

Maisons-Alfort, le 17 septembre 2007

NOTE

de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relative au dépistage *ante mortem* des bovins à viande en terme de contamination aux dioxines et au devenir des veaux de huit jours

1. RAPPEL DE LA SAISINE

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) a été saisie par la Direction générale de l'alimentation (DGAI) :

- le 31 août 2007, d'une demande d'appui scientifique et technique relatif d'une part à l'estimation d'une zone à risque en terme d'exposition d'animaux aux dioxines et d'autre part à l'utilisation des prises de sang, en complément à l'avis du 1^{er} décembre 2006, comme outil de dépistage *ante mortem* des contaminations aux dioxines,
- le 7 septembre 2007, d'une demande d'appui scientifique et technique relatif au devenir des veaux de huit jours.

Les premiers éléments de réponse de l'Afssa, concernant principalement l'estimation d'une zone à risque en terme d'exposition d'animaux aux dioxines, ont été transmis à la DGAI le 11 septembre 2007. La présente note complète cette réponse sur les aspects du dépistage *ante mortem* des bovins à viande et sur le devenir des veaux de huit jours.

2. CONCERNANT LE DEPISTAGE ANTE MORTEM DES BOVINS A VIANDE

Il est demandé à l'Agence de se prononcer sur l'extrapolation de corrélations entre les teneurs dans la graisse sous-cutanée et les teneurs dans le muscle établies pour une famille de molécules en cause dans la Meuse : les PCB (données disponibles pour PCB-DL et PCBi) à une autre famille de molécules les PCDD/F, en cause dans la situation faisant l'objet de l'appui scientifique et technique.

Il convient donc de s'interroger d'une part sur la signification biologique d'une telle extrapolation et d'autre part, sur le caractère suffisant de corrélations établies sur la base de 4 animaux.

Concernant l'extrapolation de données de PCB à des PCDD/F

Les différences en terme de nombre d'atomes de chlore et de nombre d'atomes de carbone libres entre PCB et PCDD/F conduisent à des différences métaboliques significatives, notamment concernant la demi-vie d'élimination (plus courtes pour les PCB de type dioxines que pour les dioxines).

Or, dans le cas de la Meuse il s'agissait d'une contamination par des PCB seuls (dioxines au bruit de fond national) alors que dans la présente situation, il s'agit d'une contamination par les dioxines seules (PCB-DL au bruit de fond national).

Après consultation d'experts compétents dans le domaine du métabolisme animal et de la toxicologie, il apparaît que les corrélations établies pour les PCB-DL avec les données de la Meuse ne peuvent pas être utilisées pour les dioxines.

Néanmoins, les données PCB-Meuse permettent d'apporter certaines conclusions utiles concernant la présente situation de contamination par les dioxines.

Concernant les données PCB-DL issues de l'incident de la Meuse (données Laberca)

Les données issues du cheptel meusien sont issues de 4 animaux, avec pour chaque animal des teneurs dans 4 muscles, plus une teneur dans un pool de ces 4 mêmes muscles, ainsi que des teneurs dans les tissus adipeux de l'oreille, périrénaux ou du cou.

Des corrélations ont été établies par le Laberca entre ces différentes concentrations tissulaires, toujours rapportées à la matière grasse.

L'analyse repose sur la capacité prédictive de la teneur en dioxines dans la graisse d'oreilles pour les teneurs dans les différents muscles de la carcasse.

Les coefficients de corrélation entre gras auriculaire et gras musculaire sont tous significatifs ($>0,95$), pour les PCB-DL comme pour les PCBi.

Il y a cependant une variabilité de pente, le muscle du gîte répondant moins que les autres muscles étudiés (macreuse, onglet, collier). Le gîte est en effet le muscle le moins gras avec entre 1 et 2% de lipides seulement.

Les intervalles de confiance de la moyenne des valeurs prédites dans le muscle ont été calculées sur la base des données du Laberca, dans le cas des teneurs dans le muscle du collier à partir de données dans la graisse de l'oreille (annexe 1). Il peut être conclu que de telles données ne peuvent être interprétées pour la gestion que pour de fortes concentrations de graisse de l'oreille. A savoir qu'une concentration de 10 pg/g MG dans la graisse conduit à une concentration dans le muscle supérieure à 3 pg/g MG. En revanche, il n'est pas possible de se prononcer quant à la conformité des viandes pour des concentrations en dioxines inférieures à 10 pg/g MG.

Une simulation statistique permet de constater que cette limite pourrait être abaissée à 5 pg/g MG si les corrélations avaient été fondées sur 6 animaux.

Par analogie avec cette analyse et afin d'établir les corrélations entre la concentration en dioxines dans la graisse et celle dans le muscle, l'Afssa recommande l'analyse de 6 bovins : 3 prélèvements de graisse (oreille, sternum, queue), 2 prélèvements de muscles (gîte et onglet) et 1 prélèvement de sang par bovin.

Pour garantir la qualité des données, il conviendra de veiller au respect des localisations des prélèvements et de choisir des animaux dont l'exposition a *a priori* été très forte, moyenne et faible (pour l'exposition faible, il peut s'agir d'animaux conformes). Ce point est important pour une interprétation des faibles doses autour du seuil réglementaire.

Il est à noter que, concernant les analyses des 3 taurillons transmises à l'Agence (les 7 et 14 septembre 2007), aucune analyse de corrélation ne peut être entreprise dans la mesure où les graisses prélevées ne correspondent pas à des graisses périphériques (cavité abdominale sans précision sur la localisation exacte du prélèvement, *a priori* deux graisses périrénales et une autre graisse dont l'origine n'a pas été renseignée).

Néanmoins, ces données présentent des tendances similaires à celles relevées dans le cas des PCB-Meuse : à teneur élevée en contaminants, la concentration dans la graisse est supérieure à celle du muscle ; à teneur du « bruit de fond national » (autour de 0,5 pg/g MG), c'est l'inverse, la teneur du muscle est supérieure à celle de la graisse.

3. CONCERNANT LE DEVENIR DES VEAUX DE HUIT JOURS**Concernant les éléments à prendre en compte****1) Diversité des scénarii d'exposition**

Une grande diversité de scénarii d'exposition des veaux peut être envisagée, liée à la diversité des expositions de la mère dans les exploitations non-conformes (lait de tank supérieur à 3 pg/g MG).

La proposition de discrimination des veaux sur la base de la concentration en dioxines des laits de tank (donc de mélange au niveau d'une exploitation) correspond à l'hypothèse de prise en compte d'une moyenne de contamination des veaux d'une exploitation.

2) Exposition *in utero*

Il apparaît excessif d'indiquer que les veaux de huit jours nés de vaches laitières contaminées et ayant reçu le colostrum de ces mères ne sont pas *a priori* faiblement contaminés.

En effet, le lait des vaches laitières gestantes n'est plus prélevé durant les 2 mois précédents leur mise bas, (supprimant l'excrétion des polluants via le lait). Dans ce cas, la demi-vie des PCDD/F dans la vache augmente de manière significative, conduisant à un accroissement de leur charge corporelle, si l'alimentation reste contaminée. La demi-vie moyenne pour les principaux congénères PCDD/F chez la vache en lactation est comprise entre 30 et 60 jours (Firestone *et al.*, 1979 : 41-51j ; Huwe et Smith, 2005 : 35-50j ; Olling *et al.*, 1991 : 27-49j ; synthèse de Kan et Meijer, 2003 : 27-56j, 45-100j et 63-76 j) et ce y compris pour des vaches ayant atteint 20 à 35 pg TEQ/g MG dans le lait. Mais lorsque les bovins ne sont pas en lactation, cette demi-vie augmente significativement, elle est de l'ordre de 100 à 500 jours suivant le congénère PCDD/F (Jensen *et al.*, 1981 : 500j pour la TCDD ; Thorpe *et al.*, 2001 : 93-148j ; Kan et Meijer, 2003 : 159-279j).

Le transfert de la mère au fœtus a été démontré dans diverses espèces :

- chez la souris, les métabolites du PCB-77 ont été retrouvés dans le fœtus (Darnerud *et al.*, 1996) ; la 2,3,7,8-TCDD a été retrouvée chez le fœtus, avec une concentration dans le foie 2 à 4 fois supérieure à celle des autres organes fœtaux (Nau et Bass, 1981) ;
- chez le beluga, une teneur hépatique en OCDD de 1138 pg/g a été relevée chez un nouveau-né (Gauthier *et al.*, 1998) ;
- chez l'homme, des congénères de PCB ou de PCDD/F ont été retrouvés dans le placenta, le liquide amniotique et les tissus fœtaux (Feeley et Brouwer, 2000 ; Suzuki *et al.*, 2005) ;
- et enfin chez le veau nouveau-né (Hirako *et al.*, 2005).

Chez le veau à 270 jours de gestation (soit juste avant la mise bas), le ratio entre sang fœtal et sang maternel est compris entre 0,1 et 0,8 pour la majorité des composés détectés dans les 2 matrices (Hirako *et al.*, 2005). Pour la 2,3,4,7,8-PeCDF par exemple, les concentrations sont de 2,9 dans le sang maternel contre 1,7 pg/g MG dans le sang fœtal. En revanche, ce ratio est supérieur à 1 pour l'OCDD, ce dernier étant 2,5 fois plus concentré dans le sang fœtal que dans le sang maternel.

Le veau nouveau-né présente donc une teneur sanguine en dioxines qui ne peut être négligée, certains congénères pouvant notamment être accumulés dans le foie (Nau et Bass, 1981 ; Gauthier *et al.*, 1998). En revanche, ne disposant que de très faibles réserves de graisses, il n'y a pas de stock adipeux de dioxines.

3) Apport via le colostrum

La courbe d'excrétion des dioxines dans le lait est une exponentielle biphasique avec une phase d'élimination rapide au début. Le colostrum présentant un taux de matière grasse d'environ 6,5% (contre 4% pour le lait) est très gras et donc chargé en dioxines. Or, l'absorption de ce type de polluants organiques est très élevée chez le jeune veau. A partir d'un bilan fécal, Keller *et al.* (2001) ont montré une absorption de l'ordre de 72% pour l'OCDD pourtant réputé peu disponible parmi les PCDD/F.

Les veaux ayant reçu le colostrum de leur mère contaminée auront donc absorbé une charge de dioxines additionnelle à la charge fœtale.

Concernant les facteurs de dilution

1) Dilution par gain de poids

Concernant l'effet de dilution résultant du gain de poids entre la naissance et 18 mois, il convient de distinguer 2 compartiments : les graisses et le foie.

Concernant les graisses, la situation décrite dans le tableau 1 peut être retenue.

Tableau 1 : Masse de lipides corporels chez le bovin en fonction de l'âge

Age	Masse de lipides corporels (estimée d'après Robelin et Casteilla, 1990)	Masse totale
naissance	0,6 kg	50 kg
8-15 j	1 kg	
4-5 mois	4 kg	150 kg
18 mois	100 kg	500 kg

Le gain de poids entre la naissance et 18 mois pourrait correspondre à un facteur de dilution lipidique de l'ordre de 100.

Le gain de poids entre la naissance et 4-5 mois pourrait correspondre à un facteur de dilution lipidique de 6.

Concernant le foie, le gain de poids entre la naissance et 18 mois est plus réduit, le facteur de dilution hépatique pourrait être estimé à 6.

De manière globale, dans l'hypothèse où le foie du fœtus aurait séquestré des dioxines de manière significative en fin de gestation, un relargage après la naissance de ces dioxines dans le sang ne peut être exclu. La cinétique de dilution lipidique pourrait en être affectée (réduction du facteur de dilution).

2) Demi-vie des dioxines

Le second effet réducteur de la charge corporelle en dioxines à prendre en compte est l'élimination des PCDD/F. La demi-vie de ces composés est comprise entre 100 et 500 jours, comme vu précédemment (Jensen *et al.*, 1981 ; Thorpe *et al.*, 2001 ; Kan et Meijer, 2003). Afin d'être protecteur, une demi-vie d'un an peut être retenue.

Pour un taurillon de 18 mois, cela correspondrait à une perte de charge d'un peu plus de la moitié (temps supérieur à la demi-vie). **En restant protecteur**, la charge résiduelle pourrait être divisée par 2 sur cette période.

Pour les veaux de boucherie abattus vers 4-5 mois, la baisse de charge due à l'élimination des composés est inférieure à la demi-vie retenue. Le facteur d'abaissement sera donc beaucoup plus faible.

L'Afssa recommande l'acquisition de données sur 6 couples veaux/mères issus d'exploitations conformes, moyennement contaminées et fortement contaminées, avec des analyses sur le lait et la graisse périphérique des mères, le foie et le tissu adipeux des veaux (si prélèvement de gras insuffisant : gras du muscle).

Ces données devraient permettre de mieux appréhender la réalité de l'imprégnation des veaux par les dioxines par rapport à celle de leur mère .

Comme évoqué dans son avis du 1^{er} décembre 2006, **l'Afssa recommande l'acquisition de connaissances sur les corrélations de ces contaminants (PCB, dioxines) dans les différents compartiments et les cinétiques de décroissance chez les bovins.** Outre le bénéfice que ces données représenteraient dans les cas d'une nouvelle situation de crise impliquant les dioxines et les bovins, celles-ci permettraient également de conforter les hypothèses sur lesquelles s'est fondé cet appui scientifique et technique.

4. PRINCIPALES REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Feeley M., Brouwer A., 2000. Health risks to infant from exposure to PCBs, PCDDs and PCDFs. *Food Additives Contaminants*, 17, 325-333.
- Feil V.J., Huwe J., Zaylskie R.G., Davison K.L., Anderson V.L., Marchello M., 2000. Chlorinated dibenzo-p-dioxin and dibenzofuran concentrations in beef animals from a feeding study. *J. Agric. Food Chem.* 48, 6163-6173.
- Firestone D., Clower M., A.P. Borsetti, Teske R.H., Long P.E., 1979. Polychlorodibenzo-p-dioxin and pentachlorophenol residues in milk and blood of cows fed with technical pentachlorophenol. *J. Agric. Food Chem.* 27, 1171-1177.
- Gauthier J.M., Pelletier E., Brochu C., Moore S., Metcalf C.D., Béland P., 1998. Environmental contaminants in tissues of a neonate St Lawrence beluga whale (*Delphinapterus leucas*). *Marine Pollution Bulletin*, 36, 102-108.
- Hirako M., Aoki M., Kimura K., Hanafusa Y., Ishizaki H., Kariya Y., 2005. Comparison of the concentrations of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans, and dioxin-like polychlorinated biphenyls in maternal and fetal blood, amniotic and allantoic fluids in cattle. *Reproductive Toxicology*, 20, 247-254.
- Huwe J., Smith D.J., 2005. Laboratory and on-farm studies on the bioaccumulation and elimination of dioxins from a contaminated mineral supplement fed to dairy cows. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 2362-2370.
- Jensen D.J., R.A. Hummel, N.H. Mahle, C.W. Kocher and H.S. Higgins, 1981. A Residue Study on Beef Cattle Consuming 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *J. Agric. Food Chem.* 29, pp. 265-268.
- Kan C.A., Meijer G.A.L., 2003. Overzicht dioxine proeven uitgevoerd in Nederland met koeien en schapen. ID Lelystad Rapportnr: 03/0000744, januari 2003.
- Keller H.L., Borger D.C., Willett L.B., 2001. Uptake and excretion of organochlorine compounds in neonatal calves. *J. Anim. Sci.*, 79, 155-166.
- Nau H., Bass R., 1981. Transfer of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) to the mouse embryo and fetus. *Toxicology*, 20, 299-308.
- Olling M., H. J. G. M. Derks, P. L. M. Berende, A. K. D. Liem, A. P. J. M. de Jong, 1991. Toxicokinetics of eight ¹³C-labelled polychlorinated dibenzo-p-dioxins and -furans in lactating cows. *Chemosphere*, 23, 1377-1385.
- Richter W., McLachlan M.S., 2001. Uptake and transfer of PCDD/Fs by cattle fed naturally contaminated feedstuffs and feed contaminated as a result of sewage sludge application. 2. Non lactating cows. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 5857-5865.
- Robelin J., Casteilla L., 1990. Différenciation, croissance et développement du tissu adipeux. *INRA Productions Animales*, 3, 243-252.
- Suzuki G., Nakano M., Nakano S., 2005. Distribution of PCDDs/PCDFs and co-PCBs in human maternal blood, cord blood, placenta, milk, and adipose tissue: dioxins showing high toxic equivalency factor accumulate in the placenta. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 69, 1836-1847.
- Thorpe S., Kelly M., Startin J., Harrison N., Rose M., 2001. Concentration changes for 5 PCDD/F congeners after administration in beef cattle. *Chemosphere*, 43, 869-879.

Pascale BRIAND

Annexe 1

Tableau 2 : intervalles de confiance à 95% des valeurs prédites de PCB-DL dans la viande de collier à partir de la graisse de l'oreille, en fonction de nombre de valeurs utilisées pour établir la relation (à partir des données PCB-DL Meuse du Laberca)

graisse oreille	prédictions								
	muscle moyen	int haut	int bas	muscle moyen	inthaut	int bas	muscle moyen	inthaut	int bas
0,10	1,79	6,95	0,00	1,79	4,86	0,00	1,79	4,25	0,00
0,40	2,03	7,17	0,00	2,03	5,08	0,00	2,03	4,47	0,00
0,50	2,12	7,24	0,00	2,12	5,16	0,00	2,12	4,55	0,00
0,50	2,12	7,24	0,00	2,12	5,16	0,00	2,12	4,55	0,00
0,70	2,28	7,38	0,00	2,28	5,31	0,00	2,28	4,70	0,00
0,80	2,36	7,45	0,00	2,36	5,38	0,00	2,36	4,77	0,00
1,00	2,53	7,60	0,00	2,53	5,53	0,00	2,53	4,92	0,13
2,00	3,34	8,31	0,00	3,34	6,28	0,41	3,34	5,67	1,01
3,00	4,16	9,03	0,00	4,16	7,02	1,30	4,16	6,43	1,90
4,00	4,98	9,74	0,21	4,98	7,77	2,19	4,98	7,18	2,78
5,00	5,80	10,46	1,13	5,80	8,52	3,08	5,80	7,93	3,66
10,00	9,88	14,11	5,66	9,88	12,28	7,49	9,88	11,72	8,05
20,00	18,06	21,67	14,46	18,06	20,00	16,13	18,06	19,44	16,68
60,00	50,77	56,70	44,84	50,77	54,37	47,17	50,77	53,70	47,84
80,00	67,12	75,56	58,69	67,12	72,41	61,84	67,12	71,54	62,71
	4 valeurs			6 valeurs			9 valeurs		

y = 0,8177x + 1,7079 avec y valeur dans viande collier et x valeur dans graisse oreille
R2 = 0,9967 qualité ajustement

Annexe 2

Données bibliographiques sur d'éventuelles corrélations entre lipides de différents tissus pour les PCDD/F

* Publication montrant une valeur dans le muscle supérieure à celle dans le tissu adipeux

Thorpe *et al.* (2001) ont montré chez des bovins de type viande contaminés artificiellement par 5 congénères que les teneurs exprimées sur une base lipides n'étaient pas équivalentes entre les différents tissus. Ils observent chez les animaux traités aux trois périodes d'abattage post traitement que les concentrations dans le foie et le muscle sont supérieures à celles du tissu adipeux (sous-cutané ou périrénal). L'écart est très fort pour le premier abattage juste après les 4 semaines de traitement (ratio muscle/tissu Aadipeux= 5/1), il se réduit par la suite (2/1).

A noter que les niveaux mesurés chez les animaux témoins avec une valeur en TEQ issue des 5 congénères recherchés est égale à 10 pg TEQ/g MG. **Chez les témoins, la valeur dans le muscle est également supérieure à la valeur dans le tissu adipeux.** Les teneurs dans la graisse périrénale et la graisse sous-cutanée sont par contre très proches.

* Publications montrant une similarité de niveau entre muscle et tissus adipeux

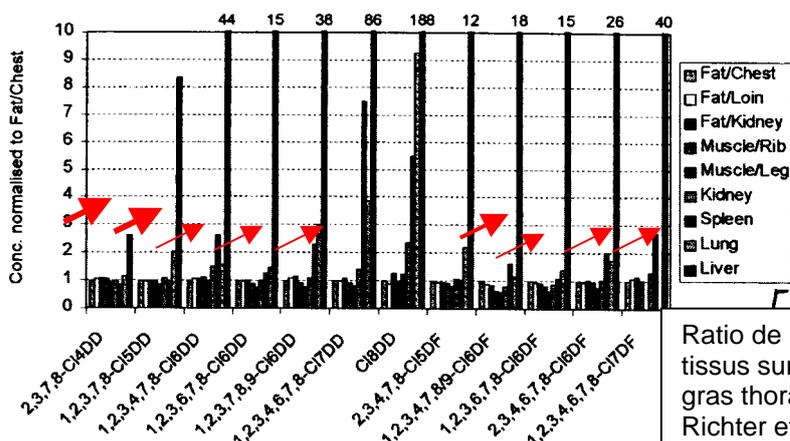
Richter et McLachlan (2001) ont travaillé avec des vaches non lactantes ayant reçu des PCDD/F par voie orale. Les résultats de contamination tissulaire sont disponibles pour trois gras différents, deux muscles, les reins, le foie et les poumons.

Le premier graphique montre que le foie diverge avec un ratio minimum de 2,5 pour la TCDD et de 188 pour l'OCDD (plus le composé est chloré plus l'accumulation hépatique est forte par rapport à la graisse (ratio de 8 et 12 respectivement pour la PeCDD et la 23478PeCDF)).

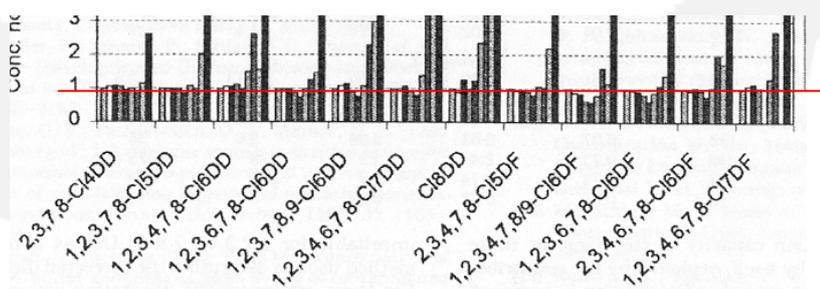
Le zoom sur la partie basse montre que pour les composés contribuant majoritairement au TEQ (flèches rouges) la ratio est très proche de 1 pour le gras de longe, le gras périrénal, le gras du muscle de la longe ou de la cuisse. Les concentrations par g de lipides sont donc très proches dans ces différents tissus.

Uptake and Transfer of PCDD/Fs by Nonlactating Cows

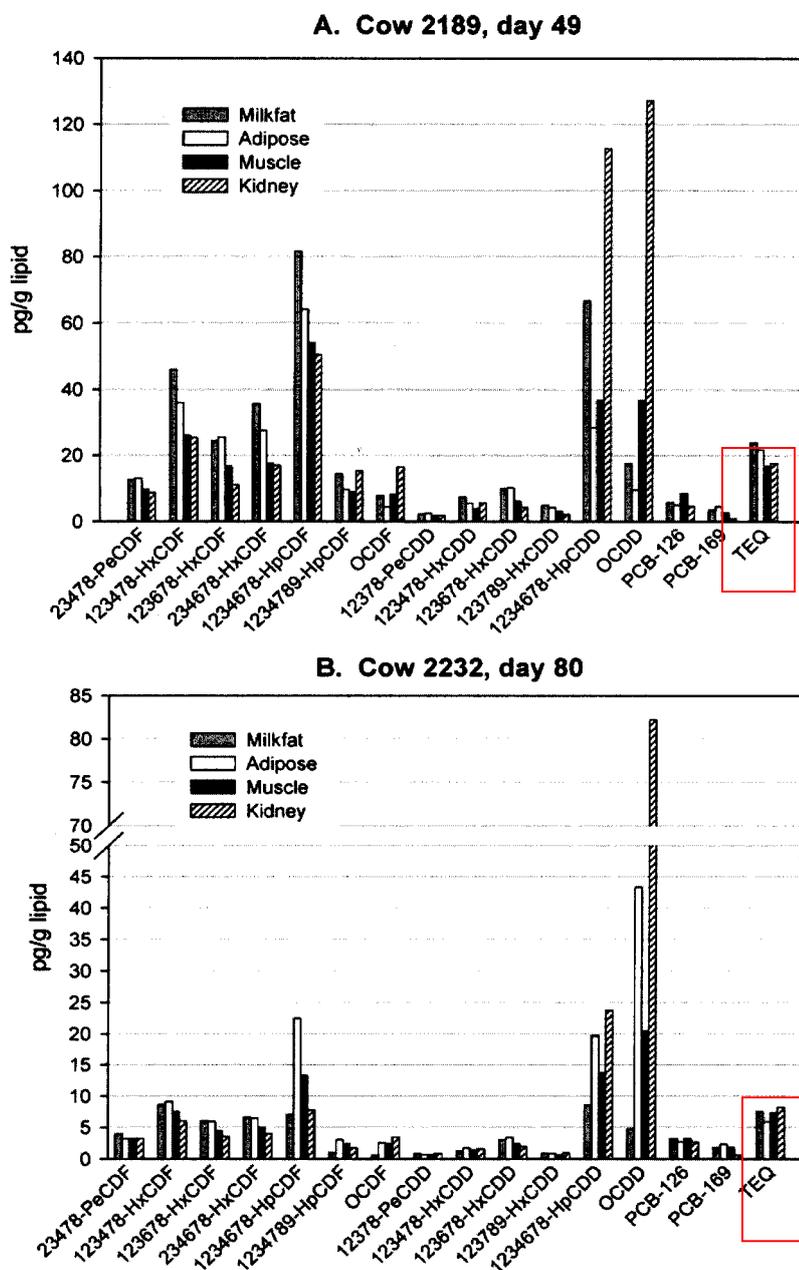
J. Agric. Food Chem., Vol. 49, No. 12, 2001



Ratio de la concentration dans les tissus sur la concentration dans le gras thoracique (base lipides)
Richter et McLachlan, 2001



J. Agric. Food Chem., Vol. 53, No. 6, 2005



Les résultats suivants sont issus des travaux de Huwe et Smith (2005).

Les concentrations en pg/g MG sont à nouveau proche que ce soit pour la graisse du lait, de tissu adipeux ou le gras musculaire (Huwe et Smith, 2005). Seul le rein s'éloigne pour les composés fortement chlorés mais si la comparaison est effectuée sur la base pg TEQ / g MG les différences sont minimales, avec un ratio muscle/ tissu adipeux de l'ordre de 0,86 pour la première vache et d'environ 1,17 pour la deuxième. Ce qui donne en moyenne un ratio de 1,02 ; les graphes montrent pour la majorité des congénères des valeurs supérieures pour le tissu adipeux, ce qui montre la limitation du risque en estimant la valeur musculaire à partir de celle du tissu adipeux avec un coefficient directeur de 1 et une ordonnée à l'origine positive.

*** Publication montrant une convergence tissu adipeux/muscle sauf pour un congénère**

Feil *et al.* (2000) ont étudié le transfert de PCDD/F chez des bœufs et ont dosé les concentrations dans le foie, le gras périrénal et dorsal et le muscle (faux-filet probablement).

Les teneurs sont données en pg/g de matière fraîche avec une indication des teneurs en limites des différents tissus analysés. La conversion en pg / g MG est délicate pour le muscle car le taux de lipides étant proche de 1 cela revient à multiplier la valeur par presque 100 ce qui amplifie considérablement l'incertitude. Les valeurs obtenues en TEQ/ g MG sont alors supérieures dans le muscle par rapport au tissu adipeux. L'amplitude de la différence est expliquée par un seul congénère : la TCDD, tous les autres congénères ont une concentration par g de MG équivalente entre les deux tissus adipeux et le muscle.

Le profil des PCDD/F est donc important dans les corrélations potentielles entre tissus. Le niveau de contamination assez homogène entre animaux ne permet pas ici d'établir une corrélation significative entre tissus car il n'y a pas d'effet dose pour étirer la courbe.

*** Publication basée sur des études toxico-cinétiques des PCDD/F chez la vache laitière**

McLachlan (1994) qui a proposé un modèle du devenir des contaminants hydrophobes chez la vache a développé son modèle final avec 4 compartiments, le tractus digestif, le sang, le gras et la mamelle. Dans ce modèle le gras n'est pas distingué quant à sa localisation anatomique, l'hypothèse biologique étant une diffusion passive globale vers ce compartiment. Cette approche va dans le sens d'une convergence entre teneur en PCDD/F dans les lipides du tissu musculaire et ceux du tissu adipeux.