

# Le problème des dioxines

(Résumé de l'intervention de M FRAISSE -CARSO\*  
lors de l'Assemblée générale 2000 de CECALAIT)

Les dioxines regroupent deux grandes familles de molécules : les dibenzo-p-dioxines polychlorées (PCDD), comprenant 75 molécules, les dibenzofuranes polychlorés (PCDF) de structure chimique voisine, comprenant 135 molécules. 7 PCDD, dont la dioxine de Seveso et 10 PCDF partagent une structure planaire, rigide et très stable : ce sont les plus toxiques. Elles agiraient directement au niveau du noyau cellulaire et leurs effets dépendent de la dose, de l'espèce et de la sensibilité des sujets. Aux doses élevées, on a observé des troubles hépatiques, neurologiques et dermatologiques graves ainsi que des effets tératogènes.

Les dioxines sont produites principalement lors de la combustion de produits organiques, en présence de chlore ou lors du chauffage intense des PCB (polychlorures biphenylés), très utilisés dans l'industrie. Transportées par les poussières en suspension dans l'air ou par les eaux, elles arrivent dans la chaîne alimentaire et se concentrent dans les tissus adipeux animaux ou humains. Leur toxicité se mesure en ITEQ, une échelle établie, à partir de la toxicité de la dioxine de Seveso. L'exposition tolérable est alors calculée à partir de cette échelle, en considérant toutes les sources possibles de dioxines dans l'environnement. L'OMS a fixé la dose maximale tolérable à 4 pg/j/kg de poids corporel et recommande une valeur guide de 1pg/j/kg. Leur dosage nécessite des méthodes extrêmement sophistiquées, compte tenu des concentrations recherchées. Il fait appel à la chromatographie en phase gazeuse à haute résolution couplée à la spectrométrie de masse, après dilution isotopique.

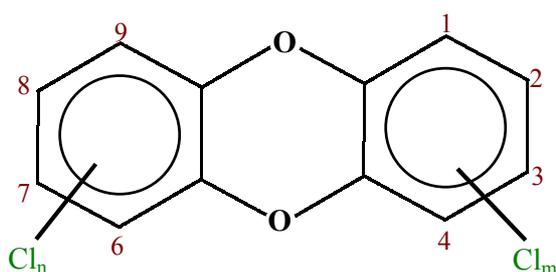
Révélee au grand jour lors de la mise en évidence en 1957 des effets tératogènes liés à la fabrication d'un pesticide chloré, puis lors d'accidents industriels, notamment celui de Seveso, la question des dioxines apparaît régulièrement dans l'actualité. L'affaire des poulets contaminés en Belgique en 1999 a, de plus, attiré l'attention sur leur impact dans la chaîne alimentaire. D'où l'intérêt d'une mise au point sur cette question pour rappeler la définition des dioxines, leurs sources et leur toxicité, pour préciser quelle est la contamination des produits alimentaires, pour s'informer des possibilités de dosage.

## Structure et propriétés chimiques

Les dioxines ou dibenzo-p-dioxines polychlorées ou PCDD constituent une famille de molécules dont la structure chimique (cf figure 1 ci-dessous) est basée sur un noyau dibenzodioxine, c'est à dire 2 noyaux benzeniques reliés par une dioxane centrale. Ceux-ci comportent 8 sites où les atomes d'hydrogène sont susceptibles d'être substitués par des atomes de chlore. L'utilisation de toutes les différentes possibilités de substitution aboutit à une famille de 75 congénères.

Fig 1 : schéma d'une molécule de dibenzo-p-dioxine polychlorée ou PCDD

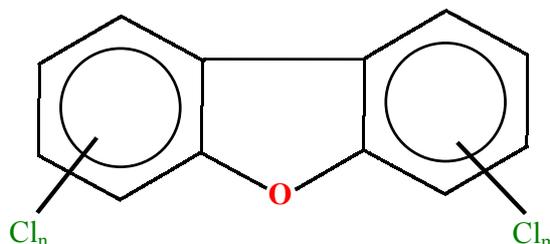
Fig 1 : scheme of a PCDD molecule



En outre, dans l'usage courant, le terme générique « dioxines » désigne également les furanes ou dibenzofuranes polychlorés ou PCDF, de structure chimique voisine (cf figure 2 ci-dessous). Comme pour les PCDD, le jeu des différentes possibilités de substitution aboutit à une famille de 135 congénères.

Fig 2 : schéma d'une molécule de dibenzofurane polychloré ou PCDF

Fig 2 : scheme of a PCDF molecule



Parmi ces 210 (75 + 135) molécules, celles qui comprennent au moins 4 atomes de chlore substituant les sites 2-3-7-8 acquièrent ainsi des propriétés particulières. En effet, leur structure est planaire et d'une grande rigidité ; l'encombrement stérique autour de chaque atome de chlore les rend d'accès difficile aussi bien pour les réactions chimiques que biochimiques. Elles sont donc très faiblement biodégradables et tendent à s'accumuler dans les organismes vivants. Cette conformation est commune à 10 molécules de furanes et 7 de dioxines - dont la « dioxine de Seveso », 2,3,7,8 tétrachloro-dibenzodioxine ou 2,3,7,8 TCDD - qui sont appelées « les toxiques » (*dirty dioxins*).

Ces molécules sont peu solubles dans l'eau - avec une solubilité décroissant selon le nombre d'atomes de chlore -, peu volatiles et chimiquement et thermiquement très stables. Elles sont, en revanche, solubles dans les solvants organiques et les graisses et sensibles au rayonnement ultra-violet.

## Origine et cycle des dioxines dans l'environnement

Les dioxines se forment lors de la combustion, à relativement haute température (plus de 300°C) de produits organiques en présence de chlore. Elles proviennent donc pour partie d'éruptions volcaniques, de feux de forêts, de la combustion du charbon, mais surtout de l'incinération des déchets ménagers. Ce sont, en outre, des produits secondaires ( *byproducts*) liés à la fabrication industrielle de pesticides, de bactéricides, au blanchiment de la pâte à papier. Enfin, elles peuvent être produites accidentellement lors de l'emballage de réactions chimiques utilisant des chlorophénols (accident de Seveso) ou en cas de chauffage intense de polychlorures biphénylés (PCB), très utilisés dans l'industrie pour leurs propriétés diélectriques, qui dégagent alors des furanes.

Les rejets de dioxines touchent l'air, le sol et l'eau. Dans l'air, leur demi-vie est de quelques jours, mais les poussières en suspension peuvent, en se redéposant, contaminer indirectement le sol ou les eaux. Au sol, la demi-vie est de 1 à 3 ans en surface, mais de plus de 10 ans en profondeur. Les eaux peuvent, en outre, se contaminer par lixiviation. En ce qui concerne les organismes vivants, aucune absorption et bioaccumulation n'a pu être observée dans les plantes terrestres, quel que soit leur mode de contamination, contrairement aux algues. Les animaux, en revanche, et l'homme absorbent les dioxines par leur alimentation et les accumulent dans les tissus adipeux.

L'évaluation du degré d'exposition de l'homme aux dioxines se fait :

- soit à partir de l'estimation de la quantité de dioxines susceptible d'être produite par toutes les sources citées ci-dessus,
- soit, considérant que la voie alimentaire est la source d'exposition majeure, en se basant sur les données de consommation et les données de contamination des différentes catégories d'aliments entrant dans le régime alimentaire d'une population donnée (*c'est le cas des récentes études françaises; cf bibliographie*).

## Toxicité et exposition de l'homme

Tous les modes d'action des dioxines ne sont pas connus. Un des schémas, bien établi cependant, montre les molécules pénétrant dans les cellules et se fixant à une protéine qui joue le rôle de récepteur aux arylhydrocarbures (Ah). Le complexe ainsi formé pourrait pénétrer dans le noyau, se recombinaison à une nouvelle protéine et cet ensemble viendrait ensuite se fixer sur un site favorable sur l'ADN, aboutissant à une altération de l'expression de certains gènes.

Les études toxicologiques menées en laboratoire sur des animaux montrent une faible toxicité aiguë. En revanche, une exposition chronique conduit à des dérèglements neurologiques et hépatiques, ainsi qu'à des effets cancérigènes avec certaines molécules, notamment la 2,3,7,8 TCDD. La sévérité des troubles dépend cependant étroitement :

- de la sensibilité de l'espèce : les cobayes développent ainsi des cancers du foie à des doses relativement faibles, qui n'affectent pas les rats,

- du sexe : même au sein d'une espèce peu sensible comme le rat, les femelles développent des cancers du foie à des doses n'affectant pas les mâles.

Dans l'espèce humaine, l'exposition à ces molécules provoque également des dérèglements biologiques et biochimiques, mais leur signification clinique n'est pas encore connue, aux doses faibles habituellement ingérées. A des doses sévères, observées, par exemple, lors de l'exposition à l'agent orange défoliant pendant la guerre du Vietnam ou lors d'accidents industriels comme à Yusho Oil au Japon en 1968 ou comme à Seveso en 1976, les victimes ont souffert de maladies de peau (chloracné) et de différents troubles neurologiques : maux de tête, vertiges, oedèmes avec atteintes nerveuses des membres inférieurs. Des troubles de la reproduction (nouveaux-nés de faible poids) et des effets tératogènes, en particulier lors des accidents liés à la fabrication du 2,4,5-T en 1957, ont également été observés.

L'expression de la toxicité et le calcul de la dose journalière admissible doivent tenir compte de tous ces éléments. Ils doivent également considérer le fait que l'exposition aux dioxines est le fait d'un mélange complexe de plusieurs molécules. C'est pourquoi, la toxicité est exprimée en unités ITEQ (International Toxic Equivalency Quantity) qui se réfèrent à une échelle de Facteurs de Toxi Equivalence (TEF), « classant » les composants évalués par rapport à la toxicité de la 2,3,7,8 TCDD, laquelle a un TEF de 1. La toxi équivalence (ITEQ) est alors calculée selon la formule suivante :

$$\text{ITEQ} = \sum \text{TEF}_i \times C_i$$

où  $C_i$  est la quantité ou la concentration du congénère  $i$ .

Les TEF des 7 molécules de dioxines « toxiques » varient ainsi de 1 pour la 2,3,7,8 TCDD, mais aussi pour la 1,2,3,7,8-PeCDD\*\* (pentachlorodioxine) à 0,0001 pour la 1,2,3,4,6,7,8,9 OCDD (octachlorodioxine). Pour les 10 molécules de furanes « toxiques », les TEF varient de 0,5 à 0,0001.

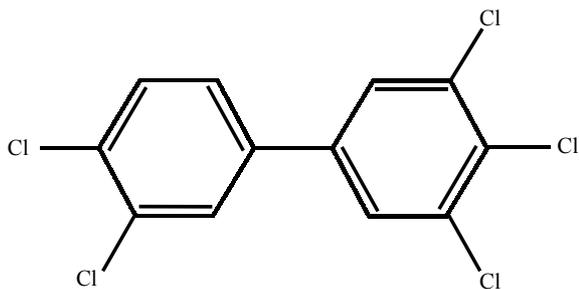
\*\* depuis la nomenclature de l'OMS de 1997.

## Dose journalière admissible

L'échelle des TEFs ainsi que la liste des composés à considérer pour le calcul de l'ITEQ sont revues périodiquement à la lumière des nouvelles connaissances et données disponibles. Ainsi les nomenclatures établies par l'EPA en 1987 ou par l'OTAN en 1989 (cette dernière continuant à être largement utilisée depuis, y compris jusque dans les études récentes de l'AFSSA ou de l'InVs) ne prenaient en compte que les PCDD et les PCDF et le TEF de la 1,2,3,7,8 PeCDD n'y était, par exemple, que de 0,5. Mais depuis 1997, l'OMS, puis l'EPA recommandent d'élargir la palette des composés considérés à certains PCBs, dits « *dioxin like* » (cf fig 3, à titre d'exemple). Il s'agit d'un groupe de 14 molécules (sur les 209 PCBs existants) qui :

- d'un point de vue chimique, présentent une structure coplanaire stable, proche des PCDD ou PCDF et sont substituées en mono ortho, di ortho ou non ortho,
- d'un point de vue biologique, se lient également aux récepteurs cellulaires Ah, induisent des effets biologiques voisins des dioxines et sont bioaccumulés.

Fig 3 : schéma de la molécule de PCB 126  
Fig 3 : scheme of the PCB 126 molecule



D'après l'échelle de toxicité établie par l'OMS en 1997, leurs TEF varient de 0,1 pour le PCB 126 à 0,00001 pour les PCB 167 et 180. Ces valeurs peuvent, de prime abord sembler négligeables par rapport à celles des PCDD, mais comme ces PCBs sont beaucoup plus abondants dans l'environnement que les PCDD, leur impact sur l'ITEQ ne sera pas négligeable\*\*\*. Cette échelle va d'ailleurs continuer à évoluer, puisque l'OMS recommande d'ores et déjà d'inclure en plus, dans la prochaine révision (en 2003) les dérivés bromés des dibenzodioxines.

\*\*\* Dans ce cadre, la formule de calcul de l'ITEQ ci-dessus doit bien sûr être complétée par la somme des  $PCB_i \times TEF_i$ .

A l'heure actuelle, ces calculs aboutissent à une recommandation par l'OMS d'une dose journalière admissible de 1 à 4 pg/kg de poids corporel/j, cette dose correspondant à une exposition chronique, c'est à dire à un apport journalier pendant toute une vie, calculé pour un adulte de 70 kg.

## Dosage des dioxines

### ➤ UNE METHODE ANALYTIQUE SOPHISTIQUEE

Compte tenu des valeurs données ci-dessus, le dosage des dioxines revient à la quantification d'ultra-traces, de l'ordre du pg, voire du  $\frac{1}{2}$  pg par g de matière. Plusieurs méthodes analytiques revendiquent une telle sensibilité, mais celle qui est reconnue comme la plus performante, à ce jour, fait appel au couplage de la chromatographie gazeuse et de la spectrométrie de masse à haute résolution, en utilisant la dilution isotopique par des homologues marqués au  $^{13}C$  pour la quantification.

La dilution isotopique consiste à ajouter une masse connue d'un produit marqué, à une masse inconnue, à doser, du même produit natif. Le rapport entre les congénères natifs et leurs homologues marqués permet de quantifier la masse inconnue. Cette technique est recommandée lorsque les étapes d'extraction et de purification de l'échantillon, puis de l'extrait brut risquent de conduire à des pertes importantes du produit à doser. En effet, le produit marqué étant incorporé dans la matrice à un stade précoce de la manipulation, il subira les mêmes étapes et les mêmes pertes que le produit natif.

Les échantillons à doser, qui doivent être représentatifs, reçoivent, après broyage, tamisage et/ou homogénéisation éventuelles, un apport des 17 congénères marqués au  $^{13}C$ . Pour les produits alimentaires, dont les produits laitiers, qui contiennent une part importante de matière grasse, ces molécules marquées

ne seront introduites que dans la matière grasse des échantillons, après son extraction.

Les contaminants de la matière grasse doivent ensuite en être séparés et être concentrés :

- soit, dans la méthode de référence du CARSO, d'origine hollandaise, par passage sur colonne de charbon actif; une méthode très longue, mais qui, en permettant de traiter plusieurs dizaines de grammes de matière grasse, permet de détecter des concentrations très faibles de dioxines,
- soit, plus rapidement, selon différentes étapes de chromatographie sur colonne.

Les contaminants qui ne sont pas recherchés dans la suite de l'analyse, et notamment les PCB non « dioxin-like » doivent ensuite être éliminés par différentes étapes de chromatographie préparative sur colonne. L'extrait ainsi obtenu, qui ne devrait plus contenir, en principe que les PCDD, PCDF et quelques PCB « dioxin-like », sera ensuite analysé par couplage de la chromatographie gazeuse haute résolution et de la spectrométrie de masse haute résolution.

Les résultats obtenus se présentent sous forme de profils chromatographiques des différents congénères présents dans l'échantillon. Ces profils sont obtenus à la fois pour les molécules marquées et pour les molécules natives. Cela permet donc de déterminer par calcul, la masse initiale de chacune d'entre elles, ainsi que la quantité totale de dioxines, quelles que soient les pertes subies. Il est souhaitable cependant que celles-ci ne dépassent pas 50%, ce que l'introduction d'un 18<sup>e</sup> étalon marqué, juste avant le passage en chromatographie gazeuse, permet de vérifier. Il est indispensable, en outre, que l'ensemble de l'analyse ait été effectuée dans des conditions de laboratoire très rigoureuses, permettant d'éliminer tout risque de contamination accidentelle d'un échantillon ou d'un réactif.

Chaque congénère PCDD ou PCDF quantifié dans la matrice étudiée, est ensuite multiplié par son TEF correspondant, ce qui conduit à l'ITEQ du produit étudié. L'étude des profils est très intéressante : on a ainsi pu constater que le lait de vache, le lait maternel ou les tissus adipeux humains présentent des profils comparables, avec accumulation des mêmes congénères, mais à des concentrations différentes.

Il existe d'autres méthodes de dosage, notamment l'utilisation de la spectrométrie de masse basse résolution, mais elles n'atteignent pas la même sensibilité. D'autres tests plus rapides, sont toujours en cours d'évaluation. Une stratégie consistant à rechercher le niveau de certains PCB, considérés comme marqueurs de la pollution aux dioxines a également été préconisée. Or l'analyse des PCB est, sauf pour les PCB *dioxin-like*, globalement plus rapide, plus facile (chromatographie en phase gazeuse), moins chère et pratiquée par un peu plus de laboratoires que l'analyse des dioxines. Mais en fait, cette approche n'est valable que lorsque la contamination en PCDD-PCDF provient de PCB, source de furanes –ce qui était le cas lors de la crise belge -. Dans les autres cas, aucun lien entre teneurs en PCB et teneur en dioxines n'a pu être mis en évidence.

## ➤ ACCREDITATION, METHODE DE REFERENCE ?

La seule norme qui existe actuellement au niveau européen concerne le dosage des dioxines dans les émissions et a servi de base au programme d'accréditation (n° 97) du COFRAC. Ce programme ne couvre pas cependant les demandes d'accréditation concernant les matrices contenant des corps gras, dont le lait. Celles-ci font l'objet d'un traitement spécifique et très peu de laboratoires sont accrédités pour l'heure. Le CARSO a, dans ce cadre, validé sa méthode; applicable à ce type de matrice, élaborée à partir de la littérature scientifique internationale. Pour tout développement de méthode, il recommande la lecture de la méthode EPA 1613, qui sert d'ailleurs de base à la préparation d'une norme ISO sur la question. Dans l'attente, lors d'une analyse de dioxines, des précisions sur le protocole expérimental et la technique utilisés sont indispensables.

**En conclusion**, le dosage des dioxines fait appel à des méthodes analytiques très sophistiquées, étant donné les teneurs faibles –ultratracés- recherchées. Une tendance à la normalisation des méthodes se dessine et correspondrait aux attentes des demandeurs d'analyse, notamment des professionnels de l'industrie agro-alimentaire. En dehors des accidents, la voie alimentaire constitue en effet la source d'exposition majeure -90%- de la population, notamment par le biais des aliments riches en matière grasse.

En France, trois rapports récemment publiés permettent d'évaluer le niveau d'exposition aux dioxines et furanes (PCDD et PCDF), par voie alimentaire, de la population française en général, ainsi que dans différentes classes d'individus présentant des régimes alimentaires spécifiques (enfants de moins de 2 ans, de 2 à 9 ans et adolescents de 10 à 14 ans). D'après l'étude AFSSA-CSHPF, la valeur d'exposition moyenne de la population française aux dioxines et aux furanes est de 1,3 pg/kg de poids corporel/j. Dans le rapport d'expertise collectif de l'INSERM, qui prend également en compte les PCB *dioxin like*, elle serait de 2 pg/kg poids corporel/j. Cette valeur d'exposition moyenne peut être transitoirement plus élevée pour des catégories aux régimes alimentaires particuliers, notamment les jeunes enfants. Cependant, ramenée aux doses absorbées durant toute une vie, elle reste, comme celle de la population générale dans les limites recommandées par l'OMS.

## Abréviations

ADEME : Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie  
ADN : acide désoxy-ribo-nucléique  
AFSSA : Agence Française de Sécurité Sanitaire des aliments  
Ah : (récepteur) Arylhydrocarbure  
COFRAC : Comité Français d'Accréditation  
CSHPF : Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France  
EPA : Environmental Protection Agency  
INSERM : Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale  
InVS : Institut de Veille Sanitaire  
ISO : International Standardization Organization  
ITEQ : International Toxic Equivalency Quantity  
OCDD : octachlorodioxine  
OMS : Organisation Mondiale de la Santé  
OTAN : Organisation du Traité de l'Atlantique Nord  
PCB : polychlorures biphénylés  
PCDD : dibenzo-p-dioxines polychlorées  
PCDF : dibenzofuranes polychlorés  
PeCDD : pentachlorodioxine  
pg : picogramme = 10<sup>-12</sup>g  
TCDD : tétrachloro-dibenzodioxine  
TEF : Facteur de Toxi Equivalence

## Bibliographie

- ♦ **AFSSA - CSHPF**. Dioxines : données de contamination et d'exposition de la population française. Rapport : Juin 2000, 45 pages (consultable sur <http://www.afssa.fr/ftp/basedoc/Dioxines2bis.pdf>)
- ♦ **CERIN** (Centre de recherche et d'Information Nutritionnelles). Dioxines et furanes : doit-on s'inquiéter ? Nutri-doc, octobre 1999, n°21
- ♦ Dioxines. La Lettre ARITT, septembre 1999, n° 13, 5 pages
- ♦ EPA Dioxin Reassessment (Draft Documents, September 2000) : <http://www.epa.gov>
- ♦ **European Commission. Health & Consumer Protection Directorate General**. Reports on task for Scientific Cooperation. Assessment of dietary intake of dioxins and related PCBs by the population of EU members States. June 2000, 115 pages. (consultable sur [http://europa.eu.int/comm/dgs/health\\_consumer/library/pub](http://europa.eu.int/comm/dgs/health_consumer/library/pub))
- ♦ **INSERM**. Dioxines dans l'environnement : quels risques pour la santé ? Rapport d'expertise collective de l'INSERM, octobre 2000. Editions INSERM. (consultable sur <http://www.inserm.fr>)
- ♦ **InVs / ADEME**. Etude sur les dioxines et les furanes dans le lait maternel en France. Rapport : Juin 2000, 173 pages (consultable sur <http://www.invs.sante.fr>)

\* **CARSO** : Centre d'Analyses de Traces, 321 avenue Jean Jaurès 69362 LYON CEDEX 07