
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).

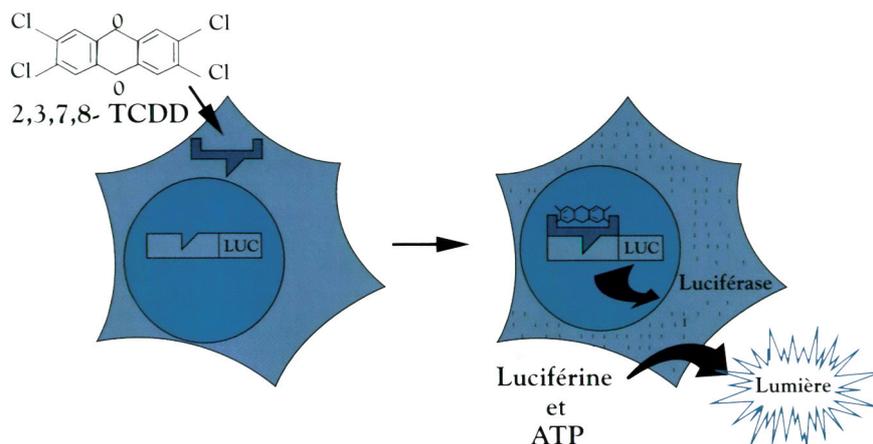


Figure 1 : Principe du dosage biologique CALUX

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 μ g par puits). Pour les aliments animaux ou leurs composants, l'échantillon est de 5 g (625 μ g/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.

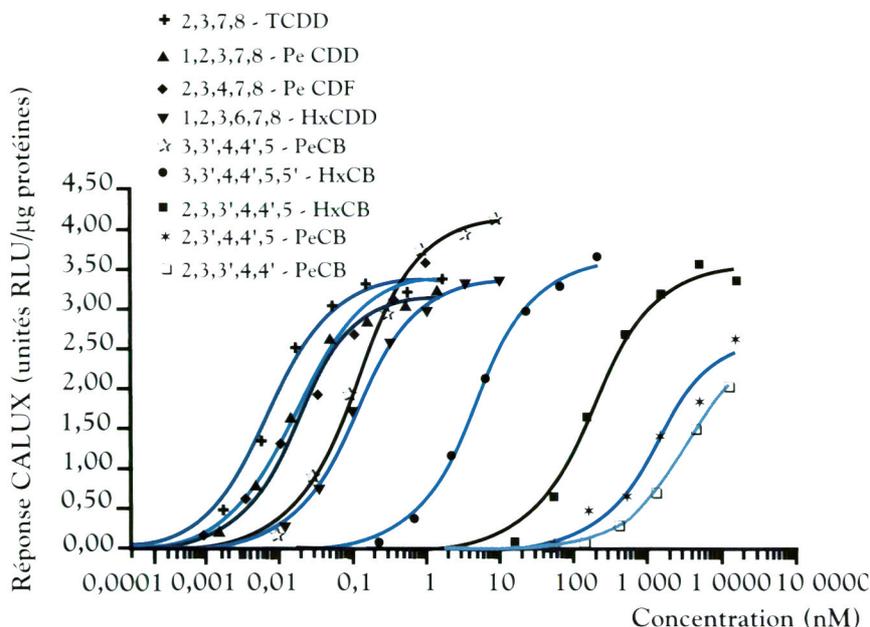


Figure 2 : Réponses (unités RLU) obtenues avec différents congénères de dioxines et de PCB après exposition des cellules pendant 20 heures (d'après Bovee et coll., 1998)

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

Contenu en dioxines (pg TEQ/g)	Niveaux déterminés par CALUX (pg 2,3,7,8-TCDD eq./g)					Rendement	
					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. A 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.

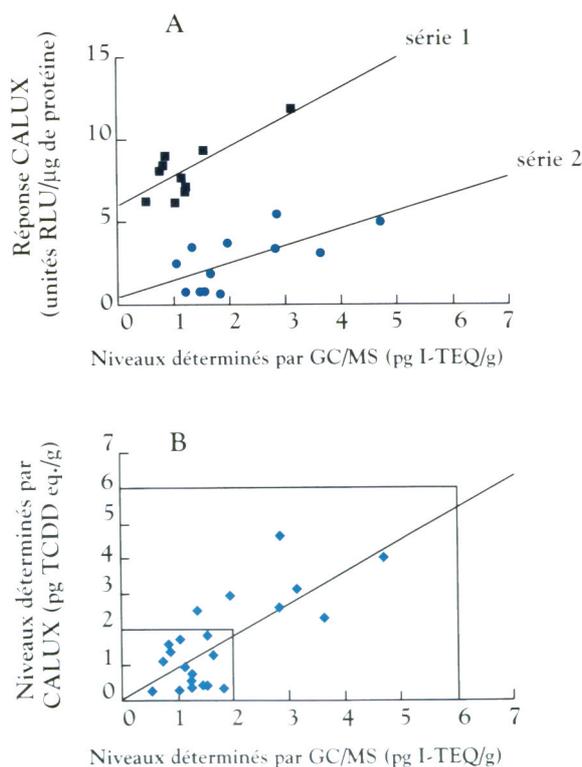


Figure 3 : Comparaison de la réponse CALUX (A) ou du contenu correspondant en dioxines (B) avec les contenus en TEQ déterminés par GC/MS pour 22 échantillons de lait collectés en 1997 aux Pays-Bas.

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

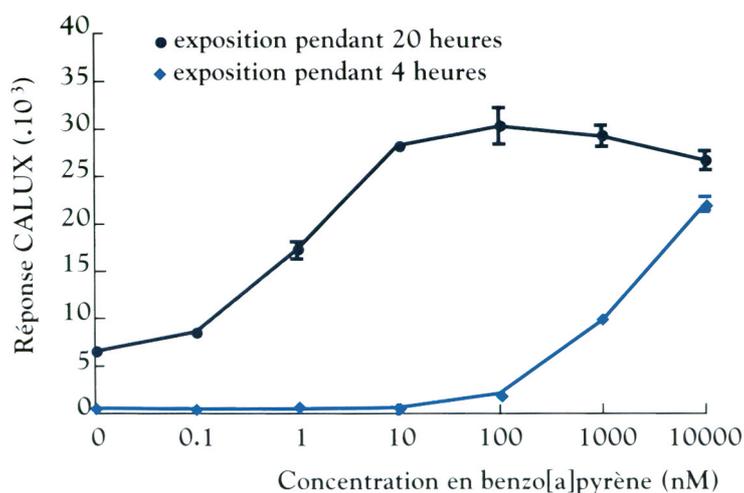


Figure 4 : Réponse (·10³ unités RLU) obtenue avec le benzo[a]pyrène après exposition pendant 4 ou 24 heures (d'après Hoogenboom et coll., 1999)

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).

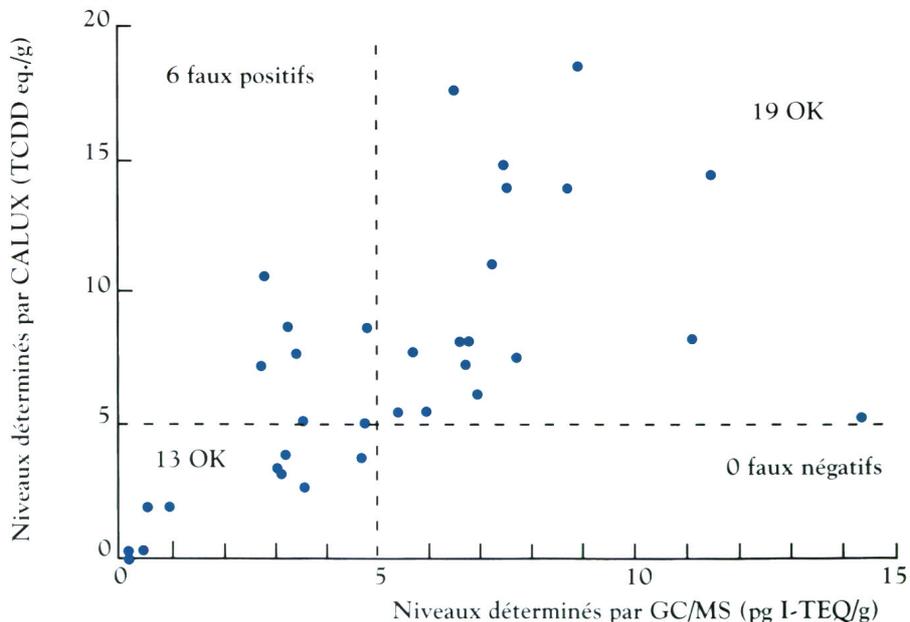


Figure 5 : Comparaison des résultats des dosages CALUX et GC/MS effectués sur des échantillons de pulpe d'agrumes du Brésil testés durant le printemps

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