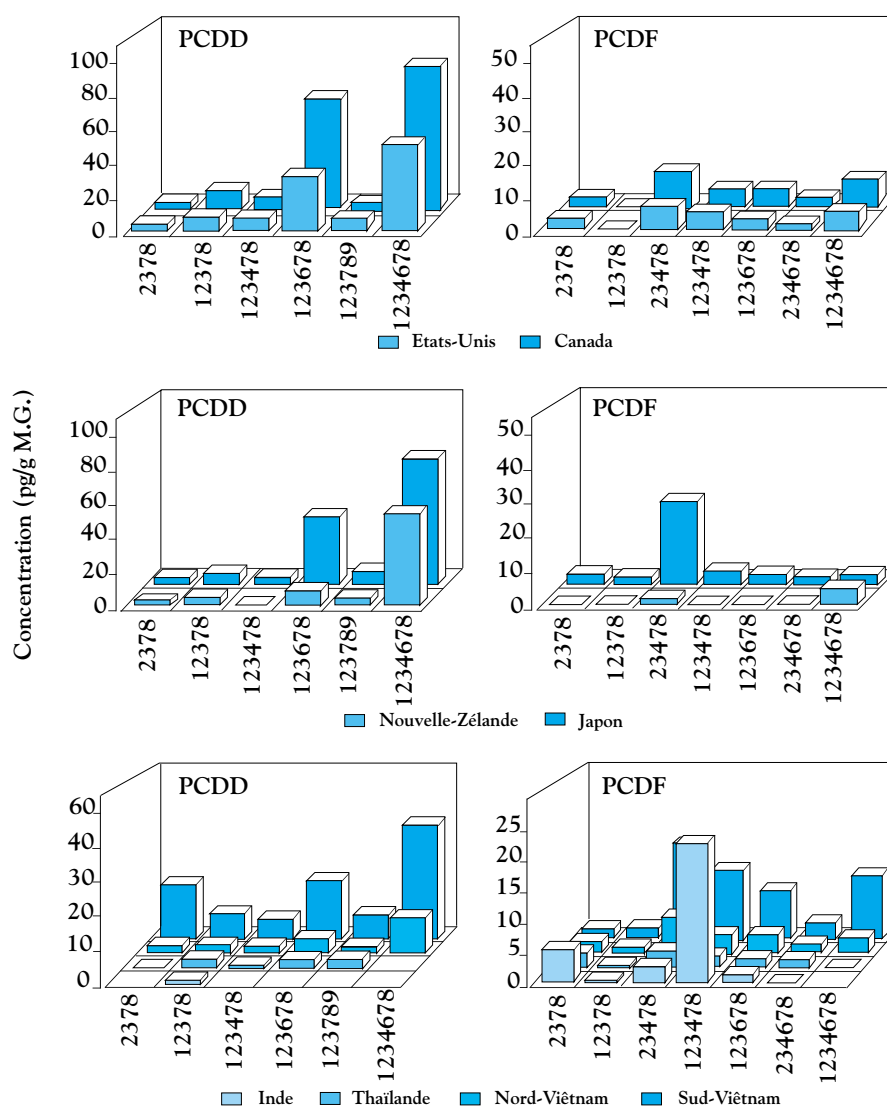


Figure 18.1 : Distribution globale selon les congénères et concentrations des PCDD et PCDF dans le lait humain. (A) en Europe de l'Ouest (haut), Europe du Nord (milieu), Europe centrale (bas) ; (B) Amérique du Nord (haut), Pacifique (milieu), Asie du Sud-Est (bas)

B



Distribution

La distribution se fait en fonction de la teneur en graisses des différents tissus et de leur concentration en cytochrome P450 (CYP), auquel les dioxines se fixent d'autant mieux qu'elles sont plus chlorées.

Chez l'humain, aux concentrations habituellement rencontrées, l'effet de séquestration par les CYP (principalement dans le foie) est nettement moins marqué que chez les animaux (rat en particulier). Pour la 2,3,7,8-TCDD, le 2,3,7,8-TCDF et les congénères les moins substitués, c'est la fraction lipidique des tissus qui détermine la distribution. Les concentrations tissulaires de ces congénères, exprimées en quantité par gramme de graisse dans le tissu concerné, sont donc sensiblement les mêmes. Les concentrations tissulaires approximatives pour un sujet donné peuvent donc être obtenues à l'aide d'une seule mesure (par exemple dans le lait maternel) et de la connaissance des teneurs en lipides des différents tissus (pour revue Van der Molen et coll. 1996). La figure 18.1 donne les concentrations de différents congénères dans le lait de femmes de divers pays (OMS, 1989). L'allaitement diminue le stock de dioxines chez la mère mais le transfère à l'enfant. L'exposition *in utero* est comparativement négligeable d'un point de vue quantitatif (mais peut-être pas d'un point de vue qualitatif). Les congénères les plus substitués sont présents à des concentrations relativement plus élevées dans le foie que dans les autres tissus (si l'on tient compte des teneurs en lipides de ceux-ci), sans que l'importance de ce phénomène sur leur éventuelle toxicité soit connue.

Chez l'animal, et en particulier le rat, il y a accumulation du produit dans le foie lors de l'administration de fortes doses de 2,3,7,8-TCDD. Cet effet dépend de l'espèce et est non-linéaire lorsqu'une induction enzymatique de CYP se produit. À part cet effet, dont l'importance toxicologique est discutée, la distribution est fonction de la teneur en lipides des tissus, comme chez l'humain.

Élimination

Le métabolisme et l'excrétion fécale passive sont les deux voies d'élimination pour ces produits mais la part relative de ces deux processus est difficile à estimer. Le métabolisme conduit à la substitution de chlore par des groupements OH et éventuellement à la formation de dichlorocatéchol (pour la 2,3,7,8-TCDD). Les métabolites sont éliminés dans la bile.

Chez l'humain, l'élimination de la 2,3,7,8-TCDD se fait approximativement selon un processus du premier ordre et la demi-vie apparente dans l'organisme varie entre 2 ans (chez l'enfant) et au moins 30 ans (chez l'adulte âgé). Cette demi-vie dépend fortement de l'âge et de facteurs individuels probablement liés à l'alimentation (indépendamment de l'ingestion de dioxines), à l'adiposité, et à la variabilité du métabolisme d'un individu à l'autre. La détermination de cette demi-vie est difficile car il faudrait suivre de nombreux individus très longtemps pour avoir de bonnes estimations, tout en contrôlant leur apport journalier de 2,3,7,8-TCDD. Il n'y a apparemment pour ce congénère qu'une seule étude expérimentale chez un volontaire humain ayant ingéré

au cours du temps entre 6 et 10 ans, mais le suivi ne s'est fait que sur 5 ans. L'analyse de cohortes exposées professionnellement ou accidentellement requiert diverses hypothèses quant à la dose d'exposition et fait appel, au moins implicitement, à divers modèles d'élimination, tous assez mal validés. Ainsi, des analyses successives de la cohorte de Ranch Hand donnent des demi-vies allant de 5,8 à 9,6 ans (Pirkle et coll., 1989), 10 à 14,1 ans (Wolfe et coll., 1994), 7,6 à 11 ans (Michalek et coll., 1996), 7,7 à 12,3 ans (Thomaseth et Salvan, 1998), et finalement 4,5 à 28 ans (Michalek et Tripathi, 1999). La moyenne estimée varie un peu moins : de 7 à 9,5 ans. Ces analyses souffrent de biais de sélection potentiels, de méthodes statistiques parfois sommaires, et aucune n'est pleinement satisfaisante. L'utilisation d'une moyenne de 8,5 ans (Van der Molen et coll., 1998) reflète mal l'hétérogénéité de la demi-vie dans la population générale. Par contre, le modèle de Van der Molen et coll. (1996) utilise une constante d'élimination de 15,5 ans et cette valeur conduit à des demi-vie apparentes qui reflètent assez bien la variabilité observée dans la population. Pour les autres congénères les données fiables manquent encore plus. Les produits moins substitués semblent être éliminés plus rapidement (demi-vies entre 2 et 7 ans) (Van den Berg et coll., 1994). Pour les plus substitués, les estimations sont très variables, mais ils semblent plus lentement éliminés que la 2,3,7,8-TCDD (Schlatter, 1991 ; Van den Berg et coll., 1994).

Pour les animaux, la demi-vie de la 2,3,7,8-TCDD dans l'organisme est plus courte que chez l'humain (10-30 jours chez la souris et le rat ; 100-130 jours chez la truite ou la perche ; 1 an chez le singe). Les animaux accumulent par conséquent moins de 2,3,7,8-TCDD que l'humain, à exposition égale. Là aussi, les congénères les moins substitués sont le plus rapidement éliminés.

Modèles toxicocinétiques

Plusieurs modèles toxicocinétiques, de structure suffisamment simple et générale pour pouvoir s'appliquer aux différents congénères, ont été développés pour les dioxines. La plupart, cependant, utilisent des paramètres spécifiques de la 2,3,7,8-TCDD. Ces modèles ont été utilisés principalement pour analyser de façon synthétique des ensembles de données animales ou humaines et analyser les mécanismes d'action des dioxines (Kissel et Robarge, 1988 ; Leung et coll., 1988 ; Leung et coll., 1990a et b ; Kohn et coll., 1993 ; Kedderis et coll., 1993 ; Carrier et coll., 1995a et b ; Kohn et coll., 1996 ; Kelley et coll., 1998), pour déterminer prospectivement les risques liés à l'exposition à ces produits (Andersen et coll., 1993 ; Campbell et coll., 1996 ; Van der Molen et coll., 1996 ; Andersen et coll., 1997a et b ; Lawrence et Gobas, 1997), ou pour déterminer rétrospectivement les expositions humaines à la 2,3,7,8-TCDD dans les cohortes de Ranch Hand (Pirkle et coll., 1989 ; Michalek et coll., 1992 ; Thomaseth et Salvan, 1998 ; Van der Molen et coll., 1998 ; Michalek et Tripathi, 1999) et de Seveso (Bois et Eskenazi, 1994).

Des modèles compartimentaux de type classique (Thomas, 1995) ont été utilisés en général pour les analyses de toxicocinétique de la 2,3,7,8-TCDD dans les cohortes humaines (Pirkle et coll., 1989 ; Michalek et coll., 1992 ; Bois et Eskenazi, 1994 ; Campbell et coll., 1996 ; Thomaseth et Salvan, 1998 ; Van der Molen et coll., 1998 ; Michalek et Tripathi, 1999). Un modèle compartimental applicable à plusieurs espèces a été proposé par Carrier et coll. (1995a et b). Ces modèles, relativement simples, requièrent d'être ajustés à des données à l'aide de méthodes statistiques. Les modèles publiés souffrent cependant de divers problèmes méthodologiques. Ainsi, la sélection des sujets biaise potentiellement les études de Thomaseth et Salvan (1998) et de Michalek et Tripathi (1999). Les analyses statistiques sont parfois sommaires comme dans les études de Van der Molen (1998) ou de Michalek et coll. (1998). Par ailleurs, des modèles à un compartiment et à coefficients constants décrivent mal ce que l'on sait de la toxicocinétique des dioxines. Dans ces conditions, il ne faut sans doute pas s'étonner de la dispersion des estimations de la demi-vie de la 2,3,7,8-TCDD pour les cohortes analysées.

Les modèles physiologiques (PBPK) de la toxicocinétique des dioxines sont en principe plus satisfaisants car ils décrivent de façon plus détaillée les mécanismes connus de l'absorption, distribution, métabolisme et excrétion de ces produits. Ces modèles ont été particulièrement utilisés aux États-Unis. Plusieurs décrivent avec différents degrés de finesse la toxicocinétique de la 2,3,7,8-TCDD chez le rat (Leung et coll., 1990a ; Kohn et coll., 1993, 1996 ; Andersen et coll., 1997a et b ; Wang et coll., 1997) ou la souris (Leung et coll., 1988). D'autres congénères ont été également étudiés (2-iodo-3,7,8-trichlorodibenzo-*p*-dioxine par Leung et coll., 1990b ; tétrabromodibenzo-*p*-dioxine par Kedderis et coll., 1993). Quelques modèles s'intéressent à d'autres espèces animales comme la truite (Nichols et coll., 1998). Deux au moins décrivent exclusivement la toxicocinétique de la 2,3,7,8-TCDD chez l'humain (Kissel et Robarge, 1988 ; Van der Molen et coll., 1996). D'autres enfin tentent les transpositions interespèces (Lawrence et Gobas, 1997). Ces modèles sont souvent très complexes. Ils font de nombreuses hypothèses difficilement vérifiables. Ils sont en général mal calibrés (validés) et donc peu fiables. Le but de ces modèles est en partie de mieux transposer à l'humain les résultats obtenus chez l'animal (en s'affranchissant de facteurs de sécurité arbitraires). Il serait souhaitable d'utiliser un modèle PBPK pour une évaluation détaillée des risques de la 2,3,7,8-TCDD, à condition que ce modèle soit suffisamment bien calibré.

S'il s'agit de prédire simplement l'accumulation des dioxines chez l'humain lors d'exposition à court ou long terme, le modèle de Van der Molen et coll. (1996) est probablement le plus approprié. Ce modèle est relativement simple et ne prédit pas les effets toxiques. Il est adapté à la prédiction de la toxicocinétique des produits lipophiles persistants chez l'homme ou la femme. Il a été partiellement calibré sur la base de données hollandaises et allemandes sur la

toxicocinétique de la 2,3,7,8-TCDD chez l'humain. Afin d'illustrer son utilisation, nous avons codé les équations du modèle à l'aide du programme MCSim (Bois et Maszle, 1997). La figure 18.2 présente schématiquement ce modèle.

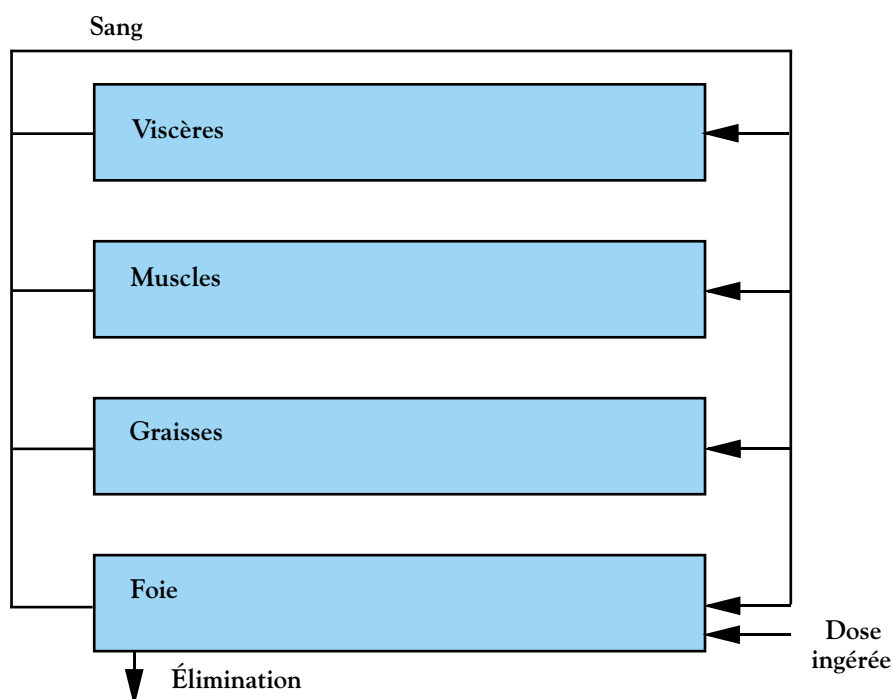


Figure 18.2 : Représentation schématique du modèle toxicocinétique de Van der Molen pour la 2,3,7,8-TCDD. Les paramètres du modèle incluent les volumes, les flux sanguins, les coefficients de partition de chaque compartiment et la constante d'élimination du produit

La formulation originale considère tous ces compartiments comme étant à l'équilibre de façon instantanée. Nous avons opté pour une formulation dynamique, plus précise sur de courtes échelles de temps, puisque la simulation de pic d'exposition nous intéresse. La 2,3,7,8-TCDD se répartit entre le sang, les graisses, les muscles et la peau et les viscères. Seule l'exposition par ingestion est modélisée. Le volume des compartiments évolue au cours du temps avec l'âge des individus et de façon différente entre les hommes et les femmes (figures 18.3 et 18.4).

Pour simuler l'exposition de base des populations nous avons repris la courbe d'exposition donnée par van der Molen (figure 18.5).

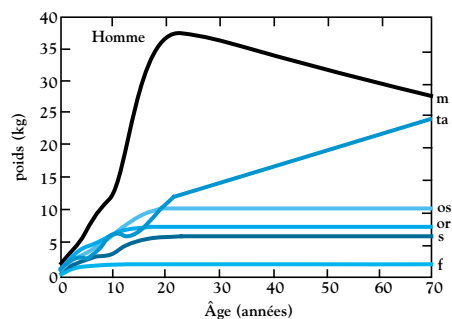


Figure 18.3 : Poids de tous les compartiments chez l'homme
m (muscle), ta (tissu adipeux), os (tissu osseux), or (autres organes), s (sang), f (foie)

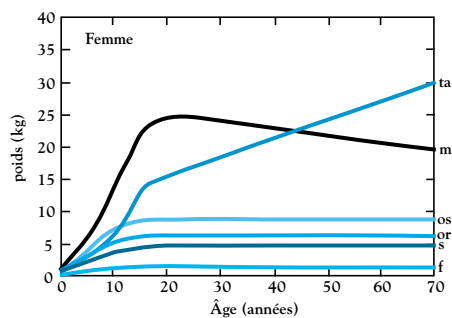


Figure 18.4 : Poids de tous les compartiments chez la femme
m (muscle), ta (tissu adipeux), os (tissu osseux), or (autres organes), s (sang), f (foie)

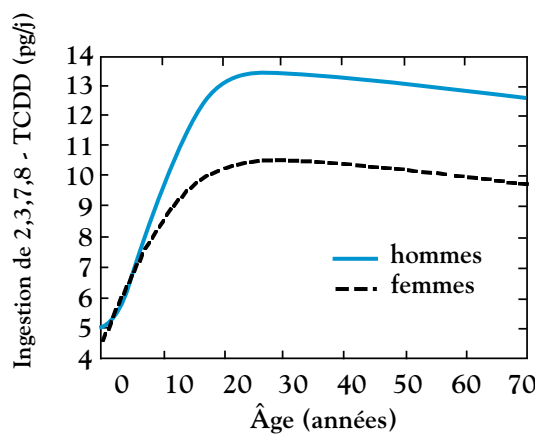


Figure 18.5 : Exposition par ingestion à la 2,3,7,8-TCDD, basée sur une étude transversale de la population hollandaise

Les expositions françaises devraient être similaires. La figure 18.6 présente les résultats de la simulation de quatre scénarios d'exposition, pour une femme exposée à la 2,3,7,8-TCDD sa vie durant. La concentration sanguine de 2,3,7,8-TCDD a été suivie entre 7 et 77 ans. Le scénario I correspond à celui décrit figure 18.5 (environ 10 pg/j après l'âge de 20 ans). La courbe plonge lors de la puberté pour remonter ensuite constamment vers un plateau (jamais atteint au cours d'une vie humaine). Le scénario II ajoute au précédent un épisode de contamination correspondant à l'ingestion de 100 pg de 2,3,7,8-TCDD deux fois par semaine, durant 3 semaines, à l'âge de 35 ans (une telle exposition aurait pu être rencontrée par les personnes fortement exposées à l'occasion de l'incident rapporté en Belgique par Bernard et coll. (1999)). Les deux courbes sont visuellement indissociables ; la différence est en moyenne de 0,2 % et au plus de 0,3 %. On peut donc considérer que l'impact d'une contamination passagère sur la concentration de 2,3,7,8-TCDD dans le corps, et dans le cadre de ces scénarios, est négligeable. Pour le scénario III l'exposition journalière a été divisée par 10 (soit environ 1 pg/j après l'âge de 20 ans). Le scénario IV ajoute la même contamination passagère que dans le scénario II. Ici encore, les deux courbes sont pratiquement superposées. La différence est en moyenne de 3 % et au plus de 5 %. Il est logique que des personnes les moins exposées d'habitude subissent une augmentation relative supérieure pour la même surexposition. Il est donc probable que l'impact des surexpositions simulées ici est négligeable sur le risque de toxicité chronique par la 2,3,7,8-TCDD. Ces simulations sont sommaires et il serait bon d'avoir une idée de leur précision ; ce qui serait faisable par des méthodes stochastiques (Bois, 1999). Néanmoins, le modèle de Van der Molen est raisonnable et relativement facile à utiliser pour évaluer divers scénarios de contamination.

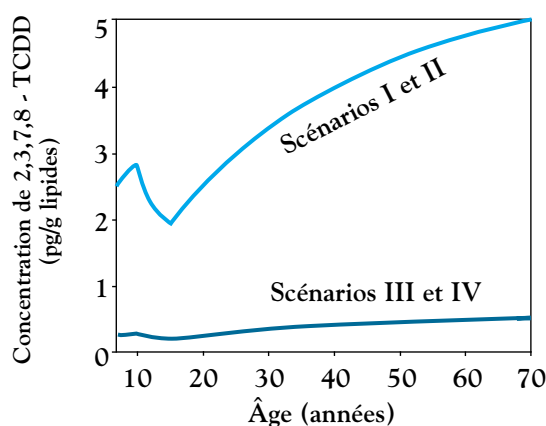


Figure 18.6 : Prédictions du modèle de Van der Molen pour la concentration de 2,3,7,8-TCDD dans les lipides sanguins d'une femme exposée selon divers scénarios

Modèles toxicodynamiques

Plusieurs modèles ont également été développés pour tester la cohérence de diverses hypothèses sur les mécanismes de toxicité de la 2,3,7,8-TCDD chez l'animal. On a aussi tenté de tirer de ces modèles des conclusions qualitatives sur la forme de la relation dose-réponse pour ce congénère, ainsi que des estimations quantitatives de ses effets toxiques. Dans ce cas, la finalité de l'exercice est d'obtenir une estimation de la relation dose-réponse transposable à l'humain. Notons que, à notre connaissance, cet exercice n'a jamais été réellement mené à son terme, peut-être par prudence au regard du nombre d'hypothèses qu'il requiert. Ces modèles, lorsqu'ils décrivent des effets systémiques, sur l'organisme entier, sont souvent couplés à des modèles toxicocinétiques (Leung et coll., 1990a ; Kedderis et coll., 1993 ; Andersen et coll., 1993, 1997a et b ; Kohn et coll., 1993, 1994, 1996 ; Conolly et Andersen, 1997). En revanche, certains prennent appui sur des mesures à des étapes intermédiaires du processus toxicocinétique/toxicodynamique et ne nécessitent pas un tel couplage (Portier et coll., 1993 et 1996).

Parmi ces modèles, un certain nombre se sont attachés à décrire un des effets les plus proéminents de la 2,3,7,8-TCDD : l'induction de CYP et son impact sur la distribution de ce congénère dans l'organisme animal (Leung et coll., 1990a ; Carrier et coll., 1995a et b ; Andersen et coll., 1993, 1997a et b). Kedderis et coll. (1993) se sont intéressés à cette question dans le cas de la tétrabromodibenzo-*p*-dioxine. Ces modèles donnent tous des résultats similaires et sont capables de simuler raisonnablement bien les données animales qui ont servi à les construire. Il est dommage qu'aucune mesure des incertitudes attachées à leurs prédictions ne soit donnée et il est difficile, dans ces conditions, de savoir quel crédit leur accorder. S'il était évident que la dose effective pour la 2,3,7,8-TCDD est bien mesurée par l'induction enzymatique qu'elle entraîne, ce dont les données et l'analyse font douter (Maronpot et coll., 1993), alors ces modèles pourraient être utilisés comme étape intermédiaire dans un calcul de risque (en amont d'un modèle d'effet liant induction et toxicité). Malheureusement, leur transposition à l'humain, ou même à d'autres ensembles de données que ceux sur lesquels ils ont été bâtis, est pour le moins problématique. Cela n'a pas empêché Conolly et Andersen de proposer un modèle liant l'induction de CYP à la promotion par la 2,3,7,8-TCDD de tumeurs induites par la diéthylnitrosamine chez le rat (Conolly et Andersen, 1997). L'exercice est audacieux et mériterait d'être mieux validé pour pouvoir être pris sérieusement en considération pour une évaluation quantitative du risque pour les populations humaines (Portier et Ye, 1998). Portier et coll. (1996) arrivent d'ailleurs à des conclusions différentes (et notent un effet initiateur indirect de la 2,3,7,8-TCDD) sur la base des mêmes données, à l'aide du modèle de cancérogenèse de Moolgavkar et Venzon (1979).

D'autres modèles se sont intéressés à lier des étapes intermédiaires et divers aspects de l'action de la 2,3,7,8-TCDD. Ainsi, Kelley et coll. (1998) utilisent des modèles multicompartimentaux classiques pour quantifier l'effet de la 2,3,7,8-TCDD sur le devenir de la vitamine A chez le rat, Kohn et coll. (1993) prédisent l'induction de CYP et l'effet de la 2,3,7,8-TCDD sur les récepteurs Ah, œstrogéniques et EGF chez le rat, sur la base de données de Tritscher et coll. (1992). Le modèle est légèrement étendu par Kohn et coll. (1994) pour simuler explicitement la transcription du gène de CYP1A1. Une des conclusions de ces travaux est que la relation entre les concentrations intracellulaires de CYP1A1 et de 2,3,7,8-TCDD est linéaire, sans seuil, aux faibles doses. Ces conclusions sont reprises par Portier et coll. (1993) et étendues à l'effet sur l'EGF, sur la base de modèles plus simples et potentiellement plus robustes. Une série d'extensions supplémentaires permet aux auteurs de décrire l'effet de la 2,3,7,8-TCDD sur le niveau d'hormones thyroïdiennes circulantes chez le rat (Kohn et coll., 1996), ceci afin de mieux décrire l'apparition de cancers de la thyroïde constatée après exposition de ces animaux à ce congénère (NTP, 1982). Le modèle souffre cependant des mêmes problèmes que les précédents, même si son calibrage à l'aide de données expérimentales est de meilleure qualité.

En conclusion, la teneur en graisses des différents tissus et leur concentration en cytochrome P450 (CYP) conditionne la distribution des dioxines. Dans l'espèce humaine, l'effet de séquestration de la 2,3,7,8-TCDD par les CYP n'est sans doute pas important aux concentrations habituellement rencontrées et c'est la fraction lipidique des tissus qui détermine sa distribution. Durant la lactation, le stock de 2,3,7,8-TCDD des mères diminue, mais celui-ci est transféré à l'enfant. Le métabolisme des dioxines est le facteur limitant de leur élimination (très lente). Les congénères les moins substitués sont les plus rapidement éliminés.

Plusieurs modèles toxicocinétiques ont été développés pour analyser quantitativement des données animales de toxicologie moléculaire visant à élucider les mécanismes d'action, et pour déterminer rétrospectivement les expositions humaines et les demi-vies de tous les congénères dioxines. Chez l'humain, la demi-vie d'élimination est d'environ 8,5 ans pour les cohortes professionnelles et de 15,5 ans pour la population générale (toutes tranches d'âge confondues). Cette demi-vie varie fortement entre individus (par exemple en fonction de leur poids corporel), et augmente avec l'âge ; certains individus présentent des demi-vies d'élimination de la 2,3,7,8-TCDD allant jusqu'à 30 ans. L'homme accumule au total beaucoup plus la 2,3,7,8-TCDD que ne le fait l'animal. Les données animales indiquent en effet que la demi-vie de la 2,3,7,8-TCDD dans l'organisme est seulement de 10 à 30 jours chez la souris et le rat, et de 1 an environ chez le singe.

Des modèles toxicocinétiques physiologiques ont été utilisés pour simuler et prédire l'effet de la 2,3,7,8-TCDD sur l'induction de CYP, l'expression du TGF

β , (*transforming growth factor*) le métabolisme de l'œstradiol, le devenir de la vitamine A, ou l'action sur les hormones thyroïdiennes. Ces modèles décrivent de façon plus détaillée les mécanismes connus de l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'excrétion des dioxines. Certains modèles comme le modèle de Van der Molen permettent une bonne prédiction de l'accumulation des dioxines chez l'homme. Il est possible d'utiliser de tels modèles pour des évaluations détaillées des risques de la 2,3,7,8-TCDD, par exemple dans le cas de contaminations accidentelles. Sur le plan des effets, l'induction de CYP1A1 et de CYP1A2 (ou la réduction de l'EGF, *epidermal growth factor*) est compatible avec un modèle sans seuil. Cependant, l'effet cancérogène promoteur de la 2,3,7,8-TCDD dans le foie de rat ne dépend sans doute pas seulement de l'action *via* les CYP et la relation dose-réponse pour cet effet est potentiellement non linéaire. Il est donc difficile, actuellement, de décider de l'existence d'un seuil dans les effets cancérogènes de la 2,3,7,8-TCDD.

La toxicocinétique des dioxines explique partiellement les différences de toxicité entre espèces et indique une susceptibilité accrue pour l'humain en raison de la durée de vie et de la charge corporelle. Au regard des incertitudes sur la signification de l'accumulation des dioxines dans le foie pour certaines espèces, il n'est pas déraisonnable de baser les estimations de risques sur les charges corporelles. La charge corporelle, chez l'homme, dépend fortement de la demi-vie du produit considéré et les études récentes montrent une grande variabilité de ce paramètre dans la population. Il est donc nécessaire de tenir compte, dans l'évaluation des risques, de l'existence de populations sensibles aux effets des dioxines.

BIBLIOGRAPHIE

- ANDERSEN ME, MILLS JJ, GARGAS ML, KEDDERIS L, BIRNBAUM LS et coll. Modeling receptor-mediated processes with dioxin : implications for pharmacokinetics and risk assessment. *Risk Anal* 1993, **13** : 25-36
- ANDERSEN ME, EKLUND CR, MILLS JJ, BARTON HA, BIRNBAUM LS. A multicompartment geometric model of the liver in relation to regional induction of cytochrome P450s. *Toxicol Appl Pharmacol* 1997a, **144** : 135-144
- ANDERSEN ME, BIRNBAUM LS, BARTON HA, EKLUND CR. Regional hepatic CYP1A1 and CYP1A2 induction with 2,3,7,8- tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin evaluated with a multicompartment geometric model of hepatic zonation. *Toxicol Appl Pharmacol* 1997b, **144** : 145-155
- BERNARD A, HERMANS C, BROECKAERT F, DE POORTER G, DE COCK A, HOUINS G. Food contamination by PCBs and dioxins. *Nature* 1999, **401** : 231-232
- BOIS FY, ESKENAZI B. Possible risk of endometriosis for Seveso (Italy) residents - An assessment of exposure levels. *Environ Health Perspect* 1994, **102** : 476-477
- BOIS FY, MASZLE D. MCSim : a simulation program. *J Stat Software* 1997, **2** (9)
294 <http://www.stat.ucla.edu/jss> (also available at <ftp://sparky.berkeley.edu/users/fbois>)

BOIS FY. Analysis of PBPK models for risk characterization. *Ann NY Acad Sci* 1999, **895** : 317-337

CAMPBELL CA, TESCHKE K, BERT J, QUINTANA PJE, HERTZMAN C. Pharmacokinetic model of dioxin and furan levels in adipose tissue from sawmill work involving chlorophenate fungicides. *Chemosphere* 1996, **33** : 2373-2381

CARRIER G, BRUNET RC, BRODEUR J. Modeling of the toxicokinetics of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans in mammals, including humans - I. Nonlinear distribution of PCDD/PCDF body burden between liver and adipose tissues. *Toxicol Appl Pharmacol* 1995a, **131** : 253-266

CARRIER G, BRUNET RC, BRODEUR J. Modeling of the toxicokinetics of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans in mammals, including humans - II. Kinetics of absorption and disposition of PCDDs/PCDFs. *Toxicol Appl Pharmacol* 1995b, **131** : 267-276

CONOLLY RB, ANDERSEN ME. Hepatic foci in rats after diethylnitrosamine initiation and 2,3,7,8- tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin promotion : evaluation of a quantitative two- cell model and of CYP 1A1/1A2 as a dosimeter. *Toxicol Appl Pharmacol* 1997, **146** : 281-293

IARC (International agency for research on cancer). *Polychlorinated Dibenzo-para-dioxins and Polychlorinated Dibenzofurans*. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. 1997, **69**, World Health Organization

KEDDERIS LB, MILLS JJ, ANDERSEN ME, BIRNBAUM LS. A physiologically based pharmacokinetic model for 2,3,7,8- tetrabromodibenzo-*p*-dioxin (TBDD) in the rat : tissue distribution and CYP1A induction. *Toxicol Appl Pharmacol* 1993, **121** : 87-98

KELLEY SK, NILSSON CB, GREEN MH, GREEN JB, HAKANSSON H. Use of model-based compartmental analysis to study effects of 2,3,7,8- tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin on vitamin a kinetics in rats. *Toxicol Sci* 1998, **44** : 1-13

KISSEL JC, ROBARGE GM. Assessment of the elimination of 2,3,7,8- TCDD from humans with a physiologically based pharmacokinetic model. *Chemosphere* 1988, **17** : 2017-2027

KOHN MC, LUCIER GW, CLARK GC, SEWALL C, TRITSCHER AM, PORTIER CJ. A mechanistic model of effects of dioxin on gene expression in the rat liver. *Toxicol Appl Pharmacol* 1993, **120** : 138-154

KOHN MC, LUCIER GW, PORTIER CJ. The importance of biological realism in dioxin risk assessment models. *Risk Anal* 1994, **14** : 993-1000

KOHN MC, SEWALL C, LUCIER GW, PORTIER CJ. A mechanistic model of effects of dioxin on thyroid hormones in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol* 1996, **165** : 29-48

LAWRENCE GS, GOBAS FA. A pharmacokinetic analysis of interspecies extrapolation in dioxin risk assessment. *Chemosphere* 1997, **35** : 427-452

LEUNG HW, KU RH, PAUSTENBACH DJ, ANDERSEN ME. A physiologically based pharmacokinetic model for 2,3,7,8- tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in C57BL/6J and DBA/2J mice. *Toxicol Lett* 1988, **42** : 15-28

- LEUNG HW, PAUSTENBACH DJ, MURRAY FJ, ANDERSEN ME. A physiological pharmacokinetic description of the tissue distribution and enzyme-inducing properties of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol* 1990a, **103** : 399-410
- LEUNG HW, POLAND A, PAUSTENBACH DJ, MURRAY FJ, ANDERSEN ME. Pharmacokinetics of [125I]-2-iodo-3,7,8-trichlorodibenzo-*p*-dioxin in mice : analysis with a physiological modeling approach. *Toxicol Appl Pharmacol* 1990b, **103** : 411-419
- MARONPOT RR, FOLEY JF, TAKAHASHI K, GOLDSWORTHY T, CLARK G et coll. Dose response for TCDD promotion of hepatocarcinogenesis in rats initiated with DEN : histologic, biochemical, and cell proliferation endpoints. *Environ Health Perspect* 1993, **101** : 634-642
- MICHALEK JE, TRIPATHI RC, CAUDILL SP, PIRKLE JL. Investigation of TCDD half-life heterogeneity in veterans of Operation Ranch Hand [published erratum appears in *J Toxicol Environ Health* 1992, **36** : 431]. *J Toxicol Environ Health* 1992, **35** : 29-38
- MICHALEK JE, PIRKLE JL, CAUDILL SP, TRIPATHI RC, PATERSON DG, NEEDHAM LL. Pharmacokinetics of TCDD in veterans of operation Ranch Hand : 10-year follow-up. *J Toxicol Environ Health* 1996, **47** : 209-220
- MICHALEK JE, TRIPATHI RC. Pharmacokinetics of TCDD in veterans of operation Ranch Hand : 15-year follow-up. *J Toxicol Environ Health* 1999, **57** : 369-378
- MOOLGAVKAR SH, VENZON J. Two-events models for carcinogenesis : incidence curves for childhood and adult tumors. *Math Biosci* 1979, **47** : 55-77
- NICHOLS JW, JENSEN KM, TIETGE JE, JOHNSON RD. Physiologically Based Toxicokinetic model for maternal transfer of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in Brook Trout (*Salvelinus fontinalis*). *Environ Toxicol Chem* 1998, **17** : 2422-2435
- NTP (National Toxicology Program). *Carcinogenesis Bioassay of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in Osborne-Mendel Rats and B6C3F1 Mice*. National Toxicology Program Technical Report n° 209. Research Triangle Park, NC, 1982
- OMS (Organisation Mondiale de la Santé). Levels of PCBs, PCDDs, and PCDFs in breast milk. *Environmental Health Series*, n° 34 (YRJÄNHEIKKI EJ, Ed), 1989, World Health Organization - Regional Office for Europe
- PIRKLE JL, WOLFE WH, PATTERSON DG, NEEDHAM LL, MICHALEK JE et coll. Estimates of the half-life of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in Vietnam Veterans of Operation Ranch Hand. *J Toxicol Environ Health* 1989, **27** : 165-171
- PORTIER C, TRITSCHER A, KOHN M, SEWALL C, CLARK G et coll. Ligand/receptor binding for 2,3,7,8-TCDD : implications for risk assessment. *Fundam Appl Toxicol* 1993, **20** : 48-56
- PORTIER CJ, SHERMAN CD, KOHN M, EDLER L, KOPP-SCHNEIDER A et coll. Modeling the number and size of hepatic focal lesions following exposure to 2,3,7,8-TCDD. *Toxicol Appl Pharmacol* 1996, **138** : 20-30
- PORTIER C, YE F. U-shaped dose-response curves for carcinogens. *Human Exp Toxicol* 1998, **17** : 705-707

SCHLATTER C. Data on kinetics of PCDDs and PCDFs as a prerequisite for human risk assessment. In : *Biological basis for risk assessments of dioxins and related compounds*. Branbury Report 35. Cold Spring Harbor. GALLO M, SCHEUPLEIN R, VANDER HEIJDEN K, Eds. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1991 : 215-228

THOMAS G, SANDOUK P, GIRRE C, SCHERRMANN JM. Toxicocinétique des substances chimiques. In : *Encyclopédie Médico-Chirurgicale, Toxicologie-Pathologie Professionnelle*. Editions Techniques, 1995 : 16-001-A-20

THOMASETH K, SALVAN A. Estimation of occupational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin using a minimal physiologic toxicokinetic model. *Environ Health Perspect* 1998, **106** : 743-753

TRITSCHER AM, GOLDSTEIN JA, PORTIER CJ, MCCOY Z, CLARK GC, LUCIER GW. Dose-response relationships for chronic exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in a rat tumor promotion model : quantification and immunolocalization of CYP1A1 and CYP1A2 in the liver. *Cancer Res* 1992, **52** : 3436-3442

VAN DEN BERG M, DE JONGH J, POIGER H, OLSON JR. The toxicokinetics and metabolism of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins (PCDDs) and dibenzofurans (PCDFs) and their relevance for toxicity. *Crit Rev Toxicol* 1994, **24** : 1-74

VAN DER MOLEN GW, KOOIJMAN SALM, SLOB W. A generic toxicokinetic model for persistent lipophilic compounds in humans : an application to TCDD. *Fundam Appl Toxicol* 1996, **31** : 83-94

VAN DER MOLEN GW, KOOIJMAN SA, MICHALEK JE, SLOB W. The estimation of elimination rates of persistent compounds : a re-analysis of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin levels in Vietnam veterans. *Chemosphere* 1998, **37** : 1833-1844

WANG X, SANTOSTEFANO MJ, EVANS MV, RICHARDSON VM, DILIBERTO JJ, BIRNBAUM LS. Determination of parameters responsible for pharmacokinetic behavior of TCDD in female Sprague-Dawley rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 1997, **147** : 151-168

WOLFE WH, MICHALEK JE, MINER JC, PIRKLE JR, CAUDILL SP et coll. Determinants of TCDD-half-life in veterans of operation Ranch Hand : 10-year follow-up. *J Toxicol Environ Health* 1994, **41** : 481-488

19

Évaluation des risques : principes et démarches

Les principes généraux de l'évaluation du risque dioxine retenus dans ce texte s'appuient sur la démarche proposée par l'Académie des sciences des États-Unis (*National research council : Committee on the institutional means for the assessment of risks to public health*, 1983). L'un des points clés de la démarche est de bien différencier et de séparer l'évaluation du risque de sa gestion, entendue ici comme le processus de prise de décision, qui doit rester de la responsabilité du décideur, et non de celle du professionnel appelé à décrire les effets d'une exposition environnementale. Ceci permet en principe d'éviter que les hypothèses nécessairement faites aux différentes étapes du processus de l'évaluation des risques ne soient influencées dans un sens qui les rendent plus faciles à gérer par le décideur. Quatre étapes sont classiquement distinguées (figure 19.1) :

- l'évaluation du potentiel dangereux (*hazard assessment*) de l'agent à étudier, indépendamment de la probabilité de réalisation du risque de voir se manifester ces effets néfastes ;
- l'estimation des expositions (*exposure assessment*) où les populations susceptibles d'être ou d'avoir été exposées sont décrites et quantifiées, groupe par groupe ;
- l'estimation de la relation dose-réponse (*dose-response assessment*) ou exposition-effet ;
- enfin, l'étape de synthèse, appelée caractérisation du risque (*risk characterization*) permet de décrire, pour chaque circonstance d'exposition de chacun des groupes exposés, la probabilité d'apparition des effets néfastes évoqués.

Les résultats attendus de la démarche s'inscrivent dans deux catégories d'objectifs. On peut s'intéresser à l'impact des expositions passées et actuelles sur la santé publique d'une part. D'autre part, la démarche permet de fonder des valeurs de référence à des fins de prévention, quelle que soit l'appellation de ces valeurs (normes, valeurs-guides, etc.).

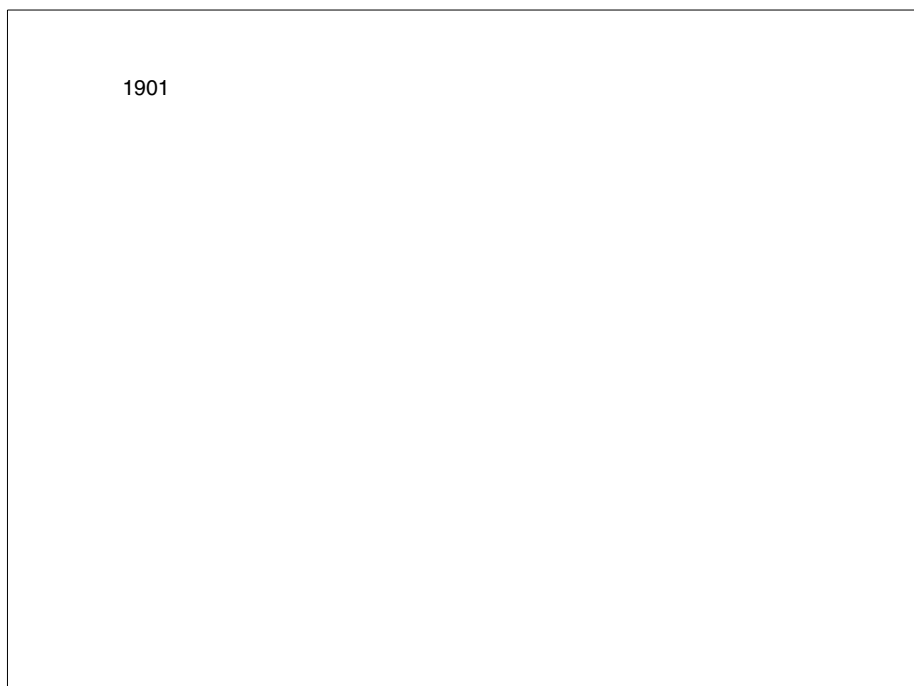


Figure 19.1 : Démarche d'évaluation du risque

Estimation de la relation dose-réponse

On retient ici les termes de relation dose-réponse (RDR), dans la mesure où l'ensemble des manifestations possibles de l'action des dioxines va être examiné, sans *a priori* sur ce qui sera retenu comme effet(s) (*outcome*) critique(s).

Estimer la relation dose-réponse pour divers effets, cancers ou autres permet, au vu des données disponibles, notamment pour ce qui concerne le mode d'action, de déterminer le type d'approche pertinent pour estimer les risques aux niveaux d'expositions des populations examinées. Sur un plan quantitatif, la RDR permet d'estimer l'ampleur de l'effet attendu pour un niveau de dose donné.

RDR à faible dose et le risque

300 Du point de vue de la santé publique, ce sont les faibles expositions aux dioxines et les faibles doses qui en découlent qui sont importantes, puisque chacun y est soumis. Des accidents de l'ampleur de celui de Seveso ou les expositions très élevées de travailleurs ne sont en principe plus une réelle menace dans notre pays à l'heure actuelle, du fait notamment des changements dans les produits fabriqués et dans les procédés industriels. Or les

données disponibles pour la plupart des manifestations toxiques des dioxines dont la démonstration fait consensus ont été obtenues pour des doses élevées. Pour estimer le risque, il va être nécessaire d'extrapoler des fortes vers les faibles doses. Schématiquement, la relation dose-réponse a trois allures possibles (figure 19.2). L'une présente un seuil d'action (la relation sublinéaire), mais pas les deux autres.

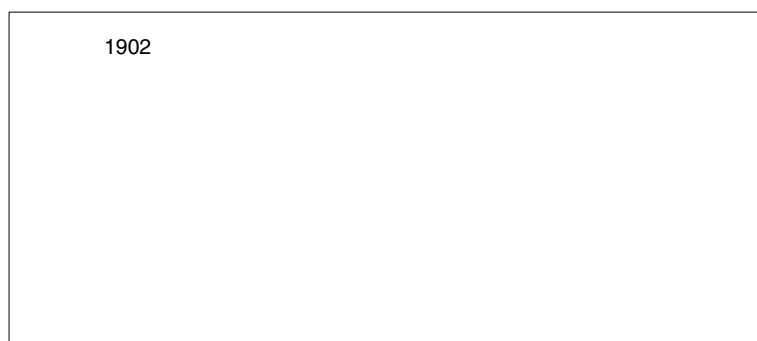


Figure 19.2 : Allures possibles de la relation dose-réponse à faible dose

Détermination des doses « acceptables » ou « virtuellement sûres »

Pour estimer les risques d'une faible dose donnée, deux types d'approches sont classiquement envisageables selon que l'on considère que le risque étudié est de nature stochastique ou déterministe. Les effets déterministes sont ceux dont la gravité est fonction de l'exposition. Un exemple simple est celui des brûlures, quelle qu'en soit la cause : chacun en a fait l'expérience et expérimenté qu'il existe bien dans ce cas un seuil d'innocuité. Ce type d'effet a aussi pour caractéristique de survenir à relativement forte dose. Les effets stochastiques sont ceux dont la fréquence, mais non la gravité, est fonction de l'exposition. Ces effets surviennent sans seuil. En d'autres termes, on admet qu'il n'existe pas de dose, si faible soit-elle, à risque nul. Les cancers en constituent un exemple prototypique. Ce sont les cancérogènes qui agissent par atteinte du matériel génétique (mutation ou altération fonctionnelle des chromosomes) que l'on classe dans cette catégorie. Dans ce cas, on cherchera à estimer un risque considéré comme « acceptable ».

Effets déterministes

L'approche déterministe, parfois appelée « méthode toxicologique » est très largement utilisée depuis des décennies. On cherche à déterminer un seuil d'innocuité et à prendre une marge de prudence pour être raisonnablement assuré que la dose de référence retenue protège bien la totalité de la population susceptible d'être exposée, phénomènes de sensibilisation allergique exclus. Elle a pour principe d'appliquer à la dose expérimentale la plus faible dont on dispose (Dose minimale entraînant un effet (nocif) observé (DME(N)O) ou

Lowest (adverse) observed effect level (LO(A)EL) des Anglo-Saxons), une série de facteurs de « sécurité » ou d'« incertitude », aboutissant à un niveau de dose (« dose de référence » ou DRf) dont on est raisonnablement sûr qu'il ne produira pas d'effet. En pratique, on applique le plus souvent à la DMEO un facteur 10 (FI_1) pour obtenir une Dose sans effet (nocif) observé (DES(N)O) ou *No observed (adverse) effect level* (NO(A)EL). On applique à la DSEO un deuxième facteur d'incertitude (FI_2) pour tenir compte de la variabilité intra-espèce. Enfin, un troisième facteur d'incertitude (FI_3) est utilisé pour tenir compte de la variabilité interespèce. On peut décider d'appliquer au cas par cas d'autres facteurs d'incertitude, parce que l'on dérive une dose de référence chronique à partir de données d'exposition subchroniques, ou bien parce que les données d'exposition sont de mauvaise qualité, etc. On les appelle parfois « facteurs de modification ». Au total, on obtient :

$$\text{Dose de référence (DRf)} = \frac{DMEO}{FI_1 \times FI_2 \times FI_3 \times \dots \times FI_n}$$

Dans certains cas, la DSEO est estimée directement à partir des données expérimentales. On retient la DSEO la plus forte parmi les données disponibles pour un effet particulier. L'application du FI_1 n'est plus nécessaire.

Quelle que soit la méthode, la valeur exacte du seuil n'est pas connue (figure 19.3). Dans cette figure, les points expérimentaux représentent la proportion d'animaux porteurs d'une tumeur dans chacun des groupes de doses. Les « vraies » DSEO et DMEO peuvent se situer n'importe où de part et d'autre de la dose zéro pour la première, entre cette dernière et la DMEO apparente pour la seconde. Dans l'intitulé des DMEO et DSEO figure le mot « observé ». Il s'agit là d'une précaution portant à la fois sur la puissance statistique des études expérimentales (les protocoles standards permettent au mieux de mettre en évidence des excès de risque de 10 %) et plus qualitativement sur le fait que l'on ne trouve... que ce l'on cherche. De même, dans

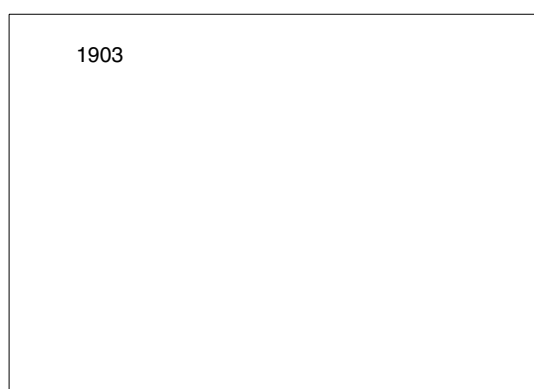


Figure 19.3 : Détermination de la dose sans effet observé (DSEO ou NOEL, *no observed effect level*) et de la dose minimale entraînant un effet observé (DMEO ou LOEL, *lowest observed effect level*)

l'intitulé des DMENO ou DSENO, l'adjectif « nocif » renvoie à la discussion sur la mise en évidence du potentiel dangereux.

Parfois, lorsque la qualité des données est jugée peu satisfaisante, on applique un FI supplémentaire. Le plus souvent, chacun des FI est de 10, choix qui est fondé sur une série d'observations (Pieters et coll., 1998 ; Renwick et Lazarus, 1998). Cette approche, d'un point de vue pragmatique, a fait la preuve de son efficacité au cours des dernières décennies, puisqu'elle ne semble pas avoir causé de dommages répertoriés. Parmi ses autres avantages, citons sa facilité de mise en œuvre et son côté transparent : chacun peut en comprendre le principe. Le principal inconvénient de cette méthode est l'impossibilité de hiérarchiser des risques : comparer le fardeau pour la santé publique constitué par deux dangers de nature différente est impossible. On peut seulement estimer qu'un pourcentage donné de la population étudiée est au-dessus de la dose de référence.

Effets stochastiques

Comme il est admis que les effets stochastiques s'exercent sans seuil, il existe toujours dans ce cas, quelle que soit la dose, un risque résiduel qu'il s'agit d'estimer. C'est à ce propos que l'on parle d'évaluation quantitative du risque (EQR). De nombreux modèles d'extrapolation sont disponibles qu'ils soient purement statistiques, ou fassent appel à des hypothèses biologiques, prenant en compte ou non le délai d'apparition de la pathologie étudiée ou incorporant des éléments pharmacocinétiques... Ils ont fait l'objet d'une revue critique par Johannsen (Johannsen, 1990). L'US EPA (*Environmental protection agency* des États-Unis) utilise systématiquement, dans l'évaluation du risque cancérigène à faible dose, un modèle (« mécaniste ») comportant des hypothèses biologiques appelé multiétapes linéarisé (*linearized multistage*).

Les modèles quels qu'ils soient s'ajustent en règle générale de manière satisfaisante aux données du domaine observable. En revanche, les estimations de risque à faible dose qui en découlent peuvent varier très largement, de plusieurs ordres de grandeur. Il n'est pas possible de vérifier expérimentalement ou épidémiologiquement qu'un modèle reflète mieux la réalité des événements biologiques à très faible dose.

Principes de modélisation

Sur le plan des principes, deux approches sont possibles pour modéliser les données biologiques : une approche purement statistique d'ajustement d'une courbe aux données (*top-down*) et une approche dite mécanistique (*bottom-up*).

Dans l'approche statistique, il est de règle que plusieurs modèles s'ajustent aux données. Dès lors, le choix d'un modèle particulier devra faire appel soit à des hypothèses mécanistiques, soit à des considérations qui relèvent plutôt de la gestion du risque. Le choix par l'US EPA du modèle de cancérogenèse dit multiétapes linéarisé (MEL) comme modèle par défaut repose sur les deux

hypothèses, la considération de gestion conduisant au choix du modèle qui prévoit les estimations de risque les plus pessimistes à dose donnée.

Il est parfois nécessaire dans la démarche d'évaluation du risque de faire des choix sur la nature des lésions à prendre en compte : selon que l'on considère toutes les tumeurs, bénignes (et susceptibles de subir une transformation maligne) et malignes, ou seulement les tumeurs malignes, les estimations de risque par unité de dose peuvent varier très largement. Un exemple est donné figure 19.4, où l'on peut également observer que, dans le cas des tumeurs, ce ne sont pas les modèles MEL (MS sur la figure) qui sont les plus pessimistes.

Dans l'approche mécanistique, on procède par manipulations successives, une première expérimentation permettant de tester des hypothèses de mécanisme d'action et donc de poser des bases précises pour la manipulation suivante, etc. On en déduit en principe directement les paramètres du modèle. En pratique

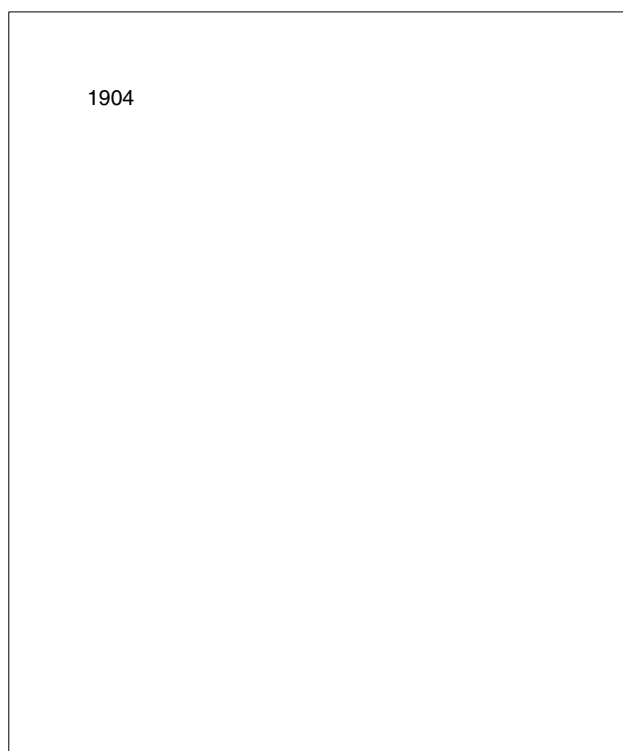


Figure 19.4 : Application de différents modèles à un même jeu de données de cancérogenèse chez le rat, après application de 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-*p*-dioxine (TCDD) (d'après Longstreth et Hushon, 1983).

Mh : *multihit* ; W : *Weibull* ; L : *logit* ; P : *probit* ; Ms : *multistage* ; MS₂ : *multistage* appliqué au jeu de données moins un groupe de doses, le plus élevé (pour assurer une meilleure adéquation du modèle aux données expérimentales)

cependant, il est fait appel à des techniques statistiques plus ou moins élaborées pour tirer le meilleur parti des données expérimentales.

L'exercice a dans le cas de la 2,3,7,8-TCDD une autre limite importante : tous les types cellulaires disposent semble-t-il du récepteur Ah, pourtant leur sensibilité aux effets toxiques de la dioxine est hautement variable, indiquant que d'autres éléments entrent en jeu dans son mécanisme de toxicité. Or des interactions complexes devraient en principe avoir pour résultat des RDR non linéaires. La réponse tissulaire n'est pas directement en rapport avec l'exposition.

Durée d'exposition

La dose de référence prend en compte la durée d'exposition. La situation d'exposition chronique aux dioxines est congruente avec la durée de 7 ans que retient l'US EPA (1989) pour la survenue des effets également qualifiés de chroniques. Pour les effets stochastiques, l'estimation de l'excès de risque individuel (ERI) de cancer pour une vie entière prend en compte la dose reçue par un individu pendant la durée d'exposition, fixée par convention à 70 ans.

Évolution des approches

Afin de ne pas perdre l'information sur l'ensemble des groupes de doses (puisque l'on utilise dans l'approche toxicologique traditionnelle une seule dose, la DMEO ou la DSEO), il est maintenant proposé d'appliquer aux effets à seuil une approche qui consiste à modéliser les données pour en dériver une dose responsable d'un excès de risque fixé qui peut être selon les cas de 10 %, 5 % ou 1 %. Cette dose est appelée dose repère (DR, *benchmark dose* ou BMD). Il est important d'examiner avec attention l'ampleur des intervalles de confiance, qui indique le degré de précision de l'estimation. On peut ensuite choisir ou bien de calculer une dose de référence en appliquant des facteurs de sécurité comme précédemment (Gaylor et coll., 1999), ou bien de considérer que la modélisation ne montrant pas de seuil (linéarité), on peut extrapoler linéairement à zéro la dose repère.

Effets cancérogènes

L'approche stochastique et l'approche déterministe seront successivement présentées.

Approche stochastique

On dispose de données à la fois expérimentales (Kociba et coll., 1978 ; NTP, 1982a et b) et épidémiologiques (US EPA, 1997 ; Becher et coll., 1998) dont la modélisation par l'US EPA (1997) ne permet pas de rejeter l'hypothèse

d'absence de seuil. Le tableau 19.I résume les résultats de la littérature. Les techniques de modélisation des données épidémiologiques utilisées sont standards.

Tableau 19.I : Excès de risque de cancer vie-entière pour une exposition de 1 pg/kg/j moyennée sur la vie entière (tous sites de cancer)

Source des données	Modèle utilisé	Estimation du risque unitaire au maximum de vraisemblance (pg TEQ/kg/j) ⁻¹	Limite supérieure de l'intervalle de confiance du risque unitaire (pg TEQ/kg/j) ⁻¹
Rats SD (Kociba et coll., 1978)*	2 étapes, MEL, multi-étapes Weibull	$1,2 \cdot 10^{-4} - 2,6 \cdot 10^{-4}$	$0,5 \cdot 10^{-6} - 1,6 \cdot 10^{-4}$
3 cohortes de travailleurs de l'industrie chimique américaine (Fingerhut et coll., 1991 ; Ott et coll., 1993) et allemande (Zober et coll., 1990 ; Manz et coll., 1991)	Modèle de risque additif Modèle de risque multiplicatif	$28 \cdot 10^{-4}$ $17 \cdot 10^{-4}$	
Cohorte de travailleurs de l'industrie chimique allemande (Becher et coll., 1998)	Modèles de Cox et de Poisson	$10^{-2} - 10^{-3}$	

* réévaluation histopathologique par Goodman et Sauer, 1992

Dans le processus de réévaluation entrepris par l'US EPA (2000), une approche différente a été adoptée. La modélisation des données épidémiologiques repose sur un modèle de risque linéaire et l'utilisation de la charge corporelle en dioxines plutôt que l'apport quotidien journalier. Sur les mêmes principes décrits plus haut à propos de la dose repère, il est calculé une dose responsable d'un excès de risque de décès par cancer (DE_{01} ou ED_{01} en anglais) et sa limite inférieure de l'intervalle de confiance ($LIDE_{01}$ ou LED_{01} en anglais). Les données permettant la modélisation proviennent des études de cohortes utilisées dans les estimations de risque précédentes de cette institution, présentées dans le tableau 19.I. A partir des DE_{01} et $LIDE_{01}$, on tire une droite vers zéro, dont la pente donne le risque unitaire de décès par cancer vie entière. Par prudence, on retient plutôt la pente issue de la droite construite à partir de la $LIDE_{01}$. Les résultats obtenus par cette approche indiquent que l'excès de risque de décès maximal par cancer pour une vie entière reste de l'ordre de 10^{-2} à 10^{-3} pour la population générale, pour les charges corporelles actuelles résultant d'un apport quotidien moyen de dioxines estimé à 3 pg TEQ/kg de poids/j. Il faut souligner que tout indique que cet apport moyen décroît dans les pays industrialisés pour se situer actuellement aux alentours de 1 pg TEQ/kg/j. Cependant, cette décroissance de l'exposition ne

modifie que marginalement le risque de cancer, qui reste dans le même ordre de grandeur, de l'ordre de 10^{-3} pour un tel niveau d'apport quotidien.

Dès lors, il est nécessaire d'examiner la compatibilité de ces conclusions avec ce que l'on sait du mécanisme d'action des dioxines. Pour résumer sommairement les données pertinentes à cet égard, il paraît acquis qu'aux taux d'exposition de la population générale, les concentrations de 2,3,7,8-TCDD atteintes au niveau cellulaire sont en principe suffisantes, compte tenu de l'affinité du récepteur dans l'espèce humaine (K_d de l'ordre de 10^{-9}), pour provoquer une réponse biochimique, l'induction de transcription du cytochrome P450 (CYP1A1). Cette réponse est linéaire à faible dose (figure 19.5). En d'autres termes, une partie de l'induction du CYP1A1 est imputable à la 2,3,7,8-TCDD, en sus de celle réalisée par d'autres ligands, exogènes et peut-être endogènes, du récepteur Ah.

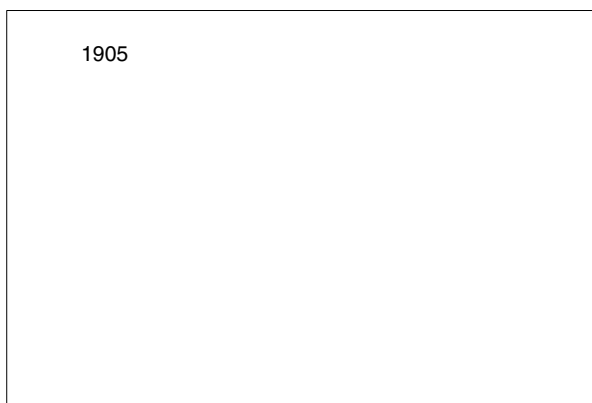


Figure 19.5 : Occupation du récepteur Ah et réponse biologique

La question clé est alors de savoir si cette induction est une étape nécessaire du processus de cancérisation induit par la 2,3,7,8-TCDD. Il semble qu'aucune réponse sur ce point ne puisse être scientifiquement justifiée. On admet donc qu'il n'est pas possible d'écarter la possibilité d'une réponse linéaire y compris à faible dose pour ce qui concerne la cancérogenèse induite par la 2,3,7,8-TCDD.

Approche déterministe

Dans l'approche déterministe standard, la DME0 issue des données de Kociba et coll. (1978) établie à 10 ng/kg/j est divisée par 1 000 (division utilisant 3 facteurs d'incertitude de 10), ce qui donne une dose de référence de 10 pg/kg/j. Cependant, lorsqu'il est tenu compte non plus des doses quotidiennes par kg de poids corporel mais de la charge corporelle respective des rats et de l'humain (pour atteindre des niveaux de charge corporelle similaires à ceux

de l'homme, les doses données aux rongeurs doivent être de 100 à 200 fois plus élevées), l'OMS (WHO, 1998) conclut que cette DMEC correspond dans ce cas à un apport chez l'homme de 150 pg/kg/j pour une charge corporelle de 294 ng de 2,3,7,8-TCDD par kg de poids corporel. Le cancer ne fait donc pas aux yeux de groupes d'experts l'objet d'un souci particulier étant donné le niveau des apports quotidiens en population générale (1-3 pg TEQ/kg/j en moyenne), dans la mesure où il est admis dans cette approche que la 2,3,7,8-TCDD est un cancérigène à seuil.

Conclusions pour l'évaluation du risque cancérigène

Un groupe de travail réuni en 1998 par le Comité de la prévention et de la précaution du ministère de l'Aménagement du territoire et de l'environnement a appliqué à la population française et à son exposition moyenne les coefficients de risque pour tous cancers issus de la modélisation des données épidémiologiques par l'US EPA en 1997 (Comité de la prévention et de la précaution, 1998). En considérant que le risque croît selon la fonction de risque unitaire estimée par l'US EPA au-delà de la dose journalière totale (DJT) définie par le Conseil supérieur d'hygiène publique de France (1 pg TEQ/kg/j), on peut déterminer un excès de risque de cancer associé à l'exposition moyenne des populations. En tenant compte des données du recensement récent (mars 1999) de la population française, cette estimation est de 1 462 (IC 95 % : 859-2 493) et 2 407 (IC 95 % : 1 289-4 470) décès annuels par cancer selon le choix du modèle (additif ou multiplicatif, respectivement).

Il faut rappeler une fois de plus que ces estimations sont des valeurs maximales, que les estimations numériques des cas attendus sont à prendre en considération comme indication d'ordre de grandeur et qu'enfin il ne s'agit que d'un modèle dont la validité est en l'état actuel des connaissances impossible à confirmer ou à infirmer. Sa valeur, ici encore, est essentiellement celle d'une aide à la décision. Enfin, la question reste posée de l'extension aux expositions formulées en équivalent-dioxines d'estimations de risque unitaire construites à partir des données portant sur la seule 2,3,7,8-TCDD.

Effets systémiques

De même, pour les effets systémiques, deux approches sont proposées d'une part par l'OMS, d'autre part par l'US EPA.

Approche « toxicologique »

308 Les principaux résultats dont la récente révision de l'évaluation du risque dioxine par l'OMS (WHO, 1998) figurent au tableau 19.II. Ces résultats sont

Tableau 19.II : Effets de l'action de la 2,3,7,8-TCDD observés pour de faibles doses

Effets	Espèce	DMEQ ou DMENO (pg TEQ/kg/j)	Charge corporelle (ng TEQ/kg)*
Effets nocifs			
Altération du développement	Singe rhésus	≈ 160	42**
Neurotoxicité			
Apprentissage des objets			
Reproduction	Rat		
↳ Spermatozoïdes		64 000	28
Glaire		200 000	73
Immunotoxicité	Rat	100 000	50
Sensibilité aux infections virales	Souris	10 000	10
Endométriose	Singe rhésus	≈ 160	42
Effets dont la nocivité est incertaine			
<i>Effets biochimiques</i>			
CYP1A1	Souris	150	3
	Rat	150	3
CYP1A2	Souris	450	10
EGFR	Rat	100	3
IL ₁ β	Souris	450	10
<i>Effets fonctionnels</i>			
Stress oxydatif	Souris	450	10
Sous-populations de lymphocytes	Singe ouistiti	≈ 200	6-8

* en sus de la charge corporelle due au bruit de fond ; ** en fin d'expérimentation, chez les mères

le produit d'une réunion d'experts internationaux. On peut considérer qu'ils font l'objet d'un consensus international. Les données analysées dans le cadre de cette expertise ne permettent pas de remettre en cause ce consensus.

Approche par dose repère

Le chapitre 8 du projet de réévaluation du risque dioxine par l'US EPA (1997), disponible sur Internet propose une modélisation pour les effets non cancérogènes basée sur deux modèles différents, le modèle de Hill et la « *power function* ».

Le modèle de Hill s'écrit

$$R(d) = b + \frac{vd^n}{k^n + d^n}$$

où n est le coefficient de Hill, v , d , k des paramètres à estimer : b correspond au bruit de fond de la réponse, v est la réponse maximale, k correspondant à 50 % de v .

Le coefficient de Hill, ou paramètre de forme, décrit la forme de la RDR. Lorsque n est proche ou inférieur à 1 le risque prédit est à peu près proportionnel à la dose ou plus que proportionnel. La caractéristique intéressante dans ce cas est que le modèle écarte en principe une allure sublinéaire, donc un seuil de dose. À l'inverse, lorsque n est bien supérieur à 1 ($> 1,5$) la courbe dose-réponse est sigmoïde et compatible avec l'existence d'un seuil (figure 19.6).

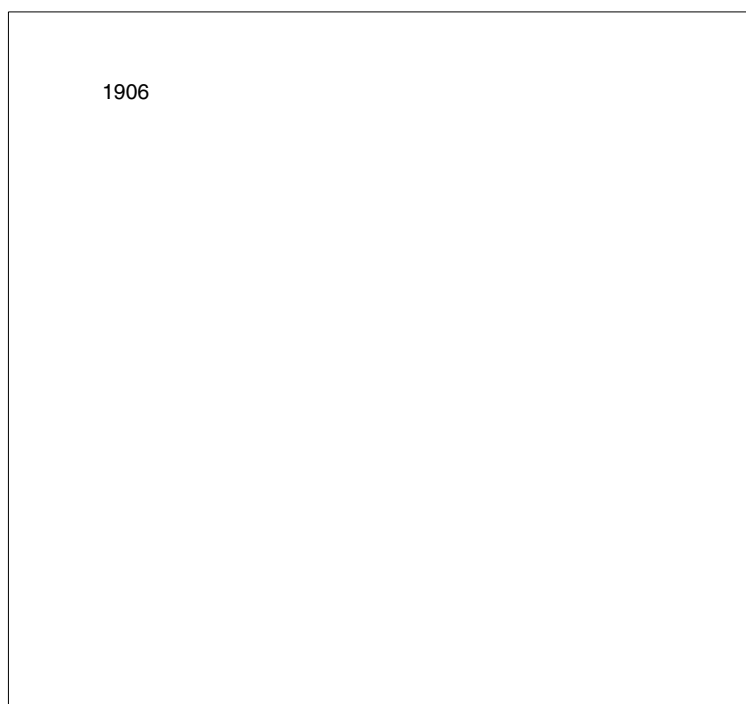


Figure 19.6 : Coefficient de Hill et allure de la relation dose-réponse

L'autre modèle utilisé dans ce document est la « *power function* » qui s'écrit

$$R(d) = b + sd^n$$

où s , appelé paramètre d'échelle, décrit l'ampleur de l'effet par unité de dose ; les paramètres b et n ont la même signification que dans le modèle de Hill.

L'adéquation de l'un et l'autre modèles est testée pour chaque jeu de données, et le modèle retenu est bien sûr celui dont l'adéquation aux données est la meilleure.

On calcule ensuite des doses effectives 1 %, 5 % ou 10 %, le paramètre de forme n pour les études publiées pour lesquelles suffisamment de données sont

fournies. La dose effective d_p pour un excès de risque p de 1 %, 5 % ou 10 % satisfait la relation d'excès de risque :

$$p = \frac{R(d_p) - R(0)}{R(\infty) - R(0)}$$

On calcule d'autre part les intervalles de confiance à 95 % de l'estimation de d_p . Les résultats sont fournis au tableau 19.III.

Ne figurent dans ce tableau que les effets qui peuvent être sans ambiguïté qualifiés de nocifs. Les résultats de modélisations pour l'induction enzymatique ou correspondant à des modifications des concentrations tissulaires ou plasmatiques en rétinol, en cholestérol ou triglycérides, ou encore des altérations de la fonction immune ne sont donc pas présentés. Les raisons en ont été discutées plus haut : de tels résultats ne sont pas interprétables pour évaluer le risque en l'état actuel des connaissances. D'autre part, on ne présente ici que les données pertinentes en termes d'estimation du risque à faible dose. Par exemple, on ne tient pas compte de résultats de la modélisation qui donnent des doses effectives 1 % excédant les 10 µg/kg.

On ne retient ici de ce fait que les résultats des modélisations pour les altérations de la fertilité de Mably et coll. (1992) et les essais de tératogenèse de Birnbaum et coll. (1989). Le rapport entre les estimations au maximum de vraisemblance et la limite inférieure de l'intervalle de confiance indiquent la précision de l'estimation. Les paramètres de forme permettent de justifier le choix de retenir une linéarité à faible dose (figure 19.6). C'est le cas par exemple du dénombrement des spermatozoïdes. D'autre part, il est souligné que la sensibilité *in vitro* de cellules palatines de souris aux effets tératogènes (fentes palatines) de la 2,3,7,8-TCDD est de 100 à 1 000 fois plus importante que celle de cellules de rat ou d'humain. Les données disponibles au moment de la modélisation ne permettaient pas de modéliser l'endométrieose et la toxicité comportementale et développementale.

L'approche du risque par modélisation utilisant les charges corporelles en dioxines et non l'apport quotidien a également été mise en œuvre par l'US EPA pour les effets autres que les cancers (US EPA, 2000). Les études contribuant à fournir des données pour cet exercice sont beaucoup plus nombreuses. Globalement, les estimations des $LIDE_{01}$ pour divers effets varient sur 10 ordres de grandeur. Les auteurs relèvent la sensibilité des estimations au schéma d'administration des doses et les écarts d'estimation des $LIDE_{01}$ observées d'une espèce ou d'une lignée à l'autre pour un même effet toxique. Les résultats obtenus doivent donc être discutés en détail. Les auteurs soulignent que la constatation d'une linéarité de la relation dose-réponse dans le domaine observable ne fait que fournir des éléments à l'appui d'une prise de décision pour extrapoler (y compris le choix de retenir ou non une approche à seuil).

Tableau 19.III : Doses effectives pour des excès de risque d'effets systémiques de 1 %, 5 % et 10 %

Source des données	Effet (dose unique)	Paramètre de forme <i>n</i>	Dose (ng/kg) correspondant à un excès de risque de ¹		
			1 %	5 %	10 %
Maby et coll. (1992) Rates Holtzmann gravides 64 ng/kg à jour 15 Examen de la progéniture mâle à jours de vie 32, 49, 63 et 120	Morphologie des spermatozoïdes, J 120	4,20	82,3 (0,00)	122 (0,01)	146 (0,00)
	Index de fertilité	23,06	327,5 (327,5)	351 (350,53)	361 (360,50)
	Dénombrement spermatozoïdes queue épididyme, J 63	0,86	0,33 (0,00)	2 (0,00)	4,3 (0,00)
	Dénombrement spermatozoïdes queue épididyme, J 120	0,97	0,69 (0,00)	3,5 (0,00)	6,8 (0,00)
	Production /jour spermatozoïdes (FJS)/g, J 49	1,48	4,80 (0,00)	13,8 (0,00)	21,4 (0,00)
Birnbaum et coll. (1989) Souris C57BL/6N 1 000 ng/kg à jour de gestation 10 et 12	J 63	0,39	0,00 (0,00)	0,16 (0,00)	0,87 (0,00)
	J 120	1,72	2,8 (0,00)	6,95 (0,00)	10,1 (0,00)
	Dénombrement spermatozoïdes/g, J 120	1,50	2,30 (0,00)	6,6 (0,00)	10,1 (0,00)
	Fente palatine, J 10	6,96	7 636 (–)	9 685 (–)	10 791 (–)
	Fente palatine, J 12	5,21	4 932 (–)	6 764 (–)	7 797 (–)
Van Birgelen et coll. (1995) Rates Sprague-Dawley 14 ng/kg/ pendant 13 semaines	Total T4	0,54	5,4 (0,00)	96,6 (0,00)	317,2 (0,00)
	T4 libre	0,88	4,2 (0,00)	24,9 (0,00)	55,2 (0,00)
	T4 hépatique glucuronidée	0,93	1,5 (0,03)	8,7 (0,55)	19,6 (2,49)

¹ : Limite inférieure de l'intervalle de confiance à 95 %

Conclusions pour l'évaluation de risque des effets systémiques

L'OMS (WHO, 1998) base ses estimations de dose journalière tolérable (DJT) en comparant les charges corporelles des animaux d'expérimentation et de l'humain pour une même dose journalière par kg de poids corporel en administration chronique, ce qui justifie le calcul des doses quotidiennes estimées (DQE) présentées dans le tableau 19.IV. Les doses humaines correspondant aux charges corporelles ont été calculées sous l'hypothèse d'un état d'équilibre de la charge corporelle. La formule utilisée est :

$$\text{Apport (ng/kg/j)} = \text{charge corporelle (ng/kg)} \times (\ln(2)/\text{demi-vie})/f$$

f étant la fraction de dose absorbée posée à 50 % pour l'humain. La demi-vie retenue chez l'humain est de 7,5 ans. Les résultats sont présentés dans le tableau 19.IV.

Tableau 19.IV : Charge corporelle des animaux d'expérience et doses quotidiennes estimées (DQE) humaines correspondantes

Source des données	Réponse (DMENO)	Charge corporelle (ng TEQ/kg poids corporel)*	DQE humaine (pg TEQ/kg/j)
Gray et coll., 1997a Rat	Baisse dénombrement spermatozoïdes chez descendance	28	14
Gehrs et coll., 1997 ; Gehrs et Smialowicz, 1998 Rat	Suppression immunitaire chez descendance	50	25
Gray et coll., 1997b Rat	Augmentation malformations génitales chez descendance	73	37
Schantz et Bowman, 1989 Singe	Trouble neuro-comportement chez descendance	42	21
Rier et coll., 1993 Singe	Endométriose	42	21

* en supplément par rapport à la charge corporelle due à l'exposition de fond

Pour calculer une DJA, le groupe d'experts de l'OMS a considéré le fait que les données fournissent des DMENO et non des DSENO, l'usage des charges corporelles permettant selon eux de s'affranchir des différences de toxicocinétique interspèces. Pour ce qui concerne les différences de sensibilité interspèces, ce groupe a jugé que l'espèce humaine était au plus aussi sensible que les animaux d'expérimentation. Un facteur de sécurité de 10 a été appliqué aux données de la colonne de droite du tableau 19.IV, donnant une DJA comprise entre 1 et 4 pg/kg/j.

Ces valeurs sont valables pour des expositions vie-entière, des excès de dose ponctuels n'étant pas jugés de nature à provoquer des manifestations de toxicité au long cours. D'autre part ce groupe a conclu que certains sujets des pays développés peuvent présenter des charges corporelles telles (apports quotidiens de 2-6 pg/kg/j) qu'ils pourraient manifester des effets ténus (« *subtle* ») mais que ces effets ne pouvaient être considérés comme clairement toxiques.

Il est à noter que toutes les données utilisées dans le tableau 19.IV n'étaient probablement pas disponibles pour les modélisateurs de l'*US EPA* au moment de leur étude à l'exception des données de Schantz et Bowman (1989) et de Rier et coll. (1993). Concernant les sujets traités dans ces deux publications, les auteurs de l'*US EPA* (1997) ont considéré ne pas avoir de données suffisantes pour modéliser. Les comparaisons entre les résultats des tableaux 19.III et 19.IV sont donc difficiles.

La seule comparaison possible est celle des dénombrements de spermatozoïdes à partir des données de Mably et coll. (1992) et de celles de Gray et coll. (1997). Il faut souligner que pour les premières, la RDR a été jugée compatible avec la linéarité lors de la modélisation effectuée par l'*US EPA* (*US Environmental protection agency*, 1997)). Si l'on prend dans ce cas l'excès de risque 1 %, la dose estimée au maximum de vraisemblance est de 0,33 ng/kg au minimum (DMEQ). Il s'agit d'un supplément par rapport au bruit de fond et les données du tableau 19.IV permettent d'estimer que la DQE humaine correspondante est de 0,15 pg TEQ/kg/j. Elle est déjà très en dessous de la DJA de l'OMS (et des niveaux d'exposition du public), même en l'absence d'application d'un facteur de sécurité de 10. En d'autres termes, l'exposition du public à de très faibles doses de 2,3,7,8-TCDD serait de nature à entraîner une relative altération de la qualité du sperme si l'on retient les résultats de la modélisation.

En conclusion, toute évaluation des risques liés à l'exposition à la 2,3,7,8-TCDD doit impérativement tenir compte du fait qu'il n'y a pas de niveau zéro possible d'exposition. Dans ces conditions, retenir des résultats de modélisation qui indiquent une linéarité sans seuil pour au moins deux effets pertinents, le cancer et l'altération de la qualité du sperme, conduit à admettre que, quelles que soient les actions entreprises pour réduire les émissions anthropogéniques de dioxines, il restera toujours un certain nombre de cas de cancers et un certain degré d'altération de la qualité du sperme attribuables à ces composés. On se trouve, dans l'hypothèse de linéarité sans seuil à très faible dose, dans une situation similaire à celle qui fonde au plan international la logique actuelle de gestion du risque radioactif (Hubert, 1997). Selon ce modèle, on est conduit à admettre que le radon serait responsable d'environ 2 000 décès annuels par cancer du poumon (Pirard, 2000). S'il est possible de diminuer l'exposition au radon et donc le nombre de décès qui lui est attribuable, il restera inévitablement un certain niveau d'exposition et donc de décès, quoi que l'on

fasse. Toute la question est de savoir jusqu'où on veut faire baisser cette exposition et quel nombre de décès on veut éviter. Il en est de même sous cette hypothèse pour la gestion du risque dioxines : quel est le niveau incompressible du bruit de fond et jusqu'à quel point veut-on s'en rapprocher ?

BIBLIOGRAPHIE

- BECHER H, STEINDORF K et coll. Quantitative cancer risk assessment for dioxins using an occupational cohort. *Environ Health Perspect* 1998, **106** : 663-670
- BIRNBAUM LS, HARRIS MW et coll. Retinoic acid and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin selectively enhance teratogenesis in c57bl/6n mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 1989, **98** : 487-500
- COMITE DE LA PREVENTION ET DE LA PRECAUTION. Dioxines. Recommandations. *Annexe Technique* 03/04/1998
- FINGERHUT MA, HALPERIN, WE et coll. Cancer mortality in workers exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *N Engl J Med* 1991, **324** : 212-218
- GAYLOR DW, KODELL RL et coll. A unified approach to risk assessment for cancer and noncancer endpoints based on benchmark doses and uncertainty/safety factors. *Regul Toxicol Pharmacol* 1999, **29** : 151-157
- GEHRS BC, RIDDLE MM et coll. Alterations in the developing immune system of the f344 rat after perinatal exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin : ii. effects on the pup and the adult [published erratum appears in toxicology 1998 sep 1 ;130(1) :71]. *Toxicology* 1997, **122** : 229-240
- GEHRS BC, SMIALOWICZ RJ. Persistent suppression of delayed-type hypersensitivity in adult f344 rats after perinatal exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Toxicology* 1998, **134** : 79-88
- GOODMAN DG, SAUER RM. Hepatotoxicity and carcinogenicity in female Sprague-Dawley rats treated with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) : a pathology working group reevaluation. *Regul Toxicol Pharmacol* 1992, **15** : 245-252
- GRAY LE, OSTBY JS et coll. A dose-response analysis of the reproductive effects of a single gestational dose of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in male Long-Evans hooded rat offspring. *Toxicol Appl Pharmacol* 1998, **146** : 11-20
- GRAY LE, WOLF C et coll. *In utero* exposure to low doses of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin alters reproductive development of female long evans hooded rat offspring. *Toxicol Appl Pharmacol* 1997, **146** : 237-244
- HUBERT P. *Les risques radiologiques. Sciences et décision en santé environnementale*. Bard D, Cicoletta A, Jouan M, Potelon JL, Zmirou D. Vandœuvre-les-Nancy (France), Société française de santé publique 1997, 93-113
- JOHANNSEN FR. Risk assessment of carcinogenic and noncarcinogenic chemicals. *Crit Rev Toxicol* 1990, **20** : 341-367
- KOCIBA RJ, KEYES DG et coll. Results of a two-year chronic toxicity and oncogenicity study of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 1978, **46** : 279-303

LONGSTRETH JD, HUSHON JM. Risk assessment for 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (tcdd). human and environmental risks of chlorinated dioxins and related compounds. Tucker RE, Young AL and Gray AP. New York, Plenum press 1983, 639-666

MABLY TA, BJERKE DL et coll. *In utero* and lactational exposure of male rats to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. 3. effects on spermatogenesis and reproductive capability. *Toxicology and Applied Pharmacology* 1992, **114** : 118-126

MANZ A, BERGER J et coll. Cancer mortality among workers in chemical plant contaminated with dioxin. *Lancet* 1991, **338** : 959-964

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. *Committee on the institutional means for the assessment of risks to public health risk assessment in the federal government : managing the process*. Washington (DC), National academy press, 1983

NTP (NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM). Carcinogenesis bioassay of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (cas n 1746-01-6) in osborne-mendel rats and b6c3f1 mice (gavage study). Research Triangle Park, North Carolina, *National Toxicology Program* 1982a

NTP (NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM) Carcinogenesis bioassay of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (cas n 1746-01-6) in swiss-webster mice (dermal study). Research Triangle Park, North Carolina, *National Toxicology Program* 1982b

OTT M, MESSERER P et coll. Assessment of past occupational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin using blood lipid analyses. *International Archives of Occupational and Environmental Health* 1993, **65** : 1-8

PIETERS MN, KRAMER HJ et coll. Evaluation of the uncertainty factor for subchronic-to-chronic extrapolation : statistical analysis of toxicity data. *Regul Toxicol Pharmacol* 1998, **27** : 108-111

PIRARD P. *Expositions et estimation du risque en France. Exposition au radon dans les habitations : évaluation et gestion du risque*. Bard D. Paris, France, Société Française de Santé Publique, 2000

RENWICK AG, LAZARUS NR. Human variability and noncancer risk assessment - An analysis of the default uncertainty factor. *Regul Toxicol Pharmacol* 1998, **27** : 3-20

RIER SE, MARTIN DC et coll. Endometriosis in rhesus monkeys (*macaca mulatta*) following chronic exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin see comments. *Fundam Appl Toxicol* 1993, **21** : 433-441

SCHANTZ SL ET BOWMAN RE. Learning in monkeys exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD). *Neurotoxicol Teratol* 1989, **11** : 13-19

US ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (US EPA). *Risk assessment guidance for superfund. D Volume 1 : Human health evaluation manual (part a)*. Washington DC (USA), United States Environmental Protection Agency, 1989

US ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (US EPA) draft. *Dose-response modeling for 2,3,7,8-TCDD*. Office of Research & Development, 1997, chapter 8

US ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (US EPA) draft. *Exposure and human health reassessment of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) and related compounds* 2000, part II, chapter 8

VAN BIRGELEN AP, SMIT EA et coll. Subchronic effects of 2,3,7,8-TCDD or PCB on thyroid hormone metabolism : use in risk assessment. *Eur J Pharmacol* 1995, **293** : 77-85

VAN BIRGELEN AP, VAN DER KOLK Jet coll. Subchronic dose-response study of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in female sprague-dawley rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 1995, **132** : 1-13

WHO (WORLD HEALTH ORGANISATION) Asessment of health risk of dioxins : re-evaluation of the tolerable daily intake (tdi). *Executive Summary*, WHO 1998

ZOBER A, MESSERER P et coll. Thirty-four-year mortality follow-up of basf employees exposed to 2,3,7,8-TCDD after the 1953 accident. *Int Arch Occup Environ Health* 1990, **62** : 139-57.

Synthèse

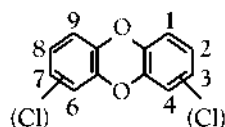
Les dioxines regroupent deux grandes familles, les polychlorodibenzo-*para*-dioxines (PCDD) et les polychlorodibenzofuranes (PCDF) qui font partie, comme les polychlorobiphényles (PCB) et les polybromobiphényles (PBB), de la classe des hydrocarbures aromatiques polycycliques halogénés (HAPH).

Les dioxines sont des contaminants produits au cours de nombreux processus chimiques impliquant du chlore, du carbone, de l'oxygène et une température élevée. Dans les pays développés, les deux principales sources d'émission de dioxines résultent des activités d'incinération de déchets ménagers, de métallurgie et de sidérurgie. Ces émissions ont considérablement diminué au cours des dix dernières années dans ces pays. Cependant, les dioxines font partie des nombreux polluants auxquels les populations sont soumises, à de très faibles doses tout au long de leur vie.

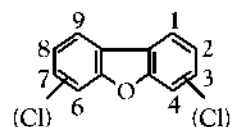
Les dioxines sont présentes dans tous les compartiments de l'écosystème (air, sols, sédiments aquatiques et marins, animaux). Très solubles dans les lipides et chimiquement stables, elles se concentrent le long de la chaîne alimentaire, et l'alimentation représente la voie majeure d'exposition pour l'homme. La possibilité d'un contrôle des aliments par la mise en place d'un plan de surveillance des produits d'origine animale, et des produits laitiers en particulier, constitue un élément important de la surveillance. La difficulté réside dans la définition, à des fins de prévention, de niveaux d'exposition tolérables (normes, valeurs guides...), qui ne peuvent être établis qu'à partir du bilan des connaissances actuelles sur les effets toxiques des dioxines chez l'animal et chez l'homme. La compréhension du mécanisme d'action peut également contribuer à une meilleure définition du risque et en faciliter sa gestion.

Nomenclature et propriétés physicochimiques des PCDD et PCDF

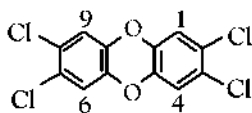
Les PCDD et les PCDF sont deux familles de composés qui, bien que distincts, sont très proches par leur structure moléculaire et leurs propriétés physicochimiques. Ce sont des composés aromatiques polycycliques oxygénés dont la structure présente deux atomes d'oxygène pour les PCDD et un seul pour les PCDF. Les positions numérotées des cycles aromatiques peuvent être occupées par des atomes d'hydrogène ou de chlore, ces derniers étant au maximum au nombre de huit.



polychlorodibenzo-*para*-dioxine



dibenzo [b-d] furane



Formule de la dioxine de Seveso (2,3,7,8-TCDD)

Formules structurales des composés de base et de la dioxine de Seveso (2,3,7,8-TCDD)

En fonction de la position et du nombre d'atomes de chlore dans la structure de base, on dénombre 75 congénères de PCDD et 135 de PCDF.

Nombre de congénères PCDD et PCDF

Nombre d'atomes de chlore	Nombre d'isomères* PCDD	Nombre d'isomères PCDF
1	2	4
2	10	16
3	14	28
4	22	38
5	14	28
6	10	16
7	2	4
8	1	1
Nombre de congénères** par famille	75	135

*isomères : molécules de même structure atomique ; **congénères : molécules de même structure de base avec un nombre d'atomes substitués différent

Les caractéristiques physicochimiques des PCDD et PCDF sont étroitement liées au degré de chloration des structures aromatiques. Ce sont des composés peu volatils, peu solubles dans l'eau mais solubles dans les lipides. Cette

lipophilie leur permet de traverser les membranes cellulaires et de s'accumuler dans les tissus gras de l'organisme.

Les PCDD et les PCDF sont stables jusqu'à 800°C et leur destruction n'est totale qu'à partir de 1 300°C. Dans l'environnement, la photolyse est l'une des rares voies de dégradation de ces molécules. La photodéchloration serait la réaction la plus importante. Elle concerne plus particulièrement les congénères les plus chlorés et peut conduire à la formation de 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-*para*-dioxine (TCDD) à partir de l'octachlorodibenzo-*para*-dioxine (OCDD) qui est le composé majoritaire dans les émissions de dioxines. La stabilité biochimique est également très importante, en particulier pour les composés les plus chlorés. Néanmoins, plusieurs études menées sur la biodégradabilité de ces polluants environnementaux montrent que certains micro-organismes (bactéries, levures, champignons) sont capables de les métaboliser.

Relation structure activité

Les propriétés cumulatives et toxiques des dioxines sont également étroitement dépendantes de leur structure chimique, c'est-à-dire du nombre et de la position des atomes de chlore des deux cycles benzéniques. Parmi les 210 congénères théoriquement présents dans l'environnement après émissions par diverses sources ponctuelles ou diffuses, les 17 composés substitués en position 2,3,7,8 (7 congénères PCDD et 10 congénères PCDF) font l'objet d'une bioaccumulation intense dans les organismes vivants où ils subissent une dégradation biologique lente, variable en fonction de la nature du congénère (plus rapide pour les PCDF que pour les PCDD).

En outre, ces 17 congénères possèdent une conformation stérique qui favorise leur fixation au récepteur intracellulaire *arylhydrocarbon* (Ah). L'affinité de ces 17 congénères pour le récepteur Ah est toutefois variable. Elle est maximale pour la 2,3,7,8-TCDD et 10 à 10 000 fois plus faible pour les congénères les plus chlorés (comme l'OCDD) dont l'encombrement stérique limite la fixation au récepteur.

Ces 17 congénères susceptibles de se fixer au récepteur Ah et comportant un minimum de 4 atomes de chlore occupant les positions 2,3,7,8 sont considérés comme les plus toxiques. La toxicité diminue quand le nombre d'atomes de chlore croît : la PCDD la plus toxique est la 2,3,7,8-TCDD. Au-delà de 5 atomes de chlore, la toxicité chute brutalement. La potentialité toxique des 17 congénères peut être exprimée en référence au composé le plus toxique, par l'intermédiaire du concept d'équivalent toxique (TEF, *toxic equivalent factor*). Celui-ci a été développé à partir de 1977 pour donner une valeur toxicologique à un mélange de composés chimiquement proches et ayant le même mécanisme d'action, c'est-à-dire actifs sur le même récepteur. Défini à partir de résultats *in vitro* modulés par les données *in vivo*, le TEF est réévalué

fréquemment en fonction de l'évolution des connaissances. Ce concept a d'abord été appliqué aux PCDD/PCDF puis étendu à d'autres membres de la famille des hydrocarbures aromatiques polycycliques halogénés (HAPH). Pour les PCDD/PCDF, le congénère de référence est la 2,3,7,8-TCDD qui a la plus forte affinité pour le récepteur intracellulaire Ah.

Ainsi, le TEF se définit de la façon suivante :

$$\text{TEF} = \frac{\text{potentialité toxique d'un composé individuel}}{\text{potentialité toxique de la 2,3,7,8-TCDD}}$$

PCDDs	(N=7)	TEF	PCDFs	(N=10)	TEF
2,3,7,8-TCDD		1	2,3,7,8-TCDF		0,1
1,2,3,7,8-PeCDD		1	1,2,3,7,8-PeCDF		0,05
1,2,3,4,7,8-HxCDD		0,1	2,3,4,7,8-PeCDF		0,5
1,2,3,7,8,9-HxCDD		0,1	1,2,3,4,7,8-HxCDF		0,1
1,2,3,6,7,8-HxCDD		0,1	1,2,3,7,8,9-HxCDF		0,1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD		0,01	1,2,3,6,7,8-HxCDF		0,1
OCDD		0,0001	2,3,4,6,7,8-HxCDF		0,1
			1,2,3,4,6,7,8-HpCDF		0,01
			1,2,3,4,7,8,9-HpCDF		0,01
			OCDF		0,0001

Structure et TEF des 17 congénères PCDD et PCDF substitués en position 2,3,7,8 (• : atome de chlore)

Méthodes de dosage

Les dioxines sont des substances présentes à l'état de traces et les techniques analytiques mises en œuvre pour les identifier sont complexes, nécessitant des seuils de détection très faibles. Parmi les 210 congénères possibles, les méthodes analytiques cherchent à doser les 17 congénères considérés comme les plus toxiques et bioaccumulables.

La méthode analytique de référence utilise la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse haute résolution (GC-MS). Deux étapes successives caractérisent cette méthode : la séparation basée sur le principe du mouvement différentiel des composés dans un flux gazeux chaud

contenu dans un tube capillaire puis la détection basée sur la détermination de la masse moléculaire des composés en spectrométrie de masse haute résolution. La méthode est très sensible et très sélective (limite de détection de l'ordre de 0,02 pg). Le résultat de l'analyse est donné sous forme d'un profil chromatographique des différents congénères qui peut être converti en quantité totale de dioxines et en poids de chaque congénère présent.

Le protocole analytique est d'autant plus complexe, long et coûteux que la quantité de dioxines présente dans l'échantillon à doser est faible. Ainsi, les protocoles d'analyse des PCDD/PCDF dans les produits biologiques comme le lait (degré de contamination de l'ordre du pg TEQ/g de matières grasses) diffèrent-ils notablement de ceux utilisés dans l'analyse d'échantillons environnementaux comme les émissions dans l'atmosphère (degré de contamination de l'ordre du ng/m³).

Les progrès de la chimie analytique séparative ont permis d'améliorer les méthodes d'extraction et de purification en les rendant plus rapides et moins coûteuses. Un protocole utilisant une extraction assistée par micro-ondes, une purification par chromatographie en phase liquide haute pression (HPLC) et une méthode d'analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse basse résolution a été récemment mis au point en France. Ce type de protocole devrait permettre de répondre à des demandes de dosages en routine d'échantillons environnementaux tout en restant compatible avec les exigences (en termes de sensibilité et de reproductibilité) de la méthode d'analyse.

Les méthodes qui reposent sur la mesure de l'activité biologique des dioxines sont complémentaires des dosages chimiques et donnent des résultats toxicologiques. Ces méthodes biologiques mesurent la quantité de dioxines en fonction de l'activation du récepteur Ah, cette activation entraînant l'expression d'un gène rapporteur dont on peut mesurer le produit. Le dosage CALUX mis au point aux Pays-Bas utilise une lignée cellulaire d'hépatome de rat génétiquement modifiée par introduction d'un plasmide vecteur du gène de la luciférase, dont la transcription est placée sous le contrôle d'une séquence de régulation d'origine murine nommée DRE (*Dioxin responsive element*). Ainsi, en réponse à une exposition aux dioxines, les cellules synthétisent de la luciférase dont l'activité enzymatique est quantifiée par une réaction lumineuse. La quantité de lumière émise est proportionnelle à l'activité du récepteur Ah. Elle est donc étroitement liée à la nature des congénères de dioxines, à leur proportion dans un mélange et donne une bonne évaluation de la toxicité. D'autres modèles cellulaires basés sur ce principe mais utilisant un autre gène rapporteur peuvent également être utilisés (système CAT, *Chloramphenicol acetyl transferase*).

Expression des résultats des dosages

Dans les dosages analytiques, l'expression des résultats varie selon la matrice utilisée.

Expression des résultats selon la matrice

Matrice analysée	Expression des résultats
Échantillons biologiques	ng TEQ/kg de poids frais ou pg TEQ/g de matières grasses
Échantillons de sols ou de sédiments	ng TEQ ou pg TEQ/g de poids sec
Émissions atmosphériques	ng TEQ/m ³

La concentration d'un congénère PCDD ou PCDF peut être convertie en une valeur d'équivalent toxique international (I-TEQ, *International toxic equivalent quantity*) égale à la concentration mesurée en PCDD ou PCDF multipliée par le TEF du composé.

Ainsi, le TEQ indique la quantité de 2,3,7,8-TCDD nécessaire pour produire le même effet toxique que celui susceptible d'être induit par le congénère étudié à la dose mesurée. Par exemple, 30 ng d'un congénère qui a un TEF de 0,1 ont le même effet que 3 ng de 2,3,7,8-TCDD. Le concept TEF est basé sur l'hypothèse de l'additivité des doses et des effets tant en aigu qu'en chronique. On peut donc faire la somme des TEQ de chaque constituant d'un mélange pour estimer la toxicité de l'ensemble.

$$\text{I-TEQ} = \sum(\text{TEF} \times \text{concentration en PCDD ou PCDF})$$

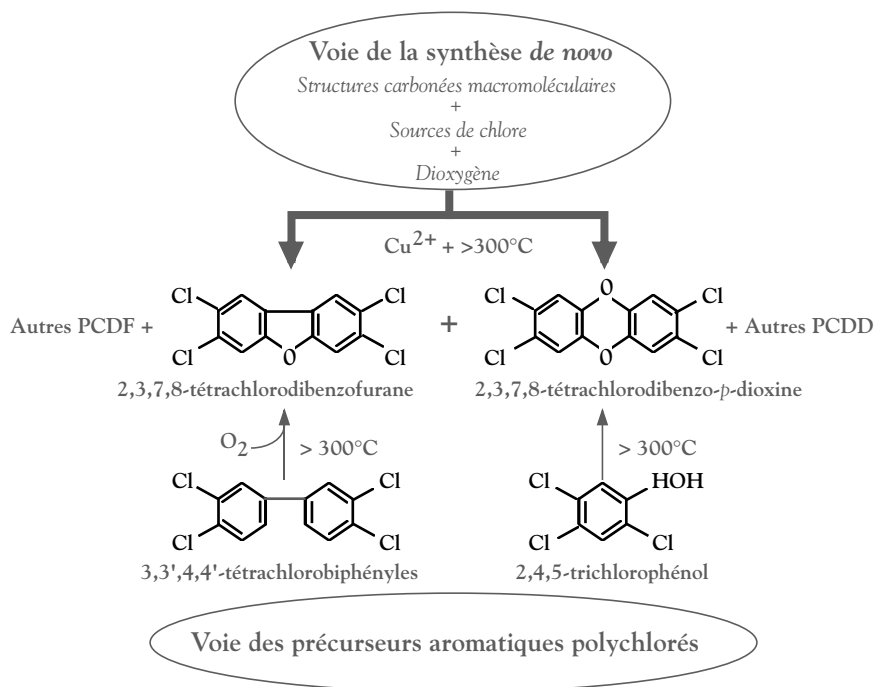
L'expression des résultats en TEQ présente des limites qui font que son utilisation est toujours fortement discutée à la fois pour l'évaluation et la gestion des risques. En ce qui concerne la gestion du risque, le TEQ ne permet pas de connaître la nature des congénères impliqués dans la contamination et donc d'identifier la source de cette contamination. En ce qui concerne l'utilisation du TEQ pour l'évaluation de risques, la notion d'additivité peut être discutée sur la base d'exemples d'interactions antagonistes ou synergiques dans un mélange complexe et sur l'existence probable de ligands endogènes du récepteur Ah. Enfin, certains des effets toxiques des PCDD et PCDF ne passent pas forcément par une liaison au récepteur Ah. Parmi tous les composés capables de se fixer sur le récepteur Ah, ne sont pris en compte dans le calcul du TEQ que les PCDD/PCDF (nomenclature OTAN) et, depuis 1997, les PCDD/PCDF ainsi que les congénères de PCB les plus proches des dioxines (PCB « *dioxin-like* ») (nomenclature OMS). Le TEQ ne prend pas en compte les autres PCB (non « *dioxin-like* ») qui sont pourtant les plus abondants.

Processus de formation des PCDD et PCDF

Les PCDD et les PCDF sont produits au cours de la plupart des processus de combustion naturels et industriels, et en particulier des procédés faisant intervenir de fortes températures (incinération, métallurgie...). Ils sont également formés lors de la synthèse chimique de dérivés aromatiques chlorés ainsi qu'au cours de processus biologiques et de réactions photochimiques naturels.

Afin de prévenir la production de PCDD et de PCDF, il apparaît essentiel de comprendre ces processus de synthèse. Beaucoup de paramètres influencent cette synthèse et, malgré les nombreuses études expérimentales sur le sujet, les mécanismes réactionnels mis en jeu restent encore peu connus de nos jours.

Les PCDD et les PCDF sont produits majoritairement sur les cendres d'incinération lors du refroidissement des fumées. Ces cendres apportent tous les éléments essentiels à cette synthèse, structures carbonées résiduelles, chlore et catalyseurs. Cette voie de synthèse est nommée synthèse « *de novo* ». Elle est fortement dépendante de la présence de chlore inorganique dans le milieu réactionnel. L'acide chlorhydrique et les dérivés métallochlorés comme le chlorure cuivrique (CuCl_2) en sont les principales sources. Le cuivre est également l'un des catalyseurs les plus actifs des réactions d'halogénéation des



Formation des PCDD et des PCDF

composés aromatiques. L'oxygène est, bien entendu, indispensable au processus de combustion des structures carbonées et à la synthèse des PCDD et des PCDF. La synthèse *de novo* est aujourd'hui reconnue comme étant la principale voie de production des PCDD et des PCDF.

Il est cependant possible de synthétiser des PCDD et des PCDF à partir de molécules organiques. Cette seconde voie de synthèse est appelée « voie des précurseurs ». C'est la voie empruntée par les composés aromatiques halogénés et/ou hydroxylés comme le chlorobenzène et le chlorophénol qui entrent dans la synthèse d'herbicides (acide 2,4,5-trichlorophénoxyacétique), de bactéricides (hexachlorophène...) et d'un produit de conservation du bois (pentachlorophénol ou PCP). Les PCDD et les PCDF se forment ici selon une réaction de condensation/cyclisation des précurseurs monocycliques (réaction d'Ullmann). Les PCB génèrent principalement des furanes par pyrolyse.

Principaux réservoirs et sources d'émission de dioxines

Les émissions de PCDD et de PCDF résultent essentiellement des activités humaines industrielles et domestiques. La part des sources naturelles, chimiques, biologiques et photochimiques reste actuellement impossible à évaluer.

L'historique des dioxines est lié à la fois aux différentes sources de production mais aussi à leur découverte en fonction de l'évolution des connaissances scientifiques. Dans les années soixante, l'émission de PCDD et de PCDF était principalement liée aux activités industrielles impliquant la synthèse de dérivés chlorés (pesticides PCB, PCP...) et de chlorures de polyvinyle (PVC). Les procédés de fabrication de la pâte à papier (blanchiment utilisant le dichlore) étaient également considérés comme des sources potentielles majeures. La production de PCDD et de PCDF résultant de ces activités industrielles a été fortement réduite à la suite de l'interdiction d'utiliser certains produits, ou par une modification des procédés technologiques. Le recyclage des métaux non ferreux qui fait intervenir la refonte de matériaux contaminés par des polluants organiques chlorés conduit également à la formation de PCDD et de PCDF.

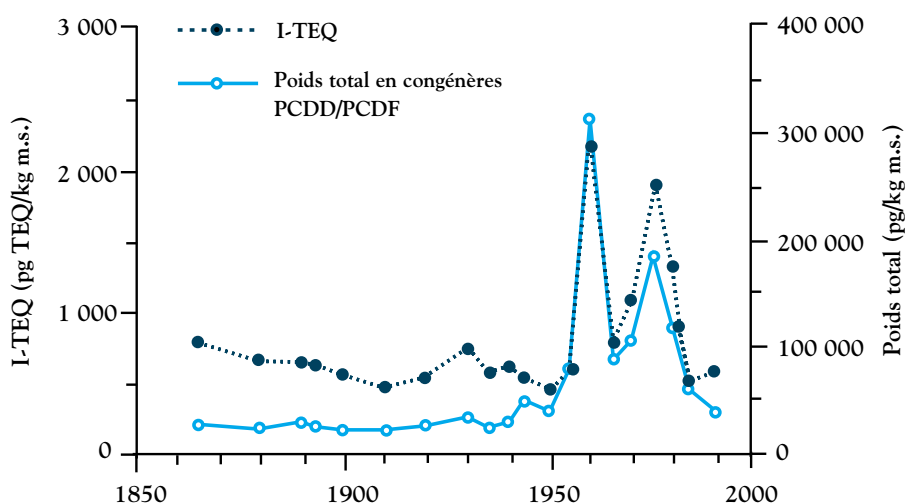
Parmi les sources accidentelles d'émission de PCDD et de PCDF, les usines de production de trichlorophénol et d'autres dérivés chlorés occupaient une place non négligeable. L'exemple de l'incident survenu dans l'usine ICMESA à Seveso est le plus connu. Les changements dans les procédés de fabrication des produits concernés devraient mettre à l'abri d'une telle menace. Les incendies dans les entrepôts, les bâtiments et les véhicules restent néanmoins des sources fréquentes : les conditions de combustion y sont médiocres et les produits brûlés contiennent de nombreux éléments favorisant la synthèse de PCDD et de PCDF (PVC, produits ignifugeants...).

326 Dans un deuxième temps, à partir des années soixante-dix, la formation des dioxines au cours des processus de combustion a été mise en évidence. Les

centrales thermiques (énergie électrique) ainsi que les fours et les chaudières (chauffage et procédés industriels) émettent des PCDD et PCDF. Ils en produisent d'autant plus qu'ils utilisent des combustibles de substitution (recyclage, valorisation de déchets). La métallurgie et la sidérurgie sont les industries les plus concernées.

Les incinérateurs de déchets ménagers ou industriels ont été pendant les vingt dernières années les principaux émetteurs de PCDD et de PCDF formés au cours des processus de combustion. De nos jours, les technologies développées pour limiter le passage des PCDD et PCDF dans les fumées sont très efficaces. L'amélioration substantielle des procédés et une rationalisation des activités d'incinération en Europe ont récemment réduit cette source de production de PCDD et de PCDF.

En Grande-Bretagne, l'analyse d'échantillons d'un herbier constitué à 40 km au nord de Londres a permis de reconstituer l'historique de la contamination de l'environnement par les PCDD et PCDF, de 1860 à 1993. Deux pics de contamination émergent dans les périodes 1960 (développement de l'industrie des produits chlorés) et 1980 (mise en route de nombreux incinérateurs d'ordures ménagères). En Suède, le dosage des PCDD et PCDF dans les œufs de guillemots (espèce d'oiseaux sentinelles) procure de la même manière des informations sur l'histoire de la contamination de l'environnement par ces composés.



Évolution des concentrations de PCDD et PCDF entre 1860 et 1993 dans les herbiers de la station expérimentale de Rothamsted (Grande-Bretagne) (m.s. : matières sèches) (d'après Kjeller et coll., 1996).

Les données obtenues en Europe montrent que les secteurs les plus concernés par les émissions de dioxines sont les usines d'incinération et la sidérurgie-métallurgie, mais que la contribution de chacun de ces secteurs est variable suivant le pays.

Distribution des émissions de dioxines en France, en Allemagne et en Grande-Bretagne

	Distribution des émissions en 1995 (%)		
	France ¹	Allemagne ²	Grande-Bretagne ²
Usines d'incinération de déchets*	46,00	10,0	87,0
Combustions industrielles	2,63	5,5	5,8
Sidérurgie-métallurgie	51,20	83,0	7,0
Circulation routière	0,17	1,5	0,2

* : ordures ménagères et déchets industriels spéciaux ; ¹ : ADEME, 1996 ; ² : *United nations environment program*, 1999

En France, une diminution supérieure à 50 % du flux annuel de dioxines a été constatée entre 1997 et 1999, pour un échantillon de 70 sites d'usines d'incinération et de 80 sites de sidérurgie et métallurgie. Les secteurs de la papeterie, de la cimenterie et de la chimie produisent chacun moins d'1 g TEQ/an.

Évolution des flux de dioxines des deux principaux secteurs en France (données de la Direction de la prévention des pollutions et des risques, ministère de l'Aménagement du Territoire et de l'Environnement)

Secteur d'activité	Nombre de sites concernés	Flux de dioxine (g TEQ/an)		
		1997	1998	1999
Usines d'incinération d'ordures ménagères*	70	500	300	200
Sidérurgie-métallurgie	80	350	300	120

*capacité supérieure à 6 tonnes par heure

Parmi les sources diffuses de PCDD et PCDF, certaines comme les gaz d'échappement, les huiles de moteurs ou le chauffage domestique (bois, charbon, gaz) semblent négligeables. En revanche, les réservoirs de PCDD/PCDF, tels que les bois traités au pentachlorophénol (PCP), les transformateurs électriques contenant des PCB, les boues d'épuration utilisées pour l'épandage, les sols et sédiments contaminés, représentent des sources potentielles de dioxines, dont l'importance réelle doit être évaluée. Récemment, la détection de fortes concentrations en dioxines dans des argiles ou kaolins situés dans des zones géographiques ou dans des strates du sol peu accessibles à une pollution

récente a focalisé les recherches sur les sources naturelles de dioxines. Ainsi, des études portant sur des échantillons collectés aux États-Unis (argile du Mississippi), en Allemagne (kaolins), en Australie et en Asie (sédiments profonds) confirment l'existence de contaminations antérieures à 1900. Les profils analytiques montrent une forte prédominance de l'octachlorodibenzo-dioxine et suggèrent la possibilité de formation naturelle de dioxines dans les sédiments marins.

Contamination de différents compartiments de l'environnement

Tous les compartiments de l'environnement sont concernés par une contamination par les PCDD et les PCDF : masses d'air, sols et sédiments, végétaux et animaux.

Les niveaux de contamination des masses d'air sont fonction des activités humaines industrielles et domestiques.

Niveaux de contamination en dioxines des masses d'air en zones urbaines et rurales pour différents pays européens (*European commission DG environment, 1999*)

Niveau de contamination des masses d'air (fg/m ³)	
Zones rurales	
Grande-Bretagne (1991-1996)	1 à 24
Allemagne (1992)	25 à 70
Zones urbaines	
Grande-Bretagne (1991-1996)	0 à 810
Allemagne (1992)	70 à 350
Belgique (1993)	86 à 129
Pays-Bas (1991-1993)	4 à 99
Autriche (1996)	26 à 314

Globalement, la concentration en PCDD/PCDF dans les sols dépend de la présence dans le voisinage (actuel ou passé) de sources potentielles telles que des usines chimiques ou métallurgiques et des d'incinérateurs. La contamination se fait essentiellement par dépôt des particules atmosphériques. Dans les sols, la migration verticale des PCDD et des PCDF est très faible et plus de 90 % des composés se retrouvent dans les 10 cm supérieurs. D'autre part, rien n'indique une perte appréciable de ces composés par évaporation ou dégradation sur une période de plusieurs années (demi-vie de la 2,3,7,8-TCDD estimée à 10 ans dans les sols), ce qui souligne encore la persistance de ces composés dans la partie superficielle des sols.

Des données ponctuelles européennes sont disponibles : en Bavière, 90 % des échantillons de sols ruraux mesurés se trouvaient en dessous de 1 pg TEQ/g. Des valeurs de contamination plus élevées ont été notées dans certaines forêts. De fortes teneurs sont retrouvées près des sources de pollution industrielle. En Allemagne, les teneurs de PCDD et PCDF dans les sols dits industriels sont en général supérieures à 100 pg TEQ/g. Aux Pays-Bas, des valeurs supérieures à 200 pg TEQ/g ont été relevées à proximité d'incinérateurs municipaux. En France, des mesures effectuées dans les sols situés à proximité d'un incinérateur de déchets urbains en fonctionnement depuis plus de 10 ans dépassaient largement la valeur de 40 pg TEQ/g au niveau de la retombée du panache.

**Concentrations en PCDD/PCDF dans les sols de différents pays européens
(European commission DG environment, 1999)**

	PCDD/PCDF (pg TEQ/g de sol)
Zones rurales	
Pays-Bas (1991)	2,2 à 16
Autriche (1989 ; 1989-1993)	1,6 à 14 (pâturages) ; < 1 à 64 (forêts)
Allemagne (1992)	1 à 5
Belgique (1992)	2
France (1999)	0,02 à 1
Zones urbaines	
Allemagne (1992)	10 à 30
France (1999)	0,2 à 17
Zones industrielles	
France (1999)	20 à 60
Allemagne (1992)	50-150
Pays-Bas (1990-1991)	13-252 (incinérateurs municipaux)

Comme pour les sols, la contamination des sédiments dépend aussi des sources de pollution, de la distance de la zone de prélèvement par rapport aux points sources, de la circulation des masses d'eau et des capacités de dilution des systèmes d'eau douce ou marins.

Les données sur la contamination des végétaux varient selon la géographie et la nature des prélèvements. En Allemagne, le chou a été choisi comme espèce sentinelle pour les retombées atmosphériques. Les valeurs vont de 0,7 pg TEQ/g en Hesse à 4,78 pg TEQ/g à Hambourg. En France, une étude de la Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes (DGCCRF) sur des végétaux collectés à proximité d'un incinérateur de déchets ménagers donne des valeurs allant de 0,21 pg TEQ/g pour le chou à 1,10 pg TEQ/g pour la salade.

Concentrations en PCDD/PCDF dans les sédiments de différents cours d'eau en Europe (*European commission DG environment, 1999*)

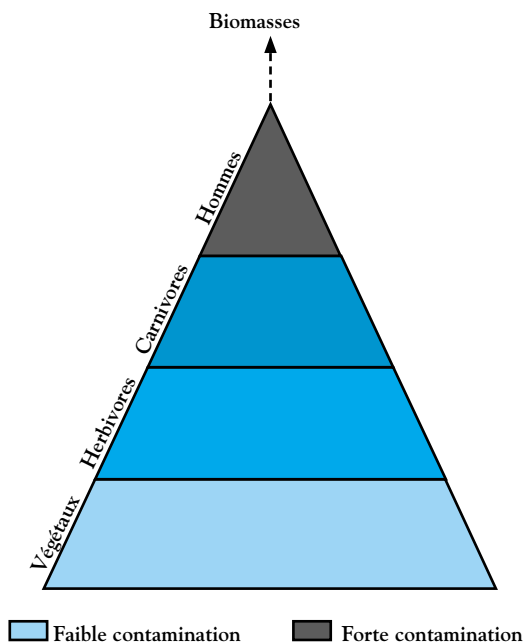
	Années de mesure	PCDD/PCDF (pg TEQ/g de sédiment)
Rivières allemandes	1994	1 à 20
Elbe Basse-Saxe	1994	1,17 à 19,2
Hambourg	1995	17,5 à 76,0
Rhin (Rhénanie du Nord/Westphalie)	1989-1996	16 à 103
	1995-1996	11 à 37
Installations portuaires (Hambourg)	1993	1 500
Estuaire du Rhin (Pays-Bas)	1980-1990	8 à 21

Pour les espèces végétales, différentes voies d'exposition et de pénétration des contaminants sont possibles. Généralement, le transfert des composés organiques des racines vers les pousses est négligeable. Des travaux réalisés en chambre de culture ont montré que, plus encore que l'absorption par les racines, c'est la dispersion des dioxines à partir du sol qui est la principale source de contamination des feuilles des fruits et des légumes. Mais, en milieu extérieur, la principale source de contamination est le dépôt atmosphérique. Les composés organiques peuvent ainsi pénétrer dans les feuilles des végétaux directement par dépôt atmosphérique en traversant la cuticule ou par les stomates. À partir des études allemandes, on peut calculer un taux moyen annuel de dépôt par unité de surface, en fonction de la contamination des masses d'air. Pour ce qui concerne les zones rurales et urbaines, un facteur moyen de 200 peut être calculé (par exemple une teneur de 25 fg/m³ dans l'air correspond à un dépôt de 5 pg/m² par an). Dans le cas d'émissions de poussières fortement concentrées en dioxines, ce facteur peut être 10 fois supérieur.

Transfert dans la chaîne alimentaire

Dans tout milieu, les chaînes alimentaires peuvent être représentées sous forme de « pyramides alimentaires ou trophiques » : les biomasses des divers niveaux (végétaux-herbivores-carnivores) décroissent fortement. Ceci explique que, pour des polluants liposolubles stables et peu biodégradés comme les PCDD et PCDF, les concentrations dans les divers niveaux trophiques augmentent de façon inversement proportionnelle à la diminution des biomasses. Par ailleurs, chaque niveau trophique peut être exposé à des sources environnementales qui s'ajoutent aux sources alimentaires ; dans le cas des PCDD et PCDF, l'exposition alimentaire apparaît toutefois prédominante par rapport aux autres sources.

En ce qui concerne les transferts vers les animaux dans les systèmes aquatiques, les analyses ont porté sur les poissons, les mollusques et les crustacés. Ces



Concentration par les chaînes alimentaires des toxiques biocumulatifs

espèces accumulent plus de dioxines que les animaux terrestres (vache, cochon, poulet...) et des concentrations de plusieurs centaines de pg TEQ/g de matières grasses ont été détectées dans certains poissons.

Pour les animaux terrestres, les données concernent surtout le lait de vache. À partir d'une source de pollution telle qu'un incinérateur, les PCDD et PCDF sont émis de façon très minoritaire sous forme gazeuse et principalement adsorbés sur des particules ; les taux émis varient de moins de 0,1 à plus de 100 ng/m³. Les PCDD et PCDF se déposent sur le sol et les végétaux, en particulier sur l'herbe, en fonction des courants atmosphériques et des précipitations. Le transfert du sol vers l'herbe semble très limité. Les bovins en pâture sont exposés surtout par l'ingestion d'herbe ou de foin contaminé ; les taux de contamination de l'herbe dans une zone exposée varient de 1 à 50 pg TEQ/g de matière sèche. La consommation de sol ou d'autres fourrages (maïs, betteraves) représente des apports nettement plus faibles.

L'absorption des dioxines par voie digestive est en général importante, avec une biodisponibilité comprise entre 60 % et 90 % chez les animaux et l'homme. Les capacités d'élimination sont faibles et varient d'une espèce à l'autre. La lactation constitue une voie majeure d'excrétion. La demi-vie des dioxines chez la vache laitière, par exemple, en est ainsi réduite. La distribution dans l'organisme s'effectue essentiellement en fonction de la teneur en lipides des tissus ; les PCDD et PCDF se fixent dans les réserves adipeuses et les

graisses tissulaires, par exemple celles de la viande des bovins. Une enquête récente en France, effectuée sur des échantillons de viandes achetées dans le commerce, a révélé des taux détectables dans tous les échantillons, mais inférieurs à 1 pg TEQ/g de matières grasses.

La mobilisation des graisses lors de la lactation explique les taux élevés de dioxines retrouvés dans le lait et ses dérivés. En France, les niveaux moyens de PCDD et PCDF dans le lait sont actuellement inférieurs à 1 pg TEQ/g de matières grasses, en l'absence d'une source de pollution locale. Lorsque les vaches laitières pâturent à proximité d'un incinérateur ou d'un site industriel émettant des PCDD et PCDF (recyclage de métaux ou de déchets industriels), les teneurs peuvent atteindre jusqu'à 50 pg TEQ/g de matières grasses en fonction de la distance, des vents dominants, mais également des paramètres zootechniques (niveau de production, nombre de lactations). En Autriche, une valeur extrême de 69 pg TEQ/g de matières grasses a été rapportée dans le lait de producteurs situés à proximité d'une usine de cuivre.

En France, la surveillance du lait et de ses dérivés est effectuée depuis 1994 par la Direction générale de l'alimentation (DGAL), en particulier à proximité d'incinérateurs ou de zones industrielles. Récemment, une circulaire du ministère de l'Environnement impose aux responsables d'unités d'incinération, outre une norme d'émission dans les fumées de 0,1 ng/m³, des mesures des teneurs en dioxines du lait des vaches situées aux alentours. À partir de la dose journalière admissible (DJA), des limites maximales de résidus (LMR) de PCDD et PCDF ont été déterminées dans certains aliments majeurs comme le lait et ses dérivés. Le Comité d'experts du Conseil de l'Europe a proposé en mars 1996 des valeurs qui ont été adoptées également en France. L'établissement de LMR pour d'autres aliments comme la viande bovine est en cours.

Recommandations sur les teneurs en dioxines dans les laits (Conseil supérieur d'hygiène publique de France, 1998)

Valeurs guides	Observation
1 pg TEQ/g de matières grasses laitières	Valeur considérée comme « bruit de fond », objectif à atteindre
3 pg TEQ/g de matières grasses laitières	Valeur maximale recommandée ; en cas de dépassement, rechercher les causes et les réduire
5 pg TEQ/g de matières grasses laitières	Valeur maximale admise ; en cas de dépassement, le lait n'est pas commercialisable

Il est possible d'établir, d'après les données expérimentales et de terrain, des coefficients de transfert entre les différents compartiments (air, sol, herbe, graisse, lait). Par exemple, un facteur de bioaccumulation (*biological accumulation*) peut être calculé à partir des valeurs en pg TEQ/g de matières grasses du lait par rapport aux concentrations en pg TEQ/g de matière sèche notées dans l'herbe des pâturages : d'après des données autrichiennes, ce facteur est égal à 2.

Ce taux concerne les transferts à partir des compartiments de l'environnement et ne concerne pas les transferts à partir des aliments pour animaux.

La détermination de coefficients de transfert permet de proposer des modèles pour prévoir l'incidence de niveaux donnés d'émission de PCDD et PCDF par une source industrielle. On peut également prévoir la cinétique de décontamination de vaches laitières après suppression d'une source de contamination, la diminution des teneurs dans le lait étant relativement rapide (quelques mois) du fait de la cinétique rapide chez la vache en lactation. Il faut tenir compte des comportements différents des divers congénères. Ainsi, la 2,3,7,8-TCDD possède le facteur de bioaccumulation le plus élevé de tous les congénères PCDD, ce qui aboutit à une différence entre les profils chromatographiques des différents congénères présents dans le sol et l'herbe d'une part, et dans le lait d'autre part.

Les concentrations en PCDD et PCDF dans les matières grasses humaines sont dix fois plus élevées que dans les matières grasses des bovins. Cette charge corporelle chez l'homme explique la concentration de 10 à 30 pg TEQ/g observée dans le lait maternel.

Évaluation de l'exposition humaine

Globalement, il est admis que l'exposition moyenne des populations se fait à plus de 95 % par voie alimentaire, en particulier par ingestion de graisses animales (lait et produits laitiers, viandes, poissons). L'apport le plus important est dû aux produits d'origine bovine (lait et dérivés, viande et abats) ; les volailles et le porc constituent des sources moindres, en raison de leur mode d'élevage en bâtiments (sauf en cas de contaminations des aliments). Les poissons et produits aquatiques représentent des sources d'importance variable, parfois relativement élevée pour certaines populations de forts consommateurs.

Diverses études montrent que la quantité totale de dioxines ingérées par voie alimentaire à l'âge adulte était d'environ 150 à 300 pg TEQ/jour entre 1980 et 1990, ce qui correspondait à une valeur médiane de 2,3 pg TEQ/kg de poids corporel/jour et une valeur maximale de 4 pg TEQ/kg/j. Ces évaluations semblent valables pour la plupart des pays industrialisés, mais évoluent vers une nette diminution depuis quelques années. En France, en 1999, l'AFSSA estime à 1,3 pg TEQ/kg/j la valeur médiane de la quantité de dioxines ingérées, avec une valeur de 2,6 pg TEQ/kg/j au 95^e percentile. Ces taux sont proches de ceux recommandés par l'OMS (1 à 4 pg TEQ/kg/j). Toutefois, l'OMS prend en compte dans le calcul du TEQ les PCB possédant une structure apparentée à celles des dioxines (PCB qualifiés de *dioxin-like*), qui contribuent en moyenne à 50 % de sa valeur. L'apport quotidien exprimé en

Apport quotidien de dioxines par les aliments : données françaises (Agence française de sécurité sanitaire des aliments, 1999), danoises (*European commission DG environment*, 1999) et américaines (*US EPA*, 2000)

	Contribution des différents aliments (pg/personne/jour)		
	France	Danemark	États Unis ¹
Lait et produits laitiers	25,8	46,0	12,0
Viande bovine et porcine	4,7	59,0	12,5
Poissons	9,3	19,2	11,5
Volailles	1,2	5,9	3,8
Œufs	4,0	3,0	0,5
Crustacés	0,8	-	-
Coquillages	7,1	-	1,3
Total	52,9	133,3	41,6

¹ : nomenclature OMS

TEQ se trouve donc sous-estimé en France, et devrait plutôt être proche de 2 pg TEQ/kg/j selon la nomenclature de l'OMS.

L'imprégnation directe par les dioxines peut être évaluée par la quantification des congénères présents dans la fraction lipidique de divers tissus biologiques humains (sang, lait maternel, graisse abdominale ou sous-cutanée). Cette quantification, introduite au début des années soixante-dix, a été initialement appliquée afin d'évaluer, souvent de façon rétrospective, l'exposition de populations de travailleurs de l'industrie chimique. Cette approche a ultérieurement permis de déterminer la nature et le degré d'exposition de travailleurs exposés, dans le cadre d'activités industrielles où les dioxines sont des impuretés de fabrication ou de production. Le dosage des 17 congénères a également servi à évaluer le degré de contamination des populations d'hommes, de femmes et d'enfants accidentellement exposés (Seveso, Viêt Nam, Yusho, Yu-Cheng). Plus récemment, cette méthode a été appliquée pour établir les niveaux moyens d'imprégnation de la population générale de divers pays à travers le monde.

Le dosage des dioxines dans les tissus biologiques humains se heurte à de nombreuses difficultés d'ordre pratique. Citons le coût financier important des dosages. S'y ajoute la nécessité de disposer d'une quantité suffisante de chaque échantillon biologique. Ainsi, le prélèvement de tissu adipeux sous-cutané ou abdominal est un geste invasif difficilement applicable dans le cadre d'études épidémiologiques. Le lait maternel, aisément accessible et riche en matières grasses, ne permet d'apprécier l'exposition que d'une fraction de la population. En ce qui concerne le sang, qui est pauvre en lipides circulants (0,5 %), une quantité relativement importante (entre 50 et 100 ml), prélevée dans des conditions adéquates (à jeun et à distance de tout repas riche en graisses) est nécessaire. Toutefois, les avancées dans les processus analytiques ont déjà

permis de doser les dioxines dans 10 à 15 ml de sang, voire moins de 1 ml quand les teneurs sont relativement élevées. Le dosage requiert en outre d'importantes compétences analytiques. De plus, l'interprétation des résultats du dosage des 17 congénères PCDD et PCDF dans les tissus biologiques humains en vue d'évaluer l'exposition humaine doit tenir compte de différents paramètres.

Tout d'abord, compte tenu du caractère cumulatif des dioxines, la mesure de ces substances fournit une bonne estimation de la charge corporelle, c'est-à-dire de la dose interne cumulée essentiellement par voie alimentaire dans les tissus graisseux au cours de toute la période de vie antérieure au prélèvement. En fait, pour une exposition constante, la charge corporelle se stabilise au bout de 5 demi-vies successives (le temps d'accumulation étant équivalent au temps d'élimination), soit après plus de 40 ans pour la majorité des congénères (demi-vie moyenne proche de 7 ans). À ce moment, la charge corporelle correspond à l'équivalent de 5 000 doses journalières cumulées. On comprend bien qu'une exposition transitoire comme la consommation pendant une brève durée de produits contaminés doit être importante pour modifier la charge corporelle. Cette modification peut être appréciée par des modèles pharmacocinétiques.

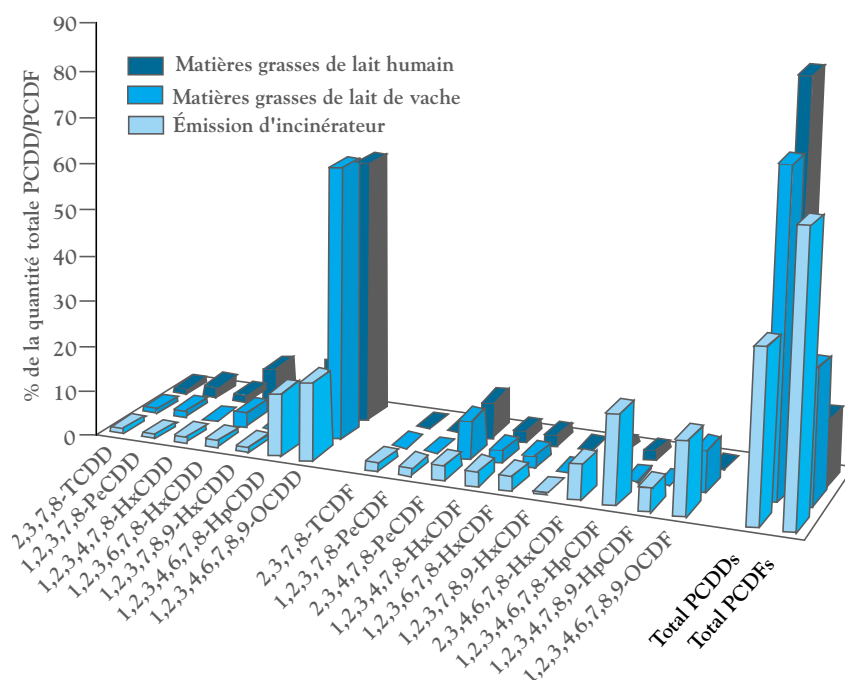
Compte tenu de la demi-vie particulièrement longue des dioxines chez l'homme, le dosage de ces substances dans les tissus biologiques permet d'apprécier à travers un dosage ponctuel l'historique de l'exposition. Toutefois, cette méthode d'évaluation ne permet pas de mettre en évidence des modifications récentes du degré de contamination de la chaîne alimentaire et des apports. Pour cette raison, la réalisation de dosages dans les vecteurs importants (lait de vache) apparaît tout à fait complémentaire à la réalisation de mesures chez l'homme. Le dosage des dioxines dans la filière bovine fournit, compte tenu du cycle de vie plus court et de l'élimination des dioxines dans le lait de vache, une bonne estimation de la contamination récente de l'environnement.

Enfin, divers facteurs affectant les concentrations ou la charge corporelle en dioxines doivent être impérativement pris en considération dans l'interprétation des valeurs. Parmi les facteurs confondants bien étudiés, citons l'âge croissant et l'accroissement de la masse corporelle qui augmentent la charge corporelle (sauf chez le petit enfant), le nombre et la durée des périodes d'allaitement qui contribuent à la réduire, les habitudes alimentaires qui constituent un déterminant majeur (consommation de produits laitiers, de viande bovine, de poissons plus ou moins contaminés suivant les zones géographiques).

Concernant la signification biologique de ce type de dosages, il est important de souligner qu'il n'y a pas de corrélation établie entre la charge corporelle et la quantité de dioxines fixées au récepteur intracellulaire Ah (ou dose effective responsable des effets biologiques). Ce lien est d'autant plus difficile à établir que diverses substances présentes dans l'environnement peuvent agir

comme agonistes (hydrocarbures aromatiques polycycliques comme par exemple ceux présents dans la fumée de tabac) ou antagonistes (polyphénols) de ce récepteur. De ce point de vue, les méthodes de dosage biologique (comme la technique CALUX), qui permettent d'apprécier le degré d'activation du récepteur Ah, apparaissent tout à fait complémentaires au dosage analytique des dioxines et pourraient constituer des méthodes de dépistage pour identifier les sujets ou populations plus exposés aux dioxines (et à d'autres ligands du récepteur Ah).

Néanmoins, l'analyse des concentrations respectives des 17 congénères est une étape indispensable dans l'évaluation biologique de l'exposition aux dioxines car elle peut contribuer à l'identification des sources de contamination. La concentration de chaque congénère intègre de multiples facteurs : quantités présentes dans l'environnement, bioaccumulation dans les chaînes trophiques, biodisponibilité après absorption et transformation métabolique chez l'homme (variable en fonction du composé). L'influence combinée de ces facteurs détermine les proportions relatives de chacun des 17 congénères dans les tissus biologiques humains. Pour cette raison, le profil des congénères dans ces tissus diffère de façon plus ou moins importante de celui observé dans l'environnement et dans divers vecteurs (produits laitiers).



Profils représentatifs de la distribution des congénères PCDD et PCDF dans différentes matrices

L'expression classique des résultats de l'analyse des 17 congénères sous forme d'équivalent toxique TEQ ne permet pas de quantifier la présence des différents congénères. Il y a parfois discordance pour certains congénères entre le caractère cumulatif et le caractère toxique : le meilleur exemple est fourni par l'OCDD qui constitue un composant majeur dans l'environnement et les chaînes trophiques mais dont la contribution à l'activité biologique des dioxines (TEQ) dans l'environnement et les organismes vivants est très faible.

Imprégnation des populations

Il est désormais bien établi que les populations de travailleurs de l'industrie chimique, de même que les populations de Seveso et de Yusho, ont été 100 à 1 000 fois plus exposées aux dioxines que ne le sont les populations soumises essentiellement à une contamination alimentaire. En outre, l'analyse du profil des congénères au sein de diverses populations démontre clairement que la nature des congénères présents dans les tissus biologiques dépend des circonstances d'exposition (prédominance de 2,3,7,8-TCDD pour les populations de Seveso, de PCDF pour celles de Yusho et Yu-Cheng ayant absorbé de l'huile de riz contaminée par des PCB, de PCDD par rapport aux PCDF en ce qui concerne le niveau de contamination de la population générale).

Concentrations sanguines relevées au sein de populations exposées aux dioxines, en comparaison avec la population générale

Population	Substances dosées (dates des prélèvements)	Concentrations min-max (en pgTEQ/g de matières grasses)
Populations fortement exposées		
Seveso (Zone A) (1976)	2,3,7,8-TCDD (1976)	828-56 000 ¹
NIOSH (1951-1972)	2,3,7,8-TCDD (1987-1988)	ND-3 400 ²
Ranch Hand-Viêtnam (1962-1971)	2,3,7,8-TCDD (1987)	ND-618 ³
Population générale		
Allemagne (1996)	PCDD, PCDF (1996)	6,1-41,5 ⁴

TCP : trichlorophénol ; ND : non détecté ; ¹ : d'après Mocarelli et coll., 1991 ; ² d'après Piacitelli et coll., 1992 ; ³ d'après Røegner et coll., 1991 ; ⁴ : d'après Wittsiepe et coll., 2000

Le suivi de diverses populations au cours des deux dernières décennies a clairement mis en évidence une diminution importante (de près de 50 %) du degré moyen d'imprégnation de la population générale dans divers pays. On estime qu'un Européen de l'Ouest a une charge corporelle en moyenne de 100-200 ng TEQ. Une étude réalisée en Allemagne de 1991 à 1996, sur des échantillons de sang provenant d'une population d'hommes de 10 à 80 ans, montre une diminution des concentrations de dioxines sur la période étudiée

d'environ 12 % par an et confirme l'augmentation des concentrations de dioxines en fonction de l'âge.

L'imprégnation des populations peut être également appréciée par les teneurs dans le lait maternel. Les résultats obtenus dans différents pays européens sont assez convergents même s'il est difficile de les comparer : beaucoup portent sur un petit nombre de sujets, les échantillons sont généralement mélangés et les conditions de recueil ne sont pas toujours précisées.

En France, une étude descriptive transversale réalisée en 1998 et 1999, portant sur 244 échantillons de lait maternel répartis sur l'ensemble du territoire français, rapporte une moyenne (arithmétique et géométrique) et une médiane autour de 16 pg TEQ/g de matières grasses (écart-type 5,15) comparable à celle des autres pays européens.

Teneurs en PCDD/PCDF des laits maternels en Europe

Pays	Année	Teneur (pg TEQ/g de matières grasses) ¹ (min-max)
Allemagne	1993	16,5
Autriche	1993	10,7-14,0
Belgique	1993	20,8-27,1
Danemark	1993	15,2
Espagne	1993	19,4-25,5
Finlande	1993	12,0-21,5
France*	1998-1999	16,4 (6,5-34,3)
Grande-Bretagne	1993-1994	17,9
Pays-Bas*	1992-1993	22,4 (10,0-35,9)

¹ : données OMS (1996), sauf France (InVS/CAREPS, 2000) ; * : mesures effectuées sur échantillons individuels – dans les autres cas, les mesures ont été effectuées sur un ou plusieurs pools

Toxicité aiguë

La toxicité des PCDD et des PCDF a été démontrée expérimentalement sur de nombreuses espèces animales, mais la plupart des études de toxicologie ont été réalisées avec la 2,3,7,8-TCDD. Les doses létales 50 (DL 50) varient fortement non seulement en fonction de l'espèce et de la souche, mais aussi du sexe, de l'âge et de la voie d'administration. Ainsi, en administration orale, un facteur 8 000 existe entre la DL50 (µg/kg) chez le cobaye, espèce la plus sensible, et la DL50 chez le hamster syrien. En administration intrapéritonéale, on trouve un facteur 300 entre le rat de souche Long Evans et le rat de souche Han Wistar.

Parmi les effets toxiques constamment retrouvés, on note une perte progressive de poids, une réduction des prises alimentaires, une atrophie du thymus et

Doses létales 50 (DL50) après administration orale de 2,3,7,8-TCDD dans différentes espèces (d'après IARC, 1997)

Espèce/souche (sexe)	DL 50 (µg/kg)
Cobaye Hartley (M)	0,6-2,0
Poulet NR	< 25
Singe rhésus (F)	70
Rat Sherman, Spartan (M)	22
(F)	13-43
Rat Sprague-Dawley (M)	43
Rat Fischer Harlan (M)	340
Souris C57BL/6 (M)	181
Souris DBA2/2J (M)	2 570
Souris B6D2F1 (M)	296
Lapin/New Zealand	115
Hamster syrien (M et F)	1 157-5 051

M : mâle, F : femelle

Réponses toxiques aiguës après exposition à la 2,3,7,8-TCDD dans différentes espèces (d'après IARC, 1997)

Réponse	Espèce				
	Singe rhésus	Cochon d'Inde	Rat	Souris	Hamster syrien
Hyperplasie ou métaplasie					
Muqueuse gastrique	++	0	0	0	0
Muqueuse intestinale	+				++
Tractus urinaire	++	++	0	0	
Canal biliaire et/ou vésicule biliaire	++	0		++	0
Poumon : foyer alvéolaire			++		
Peau	++	0	0	0	0
Hypoplasie, atrophie, ou nécrose					
Thymus	+	+	+	+	+
Moelle osseuse	+	+		±	
Testicule	+	+	+	+	+
Autres lésions					
Lésions hépatiques	+	±	+	++	±
Porphyrine	0	0	+	++	0
Cedème	+	0	0	+	+
Hémorragie	+	+	+	+	+

0 : aucune lésion observée ; + : lésion observée ; ++ : lésion sévère observée ; ± : lésion observée de façon plus ou moins importante

des hémorragies gastro-intestinales. D'autres signes caractéristiques de toxicité sont présents au niveau du foie, de la peau et des glandes endocrines. Les diverses lésions hépatiques comprennent : stéatose, hépatocytes géants, inflammation et nécrose ; au niveau de la peau, une chloracné, une hyperkératinisation, une involution des glandes sébacées et des kystes sébacés sont

constatés en particulier chez le singe, les rongeurs n'étant pas de bons modèles. Dans les cultures cellulaires et *in vivo*, des altérations de l'activité de prolifération et de l'état de différenciation des cellules épithéliales sont mises en évidence.

D'un point de vue biochimique, on observe au niveau du foie une induction enzymatique, en particulier des cytochromes P450 de type 1A1 (CYP1A1), une hyperlipidémie, une déplétion en vitamine A, ou encore l'apparition d'une porphyrie.

Immunotoxicité chez l'animal

Les effets immunotoxiques de la 2,3,7,8-TCDD ont été étudiés dans de nombreuses espèces animales : souris, rat, cobaye, lapin, singe... Il n'a pas été possible de définir un profil immunotoxicologique valable dans toutes les espèces considérées. Une hypoplasie ou une atrophie du thymus est l'un des effets les plus marquants chez les rongeurs, sans signification avérée en ce qui concerne le statut immunologique de l'animal. La souris est nettement plus sensible que le rat.

Effets immunotoxiques de la 2,3,7,8-TCDD : DME0 (dose minimale entraînant un effet observé) (d'après IARC, 1997)

Espèce	Protocole	DME0	Effet
Singe rhésus	25 ng/kg pendant 4 ans, vo	0,642 ng/kg/j	↘ Lymphocytes
Singe ouistiti	0,3 ng/kg/sem pendant 24 sem	0,135 ng/kg/j	↘ Lymphocytes
Souris C57BL/6	1 ng/kg/sem pendant 4 sem, vi	1 ng/kg/sem	Immunosuppression Faible régénération des lymphocytes T cytotoxiques
Souris B6C3F1	10 ng/kg 7 j après la fécondation	10 ng/kg à j 7	Augmentation de l'infection virale (chez la descendance)
Cochon d'Inde	8-200 ng/kg/sem pendant 8 sem	8 ng/kg/sem 200 ng/kg/sem	Immunosuppression Faible réponse à la toxine tétanique

vo : voie orale ; vi : voie intrapéritonéale ; sem : semaine ; j : jour

L'intensité de la dépression de l'immunité humorale et cellulaire varie en fonction de l'espèce. L'effet dépresseur sur l'immunité humorale est constant chez la souris. Les défenses non spécifiques (phagocytose) ne sont pas touchées. Une diminution de la résistance à une infection expérimentale est souvent, mais inconstamment, retrouvée. Il n'existe aucune donnée en faveur d'un éventuel potentiel sensibilisant de la 2,3,7,8-TCDD sur l'induction de maladies auto-immunes. Les mécanismes en cause dans l'immunotoxicité ne sont pas élucidés.

Un aspect particulier concerne les effets immunotoxiques après exposition *in utero*. Les données animales démontrent une sensibilité nettement plus grande vis-à-vis de la 2,3,7,8-TCDD pendant cette période.

Effets sur la reproduction et le développement chez l'animal

Les effets de la 2,3,7,8-TCDD sur la reproduction et le développement ont été étudiés dans de nombreux modèles animaux. Les résultats obtenus chez les rongeurs ainsi que chez d'autres espèces montrent que la sensibilité est très variable d'une espèce à l'autre, à l'intérieur d'une même espèce et même entre les différentes souches.

Des effets sur la production de gamètes et la fécondation ont été mis en évidence. La 2,3,7,8-TCDD a une influence négative sur la taille des organes reproducteurs, sur le nombre de spermatozoïdes et sur la quantité d'ovules disponibles par maturation folliculaire. La diminution de fertilité observée est cependant modérée. La fertilité est surtout réduite dans le cas d'exposition des femelles à la 2,3,7,8-TCDD, et ceci d'autant plus qu'elles ont été exposées durant la période d'organogenèse. L'axe hypothalamo-hypophysaire semble être le siège principal des dysfonctionnements. La diminution de la fécondité est aussi liée à la baisse de l'activité sexuelle chez les rongeurs.

L'exposition de la mère semble avoir peu d'effets sur l'étape de nidification. Le récepteur Ah est exprimé par l'embryon chez la souris dès le stade 8 cellules, et seul un effet de différenciation plus précoce du trophoctoderme (blastocœle) est observé chez certains rongeurs.

Les effets tératogènes documentés concernent des problèmes de différenciation sexuelle, de fentes palatines, d'hydronéphrose, de troubles de l'organogenèse dentaire chez le rat et la souris, de formation du système nerveux central (poulet), d'atteinte auditive (rat), et d'atteinte du thymus dans tous les modèles animaux. Le mécanisme d'action de la 2,3,7,8-TCDD implique un trouble dans l'apparition séquentielle des facteurs de croissance (comme le TGFβ – *transforming growth factor*) au sein de l'embryon, indispensable à une organogenèse réussie.

Les études de l'organogenèse dentaire des rongeurs ont mis en évidence la perturbation par la 2,3,7,8-TCDD de l'expression de différents facteurs de croissance impliqués dans l'élaboration de la dent, le tissu le plus sensible étant l'émail dentaire. Cet effet a été reproduit dans les cultures de tissus fœtaux humains.

Au moment de l'organogenèse, il existe une grande différence de sensibilité entre les espèces et dans une même espèce entre les différentes souches. Les souches sensibles de rongeurs peuvent présenter une fente palatine pour des concentrations de 2,3,7,8-TCDD de 1 pg/mg de tissu palatin.

Dans une étude effectuée chez des singes rhésus femelles exposées pendant 4 ans à la 2,3,7,8-TCDD *via* leur alimentation, on a constaté 10 ans après la fin du traitement la présence d'une endométriose. L'incidence de l'endométriose était directement corrélée avec l'exposition à la 2,3,7,8-TCDD et la sévérité de la maladie était dépendante de la dose administrée.

La diminution observée de la tétra-iodothyronine chez les rats exposés à la 2,3,7,8-TCDD *in utero* n'est statistiquement significative que chez les femelles. Les singes rhésus soumis à de faibles doses (proches des doses environnementales) de 2,3,7,8-TCDD présentent une atteinte significative des tests d'apprentissage relatifs à l'espace. Cette atteinte n'est plus significative quand les tests d'apprentissage sont liés aux couleurs.

Effets sur la reproduction et le développement : DMEO (dose minimale entraînant un effet observé)

Espèce	Dose, voie, durée d'administration	DMEO	Effet
Singe rhésus	5 et 25 ng/kg/j nourriture de la mère, 4 ans	0,642 ng/kg/j 0,126 ng/kg/j 0,126 ng/kg/j	Fœtotoxicité Endométriose (mère) ↘ Reconnaissance objet
Rat Sprague-Dawley	1-100 ng/kg à la mère, chronique ou 30 ng/kg/j à la mère, 6-15 ^e j de grossesse	10 ng/kg/j	Fœtotoxicité
Rat Long-Evans	50, 200, 800 ng/kg/j au 15 ^e j de grossesse	200 ng/kg/j	Formation filaments vaginaux
Rat Holtzman	64 ng/kg/j à la mère au 15 ^e j de grossesse	64 ng/kg/j	↘ Capacité de reproduction chez le mâle

Effets cancérogènes chez l'animal

Dans la famille des dioxines, c'est la 2,3,7,8-TCDD qui a été la plus étudiée sur le plan de la cancérogenèse. Sept études de cancérogenèse expérimentale à long terme ont été faites chez le rongeur, trois chez le rat, trois chez la souris et une chez le hamster. Chez le rat et la souris, le foie est la principale cible de cancer, mais d'autres sites (thyroïde, poumons, cavité orale) peuvent être également concernés. L'incidence moyenne des tumeurs (adénomes et carcinomes) est proche de 50 % et fait apparaître une susceptibilité très marquée selon le sexe. Chez le rat, les femelles se révèlent nettement plus sensibles que les mâles ; ce sont au contraire les mâles qui sont affectés chez la souris. Cette différence de susceptibilité selon le sexe est inverse de celle généralement observée dans les deux espèces lors d'études d'hépatocarcérogenèse classiques.

Si la 2,3,7,8-TCDD est qualifiée de « plus puissant cancérogène connu » et de cancérogène complet par l'*US-Environmental protection agency* (US EPA), c'est parce que chez l'animal, des doses effectivement très faibles induisent des

cancers après une administration sur une longue période. Un cancérigène complet est une substance qui, appliquée seule à l'animal pendant deux ans, donne une augmentation significative du nombre de tumeurs. Cependant, la 2,3,7,8-TCDD n'est pas mutagène et n'induit pas directement de lésions sur l'ADN, contrairement à la capacité commune des agents génotoxiques. D'après l'ensemble des données expérimentales disponibles, le Centre international de recherche sur le cancer (IARC) estimait toutefois en 1997 qu'il existait une « évidence suffisante » pour une activité cancérigène de la 2,3,7,8-TCDD chez l'animal.

Activité cancérigène hépatique de la 2,3,7,8-TCDD

Espèce	Dose effective (µg/kg)	Durée du traitement (sem)	Tumeurs (%)
Rat Sprague-Dawley	0,1/j	104	40 (F)
Rat Osborne-Mendel	0,5 × 2/sem	104	25 (F)
Rat Sprague-Dawley	1,75 × 2/sem	30	0
Souris Swiss/H/Riop	0,7/sem	52	47
	7,0/sem	52	30
Souris B6C3F1	M : 0,5 × 2/sem	104	34
	F : 2,0 × 2/sem	104	13
Souris C57Bl × C3H	5,0/sem	52	19 (F) et 66 (M)

M : mâle ; F : femelle ; sem : semaine ; j : jour

En l'état actuel des connaissances sur les effets cancérigènes de la 2,3,7,8-TCDD, il est possible d'émettre trois hypothèses concernant le mécanisme d'action :

- l'inhibition de l'apoptose favorise la survie de cellules précancéreuses par rapport aux cellules normales ;
- le déclenchement de processus oxydatifs, *via* le récepteur Ah et l'induction massive des CYP1A, provoque des lésions oxydatives de l'ADN ;
- les effets cytotoxiques de la 2,3,7,8-TCDD à bas niveau induisent une prolifération régénératrice discrète qui favorise la fixation de mutations de l'ADN, elles-mêmes provoquées par d'autres voies.

Effets cancérigènes chez l'homme

De nombreuses études épidémiologiques ont évalué les effets des dioxines sur le développement de cancers chez l'homme. Les études épidémiologiques les plus informatives sont celles qui ont étudié d'une part la population de Seveso, qui fut accidentellement exposée aux dioxines (2,3,7,8-TCDD) en 1976, et

d'autre part les travailleurs exposés dans les usines produisant des herbicides, des chlorophénols et des chlorophénoxy contaminés par des PCDD ou des PCDF. Dans ces études prospectives, des efforts considérables ont été faits pour mesurer l'exposition des populations aux dioxines. Les niveaux d'exposition étaient de 100 à 1 000 fois plus élevés que ceux de la population générale.

Cohortes de populations fortement exposées

Cohortes	Caractéristiques
NIOSH	États-Unis, 12 usines
IARC	Internationale, 10 pays, 20 cohortes
Allemande	Allemagne, 4 usines
BASF	Allemagne, 1 usine
Boehringer	Allemagne, 1 usine
Hollandaise	Pays-Bas, 2 usines
Seveso	Italie, population de Seveso
US Air Force Ranch Hand	États-Unis, anciens combattants du Viêtnam

Des excès de risque faibles pour tous cancers confondus ont été trouvés dans toutes les cohortes industrielles pour lesquelles l'exposition aux PCDD/PCDF était correctement évaluée. Cet excès de risque était de l'ordre de 40 %, 20 ans après la première exposition. Des risques plus élevés étaient constamment retrouvés chez les travailleurs ayant les expositions les plus élevées. A Seveso, le risque global de cancer n'était pas augmenté dans les premières analyses mais tend à s'élever dans les cinq dernières années. On retrouve un risque plus élevé pour certains cancers (lymphomes, myélomes multiples, sarcomes des tissus mous, cancers du poumon, cancers du foie) dans certaines études mais, dans l'ensemble, les résultats n'apparaissent pas cohérents et il ne semble pas qu'un cancer particulier prédomine dans les populations exposées.

Mortalité par cancer dans les cohortes industrielles fortement exposées aux PCDD/PCDF

Source	Effectif exposé	Nombre de décès	SMR* (95 % CI)
Cohorte internationale IARC**	13 831	394	1,2 (1,1-1,3)***
Cohorte NIOSH	5 142	40	1,6 (1,2-1,8)
Cohorte allemande	1 279	105	1,3 (1,0-1,5)
Cohorte hollandaise	549	51	1,5 (1,1-1,9)
Cohorte BASF	113	18	1,9 (1,1-3,0)

*standardized mortality ratio ; **20 ans après la première exposition ; ***pour les groupes des cohortes les plus exposées

On peut faire un certain nombre d'observations après examen des résultats de ces études sur le risque de cancer. Premièrement, il y a peu de précédents de cancérigène influant sur l'augmentation du risque de cancers sans prédominance pour un cancer spécifique. Deuxièmement, les excès de risque retrouvés dans les cohortes industrielles sont statistiquement très significatifs et un effet du hasard peut être exclu. Malgré cela, l'évaluation de ces résultats doit être faite avec prudence, étant donné que les risques globaux ne sont pas très élevés. Des biais potentiels dus à des facteurs de confusion comme le tabac ou l'exposition à d'autres substances chimiques industrielles ne peuvent pas être totalement écartés. Enfin, l'évidence la plus forte provient d'études concernant des sujets ayant des niveaux d'exposition de 100 à 1 000 fois plus élevés que la population générale. Pour extrapoler ces résultats à la population générale, il faudrait présumer que les effets sont similaires à doses élevées et à doses faibles. En l'état actuel des connaissances, aucun cas de cancer n'a pu être formellement attribué à une exposition aux dioxines en population générale.

Autres effets toxiques chez l'homme

Il a été montré à maintes reprises que l'exposition à des doses relativement élevées de dioxines entraîne des effets dermatologiques (chloracné). Cependant, il ne semble pas exister de relation directe entre le niveau d'exposition et cette manifestation.

Des études chez les travailleurs de l'industrie et dans la population exposée accidentellement à Seveso ont montré une élévation transitoire des enzymes hépatiques. Une augmentation des GGT (gamma glutamyl transférases) a été observée chez les enfants de Seveso peu de temps après l'accident, mais elle avait disparu cinq ans plus tard. Il en est de même pour l'acide D-glucarique chez les enfants et les adultes. Les niveaux sériques de transaminases (glutamique, oxalo-acétique et pyruvique) n'étaient pas augmentés une dizaine d'années après l'exposition.

Un risque augmenté de maladies cardiovasculaires et une modification des taux de lipides sanguins (cholestérol total et triglycérides augmentés) ont été observés dans certaines études de travailleurs de l'industrie, à Seveso et dans l'étude Ranch Hand (anciens combattants du Viêtnam exposés à l'agent orange, mélange défoliant fortement contaminé en dioxines). Cependant, les résultats ne sont pas entièrement cohérents entre les différentes études. Un risque augmenté de diabète a été retrouvé à Seveso et dans la cohorte Ranch Hand. L'ensemble des résultats indique une augmentation de la mortalité cardiovasculaire pour les groupes les plus exposés.

D'autres effets ont été décrits, comme des modifications de la fonction thyroïdienne, des effets neurologiques ou neuropsychologiques, mais les résultats reposent sur peu d'observations.

Mortalité par maladie cardiovasculaire pour les populations fortement exposées

Populations	SMR* (95 % CI)
Cohorte BASF	0,6 (0,2-1,3)
Cohorte IARC	1,7 (1,2-2,3)
Cohorte hollandaise	1,9 (0,9-3,6)
Cohorte Boehringer	1,4 (0,7-2,8)
Cohorte Ranch Hand	1,5 (1,0-2,2)
Cohorte NIOSH	1,8 (1,1-2,9)
Cohorte Seveso	1,6 (1,2-2,5)

*SMR : *standardized mortality ratio*

Les données humaines sur l'immunotoxicité sont relativement nombreuses, mais contradictoires. Elles concernent des expositions dont la nature (dioxine et « *dioxin-like* ») et l'importance ne sont pas connues avec précision. Les modifications rapportées, très variables, ne permettent pas de conclure quant au potentiel immunotoxique des dioxines et il ne semble pas possible en l'état des connaissances d'aboutir à une évaluation réaliste du risque immunotoxique pour les individus ou les populations exposés.

Effets (autres que cancérogènes) concernant les populations fortement exposées aux dioxines

Effet	Évidence épidémiologique
Effets dermatologiques (chloracné)	Association prouvée
Effets gastrointestinaux et enzymes hépatiques	Augmentation temporaire des enzymes hépatiques
Maladies cardiovasculaires et changements des concentrations lipidiques	Association positive dans la plupart des études à fortes doses mais résultats pas entièrement cohérents
Diabète	Augmentation des risques à Seveso et Ranch-Hand (morbidité)
Fonction thyroïdienne	Quelques petites différences de taux (↗) rapportées pour T4, TSH, TBG et T3
Effets neurologiques et psychologiques	Quelques effets rapportés à Seveso et Ranch-Hand (polyneuropathies, troubles de la coordination). Données non cohérentes. Aucune association avec la dépression
Appareil respiratoire	Données discordantes. Irritation et réduction du volume expiratoire forcé dans certaines études
Appareil urinaire	Pas de dysfonction majeure observée des reins ou de la vessie
Système immunitaire	Données non cohérentes

T4 : tétraiodothyronine (thyroxine) ; TSH : *thyroid stimulating hormone* ; TBG : *thyroxin binding globulin* ; T3 : triiodothyronine

Effets sur la reproduction et le développement chez l'homme

La plupart des études épidémiologiques menées sur les effets sur la reproduction et le développement concernent l'exposition paternelle. Il s'agit du suivi des cohortes fortement exposées à la 2,3,7,8-TCDD et autres PCDD comme les cohortes de Seveso et de Ranch Hand, ainsi que les populations industrielles. La plupart des études ont cependant une trop faible puissance pour détecter une augmentation du risque de malformation à la naissance et les résultats sont discordants concernant l'augmentation de risque d'avortements spontanés. Les études relatives aux expositions industrielles aux dioxines et à l'agent orange mettent en évidence une augmentation non significative des spina bífida et des cardiopathies congénitales. Après l'accident de Seveso, il n'a pas été mis en évidence d'excédent de malformations majeures, mais une modification du sex-ratio à la naissance chez les enfants nés de couples très exposés, avec une nette prédominance des filles sur les garçons. Ce phénomène atteint plus particulièrement la descendance des sujets âgés de moins de 19 ans au moment de l'exposition. Les résultats concernant des modifications de taux d'hormones impliquées dans la reproduction sont contradictoires. Quelques études mettent en évidence une atteinte de la fertilité lors d'expositions accidentelles ou industrielles. Il s'agit essentiellement d'anomalies de la spermatogenèse : hypoasthénospermie et tératospermie. Toutes les études n'ont pas confirmé ces atteintes.

Dans les études sur les effets liés à une exposition environnementale, il existe de façon quasiment inéluctable une co-contamination par les PCB. Les données recueillies sur le développement des enfants exposés *in utero* à des doses voisines de la limite supérieure des doses environnementales en PCB sont assez cohérentes. Tant dans la cohorte du Michigan que dans les études européennes (Pays-Bas, Finlande et Suède), on retrouve chez les enfants les plus exposés *in utero* une diminution du poids de naissance, de la taille et du périmètre crânien. Dans l'étude finlandaise, on a observé chez certains enfants la présence d'anomalies de formation de l'émail des dents (prémolaires) qui pourraient être en relation avec l'exposition au cours de l'allaitement. Chez les pêcheurs suédois, on a constaté une augmentation du temps nécessaire pour concevoir, proportionnelle à la quantité de poisson consommé. Il n'y pas encore de résultats concernant les effets sur le système reproducteur féminin, comme l'endométriose ou les effets sur la fertilité. On note par ailleurs dans ces études une incidence significativement élevée d'anomalies biologiques (sans manifestations cliniques) ainsi que des atteintes thyroïdiennes, immunitaires et de la coagulation.

Les études des années soixante-dix, réalisées aux États-Unis (en Caroline du Nord et dans les Grands Lacs) concernant les atteintes neuro-développementales ont montré une corrélation inverse entre les taux de PCB chez les enfants et leur score de réussite dans des tests de développement

cognitif et neuromoteur. Le retard neuromoteur se corrige dans la première année de vie, mais le retard développemental subsiste et, à 11 ans, on observe encore des performances moins bonnes en arithmétique. Dans les séries européennes (Pays-Bas, Allemagne) des résultats analogues ont été observés mais le suivi ne va pas au-delà de 3 ans et demi, âge auquel les anomalies persistent. Bien que l'allaitement apporte beaucoup de dioxines et de PCB, ce sont les taux à la naissance qui paraissent déterminants pour les effets observés sur le développement neuro-comportemental.

Les données d'épidémiologie suggèrent donc que, même lors d'expositions de type environnemental, le fœtus humain pourrait être vulnérable aux hydrocarbures aromatiques polycycliques halogénés (HAPH). Il faut souligner que les études en question concernent plus les PCB que les dioxines. Cependant, l'exposition aux dioxines est corrélée à celle des PCB.

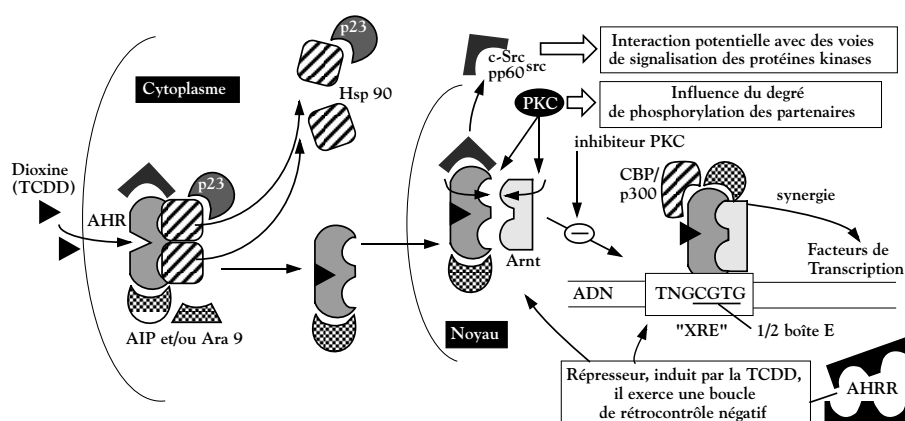
Cascade moléculaire impliquant le récepteur Ah

Les dernières années ont vu s'accomplir des progrès considérables relatifs à l'élucidation du mécanisme moléculaire responsable des manifestations toxiques de la dioxine (la 2,3,7,8-TCDD étant considérée comme référence). Le caractère indispensable du récepteur Ah dans la médiation de certains effets de la 2,3,7,8-TCDD est désormais acquis grâce aux travaux récents ayant abouti à la création indépendante de trois lignées murines d'invalidation du gène du récepteur Ah. En l'absence de ce gène, on n'observe pas les manifestations classiquement décrites (hépatotoxicité, cancers, malformations).

La structure du récepteur Ah, présent à l'état quiescent dans le cytoplasme, est connue avec précision. Elle est apparentée aux récepteurs nucléaires à domaine PAS (Per-AhR-Sim) qui interagissent avec l'ADN, grâce à leur segment amino-terminal basique-hélice/boucle/hélice (b-HLH), au niveau de séquences reconnues (TNGCGTG) dans la région 5' régulatrice des gènes qu'ils transactivent. Les protéines qui présentent un domaine PAS participent à la fonction ancestrale d'établissement des rythmes biologiques circadiens.

L'activation du récepteur Ah par un ligand comme la 2,3,7,8-TCDD conduit à une cascade d'événements. Le récepteur, engagé à l'état quiescent dans un complexe multiprotéique, se sépare de ses protéines chaperons (protéine de choc thermique Hsp90, p23, AIP (*AhR interacting protein*), ARA9 (*Ah receptor associated protein*)...) et peut pénétrer dans le noyau et se dimériser avec une protéine partenaire nommée Arnt (*AhR nuclear translocator*). Les états de phosphorylation respectifs de ces deux partenaires modulent la capacité du complexe binaire à interagir avec l'ADN et à induire la transcription de gènes cibles (coopération avec la machinerie transcriptionnelle et des facteurs de transcription spécifiques). Les séquences DRE (*Dioxin responsive elements*), reconnues par le complexe AhR-Arnt dans la région régulatrice des gènes cibles, sont présentes dans un nombre considérable de gènes (cytochromes

P450 1A, 1B...), qui ne sont pas tous identifiés. Une boucle d'autorégulation de ces inductions existe : le récepteur Ah induit la transcription de son propre répresseur, AhRR, une forme tronquée du récepteur, constitutivement activée, qui entre en compétition avec le récepteur Ah natif pour le recrutement de Arnt et la formation d'un dimère dépourvu d'activité transcriptionnelle.



Cascade moléculaire impliquant le récepteur Ah (aryl hydrocarbon)

(Hsp : protéines de choc thermique ; AIP : AhR interacting protein ; Ara 9 : Ah receptor associated protein ; Arnt : AhR nuclear translocator ; src : sarc ; PKC : protéine kinase C ; CBP : CREPB (cAMP response element-binding protein) ; XRE : xenobiotic responsive element ; AhRR : forme tronquée de AhR à fonction de répresseur)

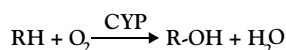
La plupart des effets de la 2,3,7,8-TCDD passent par l'activation du récepteur Ah qui initie une cascade d'événements impliquant différentes voies de signalisation (protéines kinases, phosphatases). Les effets de la 2,3,7,8-TCDD empruntent majoritairement la voie de signalisation transcriptionnelle du récepteur Ah. Cependant, les étapes de son activation dans le cytosol augmentent la disponibilité de kinases biologiquement très actives. De cette manière, l'activation du récepteur Ah est susceptible d'interférer avec d'autres voies de signalisation cellulaire qu'il faut prendre en considération.

Les études de pharmacologie comparée établissent des valeurs d'affinité de la 2,3,7,8-TCDD pour le récepteur Ah situées entre 1 et 10 nM pour la plupart des espèces. Ces différences d'affinité (relativement faibles) ne peuvent expliquer les variations de niveau des effets toxiques observées entre les différentes espèces. Conjointement, des lignées de rongeurs ayant des affinités équivalentes pour le récepteur Ah présentent des DL50 variant d'un facteur 5 000. Il apparaît que l'affinité de la 2,3,7,8-TCDD pour le récepteur ne constitue pas la clé exclusive de l'interprétation des disparités de sensibilité à la 2,3,7,8-TCDD entre les espèces.

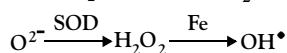
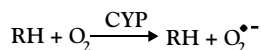
Conséquences de l'induction des cytochromes P450

Un des mécanismes de la toxicité des dioxines les plus étudiés, et qui semble peu contesté, est le déclenchement d'un stress oxydant. Ce stress peut être mesuré de plusieurs façons : mesure directe des espèces réactives de l'oxygène, peroxydation lipidique ou formation de 8-hydroxyguanine. Les mécanismes par lesquels la dioxine provoque un stress oxydant peuvent être multiples. L'induction des cytochromes P450 (CYP) est une voie possible. Les CYP sont des monooxygénases, enzymes détoxifiantes dites de phase I, qui métabolisent les xénobiotiques, en particulier les hydrocarbures polycycliques. La phase I consiste le plus souvent en une oxygénation du xénobiotique permettant par la suite l'addition d'un groupement hydrophile par les enzymes de la phase II. Il est bien établi que les monooxygénases produisent au cours de leur cycle catalytique des espèces réactives de l'oxygène (ERO) responsables d'un stress oxydant. En présence de certains substrats dits « découplés », la réaction d'oxygénation est incomplète et produit de l'eau oxygénée (H_2O_2) ou l'anion superoxyde : ce dernier, transformé en H_2O_2 par la superoxyde dismutase, peut donner un radical hydroxyl ($\text{OH}^\bullet$) en présence de fer (réaction de Fenton). Ces composés oxygénés sont très réactifs et peuvent provoquer des lésions sur l'ADN, des altérations des protéines et des modifications au niveau des lipides.

Substrat « couplé »



Substrat « découplé »



(SOD = superoxyde dismutase)

Production d'espèces réactives de l'oxygène par les cytochromes P450 (CYP)

La dioxine induit l'expression de trois cytochromes P450 de type 1 : CYP1A1, CYP1A2 et CYP1B1. *CYP1A1* est le prototype du gène inducible par les dioxines. Les dioxines induisent également l'expression des gènes codant pour les enzymes de phase II qui interviennent dans la détoxification des métabolites générés par le CYP1A1. L'équilibre entre les enzymes de phase I et II est donc important pour la détoxification des xénobiotiques. Comme les CYP métabolisent de nombreuses substances endogènes ou exogènes, la dioxine peut modifier le métabolisme de ces substances ; il est donc nécessaire d'envisager les interactions entre la dioxine et des xénobiotiques comme le benzo[a]pyrène, par exemple en cas de tabagisme.

Les cytochromes P450 induits par la dioxine métabolisent l'œstradiol (E2). Cette induction participe aux effets anticérogéniques de la dioxine et selon

le CYP mis en jeu, génère des métabolites non toxiques ou génotoxiques. Le CYP1A1 hydroxyle principalement la position 2 de E_2 , et un composé non toxique est formé. Le CYP1B1 hydroxyle principalement la position 4, ce qui conduit à un métabolite réactif capable de former des adduits à l'ADN, et donc potentiellement génotoxique.

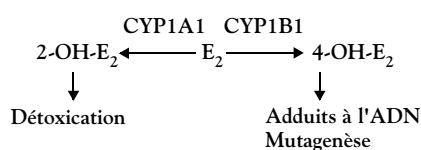


Schéma simplifié du métabolisme de l'œstradiol (E_2) par les cytochromes P450 (CYP)

Un des aspects essentiels de la toxicité des xénobiotiques est la notion de susceptibilité individuelle d'origine génétique. Une susceptibilité différente des individus peut être due à un profil génétique particulier, par exemple dans les gènes du métabolisme des xénobiotiques et les gènes régulateurs. Ce type d'études commence juste à être réalisé pour comprendre les effets de la dioxine chez l'homme. Concernant le CYP1A1, il semble que les individus pourraient être classés en trois catégories : fortement, moyennement ou faiblement inductibles. Par ailleurs, des travaux ont été réalisés pour tenter de corréler l'expression de gènes du métabolisme des xénobiotiques ou leurs polymorphismes et l'apparition de cancers chez l'homme. Les résultats concernant le CYP1A1, encore très préliminaires, sembleraient indiquer un lien entre différents variants de ce gène et le risque de développer certains types de cancers du poumon.

Mécanismes d'action impliquant le récepteur Ah dans les pathologies endocrines

Le concept de perturbateur endocrinien s'applique à des molécules capables d'imiter ou de bloquer les hormones naturelles, en particulier pendant les étapes cruciales de la vie *in utero* et du développement. Avant même tout effet antagoniste direct, les dioxines perturbent la sphère endocrine en modifiant la stéroïdogénèse. L'effet inhibiteur exercé par les dioxines sur toutes les hormones stéroïdes, aussi bien œstrogènes, progestatives qu'androgènes, en modulant notamment les voies de signalisation de ces hormones, pourrait rendre compte des effets pathogènes observés au niveau du tractus génital mâle et de l'endométriose chez le singe et le rat femelle. Les dioxines semblent aussi perturber les effets de l'hormone lutéotrope sur l'ovulation.

Différents mécanismes mettant en jeu une altération de la fonction endocrine par les dioxines peuvent être également évoqués à propos des effets toxiques

observés chez l'animal et l'homme : perturbation du transport des hormones thyroïdiennes ; modification de l'expression des cytokines et involution thyroïdienne dans les effets immunotoxiques ; inhibition de l'expression de facteurs de croissance (comme le TGF β et l'EGF – *epidermal growth factor*) et de la vitamine A dans la survenue de manifestations cutanées (chloasme) chez l'homme ; inhibition du transport du glucose en lien avec la mise en évidence récente de diabète dans les populations fortement exposées ; perturbation des interleukines dans certaines maladies inflammatoires associées à l'exposition aux dioxines. Ainsi, dans les maladies cardiovasculaires comme l'athérosclérose, signalées dans certaines cohortes, on peut penser que les dioxines augmentent l'expression de facteurs inflammatoires (élévation des cytokines) qui sont capables de provoquer un stress oxydant délétère pour les cellules endothéliales des vaisseaux.

Au regard de l'avancée des connaissances sur les multiples modes d'action des dioxines, on peut envisager la participation de ces substances dans le développement de certaines pathologies : l'ostéoporose (les dioxines sont des antioestrogènes) et l'endométriose (les dioxines sont de puissants antiprogestatifs). Les dioxines pourraient également être impliquées dans l'évolution de maladies neuro-dégénératives, par inflammation et induction de gènes spécifiques.

De nombreuses voies de recherche sont ouvertes afin, d'une part, d'identifier le ligand naturel du récepteur Ah et, d'autre part, de cerner le domaine physiopathologique de ce récepteur en fonction du ligand. La découverte de nouveaux gènes cibles endocriniens, métaboliques, neurologiques ou encore viraux, inductibles ou répressibles par les dioxines, devrait permettre de mieux comprendre les pathologies liées à ces molécules.

Modèles toxicocinétiques pour l'évaluation de risque

La distribution des dioxines est conditionnée par la teneur en graisses des différents tissus et leur concentration en cytochrome P450 (CYP). Chez l'homme, aux concentrations habituellement rencontrées, l'effet de séquestration de la 2,3,7,8-TCDD par les CYP n'est sans doute pas important et c'est la fraction lipidique des tissus qui détermine sa distribution. La mobilisation des graisses durant la lactation diminue le stock de 2,3,7,8-TCDD des mères, mais transfère ce stock à l'enfant. Le métabolisme est le facteur limitant de l'élimination (très lente) des dioxines. Les congénères les moins substitués sont les plus rapidement éliminés. Le métabolisme conduit à la substitution de chlore par des groupements hydroxyle et éventuellement à la formation de dichlorocatéchol. Les métabolites sont éliminés dans la bile.

Les données animales indiquent que la demi-vie de la 2,3,7,8-TCDD dans l'organisme est de 10 à 30 jours chez la souris et le rat et de 1 an environ chez le singe.

Des modèles toxicocinétiques ont été développés soit pour analyser quantitativement des données animales de toxicologie moléculaire visant à élucider les mécanismes d'action, soit pour déterminer rétrospectivement les expositions humaines et les demi-vies de la 2,3,7,8-TCDD dans les cohortes épidémiologiques de Ranch Hand et de Seveso, soit encore pour évaluer prospectivement les risques pour la santé humaine.

L'analyse toxicocinétique des données humaines indique que la demi-vie d'élimination est d'environ 8,5 ans pour les cohortes professionnelles et de 15,5 ans pour la population générale. Cette demi-vie varie fortement entre individus (par exemple en fonction de leur poids corporel) et augmente avec l'âge : certains individus présentent des demi-vies d'élimination de la 2,3,7,8-TCDD allant jusqu'à 30 ans. L'homme accumule au total beaucoup plus la 2,3,7,8-TCDD que ne le fait l'animal.

Des modèles toxicocinétiques physiologiques ont été utilisés pour simuler et prédire l'effet de la 2,3,7,8-TCDD sur l'induction de CYP, l'expression du TGF β et de l'EGF, le métabolisme de l'œstradiol, le devenir de la vitamine A ou l'action sur les hormones thyroïdiennes, chez l'animal et chez l'homme. Les résultats obtenus sur l'induction de CYP1A1 et CYP1A2 et sur la réduction de l'EGF sont compatibles avec un modèle sans seuil. Cependant, l'effet cancérogène de la 2,3,7,8-TCDD dans le foie de rat ne dépend sans doute pas seulement de l'action *via* les CYP.

Le but de ces modèles est en partie de mieux transposer à l'humain les résultats obtenus chez l'animal, en s'affranchissant de facteurs de sécurité arbitraires. Il est possible d'utiliser de tels modèles pour une évaluation détaillée des risques de la 2,3,7,8-TCDD, en particulier dans le cas de contaminations accidentelles.

La toxicocinétique des dioxines explique partiellement les différences de toxicité entre espèces et indique une susceptibilité accrue pour l'humain en raison de la durée de vie et de la charge corporelle. Au regard des incertitudes sur la signification de l'accumulation des dioxines dans le foie pour certaines espèces, il n'est pas déraisonnable de baser les estimations de risques sur les charges corporelles. La charge corporelle, chez l'homme, dépend fortement de la demi-vie du produit considéré et les études récentes montrent une grande variabilité de ce paramètre dans la population. Il est donc nécessaire de tenir compte, dans l'évaluation des risques, de l'existence de populations sensibles aux effets des dioxines.

Évaluation du risque pour des expositions chroniques à faibles doses

354 La démarche d'évaluation des risques pour les dioxines, proposée par l'Académie des sciences américaine (1983), s'intéresse plus particulièrement à l'étape

d'estimation des relations dose-réponse. Il est possible de distinguer qualitativement les effets déterministes (dont la gravité est fonction de la dose) qui présentent un seuil d'action, des effets stochastiques dont la fréquence est fonction de la dose et pour lesquels il est admis qu'il n'existe pas de seuil d'action. C'est le cas par exemple des cancerogènes génotoxiques. À partir des connaissances disponibles sur le mécanisme d'action, ou empiriquement à partir d'ajustements de courbes dose-réponse, on détermine si l'on considère des effets déterministes ou des effets stochastiques.

Sur un plan quantitatif, on définit pour les effets déterministes une dose sans effet observable (DSEO) ou à défaut une dose minimale pour laquelle on observe un effet (DMEO). Dans ce cas, ce n'est pas un risque qui est déterminé mais une dose journalière acceptable, en divisant les doses ci-dessus mentionnées par une série de facteurs de sécurité. Pour les effets stochastiques, il faut calculer la pente de la courbe dose-réponse pour une unité de dose quotidienne. On peut alors évaluer un risque à dose fixée, ou une dose pour un risque donné.

Aux niveaux actuels d'exposition de la population générale, on considère que l'occupation du récepteur par les dioxines est suffisante pour obtenir l'expression des gènes cibles. La relation dose-réponse est ici en principe linéaire. On ne peut pas à cette étape faire la part entre l'induction de ces gènes attribuable aux dioxines et celle attribuable à d'autres ligands exogènes ou endogènes.

Il n'est pas possible, d'après les connaissances actuelles, d'établir un lien causal entre le niveau d'expression de ces gènes cibles et le risque de cancer. Il faut donc retenir des hypothèses pour justifier le choix d'une approche déterministe ou d'une approche stochastique pour évaluer le risque de cancer. L'OMS (1998) retient l'approche déterministe et conclut que, aux doses quotidiennes d'exposition, le risque de survenue de cancer lié aux dioxines est vraisemblablement nul. Un groupe de travail de l'US EPA (1997) propose une série de modélisations pour les cancers (modèles multiétapes linéarisés et multiétapes Weibull) pour les données animales et deux modèles, additif et multiplicatif pour les données épidémiologiques. Les résultats sont compatibles avec une linéarité et un excès de risque unitaire vie-entière¹ de l'ordre de 10^{-2} à 10^{-3} pour une exposition de 1 pg TEQ/kg/j.

L'OMS (1998) retient, à partir des données animales, que les effets systémiques survenant aux plus faibles doses se traduisent par une altération de la qualité du sperme et des réponses immunitaires, par des malformations congénitales chez la progéniture de rates exposées durant la gestation, par des atteintes du développement neuro-comportemental chez de jeunes singes

1. Le « risque unitaire vie-entière » entre dans le calcul du nombre attendu de cas de cancers par an, égal à :
« risque unitaire vie-entière (ici 10^{-2} à 10^{-3}) × taille de la population (en habitants)/durée de vie moyenne (70 ans) »

dont la mère a été exposée durant la gestation et par un risque accru d'endométriose chez ces singes femelles. À partir de ces données, en considérant les différences de toxicocinétique d'une espèce à l'autre, et en appliquant un facteur de sécurité de 10, l'OMS propose une dose journalière acceptable pour l'homme de 1 à 4 pg TEQ/kg/j.

Effets les plus sensibles de la 2,3,7,8-TCDD chez l'animal

Organes/Type d'effet		Espèce (sexe)	Dose effective
Cancérogénicité	Foie Carcinome	Rat (F)	100 ng/kg
Développement	Neurotoxicité ↳ Reconnaissance d'objets	Singe rhésus	0,126 ng/kg/j
	Reproduction ↳ Nombre de spermatozoïdes	Rat	64 ng/kg/j
	Formation de filaments vaginaux	Rat	200 ng/kg/j
	Immunotoxicité ↗ Sensibilité à l'infection virale	Souris	10 ng/kg (7 ^e j)
Système immunitaire	Immunosuppression	Souris	1 ng/kg/sem
Autres	Endométriose	Singe rhésus	0,126 ng/kg/j

Le groupe de l'*US EPA* (1997), en modélisant les données des études animales qui s'y prêtent, a conclu que les altérations de la qualité du sperme, du métabolisme des hormones thyroïdiennes et du cholestérol, ainsi que la teneur en rétinol hépatique, l'induction des enzymes hépatiques CYP1A1 et CYP1A2 et l'atrophie thymique présentent une relation dose réponse linéaire. L'altération du comportement sexuel, la tératogenèse et l'immunotoxicité sont considérées comme des effets à seuil. Il n'est pas possible de conclure pour les autres effets.

Les connaissances scientifiques disponibles aujourd'hui ne permettent pas de trancher en faveur de l'une ou l'autre approche. En considérant que le risque croît selon la fonction de risque unitaire estimée par l'*US EPA* au-delà de la dose journalière totale (DJT) définie par le Conseil supérieur d'hygiène publique de France (1 pg TEQ/kg/j), on peut déterminer un excès de risque de cancers associé à cette exposition moyenne. En tenant compte des données du recensement récent (mars 1999) de la population française, cette estimation est de 1 462 (IC 95 % : 859-2 493) et 2 407 (IC 95 % : 1 289-4 470) décès annuels par cancer selon le choix du modèle (additif ou multiplicatif, respectivement). Retenir l'hypothèse de linéarité sans seuil pour les cancers conduit donc à estimer que l'exposition aux dioxines de la population pourrait être responsable de cas de cancers chaque année en France. Des cancers induits par les dioxines continueraient à survenir après que les expositions du public aient été ramenées à un niveau irréductible dû à la production naturelle de ces composés.

Évaluation du risque en cas de surexposition de durée brève

Des accidents de l'ampleur de celui de Seveso ou des expositions très élevées de travailleurs ne sont en principe plus une réelle menace à l'heure actuelle, du fait notamment des changements opérés dans la fabrication des produits concernés. Ainsi, la chimie des chlorophénols (source de l'accident de Seveso) a perdu beaucoup de son importance.

Les PCB, qui comportaient dans leur formulation commerciale de petites quantités de PCDF, sous-produits non désirés dus à la méthode de fabrication, ont été à l'origine de deux accidents très importants au Japon en 1968 et à Taïwan en 1979. Il s'agissait dans les deux cas de l'enrichissement involontaire en PCDF de PCB utilisés comme liquide caloporteur dans des installations de fabrication d'huile de riz. La fuite de ce mélange de PCB et de PCDF dans l'huile alimentaire a produit des intoxications massives (2 000 personnes sûrement exposées dans les deux cas). Mais les PCB ne sont en principe plus commercialisés depuis le milieu des années quatre-vingt.

Certaines grandes entreprises qui disposaient d'un parc important de transformateurs contenant des PCB ont entrepris d'éliminer ces transformateurs et de remplacer les PCB par d'autres produits. Le danger d'incendies ponctuels de transformateurs en service pouvant générer des dioxines n'est donc plus, en principe, à craindre. En revanche, le stockage des transformateurs mis au rebut pourrait être à l'origine d'incidents comme des fuites de PCB sur les sites. Par ailleurs, des transformateurs ayant contenu des PCB peuvent être toujours en service. Les PCB qu'ils contenaient ont été remplacés par un autre diélectrique (de l'huile minérale en particulier) qui peut être contaminé par des traces de PCB et donc donner lieu à la production de PCDF en cas d'incendie. Dans de telles circonstances accidentelles, il serait utile d'échantillonner systématiquement les produits de combustion, de manière à pouvoir le cas échéant estimer les quantités de PCDF produites.

Il reste des sources probablement minimales de surexposition brève mais éventuellement fréquentes. C'est le cas des récupérateurs de métaux, intéressés par le cuivre des transformateurs, qui est bien souvent chauffé au cours du processus de récupération et susceptible de générer de ce fait de relativement petites quantités de PCDD et de PCDF.

L'alimentation étant la source majeure de contamination humaine par les dioxines, certaines populations peuvent être plus exposées que d'autres selon leur mode d'alimentation. En cas de contamination d'un aliment, les forts consommateurs de cet aliment seront donc particulièrement exposés. Ce constat a conduit le Conseil supérieur d'hygiène publique de France puis le comité d'experts de l'AFSSA à poursuivre sa réflexion sur la définition de valeurs guide (à ne pas dépasser) pour chaque classe d'aliment. L'objectif est de protéger la population, y compris les forts consommateurs (95^e centile), de tout dépassement du seuil recommandé par l'OMS (4 pg TEQ/kg/j).

Recommandations

L'exposition des populations aux dioxines se fait essentiellement (à 95 %) par voie alimentaire. L'exposition par inhalation est négligeable. La contamination des aliments s'effectue par bioaccumulation à partir des dioxines présentes dans les différents compartiments de l'environnement, avec des niveaux particulièrement élevés dans les aliments d'origine animale (lait et produits laitiers, viande, poisson).

La contamination du milieu environnemental s'est produite pour l'essentiel au cours des cinq dernières décennies, à partir de deux sources principales : la fabrication par l'industrie chimique, dès les années cinquante et jusqu'aux années soixante-dix, de nombreux produits chlorés (polychlorobiphényles ou PCB, pentachlorophénol ou PCP, acide 2,4-dichlorophénoxyacétique ou 2,4-D) pouvant contenir des dioxines (PCDD et PCDF) qui ont avec eux été disséminés dans l'environnement ; les procédés thermiques en rapport avec des activités industrielles (métallurgie, sidérurgie, incinérations de déchets ménagers) qui sont devenus, après l'interdiction ou les limitations d'emploi des produits chlorés, la principale source d'émissions de PCDD et PCDF. Ces émissions ont été fortement réduites au cours de la dernière décennie, suite essentiellement à des modifications des procédés technologiques. Ainsi, dans les pays développés, les émissions de dioxines dans l'environnement ont été divisées par deux ou par trois. Cette baisse des émissions se traduit par une réduction de la contamination alimentaire et une diminution de l'imprégnation des populations (environ 50 % depuis 1990). Il est néanmoins important de rappeler que, quelles que soient les mesures mises en œuvre, il restera toujours une exposition résiduelle due à la formation naturelle des PCDD et PCDF, principalement par des processus thermiques (feux de forêt, activité volcanique...) et éventuellement biologiques.

Le groupe d'experts, après analyse et synthèse de la littérature et des données de contexte, propose trois axes de recommandations d'action : poursuivre la réduction de la contamination de la chaîne alimentaire par une surveillance des sources d'émission et des réservoirs connus, un dépistage des sources et réservoirs de dioxines non encore identifiés, ainsi qu'un état des lieux de la contamination de l'environnement ; une surveillance de l'imprégnation de la population générale et des populations potentiellement plus exposées ou vulnérables ; la mise en place d'un dispositif d'intervention en cas d'exposition aiguë.

Les recommandations de recherche concernent le domaine de l'environnement, avec la proposition d'une reconstitution historique du milieu ambiant

pour avoir une base scientifique d'une option de gestion française et la validation de modèles de transferts entre les différents compartiments de l'environnement ; le domaine de la santé publique, avec la nécessité de poursuivre des études épidémiologiques sur certains effets encore mal cernés ; la recherche des mécanismes moléculaires d'action de la dioxine car il reste beaucoup d'inconnues ; enfin le développement d'outils permettant d'améliorer l'évaluation de risque.

Exposition des populations

CONTINUER À DIMINUER L'EXPOSITION CHEZ L'HOMME EN SURVEILLANT LA CHAÎNE ALIMENTAIRE ET EN AGISSANT SUR LES SOURCES ET LES RÉSERVOIRS DE DIOXINES

L'alimentation constitue la voie majeure d'exposition aux PCDD et PCDF chez l'homme, la contamination s'effectuant par ingestion de graisses animales (lait et produits laitiers, viande, poissons).

En France, d'après les données récentes de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (AFSSA), la valeur médiane de l'exposition globale de la population adulte par voie alimentaire peut être estimée à environ 1,3 pg TEQ/kg/j, avec une valeur au 95^e centile de 2,6 pg TEQ/kg/j. Ces taux sont proches de ceux recommandés par l'OMS (1 à 4 pg TEQ/kg/j). Toutefois, l'OMS prend en compte dans le calcul du TEQ les PCB possédant une structure apparentée à celles des dioxines (PCB qualifiés de *dioxin-like*), qui peuvent contribuer jusqu'à 50 % de sa valeur. L'apport quotidien exprimé en TEQ se trouve donc sous-estimé en France, et pourrait atteindre 2 pg TEQ/kg/j.

Le groupe d'experts recommande d'effectuer et de maintenir des plans de surveillance de la chaîne alimentaire. Les pouvoirs publics doivent porter leur attention sur les vecteurs alimentaires qui contribuent pour 80 % de l'exposition : lait et produits laitiers, poisson, viande. Ces plans de surveillance permettront d'évaluer l'exposition par la voie alimentaire, mais aussi de suivre l'efficacité des mesures de réduction des sources d'émission dans l'environnement et de la contamination à partir de divers réservoirs. Étant donné le mode de transfert des dioxines dans la chaîne alimentaire, le groupe d'experts recommande également une surveillance de l'alimentation animale. Ceci ne peut se concevoir que si cette surveillance est réalisée en concertation avec les instances européennes. L'augmentation des contrôles de certification en amont (certification des sols et des intrants de la chaîne) éviterait la multiplication des dosages dans les produits alimentaires.

Le groupe d'experts recommande que la surveillance des produits alimentaires s'effectue par un dosage chimique permettant la mise en évidence des différents congénères s'il s'agit d'identifier une source de contamination. Les

dosages biologiques qui commencent à être disponibles donnent des résultats directement en TEQ et ne permettent pas d'établir le profil de congénères nécessaire à une identification des sources.

Pour le lait, la norme recommandée par plusieurs pays est de 5 pg TEQ/g de matières grasses pour la commercialisation. En France, le Conseil supérieur d'hygiène publique de France (CSHPF) recommande la valeur cible de 1 pg TEQ/g de matières grasses pour arriver à une dose journalière admissible (DJA) de dioxines de 1 pg TEQ/kg/j pour les populations.

La connaissance de plus en plus précise de la distribution des teneurs en dioxines dans certains aliments (en particulier le lait) permet de déterminer les valeurs moyennes (0,6 pg TEQ/g de matières grasses dans le lait de grande distribution) et d'estimer un taux de dioxines au-dessus duquel un lot d'aliments doit être considéré comme contaminé (2 pg TEQ/g de matières grasses pour le lait, par exemple).

Concernant l'exposition du nourrisson, les données françaises récentes obtenues sur le lait maternel montrent une teneur en dioxines entre 6 et 35 pg TEQ/g de matières grasses, avec une moyenne aux environs de 16 pg TEQ/g de matières grasses. Cette teneur moyenne entraîne un niveau d'exposition du nourrisson de 70 pg TEQ/kg/j, pendant les trois premiers mois de sa vie, bien supérieur à la DJA. Toutefois, celle-ci est calculée pour une exposition vie entière. Il n'apparaît pas justifié de remettre en cause l'allaitement maternel, puisque les risques éventuels d'une exposition (par exemple les effets neuro-développementaux), observés dans certaines études épidémiologiques, l'ont été chez des enfants nourris avec du lait dont la teneur en dioxines était comprise entre 30 et 60 pg TEQ/g de matières grasses, c'est-à-dire supérieure aux taux observés en France. Le développement des enfants allaités reste à ce jour considéré comme meilleur que celui des enfants nourris au lait artificiel, tout comme leur statut immunitaire.

Pour réduire la contamination alimentaire en France, des mesures d'identification des sources d'émission dans l'environnement et des réservoirs de dioxines doivent être envisagées. Une recherche des sols pollués doit permettre d'exclure certaines zones contaminées de la production laitière. Les PCDD et PCDF doivent être dosés dans les campagnes d'échantillonnage des sols et sédiments réalisées par les divers organismes concernés. L'expression des résultats des dosages doit être adaptée à l'objectif recherché : les résultats d'analyses effectuées dans un but de dépistage de sources de contamination doivent être exprimés en profil de congénères tandis que les données visant à évaluer le risque sanitaire doivent être exprimées en TEQ.

La réduction de la contamination alimentaire implique aussi la surveillance des sources connues d'émission de dioxines. Ces sources résultent des activités industrielles de type métallurgie-sidérurgie ou incinération de déchets ménagers. L'évaluation du risque lié aux émissions atmosphériques des incinérateurs sur la contamination par voie alimentaire a été effectuée en France. D'après

un calcul théorique à partir du modèle Caltox, cette voie d'exposition (par ingestion) représentait en 1997 environ 30 % de la DJA recommandée par l'OMS (1 pg/kg/j). La mise à la norme de 0,1 ng/m³ de fumée des incinérateurs permet de rendre cette contribution presque nulle (0,3 % de la DJA). Le groupe d'experts recommande une application rigoureuse des valeurs limites définies pour les émissions issues des incinérateurs de déchets domestiques et industriels pour les installations nouvelles et anciennes, en accord avec les normes définies sur le plan européen.

Le groupe d'experts souhaite qu'un dispositif de surveillance des contaminations de l'environnement par les PCDD et PCDF permette d'identifier la contribution des réservoirs et des sources diffuses de dioxines : persistance ou stockage de transformateurs contenant des PCB (en raison des fuites possibles de PCB chargés en dioxines), bois traités au PCP, boues d'épuration, compost et engrais, décharges d'ordures, chauffage domestique ou bien sources diffuses accidentelles (feux de forêts, incendies de transformateurs contenant des PCB).

ESTIMER LES NIVEAUX D'IMPRÉGNATION DANS LA POPULATION FRANÇAISE

Le suivi de diverses populations au cours des deux dernières décennies a clairement mis en évidence une diminution importante (de près de 50 %) du degré moyen d'imprégnation de la population générale en Europe. En France, des données d'évaluation biologique de l'exposition aux dioxines ont été récemment obtenues dans des échantillons de lait maternel.

Afin de connaître les niveaux de l'imprégnation de la population française, en général, et de populations plus exposées, en particulier, le groupe d'experts recommande dans un premier temps d'effectuer une étude pilote prévoyant des dosages sanguins sur un échantillon d'individus (hommes et femmes) âgés de 18 à 80 ans. Outre des informations sur les niveaux d'imprégnation et leur distribution en population, cette étude pilote devrait permettre d'apporter des éléments d'appréciation quant à l'intérêt et à la faisabilité d'une éventuelle évaluation à plus grande échelle. La réalisation d'une telle étude se justifie en termes de validation des modèles de transfert (corrélation entre les apports quotidiens et la charge corporelle) et en termes d'efficacité des options de gestion adoptées, par exemple des mesures de réduction de l'exposition (grâce au suivi des populations testées). Par ailleurs, le groupe d'experts recommande d'évaluer par questionnaire alimentaire l'imprégnation de certaines populations potentiellement exposées à une contamination plus importante, en raison d'une alimentation particulière (consommation accrue de poissons et produits de la mer, par exemple). Il serait important d'étudier, dans ces groupes exposés au-delà du 95^e centile pour lesquels les conséquences individuelles de l'exposition pourraient ne pas être négligeables, les actions susceptibles de ramener l'imprégnation vers la valeur moyenne.

METTRE EN PLACE UN DISPOSITIF D'ÉVALUATION DE RISQUE EN CAS D'EXPOSITION AIGUË

Des accidents de l'ampleur de celui de Seveso ne sont plus une réelle menace à l'heure actuelle du fait des changements intervenus dans les pratiques industrielles. Des surexpositions de brève durée aux dioxines peuvent néanmoins être observées à l'occasion de divers événements fortuits (incendie de transformateurs ou de bâtiments, fuite de fluides hydrauliques ou caloporteurs, fuites sur le lieu de stockage des vieux transformateurs, récupération de métaux et de câbles électriques, transports routiers de REFIOM (résidus d'épuration des fumées d'incinération des ordures ménagères) provenant des unités d'incinération...) ou de manœuvres frauduleuses.

Le groupe d'experts recommande de prendre toutes les mesures nécessaires visant à prévenir les surexpositions de durée brève, essentiellement par un état des lieux de toutes les sources potentielles (par exemple, stocks de PCB) et la suppression progressive ou la sécurisation de ces sources.

En cas de contamination alimentaire, trois éléments d'appréciation ont été retenus par différents pays européens : le taux d'imprégnation du produit par rapport au taux habituellement constaté (en Belgique) ; le dépassement de la DJA (en France) ; l'augmentation significative attendue de la charge corporelle (aux Pays-Bas). Selon le critère retenu, on peut définir des seuils de retrait du marché ou définir une période d'exposition durant laquelle le maintien du produit sur le marché n'entraînera pas de modification significative de la charge corporelle. Par exemple, les autorités néerlandaises estiment cette période à 30 000 jours pour des œufs contenant 60 pg TEQ/g de matières grasses, et à 275 jours dans le cas d'une contamination à taux égal de viande bovine ou de produits laitiers. En France, l'objectif est de protéger l'ensemble de la population y compris les forts consommateurs de chaque classe d'aliments (95^e centile) de tout dépassement du seuil de 4 pg TEQ/kg/jour recommandé par l'OMS. Dans le cadre de cette option de gestion française seront définis prochainement des niveaux de contamination en PCDD et PCDF devant être considérés comme des seuils d'exclusion de la commercialisation pour les aliments, autres que les produits laitiers, ayant une contribution significative à l'exposition.

En cas de contamination importante de certains aliments, celle-ci sera d'autant plus limitée et maîtrisable que les opérations de surveillance auront permis de la détecter précocement et d'établir une traçabilité pour en estimer l'étendue. Éventuellement, un plan de retrait pourra être mis en place en particulier pour les aliments contenant plus de 2 % de matières grasses.

Le groupe d'experts recommande que les mesures prises soient proportionnelles à l'importance de l'exposition (alimentaire ou environnementale) : informer les populations et les personnels de santé ; déterminer le nombre de sujets exposés et contaminés et instituer un suivi en particulier pour les femmes enceintes et les femmes allaitantes qui ont été contaminées ; utiliser des

modèles de toxicocinétique pour déterminer la durée pendant laquelle il faudra suivre les sujets qui ont été exposés et contaminés pour que les taux de dioxines reviennent à la normale et évaluer l'impact d'une telle exposition sur la charge corporelle vie entière.

Voies de recherche

DÉVELOPPER DES RECHERCHES PERMETTANT UNE MEILLEURE IDENTIFICATION DES SOURCES

Jusqu'en 1970, les PCDD et PCDF, impuretés produites au cours de la synthèse chimique des produits chlorés, ont contribué à la contamination de l'environnement. À la suite des mesures d'interdiction ou de restriction d'emploi de certains composés chlorés, les études réalisées en Suède (sur des œufs de guillemots) ou en Angleterre (sur l'herbe) ont montré une diminution des niveaux de contamination de l'environnement par les PCDD et PCDF. Au début des années quatre-vingt, la mise en service de nombreux incinérateurs d'ordures ménagères semble avoir été la cause d'une remontée de ces niveaux. La maîtrise des procédés technologiques d'incinération et de traitement des métaux a depuis permis une reprise de la baisse des contaminations environnementales.

Pour rationaliser les options de gestion du risque en France, il n'apparaît pas suffisant de se référer aux seules données européennes. Le groupe d'experts recommande que, outre un inventaire des sols, soit réalisée la constitution d'une bibliothèque d'échantillons à partir de sédiments et/ou d'herbiers, destinée à être examinée de manière rétrospective mais aussi prospective. Cette analyse permettrait d'apprécier la contribution des différentes sources au cours du temps et d'évaluer la situation actuelle dans différents compartiments de l'environnement, en particulier dans les sols et sédiments. Le groupe d'experts suggère d'identifier à cet égard l'ensemble des organismes ayant accès à des échantillons historiques et de les solliciter afin de constituer un groupe de coordination. La réalisation de ces objectifs pourrait être facilitée par la mise en place d'un observatoire des sols.

ÉTUDIER LE TRANSFERT ET LE DEVENIR DES DIOXINES DANS L'ENVIRONNEMENT

Il semble nécessaire de disposer des modèles de transfert sol → plante, retombées atmosphériques → sol, nappes phréatiques → sol pour la gestion du risque. À partir de sols et de champs contaminés, un taux de transfert moyen peut être calculé à partir des valeurs en TEQ du lait par rapport aux concentrations en TEQ retrouvées dans l'herbe des pâturages. Ce taux concerne les transferts des compartiments de l'environnement et ne concerne pas les transferts à partir des aliments pour animaux.

Le groupe d'experts recommande donc de développer et de valider des modèles de transfert, grâce à l'intervention des compétences de différents organismes concernés (Institut national de la recherche agronomique, Centre national de la recherche scientifique, Bureau des recherches géologiques et minières...).

Il existe quelques travaux concernant le potentiel biodégradable des micro-organismes sur les dioxines, micro-organismes qui pourraient être utilisés pour régénérer les sols (bactéries, levures, champignons) mais qui n'apparaissent pas toujours bénéfiques. Ce domaine pourrait être exploré et éventuellement exploité.

DÉVELOPPER DE NOUVELLES MÉTHODES DE DOSAGE

La méthode analytique de référence pour doser les PCDD et PCDF utilise la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse haute résolution (GC-MS). Il s'agit d'une méthode très sensible et sélective. Le résultat, donné sous forme de profil chromatographique des différents congénères, peut être converti en quantité totale et en poids de chaque congénère présent. La complexité et le coût du dosage (environ 5 000 F) conduisent à restreindre le nombre d'analyses d'échantillons. De plus, une grande variabilité des résultats entre différents laboratoires complique leur interprétation.

Récemment, les progrès de la chimie analytique séparative ont permis d'améliorer les étapes d'extraction et de purification et de les rendre moins coûteuses. Par ailleurs, le couplage de la chromatographie à une spectrométrie basse résolution, d'une utilisation plus facile, devrait permettre d'effectuer plus aisément des dosages en série (notamment sur des échantillons de l'environnement). Le groupe d'experts préconise de renforcer le développement et la coordination des recherches sur les techniques de dosages analytiques.

Les méthodes de dosage biologiques, reposant sur l'estimation de la fixation des dioxines au récepteur Ah, devraient prendre de l'extension dans les prochaines années. Ces méthodes, moins chères et nécessitant pour les dosages chez l'homme une prise de sang d'un volume moindre, sont mieux adaptées à la veille sanitaire. Le groupe d'experts recommande de prendre en considération les protocoles développés dans différents laboratoires pour définir et valider une technique standard. La possibilité d'effectuer facilement de tels dosages sur des échantillons de sang faciliterait la conduite d'enquêtes épidémiologiques.

DÉVELOPPER DES ÉTUDES DE TOXICOCINÉTIQUE POUR VALIDER LES MODÈLES DE TRANSFERT

Ces modèles concernent l'étude du transfert des dioxines de l'environnement à l'homme. Ce sont aussi des modèles physiologiques qui décrivent de façon

détaillée l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'excrétion des dioxines. Enfin, il s'agit de modèles de toxicodynamie qui étudient la relation dose-réponse sur laquelle repose l'évaluation du risque.

Le groupe d'experts recommande de développer des études de toxicocinétique et toxicodynamie (dose-réponse) pour établir les limites respectives de ces différents modèles. Il souligne la nécessité de renforcer les compétences en France dans le domaine de la modélisation et de l'évaluation du risque.

DÉVELOPPER DES ÉTUDES ÉPIDÉMIOLOGIQUES

Plusieurs études de cohortes industrielles ont permis de mettre en évidence un excès de risque faible pour tous cancers confondus (risque relatif de 1,4). Certaines études épidémiologiques ont montré un risque augmenté de maladies cardiovasculaires ou de diabète, mais elles ne sont pas toutes concordantes. Le groupe d'experts recommande d'encourager le suivi des cohortes existantes sur ces effets.

Dans les études épidémiologiques, l'exposition aux PCDD et PCDF est souvent associée à une exposition aux PCB, ce qui ne facilite pas leur interprétation. On doit porter une attention particulière aux nouveau-nés et aux nourrissons, du fait d'une exposition transplacentaire, c'est-à-dire à une période correspondant aux étapes critiques de l'organogenèse, et d'une forte exposition chez l'enfant allaité par la mère. Cette préoccupation est étayée, d'une part, par l'ensemble des données animales qui montrent une sensibilité plus grande aux effets des dioxines (immunotoxicité, effets sur le système reproducteur, effets neuro-comportementaux ou thyroïdiens) lors d'une exposition *in utero*, et, d'autre part, par des résultats préliminaires chez des nourrissons, qui semblent indiquer un effet de l'exposition *in utero* sur certains de ces paramètres. Le groupe d'experts préconise de développer les connaissances sur cette population de nouveau-nés et de nourrissons. Les études à promouvoir doivent intégrer une meilleure évaluation des niveaux d'exposition en dioxines et autres polluants. Compte tenu de la multiplicité des effets des dioxines, il serait important d'inclure également dans ces études différents marqueurs d'effets cliniques ou biologiques (taux de TSH, effets sur l'émail des dents...).

MIEUX CONNAÎTRE LES MÉCANISMES MOLÉCULAIRES D'ACTION DES DIOXINES

Le caractère indispensable du récepteur Ah dans la médiation de la toxicité de la 2,3,7,8-TCDD est bien démontré puisque, en l'absence du gène chez la souris, on n'observe pas les manifestations classiquement décrites (manifestations hépatiques, cancéreuses, tératogènes). L'activation du récepteur Ah initie une cascade d'événements impliquant de nombreuses voies de signalisation. Le groupe d'experts recommande d'étudier les relations entretenues avec des voies de signalisation connexes à celles du récepteur Ah et de rechercher

d'éventuels autres ligands, endogènes ou exogènes. L'étape ultime d'activation de l'expression de certains gènes est loin d'être totalement explorée. Le groupe d'experts recommande d'étudier le répertoire des gènes cibles et leur(s) fonction(s) selon les espèces.

On ne comprend pas aujourd'hui pourquoi des souches de rat dont les récepteurs ont des affinités comparables pour la 2,3,7,8-TCDD présentent des sensibilités très différentes aux effets de cette molécule. Il apparaît que l'affinité du récepteur pour la 2,3,7,8-TCDD ne constitue pas la clé exclusive d'interprétation des disparités de sensibilité entre les espèces. Par leurs effets inhibiteurs sur l'expression des facteurs de croissance et une perturbation des cytokines, les dioxines peuvent contribuer au développement de toute une gamme de pathologies. Le groupe d'experts recommande donc d'étayer, sur le plan moléculaire, l'origine fonctionnelle des observations cliniques et épidémiologiques des effets des dioxines, la variabilité interspèces et la variabilité interindividuelle de ces effets chez l'homme, en particulier celle liée au polymorphisme génétique. Cette recherche permettrait d'aboutir à une meilleure adéquation entre les mécanismes démontrés et le choix de modèles en évaluation de risque.

Le mécanisme par lequel la 2,3,7,8-TCDD induit des tumeurs n'est pas élucidé : en particulier, on ne sait pas encore aujourd'hui si cette molécule est un cancérigène complet. Bien que non mutagène, la 2,3,7,8-TCDD pourrait entraîner de façon indirecte (*via* l'induction des cytochromes) des lésions oxydatives sur l'ADN, provoquer une inhibition de l'apoptose, induire une prolifération par des effets cytotoxiques. Le groupe d'experts recommande d'examiner l'activité promotrice de tumeurs de la 2,3,7,8-TCDD après induction de lésions génotoxiques par d'autres voies.

Communications

COMMUNICATIONS

Analyse des PCDD et PCDF par chromatographie gazeuse/spectrométrie de masse haute résolution (GC/MS)

Bien que la réelle toxicité des polychlorodibenzo-*para*-dioxines (PCDD) et des polychlorodibenzofuranes (PCDF) pour l'homme ne soit pas précisément bien établie, leur caractère rémanent les classe parmi les contaminants à surveiller et donc à mesurer afin que l'exposition à ces composés reste minimale.

L'exposition tolérable à ces composés est fixée par l'organisation mondiale de la Santé (OMS) à 1 pg/kg de poids corporel/jour exprimé en équivalent toxique du congénère 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-*p*-dioxine (I-TEQ = *International total equivalent quantity*). Pour l'homme, la majeure contribution au I-TEQ se fait au travers de la chaîne alimentaire. Son évaluation dépend donc de la mesure des PCDD et PCDF dans les denrées alimentaires dont l'origine de la contamination se trouve dans les émissions des sources à combustion tels les incinérateurs et les fours d'aciéries... Parmi les 210 structures possibles, seuls les dix-sept congénères (7 PCDD et 10 PCDF) possédant au moins 4 atomes de chlore en position 2,3,7,8 (figure 1) sont toxiques et sont pris en considération dans le calcul du I-TEQ. Pour effectuer le calcul, les toxicologues ont affecté un coefficient de pondération I-TEF à chacun des 17 congénères.

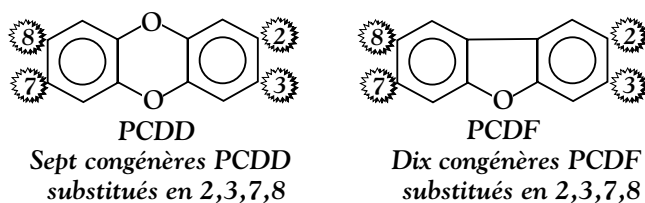


Figure 1 : Noyaux des molécules PCDD et PCDF

La toxicité d'un échantillon est par convention exprimée par le I-TEQ dont la mesure est l'objectif de l'analyste. Compte tenu des très faibles concentrations à mesurer et de l'importance des résultats qui peuvent être utilisés à des fins réglementaires, il est nécessaire d'utiliser les méthodes d'analyse les plus

performantes. A l'heure actuelle, la méthode d'analyse associant la chromatographie gazeuse haute résolution à la spectrométrie de masse haute résolution est celle qui procure le maximum de garantie dans les résultats, à condition qu'elles soient mises en œuvre par des personnes qualifiées, ayant non seulement l'expérience de l'analyse mais également celle de l'analyse de très faibles quantités, en présence d'autres contaminants présents en grandes quantités.

La spectrométrie de masse haute résolution seule ne peut pas résoudre tous les problèmes inhérents à l'analyse des PCDD et PCDF dans des matrices complexes si l'extrait purifié ne le permet pas.

Dans ce chapitre, les paramètres les plus importants pour l'analyse des PCDD et PCDF seront examinés, avec l'objectif de présenter la méthode la plus performante pour l'analyse des PCDD et PCDF en agroalimentaire et dans l'environnement.

Propriétés physiques des PCDD et PCDF

Comme pour n'importe quel composé, il est important de connaître les propriétés physico-chimiques des PCDD et PCDF qui peuvent influencer leur analyse. Les PCDD et PCDF sont des composés lipophiles peu ou non polaires. Pour exprimer la solubilité d'un composé dans les graisses, le coefficient de partage octanol-eau symbolisé par K_{ow} est le plus fréquemment utilisé. Les K_{ow} des PCDD et PCDF sont parmi les plus élevés observés pour les contaminants trouvés dans l'environnement. Le caractère lipophile des PCDD et PCDF explique que ces composés s'accumulent dans les graisses animales et végétales.

Nous savons également que la solubilité des PCDD et PCDF dans les graisses n'est pas la même pour tous les congénères. Elle augmente avec le nombre d'atomes de chlore (Mackay et coll., 1992 ; Shiu et coll., 1988). En conclusion, les PCDD et PCDF sont peu ou pas solubles dans l'eau et se fixent facilement dans les sols, les sédiments et les boues avec une grande affinité pour les graisses.

Une autre caractéristique importante pour l'analyse est leur grande stabilité en milieu acide et à hautes températures. Leur volatilité décroît lorsque le nombre d'atomes de chlore croît. Les propriétés citées sont à considérer pour l'analyse des PCDD et PCDF dans l'agroalimentaire et dans les matrices de l'environnement lors des étapes de prélèvement, d'extraction et de purification. La stabilité des PCDD et PCDF se manifeste également dans leur spectre de masse en ionisation par impact d'électrons (EI). La figure 2 présente le spectre de masse en impact d'électrons de la 2,3,7,8-TCDD. La stabilité de cette molécule se traduit par le fait que le massif moléculaire dominé par l'ion m/z 322, $(M + 2)^{+}$ est le pic de base du spectre (100 %), ce qui montre que

372 même en impact d'électrons il y a peu de fragmentation. Les ions fragments les

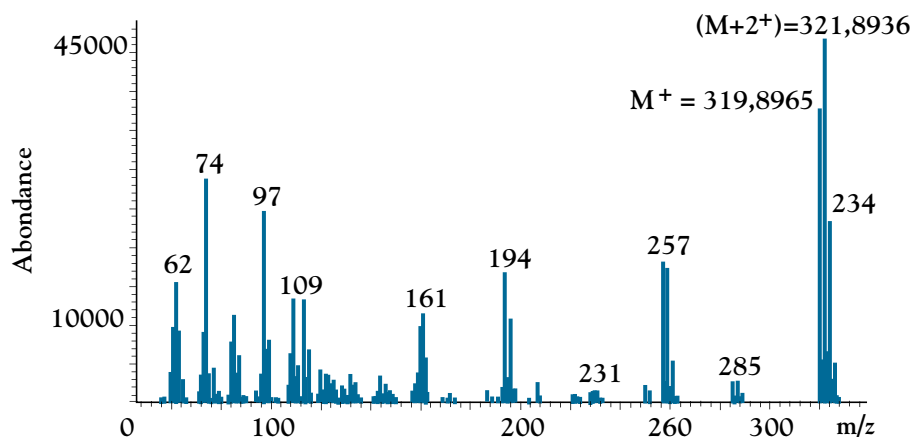


Figure 2 : Spectre de masse en impact d'électrons de la 2,3,7,8-TCDD

plus caractéristiques correspondent à une puis deux pertes de COCl à m/z 257 et 194. Les spectres en impact d'électrons ont été étudiés (Buser, 1975). Cette stabilité est favorable à la mesure des PCDD et PCDF par spectrométrie de masse haute résolution car les ions moléculaires sont les plus intenses et se situent dans un domaine de masse relativement élevé, à l'abri des ions fragments résiduels, couramment rencontrés en dessous de la masse 150.

Procédure analytique

Quelle que soit la matrice dans laquelle les PCDD et PCDF doivent être analysés, la procédure analytique comporte plusieurs étapes indispensables qui sont la collecte de l'échantillon, sa préparation à l'étape d'extraction, la purification de l'extrait et enfin la mesure des PCDD et PCDF dans l'extrait purifié.

Bien sûr, chacune de ces étapes est étroitement liée à la matrice de l'échantillon et aux propriétés physico-chimiques des PCDD et PCDF, mais il est possible de représenter en un seul schéma le déroulement d'une analyse (figure 3).

Extraction

En général, cette étape est précédée d'une préparation adaptée à la matrice de l'échantillon. Les produits alimentaires seront traités pour s'assurer de l'homogénéité et donc de la représentativité de l'échantillon.

Les traitements les plus courants utilisés en agroalimentaire sont le hachage, le broyage et la lyophilisation, par exemple pour les œufs, les végétaux et la

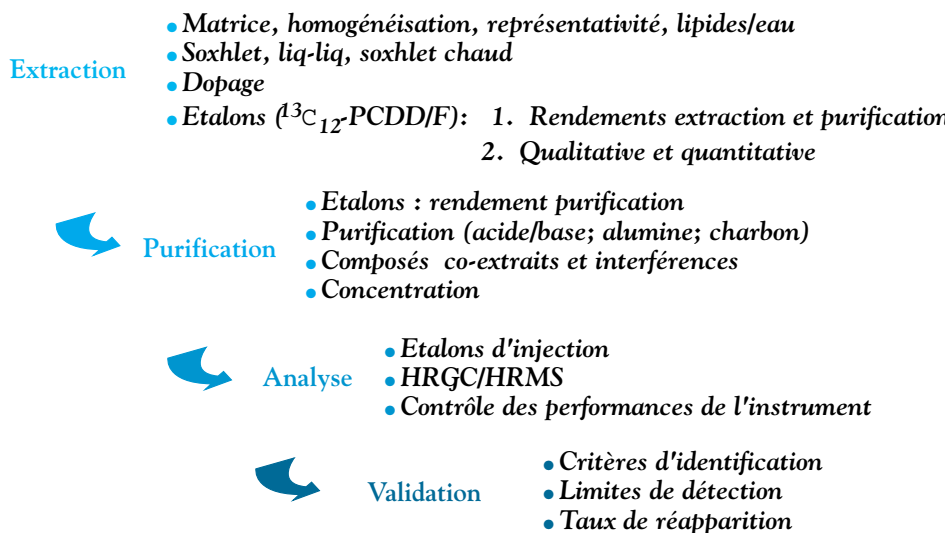


Figure 3 : Schéma d'analyse

viande. L'échantillon ainsi préparé est extrait avec un solvant ou un mélange de solvants avec comme objectif l'extraction quantitative des PCDD et PCDF en solution dans le ou les solvants ou dans la matière grasse.

Les prélèvements solides dans l'environnement peuvent également être très variés et le pré-traitement appliqué à une cendre volante est différent de celui appliqué à un sol, un sédiment ou encore un mâchefer.

Les prélèvements gazeux sont effectués sur support solide telles la résine amberlite XAD-2 ou la mousse de polyuréthane. L'extraction est une extraction liquide-solide en Soxhlet froid ou chaud avec du toluène seul ou en mélange avec des solvants plus polaires.

Les produits laitiers peuvent également être extraits par extraction liquide – liquide avec de l'éther de pétrole.

Le choix du solvant est important et doit être validé pour la matrice soumise à l'extraction.

Purification

A ce stade de l'analyse, les PCDD et PCDF sont soit en solution dans un solvant ou un mélange de solvants, ou encore dissous dans la matière grasse, dans les deux cas en présence d'autres familles de composés. La purification doit permettre l'élimination de la matière grasse et des autres familles de contaminants susceptibles d'interférer avec la mesure des PCDD et PCDF. La

374 littérature est particulièrement abondante sur le sujet, et la chromatographie

d'adsorption solide-liquide avec divers réactifs tels la silice, le florisol, l'alumine, le charbon et la chromatographie de filtration sur gel sont les plus répandues. A l'origine, la méthode décrite par Smith (Smith et coll., 1984) qui associe une série de colonnes de silicates (silice modifiée) est la première approche pour l'automatisation de la préparation des extraits. La séparation des PCDD et PCDF de la matière grasse extraite fait appel à deux techniques actuellement prépondérantes :

- La chromatographie par filtration sur gel ou d'exclusion permet une séparation des lipides de masses moléculaires élevées des contaminants chlorés de plus faibles masses moléculaires. Outre le fait que la méthode est peu sélective, la capacité des résines est limitée à 1 à 2 grammes de matières grasses et l'augmentation de la taille des colonnes augmente les quantités de solvants et augmente les risques de contamination.
- Le charbon actif a été largement utilisé et la méthode décrite par Liem (Liem et coll., 1990) présente l'avantage de pouvoir traiter jusqu'à 20 grammes et plus de matières grasses.

Identification et quantification

La méthode actuelle pour la séparation et la détection des PCDD et PCDF fait appel à la chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse haute résolution.

L'objectif est donc la mesure des 17 congénères considérés comme toxiques sur les 210 formules possibles et, notamment pour les prélèvements à l'émission, les sommes des isomères des séries homologues portant un minimum de 4 atomes de chlore.

Séparation par chromatographie gazeuse

Les propriétés séparatives des différentes phases ont été étudiées (Ryan et coll., 1991 ; Bacher et coll., 1992).

A l'heure actuelle, le constat est simple, il n'existe pas de colonne sur le marché permettant d'atteindre l'objectif fixé et il faudrait au minimum deux colonnes de polarité différente pour parvenir à éliminer les interférences dues aux autres congénères. A l'exception des exercices de certification de matériaux de référence et éventuellement des intercomparaisons entre laboratoires, l'analyse sur deux colonnes différentes n'est pas financièrement acceptable.

Cependant, il convient de pondérer ce constat car toutes les matrices ne présentent pas les mêmes difficultés dans la mesure où les laboratoires maîtrisent l'analyse de très faibles quantités, sans risque de contamination externe. Les échantillons peuvent être classés en deux grandes catégories sur la base des concentrations en PCDD et PCDF :

- la première regroupe toutes les matrices de l'environnement (émissions, air ambiant, sédiments, sols, boues...) ;
- l'agroalimentaire constitue l'essentiel de la deuxième catégorie où l'on distingue les matrices ayant subi une digestion biologique. Lors des dégradations enzymatiques, les congénères toxiques ne sont pas métabolisés et s'accumulent dans les graisses. Toutes les matrices contenant de la matière grasse affichent un profil caractérisé par la seule présence des congénères toxiques. La séparation chromatographique des 17 congénères toxiques n'est plus alors un problème, et les phases apolaires qui donnent une moins bonne séparation (au moins pour les congénères tétra et pentachlorés) que les phases fortement polaires (par ailleurs plus fragiles) peuvent être utilisées pour l'analyse des PCDD et PCDF dans les matrices agroalimentaires sans contamination externe.

Détection et mesure

La spectrométrie de masse est la technique utilisée pour la détection des PCDD et PCDF et la sensibilité maximale est obtenue en impact d'électrons comme méthode d'ionisation et en scrutation d'ions spécifiques comme méthode de détection. Par convention, les deux ions les plus intenses du massif moléculaire sont scrutés, ce qui permet de mesurer leur rapport isotopique $^{35}\text{Cl}/^{37}\text{Cl}$ et ainsi de confirmer l'identité du congénère. La quantification est réalisée par l'addition d'étalons internes avant l'extraction pour les échantillons de l'environnement et dans l'aliquote de matières grasses pour les produits agroalimentaires. La disponibilité des 17 homologues marqués au carbone-13 des congénères toxiques et leur utilisation comme étalons internes contribuent à faire de cette méthode dite à dilution isotopique la technique de choix pour l'analyse des PCDD et PCDF. L'utilisation des 17 congénères marqués est un critère de qualité important car il compense les pertes spécifiques possibles lors des différentes étapes de purification.

L'addition d'étalons internes, également marqués au carbone-13, à l'extrait purifié permet la mesure des taux de réapparition des étalons introduits avant extraction. Actuellement, seule la norme européenne sur les émissions fixe les critères d'acceptabilité des taux de réapparition, mais des critères identiques sont actuellement proposés pour l'agroalimentaire par la Communauté Européenne.

Les méthodes actuelles d'analyse des PCDD et PCDF font intervenir l'addition d'étalons marqués aux quatre grandes étapes de l'analyse si on inclut l'échantillonnage, ce qui a été fait au niveau de la norme européenne à l'émission, à savoir l'échantillonnage, l'extraction, la purification et la mesure. Ces additions multiples font de la méthode de dilution isotopique la technique de choix pour l'analyse des PCDD et PCDF dans toutes les matrices. Le

Tableau I : Utilité des étalons internes

Types d'étalons	Utilité
Etalons de prélèvements	Mesure et vérification du prélèvement
Etalons d'extraction	Rendements d'extraction et de purification Identification et quantification des congénères
Etalons de purification	Mesure des taux de réapparition liés à la purification des extraits
Etalons d'injection	Quantification des taux de réapparition d'extraction et de purification

Critères d'identification des congénères toxiques

La toxicité d'un échantillon étant le résultat de la quantification des 17 congénères toxiques chlorés en position 2,3,7 et 8, il est important qu'ils soient correctement identifiés.

L'identification est basée sur les paramètres suivants :

- le rapport isotopique des deux ions scrutés doit être égal à $\pm 15\%$ du rapport théorique ;
- l'élution de chaque congénère doit correspondre à la fenêtre d'élution de la série de même degré de chloration ;
- les temps de rétention du congénère natif doit être égal à celui de l'homologue marqué dans la fourchette de 0, + 3 sec ;
- les temps de rétention des deux ions scrutés doivent être identiques ;
- le rapport signal sur bruit doit être ≥ 5 ;
- l'absence de signaux pour les familles de composés susceptibles d'interférer (ex : PCDPE).

Spectrométrie de masse haute résolution

La nécessité d'utiliser la spectrométrie de masse haute résolution pour la mesure de la 2,3,7,8-TCDD remonte aux travaux de Baughman et Meselson en 1973 lors de l'étude de la contamination de poissons contaminés en Asie du sud-est. Mais cette technique ne s'est réellement imposée que lorsque la fiabilité, la reproductibilité et la sensibilité des instruments et la convivialité des logiciels ont permis leur utilisation pour l'analyse de grandes séries d'échantillons.

Compte tenu du coût d'un spectromètre de masse haute résolution, il est naturel d'examiner si les avantages de cette technique justifie la différence de prix avec les filtres de masse quadripolaires.

La haute résolution permet l'utilisation des tous les homologues marqués au carbone-13 et contribue à obtenir une meilleure précision de la mesure des PCDD et plus particulièrement des PCDF. Le tableau II montre les résolutions nécessaires à la séparation des PCDD et PCDF natifs de leurs homologues marqués.

Tableau II : Séparation des PCDD natifs et des $^{13}\text{C}_{12}$ -PCDF

Congénères	Résolution
$^{13}\text{C}_{12}$ -TCDF et TCDD natifs	8 000
$^{13}\text{C}_{12}$ -PeCDF et PeCDD natifs	9 000
$^{13}\text{C}_{12}$ -HxCDF et HxCDD natifs	10 000
$^{13}\text{C}_{12}$ -HpCDF et HpCDD natifs	11 000
$^{13}\text{C}_{12}$ -OCDF et OCDD natifs	12 000

Les congénères marqués bien utilisés permettent le contrôle des différentes étapes, prélèvement, extraction et purification, et contribuent à l'identification et à la quantification des PCDD et PCDF.

La haute résolution contribue à la purification des extraits et à améliorer le rapport signal sur bruit et donc la sensibilité et les limites de détection. Certaines familles de composés, par exemple les polychlorobiphényles, les chlorobenzothiophènes sont éliminés par la haute résolution. Ces familles de composés se conduisent comme les PCDD et PCDF lorsque leurs concentrations sont très élevées. Le gain de sensibilité avec la haute résolution permet la mesure des PCDD et PCDF dans les matrices agroalimentaires, les fluides biologiques, les boues de station d'épuration et les eaux, par exemple. Les concentrations mesurées dans ces matrices sont 1 000 fois plus faibles que celles mesurées à l'émission. L'augmentation des prises d'essai d'échantillons, qui s'accompagne de celle des autres familles de contaminants, ne permet pas de résoudre le problème de l'insuffisance de sensibilité des instruments basse résolution. Hayward et coll., 1999 rapportent que la MS/MS est 5 fois moins sensible que la haute résolution, ce qui confirme le résultat rapporté par Fraisse et coll. dès 1989. L'étalonnage de l'instrument de mesure est normalement réalisé à partir de quatre ou cinq solutions dont la moins concentrée, qui fixe la limite de quantification, affiche des concentrations de l'ordre de 100 pg/μl, éventuellement moins. Le critère de qualité exigé est que les concentrations des congénères des échantillons soumis à l'analyse soient comprises dans le domaine défini par l'étalonnage. Les instruments haute résolution sont les seuls à pouvoir mesurer des concentrations aussi faibles avec un rapport signal sur bruit sans ambiguïté, environ 20-30 en routine.

La figure 4 donne quelques exemples des concentrations mesurées dans des aliments faiblement contaminés. Les deux échantillons présentent le même profil où dominent les dioxines fortement chlorées.

Si on représente les mêmes analyses exprimées en TEQ, les congénères prépondérants sont la 2,3,7,8-TCDD, la 1,2,3,7,8-PeCDD et le 2,3,4,7,8-PeCDF comme illustré dans la figure 5. La mesure des concentrations observées dans ce type d'échantillon est relativement facile avec environ 5 grammes de matières grasses avec une bonne méthode de préparation et la

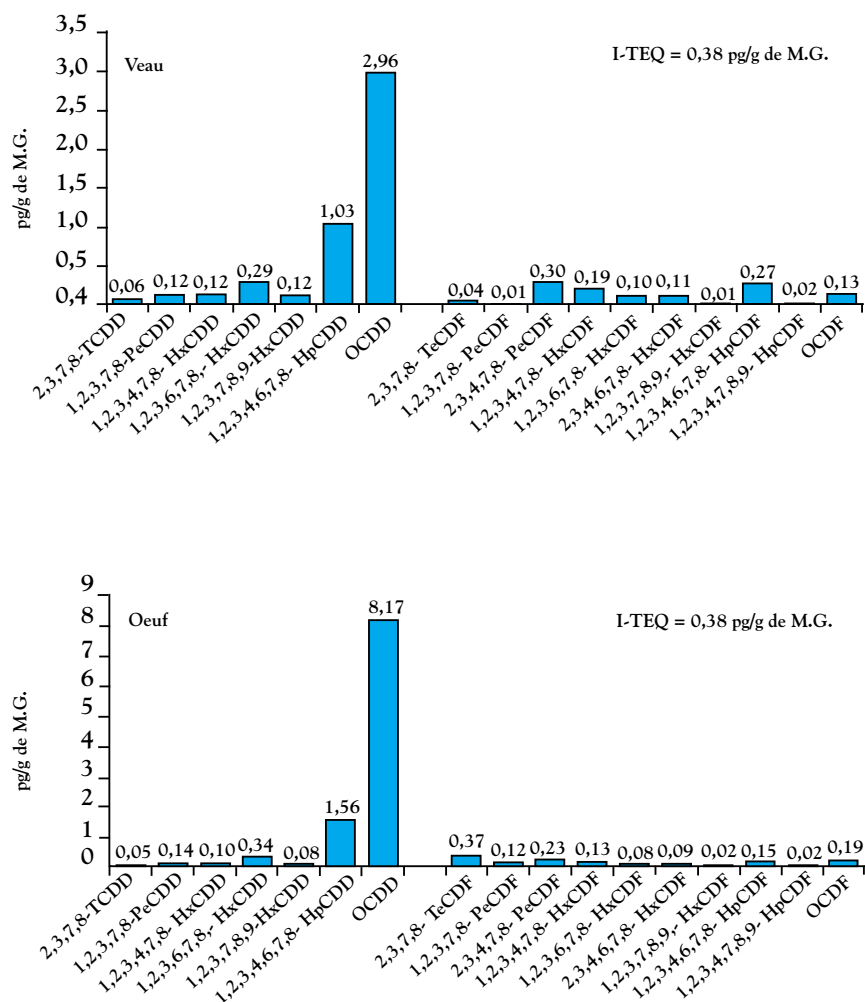


Figure 4 : Analyse (pg/g de matières grasses) des 17 congénères toxiques PCDD/PCDF dans un échantillon de viande de veau et d'œufs (M.G. : matières grasses)

D'autres exemples d'échantillons plus contaminés permettent l'analyse avec 1, 2 ou 3 grammes de matières grasses comme le montre la figure 6 pour deux échantillons de lait maternel et de tissu adipeux.

La figure 7 montre que les profils des deux échantillons sont très ressemblants et que 4 congénères sont responsables de la toxicité exprimée en TEQ.

L'analyse par spectrométrie de masse haute résolution nécessite la présence permanente d'un produit de référence (par exemple le PFK = perfluorokérosène), dont l'ionisation donne des ions d'intensité constante, utilisés pour

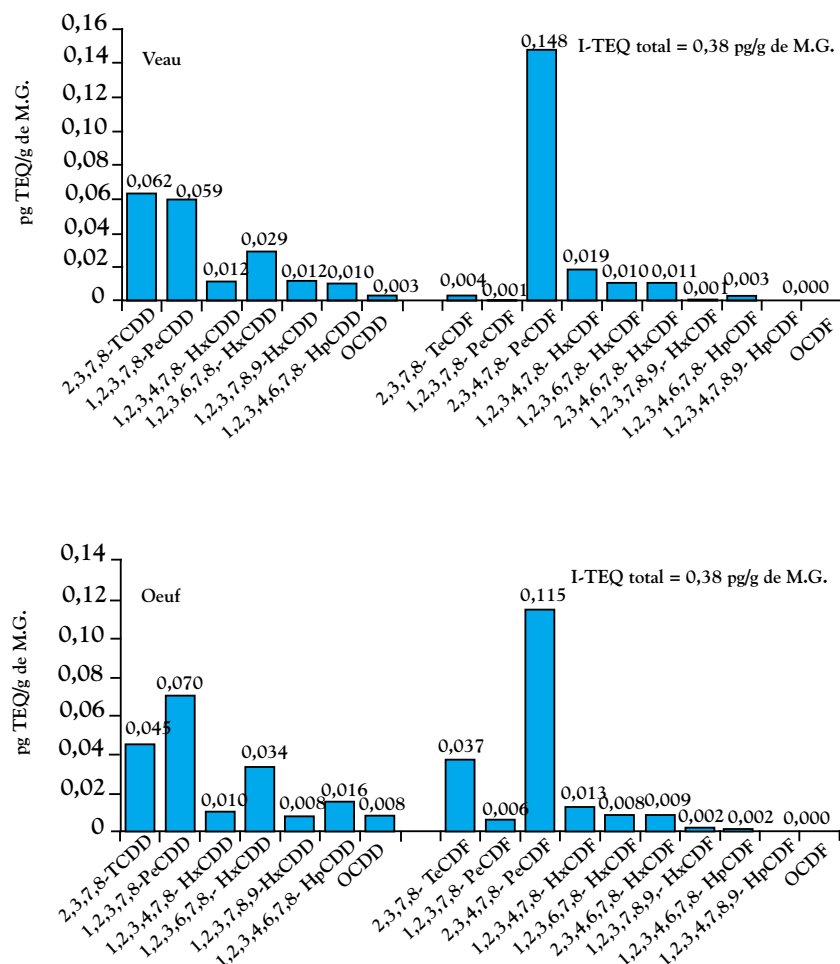


Figure 5 : Analyse (pg TEQ/g de matières grasses) des 17 congénères toxiques PCDD/PCDF dans un échantillon de viande de veau et d'œufs

« verrouiller » l'analyseur et éviter toute dérive de façon à conserver le maximum de sensibilité pour les ions des PCDD et PCDF. L'analyste dispose donc d'une trace permanente d'un ion témoin de la stabilité de l'ionisation et du spectromètre de masse. Ce paramètre est un critère de qualité de l'efficacité des étapes de purification car la présence d'impuretés modifie l'ionisation donc l'intensité du signal de l'ion de référence. Par exemple, la présence d'une interférence au temps de rétention de l'étalon interne se traduit par une baisse de l'intensité du signal et donc une quantification erronée.

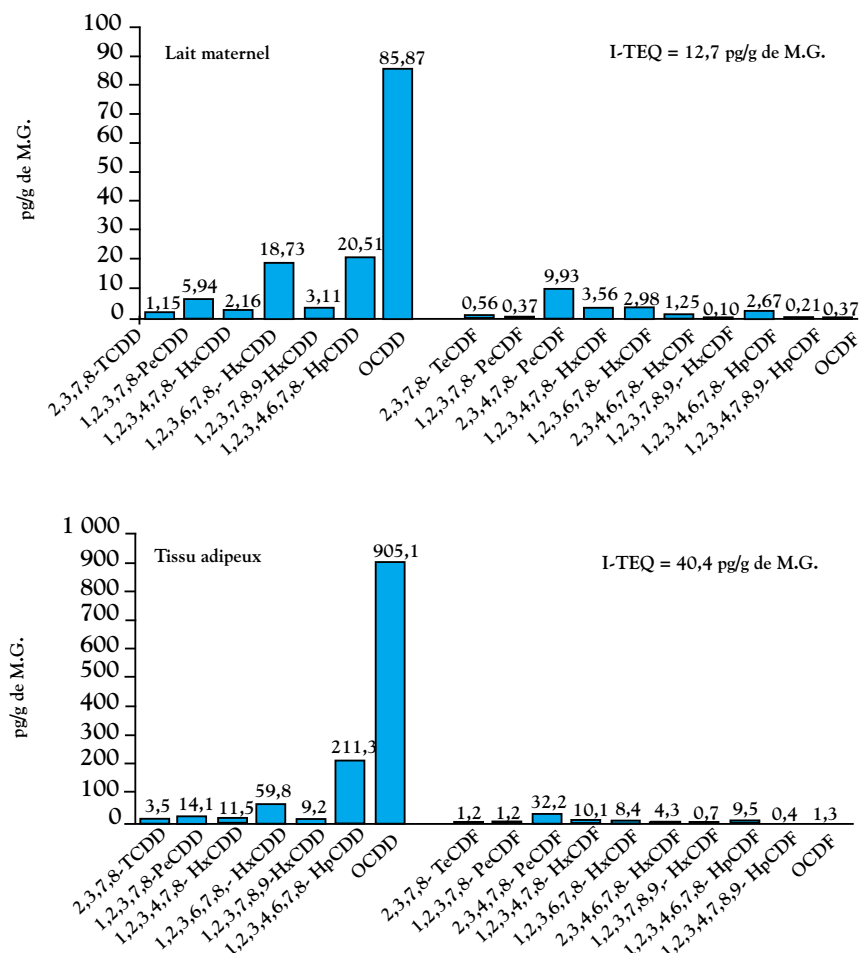


Figure 6 : Analyse (pg/g de matières grasses) des 17 congénères toxiques PCDD/PCDF dans un échantillon de lait maternel et de tissu adipeux

Contrôle de qualité dans l'analyse des PCDD et PCDF

L'analyse des PCDD et PCDF doit être exécutée avec le maximum de garanties à cause :

- des faibles quantités à mesurer ;
- de la réglementation existante : pour les émissions, norme EN 1948 en réponse à la directive européenne de 1992 ; pour les aliments des animaux, Directive 98/60/CE du 24 juillet 1998 ; pour les additifs dans les aliments pour animaux, règlement (CE) N° 2439/1999 ;

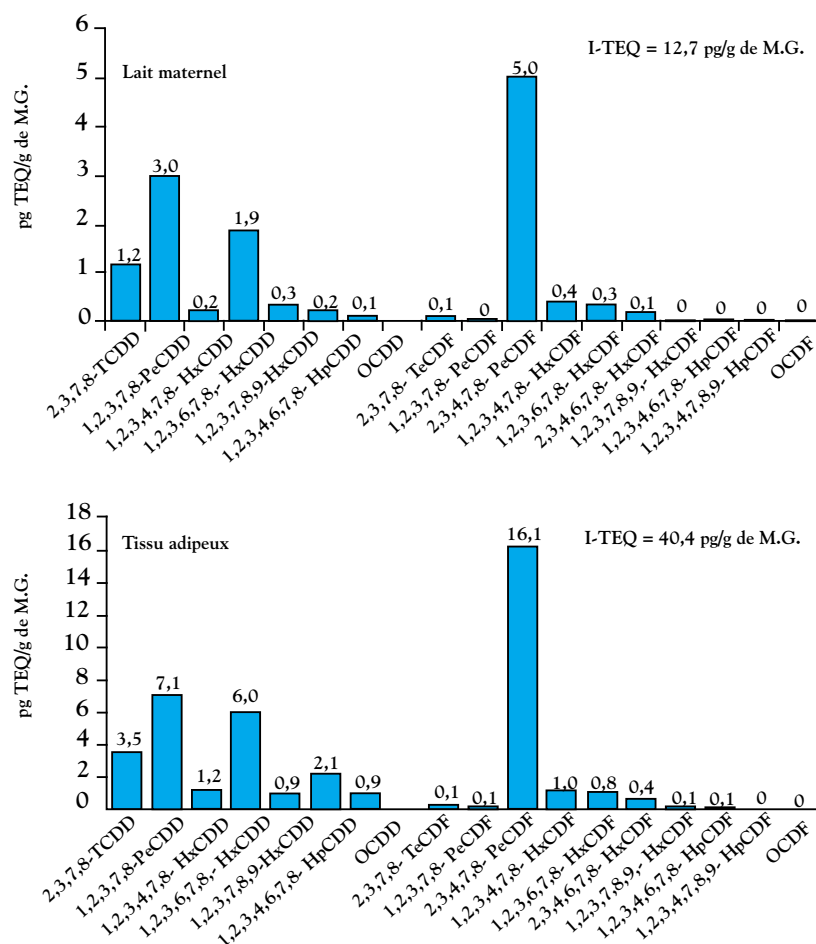


Figure 7 : Analyse (pg TEQ/g de matières grasses) des 17 congénères toxiques PCDD/PCDF dans un échantillon de lait maternel et de tissu adipeux

- de la réglementation à l'étude, notamment dans l'agroalimentaire où les concentrations maximales des PCDD et PCDF exprimées en équivalent toxique 2,3,7,8-TCDD, rapportées à la matière grasse proposées sont de 3 pg TEQ/g pour le lait, les volailles et la viande de bœuf, 2 pg TEQ/g pour la viande de porc, 5 pg TEQ/g pour les œufs et 3 pg/g pour les poissons (dans ce cas la valeur est rapportée à la totalité de l'animal) ;
- des conséquences sur la santé de l'homme.

Le contrôle de qualité est présent à tous les niveaux du protocole analytique, de la vaisselle de la verrerie à la mesure, en passant par les contrôles de tous les réactifs utilisés (solvants, adsorbants, acides...). En plus de l'étalonnage de
382 l'instrument avec plusieurs solutions, des blancs de procédure, des analyses de

contrôle de matériaux certifiés, les laboratoires doivent participer aux exercices interlaboratoires pour montrer leur aptitude à analyser des échantillons réels et valider leur méthode. Les résultats doivent être accompagnés d'un minimum d'information tels que les profils analytiques, les taux de réapparition des étalons internes et éventuellement des limites de détection pour les congénères non détectés.

En conclusion, la spectrométrie de masse haute résolution utilisée en mode de scrutation d'ions, associée à des méthodes d'extraction et de purification validées et à l'utilisation des congénères marqués est actuellement l'état de l'art. Toute autre technique doit montrer qu'elle permet d'atteindre au moins la même qualité de résultats en termes de justesse, précision, répétabilité et sensibilité, pour être utilisable. La diversité des matrices cache un grand nombre de pièges que les analystes se doivent de connaître pour pouvoir les éviter. Ceci implique la participation aux essais interlaboratoires qui, seuls, permettent la validation des méthodes de préparation et de mesure. Ces essais sont organisés depuis plusieurs années par le département de chimie de l'Université de Umeå en Suède. Complémentairement à ces essais internationaux, l'utilisation des matériaux de référence est recommandée même par les laboratoires expérimentés.

Daniel Fraisse

Laboratoire CARSO - Centre d'analyse de traces, Lyon

BIBLIOGRAPHIE

- BACHER R, BALLSCHMITER K. Separation of polychlorodibenzo-*p*-dioxins and – dibenzofurans on the new polar stationary phase DB Dioxin. *Chromatographia* 1992, **34** : 137-142
- BAUGHMAN R, MESELSON M. An analytical method for detecting TCDD (dioxin) : levels of TCDD in samples from Vietnam. *Environ Health Perspect* 1973, **5** : 27-35
- BUSER HR. Analysis of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans in chlorinated phenols by mass fragmentography. *J Chromatogr* 1975, **114** : 95-108
- FRAISSE D, GONNORD MF, BECCHI M. High resolution/Tandem mass spectrometry : Analysis of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and furans. *Rapid Commun. Mass Spectrom* 1989, **3** : 79-84
- HAYWARD DG, HOOPER K, ANDRZEJEWSKI D. Tandem-in time mass spectrometry method for the sub-parts-per-trillion determination of 2,3,7,8-chlorine-substituted dibenzo-*p*-dioxins and furans in high-fat foods. *Anal Chem* 1999, **71** : 212-220
- LIEM AKD, DE JONG APJM, MARSMAN JA, DEN BOER, AC, GROENEMEIJER GS, DEN ARTOG RS, DE KORTE GAL, HOOGERBRUGGE R, KOOTSTRA PR, VAN'T KLOOSTER HA. A rapid procedure for the analysis of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans in milk samples. *Chemosphere* 1990, **20** : 843-850

MACKAY D, SHIU WY, MA KC. In : Illustrated Handbook of physical-chemical properties and environmental fate for organic chemical, Ed. 2. Lewiw Publishers, Michigan 1992, pp 429-560

RYAN JJ, CONACHER HBS, PANOPIO LG, LAU BPY, HARDY JA, MASUDA Y. Gas chromatographic separation of all 136 tetra- to octa-polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and polychlorinated dibenzofurans on nine different stationary phases. *J Chromatogr* 1991, **541** : 131-183

SHIU WY, DOUCETTE W, GOBAS FAPC, ANDREN A, MACKAY D. Physical-chemical properties of chlorinated dibenzo-*p*-dioxins. *Environ. Sci. Technol* 1988, **22** : 651-658

SMITH LM, STALLING DL, JOHNSON JL. Determination of part-per-trillion levels of polychlorinated dibenzofurans and dioxins in environmental samples. *Anal Chem* 1984, **56** : 1830-1842

Analyse des PCDD et PCDF par chromatographie en phase gazeuse/spectrométrie de masse basse résolution en tandem

Les polychlorodibenzodioxines (PCDD) et les polychlorodibenzofuranes (PCDF) sont deux classes de composés engendrées principalement par l'activité humaine. Ce sont deux séries de composés tricycliques comportant un ou deux hétéroatomes d'oxygène et de un à huit atomes de chlore. Selon le nombre et la position de ces derniers, il existe 75 isomères de PCDD et 135 isomères de PCDF. Parmi ces 210 molécules, celles substituées en position 2,3,7,8 apparaissent les plus toxiques.

Les problèmes de dissémination dans l'environnement des dioxines et des produits organochlorés apparentés (PCDF et PCB) sont liés à plusieurs champs d'activité : industries chimiques, agroalimentaires, santé publique. La bio-accumulation de ces composés dans les organismes vivants conduit à une contamination pouvant atteindre la chaîne alimentaire.

Récemment, le Conseil de l'Europe a exprimé son désir d'obtenir des données sur les PCDD et PCDF contenus dans divers matériaux agro-alimentaires. En France, le Conseil Supérieur d'Hygiène de France a présenté la détection de ces composés comme un objectif prioritaire.

Des méthodes analytiques pour la détermination des PCDD et PCDF ont été développées dans les pays européens et d'Amérique du Nord. Une norme française AFNOR NF EN 14186 a été publiée en juin 1997 (analyse des poussières d'incinérateur). La plupart des analyses pour la détermination des PCDD et PCDF sont effectuées à l'aide de spectromètres de masse haute résolution ($P \geq 10\,000$) qui permettent d'obtenir une grande sensibilité et une grande sélectivité (limite de détection de l'ordre de 0,02 pg). Mais le prix à payer pour ce type de dosage est hors de portée pour des analyses de routine visant à traiter des centaines d'échantillons en épidémiologie ou en santé publique.

Les progrès de la chimie analytique (en particulier séparative) (Pyell et coll., 1993 ; Pyell et Garrigues, 1994 ; Stranberg et coll., 1998) permettent la réalisation de méthodologies d'extraction et de purification plus rapides, moins coûteuses mais aussi performantes quant à la validité des résultats. On peut également envisager d'utiliser la spectrométrie de masse basse résolution

en mode tandem (Hayward, 1997, Hayward et coll., 1999). Ces méthodologies sont intéressantes dans le cas d'études de surveillance dans les compartiments de l'environnement (animaux, végétaux, sols...) mais aussi dans les études épidémiologiques pour augmenter le nombre de sujets étudiés et mieux apprécier les niveaux d'exposition (dosages systématiques dans le sang par exemple).

Le développement présenté dans ce chapitre a trait à la mise au point d'un protocole analytique pour l'extraction, la séparation et la détection des PCDD et PCDF. Le but de ce projet était de développer un protocole analytique rapide et fiable pour l'analyse des PCDD et PCDF utilisant l'extraction assistée par micro-ondes, la chromatographie en phase liquide haute pression (HPLC) comme méthode de purification et la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse basse résolution comme méthode d'identification et de quantification.

Méthode d'analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse basse résolution en tandem

L'optimisation a porté dans un premier temps sur un seul composé : la 2,3,7,8-TCDD. Tous les développements analytiques ont été effectués sur un couplage chromatographe en phase gazeuse/spectromètre de masse de type trappe à ions. La colonne chromatographique était une colonne capillaire à phase stationnaire peu polaire (méthyle (95 %) - phényle (5 %) - silicone), de type CP-SIL 8CB (Chrompack) (60 m longueur $\times$ 0,25 mm diamètre intérieur $\times$ 0,25 μ m épaisseur de phase). Le gaz vecteur utilisé est l'hélium à un débit constant de 2 ml/min en mode d'injection « *on-column* ». Le programme de température du four chromatographique est le suivant : 50 °C (1 min), 15 °C/min jusqu'à 200 °C (3 min), 2 °C/min jusqu'à 290 °C (10 min). L'interface est maintenue à 260 °C et la source d'ionisation à 180 °C.

Le spectre de masse de ce composé obtenu sur cet appareillage sous impact électronique à 70 eV est caractéristique. On note le profil de distribution typique obtenu pour les ions M (m/z 320), M + 2 (m/z 322) et M + 4 (m/z 324), dans les proportions 75, 100 et 50, respectivement. L'ion majoritaire est M + 2. On note également un ion fragment caractéristique résultant de la perte de COCl (perte neutre de 63).

La limite de détection de la 2,3,7,8-TCDD en mode de balayage (*full scan*) est de 10 pg injecté. De façon à abaisser cette limite de détection, le mode d'analyse en spectrométrie de masse choisi a été celui de la spectrométrie de masse en tandem (ou mode MS/MS), qui est très facile à mettre en œuvre avec

un spectromètre de masse de type trappe à ions. Différents paramètres ont été optimisés de façon à maximiser la sensibilité :

- sélection de l'ion parent ;
- fenêtre et temps d'isolement de l'ion parent ;
- énergie de collision ;
- temps d'application de l'énergie de collision ;
- valeur de Q_z .

L'ion parent choisi pour effectuer l'analyse en mode MS/MS est l'ion majoritaire $M + 2$ (m/z 322). Le mode MS/MS permet de suivre des réactions spécifiques et de cette façon de gagner en sensibilité et sélectivité. Dans le cas présent, la réaction choisie est la perte de neutre COCl. Ainsi, on suit la fragmentation $322 - 63 = 259$.

Le temps d'isolement de l'ion parent n'a pas d'influence significative sur la sensibilité de la détection. Il est fixé par conséquent à 10 ms. En revanche, la fenêtre d'isolement de l'ion parent est un paramètre important. La sensibilité maximale est obtenue pour la fenêtre la plus petite (322 ± 2).

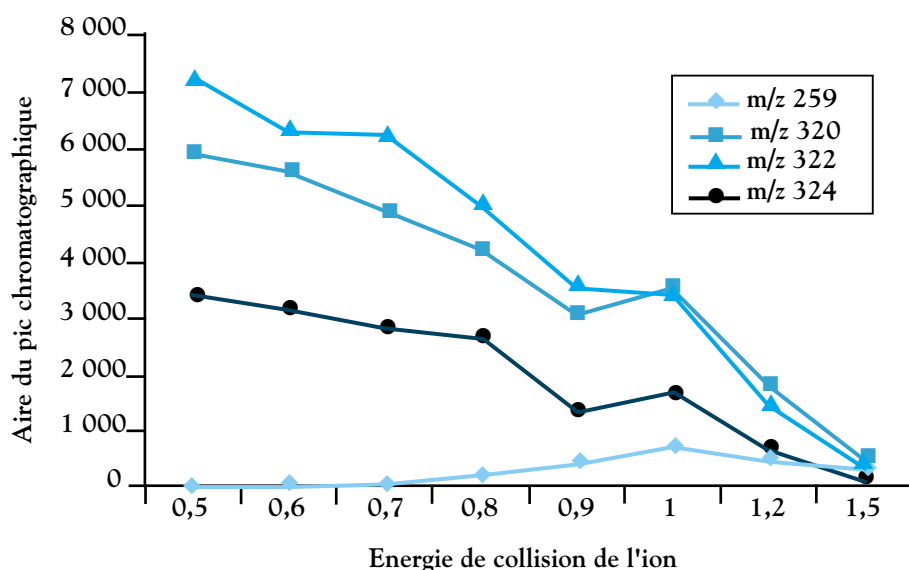


Figure 1 : Effet de l'énergie de collision sur la dissociation de l'ion parent

Il est important d'optimiser l'énergie de collision car elle a un effet important sur la dissociation de l'ion $M + 2$ et l'obtention de l'ion m/z 259. La figure 1 montre cet effet. On peut noter que m/z 259 est maximum pour une énergie supérieure à 0,9 V, mais que si cette énergie est trop forte ($> 1,2$ V) on a alors un effet contraire à celui recherché ; l'énergie étant trop forte, il y a une

fragmentation trop importante de la molécule et m/z 259 devient moins abondant.

Le temps d'application de cette énergie n'a lui en revanche que peu d'effet. Il a été fixé à 15 ms pour toute l'étude.

La valeur de Q_z a un effet très important sur la sensibilité de la détection. De plus, l'effet de l'énergie de collision dépend de la valeur de Q_z fixée (figure 2). La sensibilité de la détection est maximale pour des Q_z de 0,3 ou 0,45 et des énergies de collision de 1,3 V.

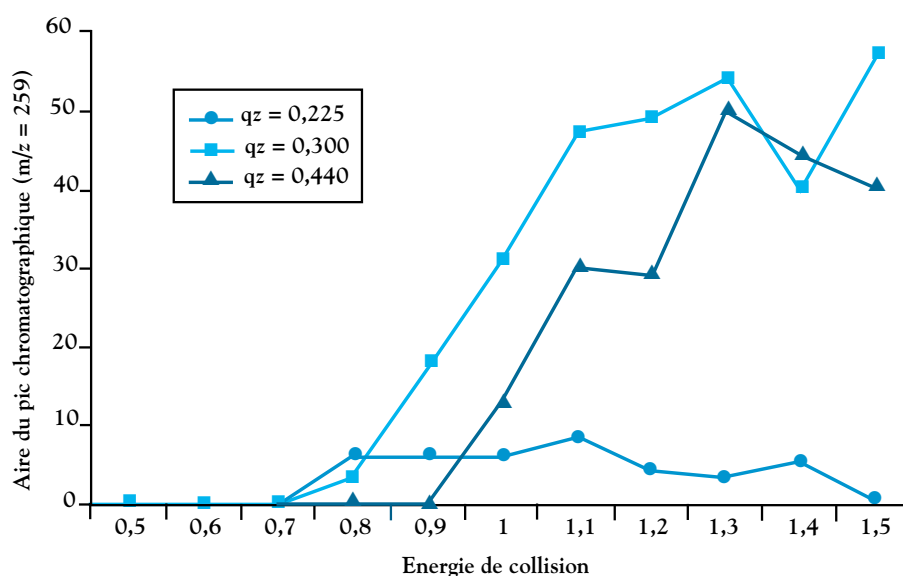


Figure 2 : Influence de l'énergie de collision et de la valeur de Q_z sur la dissociation de l'ion parent

Si l'on considère les différents paramètres optimisés, on aboutit aux conditions optimales présentées dans le tableau I.

Tableau I : Valeurs des paramètres influant sur la détection de la 2,3,7,8-TCDD

Sélection de l'ion parent	322
Fenêtre et temps d'isolement de l'ion parent	± 2 pendant 10 ms
Énergie de collision	1,3 V
Temps d'application de l'énergie de collision	15 ms
Valeur de Q_z	0,3

Dans ces conditions, on obtient pour la 2,3,7,8-TCDD une limite de quantification de 1 pg injecté. La linéarité du système est correcte (figure 3), même si elle n'est pas excellente. Ceci implique que, pour obtenir une bonne quantification (en termes de précision et de reproductibilité) par la méthode de l'étalonnage interne, les étalons internes (congénères marqués au C13) devront impérativement être rajoutés dans des teneurs voisines de celles des composés natifs présents dans les échantillons à doser.

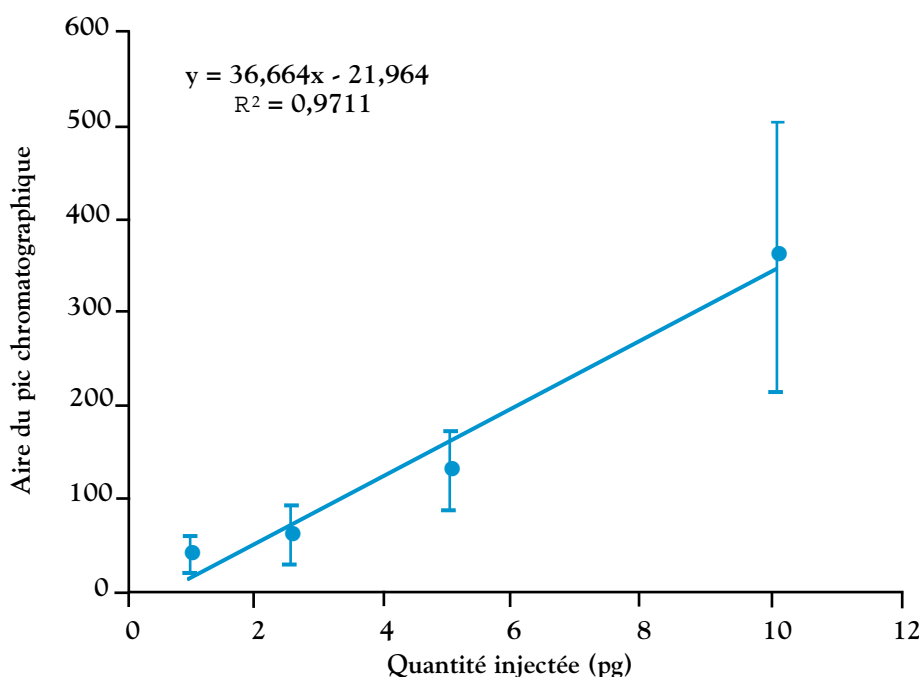


Figure 3 : Intensité du signal obtenu pour la 2,3,7,8-TCDD en fonction des quantités injectées

Une optimisation semblable à celle effectuée pour la 2,3,7,8-TCDD a été menée pour l'ensemble des 17 congénères recherchés. Les conditions optimales sont rassemblées dans le tableau II.

En ce qui concerne la 2,3,7,8-TCDD, le mode d'injection (« *splitless* » ou « *on-column* ») n'a pas d'influence sur la sensibilité. En revanche, de façon tout à fait prévisible, l'injecteur « *on-column* » permet d'améliorer les limites de détection des composés les plus lourds, notamment les octachlorés. Avec ce type d'injecteur, on obtient les limites de détection présentées dans le tableau III.

La méthode de quantification par GC/MS/MS développée a été ensuite appliquée au dosage des 17 congénères présents dans un mélange étalon. Les

Tableau II : Paramètres optimisés pour l'analyse par MS/MS des PCDD et PCDF

Composés	Ion parent (m/z)	Energie de collision (V)	Ion fils (m/z)
Tétrachlorodibenzodioxines	322	1,3	259
Pentachlorodibenzodioxines	356	1,4	293
Hexachlorodibenzodioxines	390	1,5	327
Heptachlorodibenzodioxines	424	1,6	361
Octachlorodibenzodioxine	460	1,8	397
Tétrachlorodibenzofuranes	306	1,3	243
Pentachlorodibenzofuranes	340	1,4	277
Hexachlorodibenzofuranes	374	1,5	311
Heptachlorodibenzofuranes	408	1,6	345
Octachlorodibenzofurane	444	1,8	381

Tableau III : Limites de détection pour les 17 congénères, obtenues pour la méthode de GC/MS/MS développée

Composés	Limite de quantification (pg injecté)
2,3,7,8-TCDD	1,0
1,2,3,7,8-PeCDD	1,6
(1,2,3,4,7,8 + 1,2,3,6,7,8)HxCDD	3,0
1,2,3,7,8,9-HxCDD	1,5
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	1,5
OCDD	3,0
2,3,7,8-TCDF	0,8
1,2,3,7,8-PeCDF	4,0
2,3,4,7,8-PeCDF	3,0
(1,2,3,4,7,8 + 1,2,3,6,7,8)HxCDF	8,0
2,3,4,6,7,8-HxCDF	4,0
1,2,3,7,8,9-HxCDF	4,0
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	4,0
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	4,0
OCDF	8,0

résultats obtenus sont présentés dans le tableau IV (trois solutions différentes ont été préparées et analysées séparément. Le rendement donné est la moyenne de ces trois essais avec l'écart-type obtenu).

La première phase des travaux a abouti à la mise au point d'une méthode d'analyse des PCDD et PCDF par GC/MS/MS compatible avec les exigences (en termes de sensibilité et de reproductibilité) de l'analyse d'échantillons
 390 environnementaux. Les limites de détection sont moins bonnes que celles

Tableau IV : Rendements de quantification obtenus pour les 17 congénères dans le cas d'un mélange étalon

Composé	Rendement de quantification
2,3,7,8-TCDD	97,6 ± 5,3
1,2,3,7,8-PeCDD	99,5 ± 3,5
(1,2,3,4,7,8 + 1,2,3,6,7,8)HxCDD	99,9 ± 1,1
1,2,3,7,8,9-HxCDD	101,3 ± 2,0
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	96,4 ± 6,3
OCDD	88,7 ± 8,9
2,3,7,8-TCDF	106,2 ± 3,2
1,2,3,7,8-PeCDF	96,5 ± 6,7
2,3,4,7,8-PeCDF	95,2 ± 10,9
(1,2,3,4,7,8 + 1,2,3,6,7,8)HxCDF	95,2 ± 10,9
2,3,4,6,7,8,9-HxCDF	94,2 ± 3,2
1,2,3,7,8,9-HxCDF	101,8 ± 9,9
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	92,6 ± 4,2
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	96,0 ± 13,9
OCDF	106,8 ± 2,7

obtenues par l'utilisation de spectromètres de masse haute résolution (tableau V). Néanmoins, l'appareillage employé est de type « *benchtop* » et est compatible avec une utilisation de routine.

Protocole d'extraction et de purification

L'étape d'optimisation a abouti au développement d'un protocole de routine pour l'extraction et la purification d'échantillons environnementaux pour la détermination des PCDD et PCDF, utilisant les micro-ondes et des fractionnements par HPLC. Le protocole général est donné dans la figure 4. L'extraction assistée par micro-ondes permet de diminuer de façon notable le temps consacré aux extractions (quelques minutes contre plusieurs heures pour l'extraction Soxhlet), ainsi que le volume de solvant utilisé (quelques dizaines de ml contre plusieurs centaines de ml) (Budzinski et coll., 1995 ; Letellier et Budzinski, 1999 ; Budzinski et Thompson, 1999). Les purifications par HPLC permettent un contrôle continu de la préparation d'échantillon ainsi qu'une automatisation de celle-ci, et donc un gain de temps important ainsi qu'une meilleure reproductibilité.

Ce protocole a été appliqué dans un premier temps à la détermination des 17 PCDD/PCDF dans un échantillon du port d'Arcachon dopé en PCDD et

Tableau V : Limites de détection des dioxines : comparaison entre les méthodes GC/MS haute résolution et GC/MS basse résolution

Matrice	GC/MS ¹ haute résolution				GC/MS basse résolution			
	Matrices agro-alimentaires		Sol, sédiments, boues		Matrices agro-alimentaires		Sols, sédiments	
Prise d'essai (g)	10		100		10		100	
Volume injecté (µl)	1-1,8		1-1,8		3		3	
	LOQ ² pg/g	LOD ³ pg/g	LOQ ² pg/g	LOD ³ pg/g	LOQ ⁴ pg/g	LOD ⁵ pg/g	LOQ ⁴ pg/g	LOD ⁵ pg/g
PCDD								
2,3,7,8-TCDD	0,25	0,05	0,025	0,005	0,6	0,18	0,1	0,03
1,2,3,7,8-PeCDD	1	0,2	0,1	0,02	0,8	0,2	0,1	0,03
1,2,3,4,7,8-HxCDD	1,25	0,25	0,125	0,025	1	0,2	0,2	0,03
1,2,3,6,7,8-HxCDD								
1,2,3,7,8,9-HxCDD								
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	1,25	0,25	0,125	0,025	1,4	0,4	0,2	0,07
OCDD	2,5	0,5	0,25	0,05	2	0,6	0,3	0,10
PCDF								
2,3,7,8-TeCDF	0,25	0,05	0,025	0,005	1	0,30	0,2	0,05
1,2,3,7,8-PeCDF	1	0,2	0,1	0,02	1	0,30	0,2	0,05
2,3,4,7,8-PeCDF								
1,2,3,4,7,8-HxCDF	1,25	0,25	0,125	0,025	2	0,8	0,3	0,13
1,2,3,6,7,8-HxCDF								
2,3,4,6,7,8-HxCDF								
1,2,3,7,8,9-HxCDF								
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF								
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	1,25	0,25	0,125	0,025	2	0,7	0,3	0,12
OCDF	2,5	0,5	0,25	0,05	2	0,7	0,3	0,12
Répétabilité	± 15 %		± 15 %		± 15 %		± 15 %	

¹GC/MS : chromatographie gazeuse/spectrométrie de masse ; ²LOQ : limite de quantification (concentration à laquelle un congénère de dioxine peut être détecté par l'instrument de mesure pour un rapport signal/bruit de 25) ; ³LOD : limite de détection (concentration à laquelle un analyte peut être détecté par l'instrument de mesure pour un rapport signal/bruit de 5) ; ⁴LOQ : limite de quantification (rapport signal/bruit de 10) ; ⁵LOD : limite de détection (rapport signal/bruit de 3)

PCDF. D'un point de vue qualitatif, les résultats se sont avérés très satisfaisants ; les profils chromatographiques sont corrects, sans composé interférent. D'un point de vue quantitatif, les rendements sont compris entre 80 % et 120 %.

Dans un deuxième temps, le protocole a été appliqué à la détermination des teneurs en PCDD et PCDF d'un sédiment certifié (sédiment DX1 vendu par Promochem, Molsheim, France). Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau VI (les concentrations mesurées sont la moyenne de trois réplicats indépendants donnée avec l'écart type correspondant).

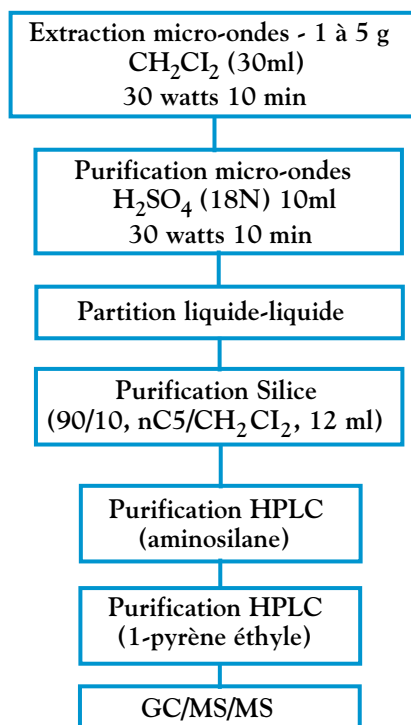


Figure 4 : Protocole développé pour l'analyse des PCDD et PCDF dans des échantillons environnementaux

Tableau VI : Concentrations certifiées et concentrations mesurées des 17 PCDD et PCDF du sédiment DX1

Composé	Concentrations certifiées	Concentrations mesurées
2,3,7,8-TCDD	263 ± 53	253 ± 46
1,2,3,7,8-PeCDD	22 ± 8	20 ± 1
(1,2,3,4,7,8 + 1,2,3,6,7,8) HxCDD	100 ± 34	99 ± 1
123789 HxCDD	53 ± 24	49 ± 5
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	634 ± 182	457 ± 64
OCDD	3 932 ± 933	3 052 ± 489
2,3,7,8-TCDF	89 ± 44	117 ± 8
1,2,3,7,8-PeCDF	39 ± 14	95 ± 14
2,3,4,7,8-PeCDF	62 ± 32	63 ± 10
(1,2,3,4,7,8 + 1,2,3,6,7,8) HxCDF	830 ± 313	663 ± 33
2,3,4,6,7,8-HxCDF	57 ± 36	45 ± 5
1,2,3,7,8,9-HxCDF	28 ± 42	25 ± 1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	2 397 ± 796	2 652 ± 199
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	137 ± 62	179 ± 44
OCDF	7 122 ± 2 406	5 420 ± 1 051

Les résultats obtenus sont tout à fait en accord avec les teneurs certifiées. Les concentrations mesurées sont dans la gamme de valeurs données pour les valeurs certifiées et les écart-types obtenus sont également comparables aux écart-types certifiés.

En conclusion, un protocole analytique rapide et fiable, utilisant l'extraction assistée par micro-ondes, des étapes de purification par chromatographie en phase liquide haute performance (CLHP) et une analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse basse résolution en mode tandem (CG/SM/SM) peut être utilisé pour l'analyse des PCDD et PCDF.

Hélène Budzinski

LPTC, UMR 5472 CNRS, université Bordeaux-I, Talence

Bernard Salinière

IEEB, 1 rue du Professeur Vèzes, Bordeaux

BIBLIOGRAPHIE

BUDZINSKI H, PAPINEAU A, BAUMARD P, GARRIGUES P. Extraction assistée par chauffage micro-ondes focalisées (mof) à pression ambiante des composés organiques dans les matrices naturelles : application à l'analyse des composés aromatiques. *C R Acad Sci Paris* 1995, t. 321, série ii b, 69-76

HAYWARD D. Determination of PCDD and PCDF in milk and cheese by quadruple ion storage collision induced dissociation ms/ms. *Chemosphere* 1997, **34** : 929-939

HAYWARD D, K. HOOPER K, ANDRZEJEWSKI D. Tandem in time mass spectrometry method for the sub parts per trillion determination of 2,3,7,8-chlorine substituted dibenzo-*p*-dioxins and furans in high fat foods. *Anal Chem* 1999, **71** : 212-220

LETELLIER M, BUDZINSKI H. Microwave assisted extraction of organic compounds. *Analisis* 1999, **27** : 259-271

PYELL U, GARRIGUES P, RAYEZ MT. Influence of shape parameters on the separation of tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin isomers on reversed-phase columns. *J Chromatogr* 1993, **628** : 3-10

PYELL U, GARRIGUES P. Clean-up by high-performance liquid chromatography of PCDD and PCDF on a pyrenylethylsilica gel column. *J Chromatogr* 1994, **660** : 223-229

THOMPSON S, BUDZINSKI H. Determination of polychlorinated biphenyls and chlorinated pesticides in environmental biological samples using focused microwave-assisted extraction. *Int J Environ Anal Chem* 1999, **75** : 1-12

Utilisation du dosage biologique CALUX pour la mesure des PCDD, PCDF et composés apparentés

Le dosage CALUX (*Chemical Activated LUciferase gene eXpression*) est un test biologique développé comme alternative relativement rapide et peu coûteuse pour la détermination des dioxines dans des échantillons alimentaires (Bovee et coll., 1996, 1998), environnementaux (Murk et coll., 1996, 1997) et biologiques (Denison et coll., 1996). Les cellules utilisées pour le dosage biologique CALUX ont été développées par le Département de Toxicologie de l'Université agronomique de Wageningen (Pays-Bas) en coopération avec l'Université de Californie à Davis (États-Unis) (Denison et coll., 1993 ; Aarts et coll., 1995 ; Sanderson et coll., 1996). Le test, utilisé depuis 1993 au RIKILT (*State institute for quality control of agricultural products*), a été validé pour les matières grasses du lait dans une gamme de 1 à 15 pg TEQ/g (Bovee et coll., 1998) et pour les pulpes d'agrumes, autour de la limite de 0,5 pgTEQ/g. Des études pilotes sur d'autres types de graisses (porcs, œufs) indiquent que le test fonctionne de la même manière que pour les matières grasses du lait, tandis que les tests sur les aliments pour animaux et les ingrédients alimentaires sont comparables à ceux des pulpes d'agrumes. Le dosage CALUX a régulièrement été utilisé, pour le dosage des dioxines dans les pulpes de citrus provenant du Brésil au printemps 1998, puis lors de la crise belge en 1999. Durant cet épisode, plus de 1 500 échantillons furent contrôlés avec le dosage CALUX, en utilisant la méthode de référence GC/MS (chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse) pour la confirmation et le contrôle de qualité.

Principe

Le dosage biologique CALUX est basé sur la réponse biologique de cellules exposées aux dioxines. Après la liaison de la dioxine au récepteur cytosolique Ah (*arylhydrocarbon*), le transport de ce complexe au noyau et sa liaison au DRE (*dioxin responsive element*), les cellules vont produire différentes protéines. Les cellules hépatomateuses utilisées dans le dosage ont été modifiées par l'introduction d'une construction contenant l'ADN codant pour l'enzyme

luciférase de luciole sous le contrôle d'un DRE murin. En conséquence, en réponse aux dioxines, les cellules produiront de la luciférase, qui peut être mesurée par la production de lumière dans un dosage enzymatique (figure 1).

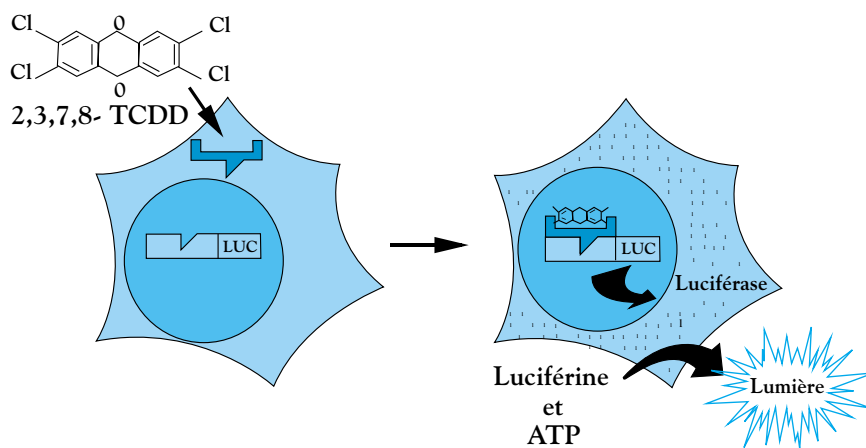


Figure 1 : Principe du dosage biologique CALUX

La figure 2 montre les réponses obtenues avec différentes dioxines et PCB coplanaires. La courbe de réponse est de type sigmoïde, ce qui permet en principe une détermination quantitative des dioxines dans un échantillon. Les courbes sont ajustées en utilisant une courbe d'ajustement à un ligand unique, après correction pour les niveaux des solutions stock déterminés par GC/MS (d'après Bovee et coll, 1998).

Sur plus d'une centaine de dosages différents, une réponse faible est déjà obtenue après exposition des cellules au congénère le plus toxique, la 2,3,7,8-TCDD, à la concentration de 0,25 pM. Quand les cellules sont exposées dans 0,5 ml de milieu par puits, la limite de quantification est de 50 fg (10^{-15} g) de 2,3,7,8-TCDD. Dans le cas des graisses, 500 mg d'échantillon sont extraits et éventuellement dissous dans 4 ml de milieu (62,5 µg par puits). Pour les aliments animaux ou leurs composants, l'échantillon est de 5 g (625 µg/puits). En théorie, cela implique des limites de détection pour les graisses et les aliments de 0,8 pg de 2,3,7,8-TCDD/g de matières grasses (MG) et 80 pg TEQ/kg de nourriture, respectivement. Ces limites sont bien en dessous des limites habituelles.

Comme indiqué dans la figure 2, les dioxines et PCB présentent des potentialités toxiques différentes, exprimées par la valeur de leur TEF. Le tableau I montre les réponses obtenues avec plusieurs dioxines et PCB différents, comparées avec celle de la 2,3,7,8-TCDD, ainsi que les valeurs I-TEF correspondantes.

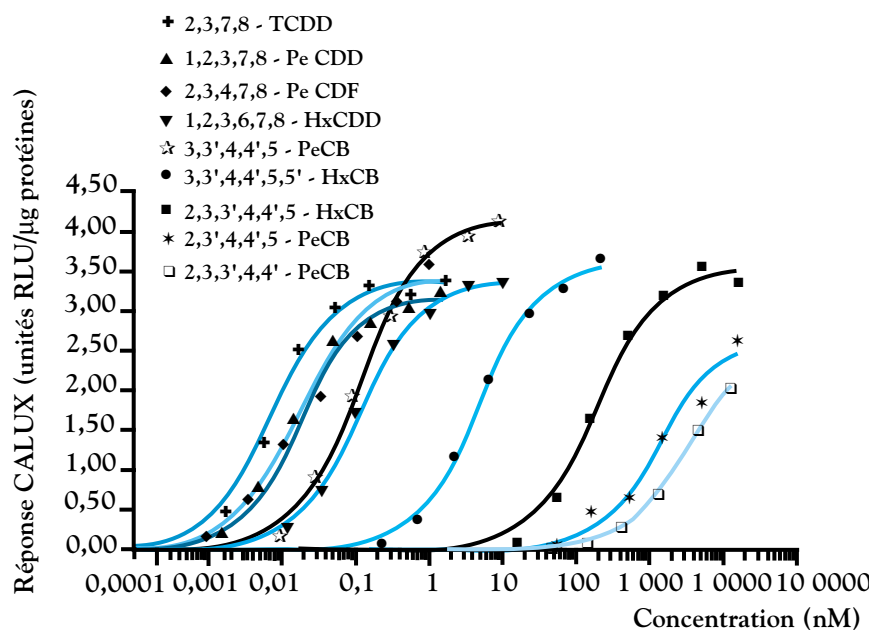


Figure 2 : Réponses (unités RLU) obtenues avec différents congénères de dioxines et de PCB après exposition des cellules pendant 20 heures (d'après Bovee et coll., 1998)

Tableau I : Facteurs de réponse relatifs (CALUX-TEF) pour l'induction de la luciférase dans les cellules H4IIE-pGudLuc1.1 par différents dioxines et PCB (d'après Bovee et coll., 1998)

Composés	EC50 (pM)	I-TEF	CALUX-TEF
2,3,7,8-TCDD	7	1	1
1,2,3,7,8-PeCDD	15	0,5	0,49
2,3,4,7,8-PeCDF	21	0,5	0,34
1,2,3,6,7,8-HxCDD	106	0,1	0,068
3,3',4,4',5-PeCB	111	0,1	0,065
3,3',4,4',5,5'-HxCB	$4,8 \times 10^3$	0,01	$1,5 \times 10^{-3}$
2,3,3',4,4',5-HxCB	$1,9 \times 10^5$	$5,0 \times 10^{-4}$	$3,8 \times 10^{-5}$
2,3',4,4',5-PeCB	$1,4 \times 10^6$	$1,0 \times 10^{-4}$	$4,9 \times 10^{-6}$
2,3,3',4,4'-PeCB	$3,3 \times 10^6$	$1,0 \times 10^{-4}$	$2,1 \times 10^{-6}$

Il existe une bonne corrélation entre les « TEF CALUX » et les I-TEF, mais le dosage est peu sensible aux composés ayant un TEF bas. Des mesures effectuées sur des échantillons contenant des mélanges de dioxines ont montré que le dosage CALUX obéissait au principe du TEQ.

Validation du dosage dans les matières grasses du lait

Un protocole particulier a été mis au point, qui permet la purification simultanée de plusieurs échantillons. Après recueil des matières grasses, les dioxines sont séparées sur une colonne de silice mélangée à 33 % d'acide sulfurique. L'extrait est séché et les dioxines sont dissoutes dans un petit volume de DMSO (diméthyl sulfoxyde) permettant leur transfert dans le milieu de culture. Pour la validation du dosage (répétabilité et reproductibilité), un échantillon de matières grasses est purifié sur du charbon activé et additionné d'un mélange contenant en quantité équivalente les 17 PCDD et PCDF substitués en 2,3,7,8. Six échantillons différents (à 1, 3, 6, 9, 12 et 15 pg TEQ/g de matières grasses) ont été ainsi obtenus et dosés dans 3 séries différentes, une en double, les autres en simple. Un échantillon de 6 pg TEQ a également été mesuré 4 fois dans une autre série. Les niveaux de dioxines sont déterminés en utilisant la courbe de calibration avec la 2,3,7,8-TCDD, après correction pour le blanc. Les tableaux IIA et IIB montrent les résultats des mesures en termes de répétabilité et de reproductibilité du dosage CALUX.

Tableau IIA : Répétabilité du dosage CALUX dans des échantillons de matières grasses du lait

Niveaux déterminés par CALUX (pg 2,3,7,8-TCDD eq./g)						Rendement	
Contenu en dioxines (pg TEQ/g)			Moyenne (± SD)		CV (%)	(%)	
Expérience 1							
1,0	0,8	0,3		0,6		60	
3,0	2,5	2,2		2,4		80	
6,0	3,6	3,0		3,3		55	
9,0	5,6	5,1		5,4		60	
12,0	6,3	6,5		6,4		53	
15,0	9,2	7,5		8,4		56	
Expérience 2							
6,0	4,8	5,6	5,5	4,6	5,1 (± 0,5)	10	85

Les contenus en dioxines déterminés par CALUX ont été corrigés pour le niveau du blanc, égal à 1,4, 1,2 pg 2,3,7,8-TCDD eq./g de MG pour la première expérience et 1,9 pg TCDD eq./g de MG pour la deuxième expérience

La relation dose-réponse est évidente même dans la gamme étroite de concentrations présentée. A 1 pg TEQ/g de matières grasses, le coefficient de variation (CV) est trop grand, ce qui peut être expliqué par la limite de détection théoriquement déterminée de 0,8 pg TEQ/g de matières grasses. Mais le dosage devrait pouvoir révéler des échantillons ayant des niveaux supérieurs à la limite de 6 pg TEQ/g de matières grasses admise actuellement aux Pays-Bas pour le lait. Bien que limite dans un cas (9 pg TEQ/g dans les séries 1,

Tableau IIB : Reproductibilité du dosage CALUX dans des échantillons de matières grasses du lait

Contenu en dioxines (pg TEQ/g)	Niveaux déterminés par GC/MS (pg TEQ/g)	Contenu déterminé par CALUX (pg 2,3,7,8-TCDD eq/g)		Rendement	
		Moyenne ± SD	CV (%)	%	
1,0	1,0	Série 1 : 0,0	0,6 ± 0,6	97	60
		Série 2 : 0,8			
		Série 3 : 1,0			
3,0	3,0	2,7	2,6 ± 0,1	4	87
		2,5			
		2,5			
6,0	6,0	5,4	3,5 ± 1,9	54	58
		3,6			
		1,6			
9,0	9,0	5,5	5,9 ± 0,6	10	66
		5,6			
		6,5			
12,0	12,0	9,6	7,4 ± 2,0	27	62
		6,3			
		6,1			
15,0	15,0	11,4	10,2 ± 1,1	11	68
		9,2			
		10,0			

Les contenus en dioxines déterminés par CALUX ont été corrigés pour le niveau du blanc, égal à 4,5, 1,4 et 2,5 pg 2,3,7,8-TCDD eq/g de MG pour les séries 1, 2 et 3, respectivement

tableau IIB), les échantillons supérieurs à 6 pg TEQ/g montraient une réponse clairement élevée par rapport à l'échantillon de 6 pg TEQ/g. À l'exception de l'échantillon de 3 pg TEQ/g dans la série 3 (faux-positifs, tableau IIB), tous les échantillons inférieurs à 6 pg TEQ/g montraient une réponse plus basse.

En principe, le dosage CALUX peut être utilisé pour déterminer les niveaux de dioxines dans les échantillons. En pratique, les résultats obtenus doivent être corrigés pour les impuretés introduites par les réactifs utilisés, c'est-à-dire tenir compte des valeurs obtenues avec le blanc. Par ailleurs, un contrôle positif ayant des niveaux en dioxines voisins de la dose maximale admissible doit être inclus dans chaque série d'échantillons afin d'évaluer et tenir compte du rendement d'extraction. Puisque, en pratique, tous les échantillons supérieurs à la dose maximale admissible doivent être confirmés par la méthode de référence (GC/MS), le RIKILT utilise le dosage CALUX principalement en test de dépistage en comparant des résultats obtenus sur des échantillons inconnus avec des échantillons de référence. Tout échantillon donnant une réponse plus basse est déclaré négatif, tout échantillon donnant une réponse plus élevée est déclaré suspect.

Comparaison des dosages CALUX et GC/MS sur des échantillons de lait de vache

Le dosage CALUX a été utilisé pour tester 22 échantillons de laits collectés en 1997 en divers sites aux Pays-Bas. Le contenu en 17 congénères PCDD et PCDF substitués en 2,3,7,8, en 3 PCB coplanaires et plusieurs PCB mono et di-ortho substitués ont été déterminés par analyse GC/MS. Les 22 échantillons ont été extraits et divisés en 2 séries. La figure 3A montre la réponse CALUX de ces 2 séries en comparaison des niveaux déterminés par GC/MS. Ces résultats montrent clairement que la première série indiquait en moyenne une réponse plus élevée, malgré les niveaux relativement bas déterminés par GC/MS. En utilisant les courbes de calibration 2,3,7,8-TCDD, la réponse CALUX a été convertie en niveaux équivalents de 2,3,7,8-TCDD et corrigée pour le blanc (figure 3B). Les droites de régression linéaire pour les deux séries séparées (A) ou combinées (B) sont incluses. Les PCB sont compris pour les TEQ déterminés par GC/MS.

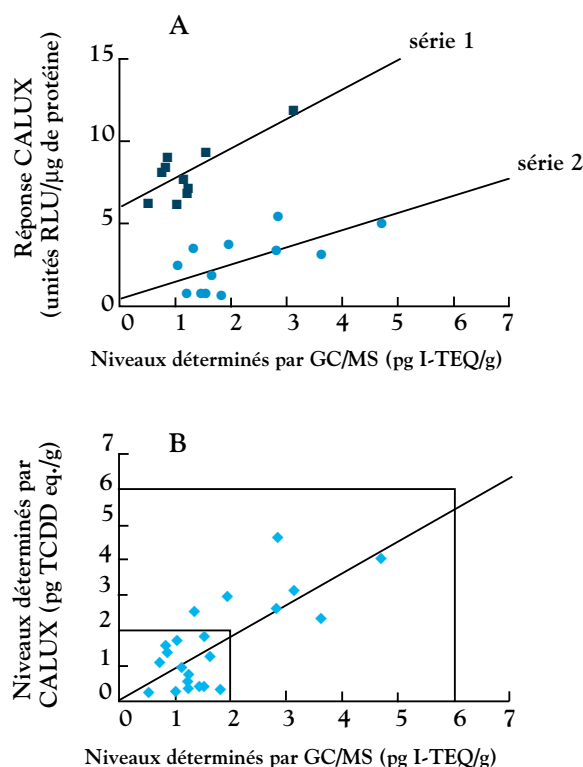


Figure 3 : Comparaison de la réponse CALUX (A) ou du contenu correspondant en dioxines (B) avec les contenus en TEQ déterminés par GC/MS pour 22 échantillons de lait collectés en 1997 aux Pays-Bas.

Les figures combinées montrent une corrélation de 0,74 entre les niveaux de dioxines déterminés par CALUX et ceux déterminés par GC/MS. Ni le dosage par GC/MS, ni celui par CALUX n'ont montré d'échantillon dépassant la limite de 6 pg TEQ/g de matières grasses. Si on met une limite arbitraire de 2 pg TEQ/g de matières grasses (deux fois la limite de quantification), les 5 échantillons au-dessus de cette limite en GC/MS montrent tous une réponse augmentée en CALUX. Tous ces échantillons ont été recueillis dans des zones situées autour d'incinérateurs. Deux autres échantillons recueillis dans des zones non situées près d'un incinérateur ont donné une réponse CALUX supérieure à 2 pg TEQ/g de matières grasses, alors qu'ils étaient inférieurs à 2 pg TEQ/g de matières grasses en GC/MS.

Spécificité du dosage

En principe, le dosage CALUX est sensible à n'importe quel composé capable de se lier au récepteur Ah. Outre les dioxines et PCB coplanaires, cela inclut certains hydrocarbures aromatiques polycycliques (PAH) comme le benzo[a]pyrène et le benz(k)fluoranthène. D'autres PAH non cancérigènes comme le pyrène et le fluoranthène ont donné des résultats négatifs. Pourtant, les cellules ont conservé la capacité de métaboliser ces composés et de dégrader la luciférase qui est produite durant les premières heures en réponse à ces composés. La figure 4 montre la relation dose-réponse obtenue avec le benzo[a]pyrène après exposition des cellules pendant 4 ou 20 heures. Ces composés ne peuvent être mesurés qu'en utilisant une durée d'exposition relativement brève, à moins que les concentrations deviennent très élevées. Dans le

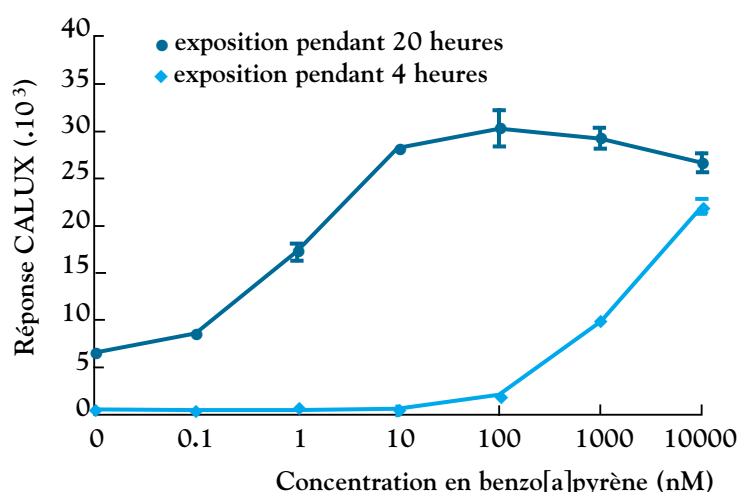


Figure 4 : Réponse ($\cdot 10^3$ unités RLU) obtenue avec le benzo[a]pyrène après exposition pendant 4 ou 24 heures (d'après Hoogenboom et coll., 1999)

cas du benzo[a]pyrène, une concentration de 100 nM est nécessaire pour avoir une réponse positive après 20 heures, corrélant avec une concentration de 0,25 µg/g de matières grasses dans les conditions utilisées. Pour cette raison, le dosage en routine utilise une exposition de 24 heures.

Jusqu'à présent, il n'y a pas d'indication concernant l'existence de composés capables d'interférer suffisamment sur la réponse cellulaire médiée par le récepteur Ah pour donner une réponse faussement négative. Dans quelques cas, une inhibition compétitive semble avoir lieu, mais cela donne quand même un résultat positif pour le dosage. De plus, des concentrations relativement élevées sont nécessaires pour cet effet. Comme le dosage nécessite une réponse active des cellules, des effets cytotoxiques pourraient certainement interférer, mais cela est contrôlé en routine en examinant les cellules après l'exposition. En outre, les matrices d'échantillons inconnus sont toujours testées avec et sans ajout d'un mélange standard de dioxines, permettant la détection de substances possiblement interférantes.

La figure 5 donne une idée de la proportion de faux positifs (6/38) et de faux négatifs (0/38) obtenus en comparant les taux de dioxines mesurés sur des échantillons de pulpe de citrus, par dosage CALUX ou par GC-MS (la limite de positivité des échantillons était fixée à 5 pg TEQ/g).

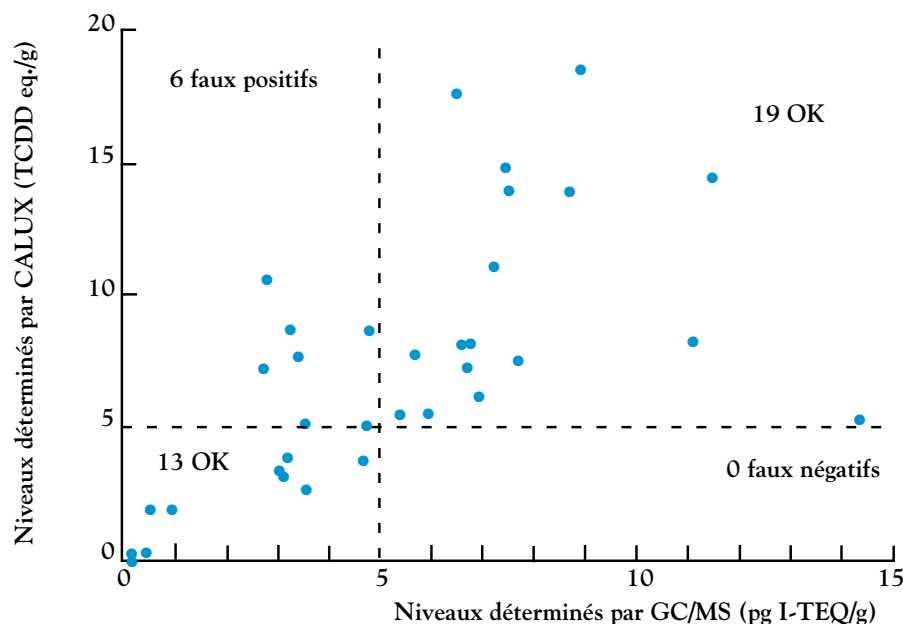


Figure 5 : Comparaison des résultats des dosages CALUX et GC/MS effectués sur des échantillons de pulpe d'agrumes du Brésil testés durant le printemps

On peut conclure de cette comparaison des résultats qu'il existe un petit risque de résultats faussement positifs avec le dosage CALUX, mais que le risque de résultats faussement négatifs semble négligeable.

En conclusion, la réponse CALUX est fonction de la dose et reflète les activités toxiques des différents congénères dioxines exprimées en valeurs TEF. En outre, les effets sont additifs, en accord avec le principe du TEQ. En plus des dioxines, les cellules répondent aux autres agonistes du récepteur Ah, comme les PCB co-planaires, les hydrocarbures aromatiques polycycliques, les médicaments à base de benzimidazole (Hoogenboom et coll., 1995), et certaines flavones naturelles. De fait, une réponse positive n'est pas forcément due à des dioxines, même si la spécificité du test est augmentée par le type de la méthode de purification acide-silice et la capacité de métabolisation des cellules. Une positivité au dosage CALUX demande donc généralement d'être confirmée de façon plus spécifique, comme par la méthode de référence GC/MS, qui permet en outre l'obtention d'informations supplémentaires sur les congénères possibles, ou l'identification d'agonistes inconnus. Des résultats faussement négatifs peuvent théoriquement être obtenus avec la présence de composés interférant dans l'une des étapes impliquées dans la réponse. Pourtant, aucun inhibiteur spécifique n'a été observé jusqu'à présent, et le problème majeur, un effet toxique sur les cellules, est contrôlé en routine. A l'heure actuelle, les données confirment que des échantillons trouvés négatifs par CALUX n'ont pas besoin d'être analysés plus avant.

Laurentius AP Hoogenboom

*State institute for quality control of agricultural products
Wageningen, Pays-Bas*

BIBLIOGRAPHIE

AARTS JMMJG, DENISON MS, COX MA, SCHALK AC, GARRISON PA et coll. Species-specific antagonism of Ah receptor action by 2,2',5,5'-tetrachloro- and 2,2',3,3',4,4'-hexachlorobiphenyl. *Eur J Pharm Environ Tox* 1995, **293** : 463-474

AARTS JMMJ, JONAS J, VAN DEN DIKKENBERG LC, BROUWER A. CAFLUX, a simplified version of the CALUX assay for Ah receptor (ant)agonists, based on enhanced green fluorescent protein (EGFP) reporter gene expression. *Organohalogen Compounds* 1998, **37** : 85-88

BOVEE TFH, HOOGENBOOM LAP, HAMERS ARM, AARTS JMMJG, BROUWER A, KUIPER HA. Validation and use of the CALUX-bioassay for the detection of dioxins and coplanar PCB in bovine milk. *Food Add Contam* 1998, **15** : 863-875

BOVEE TFH, HOOGENBOOM LAP, TRAAG WA, ZUIDEMA T, HORSTMAN JHJ et coll. Biological screening of Ah receptor agonist activity in butter fat and coconut oil by means of chemical-activated luciferase expression in a genetically engineered cell line (CALUX). *Organohalogen Compounds* 1996, **27** : 303-307

DENISON MS, EL-FOULY MH, AARTS JMMJG, BROUWER A, RICHTER C, GIESY JP. Production of novel recombinant cell-line bioassay systems for detection of 2,3,7,8-tetrachloro-*p*-dioxin-like chemicals. *Organohalogen Compounds* 1993, **13** : 365-368

DENISON MS, ROGERS WJ, FAIR M, ZICCARDI M, CLARK G et coll. Application of the CALUX bioassay for the detection of dioxin-like chemicals (Ah-receptor ligands) in whole serum samples and in extracts from commercial and consumer products. *Organohalogen Compounds* 1996, **27** : 280-284

HOOGENBOOM LAP, HAMERS ARM, BOVEE TFH. Bioassays for the detection of growth-promoting agents, veterinary drugs and environmental contaminants in food. *Analyst* 1999, **124** : 79-85

HOOGENBOOM LAP, HAMERS ARM. Effects of oxfendazole on the Ah receptor-mediated induction of ethoxyresorufin-O-deethylase and luciferase activity by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in Hepa-1c1c7 and H4IIE cell-lines. *Organohalogen Compounds* 1995, **25** : 53-57

MURK AJ, LEGLER J, DENISON MS, GIESY JP, VAN DE GUCHTE C, BROUWER A. Chemical-Activated Luciferase gene Expression (CALUX) : a novel *in vitro* bioassay for Ah-receptor active compounds in sediments and pore water. *Fundam Appl Toxicol* 1996, **33** : 149-160

MURK AJ, LEONARDS PEG, BULDER AS, JONAS AS, ROZEMEIJER MJC et coll. The CALUX (Chemical-Activated Luciferase gene Expression). *Environ Tox Chem* 1997, **16** : 1583-1589

SANDERSON JT, AARTS JMMJG, BROUWER A, FROESE KL, DENISON MS, GIESY JP. Comparison of Ah-receptor-mediated luciferase and ethoxyresorufin O-deethylase induction in H4IIE cells : Implications for their use as bioanalytical tools for the detection of polyhalogenated aromatic compounds. *Toxicol Appl Pharmacol* 1996, **137** : 316-325

Abréviations

2,3,7,8-TBDD	2,3,7,8-tétrabromodibenzo- <i>para</i> -dioxine
2,3,7,8-TBDF	2,3,7,8-tétrabromodibenzofurane
2,3,7,8-TCDD	2,3,7,8-tétrachlorodibenzo- <i>para</i> -dioxine
2,3,7,8-TCDF	2,3,7,8-tétrachlorodibenzofurane
2,4,5-T	acide 2,4,5-trichlorophénoxyacétique
2,4-D	acide dichlorophénoxyacétique
ADEME	Agence de l'environnement et de la maîtrise de l'énergie
ADN	Acide désoxyribonucléique
AFSSA	Agence française de sécurité sanitaire des aliments
Ah-CALUX	Ah-receptor dependent chemical activated luciferase gene expression
AHH	Aryl hydrocarbon hydroxylase activity
AhR	Aryl hydrocarbon receptor
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ARNT	AhR nuclear translocator
BASF	Badische anilin & soda fabrik
BCF	Bioconcentration factor
Cellules NK	Lymphocytes tueurs naturels
CIRC	Centre international de recherche sur le cancer
CNIEL	Centre national de l'industrie laitière
CSHPF	Conseil supérieur d'hygiène publique de France
CYP1A1	Mono-oxygénase à cytochrome P450 CYP1A1
DGAL	Direction générale de l'alimentation
DGCCRF	Direction générale de la concurrence, de la consommation et la répression des fraudes
DJA	Dose journalière admissible
DL50	Dose létale 50
DME(N)O	Dose minimale entraînant un effet (nocif) observé
DSE(N)O	Dose sans effet (nocif) observé
DTT	1,1,1-trichloro-2,2-bis (4-chloro-phényl) éthane
EGF	Epithelial growth factor
GST	Glutathion S-transférase
HAP	Hydrocarbures aromatiques polycycliques
HAPC	Hydrocarbures aromatiques polycycliques chlorés
HAPH	Hydrocarbures aromatiques polycycliques halogénés
HpCDD	Heptachlorodibenzo- <i>para</i> -dioxines
HxCDD	Hexachlorodibenzo- <i>para</i> -dioxines
IARC	International agency for research on cancer
IC	Intervalle de confiance

INSEE	Institut national de la statistique et des études économiques
InVS	Institut de veille sanitaire
I-TEQ	International toxic equivalent quantity
IUOM	Unité d'incinération d'ordures ménagères
LO(A)EL	Lowest (adverse) observed effect level
Lymphocyte CD4	Lymphocyte T auxiliaire de classe de différenciation 4
Lymphocyte CD8	Lymphocyte T cytotoxique de classe de différenciation 8
MDA	Malonyldialdéhyde
NFI	Nuclear factor I
NIOSH	National institute for occupational safety and health (USA)
NO(A)EL	No observed (adverse) effect level
NQO	NAD(P)H-quinone oxydoréductase
NTP	National toxicology program (department of health and human services, USA)
OCDD	Octachlorodibenzo- <i>para</i> -dioxine
OCDF	Octachlorodibenzofurane
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OR	Odds ratio
PCB	Polychlorobiphényles
PCDD	Polychlorodibenzo- <i>para</i> -dioxines
PCDF	Polychlorodibenzofuranes
PCP	Pentachlorophénol
PCQ	Polychlorinated terphenyl
POP	Persistent Organic Pollutants
ppb	Parties par billion (10^{-9} g/g)
ppt	Parties par trillion (10^{-12} g/g)
PVC	Chlorure de polyvinyle
RR	Risque relatif
SMR	Standardized mortality ratio
T4	Thyroxine (tétraiodothyronine)
TBG	Thyroxin binding protein
TCP	Trichlorophénate
TEF	Toxic equivalent factor
TGF	Transforming growth factor
TNF	Tumor necrosis factor
TSH	Thyréostimuline hypophysaire
UNEP	United nations environment programme
US EPA	United states - Environmental protection agency
WHO	World health organization