



BMH-WAL
Surveiller l'exposition des Wallons
aux substances chimiques

BIOMONITORING HUMAIN WALLON

BMH-WAL

Méthodes d'élaboration et d'analyse des résultats BMH-Wal

RP1-RAP-22-03537

28 février 2023

A. Jacques

Attachée,

Cellule Environnement et Santé,
Direction des Risques Chroniques.

P. Maggi

Attaché,

Cellule Environnement et Santé,
Direction des Risques Chroniques.

I. Ruthy

Attachée,

Cellule Environnement et Santé,
Direction des Risques Chroniques.

S. Remy

Responsable,

Cellule Environnement et Santé,
Direction des Risques Chroniques.

PRÉAMBULE

Le Biomonitoring Humain Wallon, BMH-Wal, est un programme réalisé par un consortium scientifique composé actuellement de l'Institut Scientifique de Service Public¹ (ISSEP), du Centre Hospitalier Universitaire de Liège² (CHU-Liège), de l'Université Catholique de Louvain³ (UCLouvain), des Cliniques Universitaires Saint-Luc⁴ (CUSL) et de Sciensano⁵.

Il répond au souhait du Gouvernement Wallon de disposer de valeurs de référence sur l'exposition de la population wallonne à un certain nombre de polluants et substances chimiques présents dans l'environnement, l'eau, l'alimentation ou des produits de la vie quotidienne. Sa réalisation s'est faite sous l'égide d'un comité d'accompagnement composé de représentants des ministres de la santé et de l'environnement et de leurs administrations respectives.

Ce document constitue la méthodologie d'élaboration des valeurs de référence et d'analyse des résultats du programme BMH-Wal. Ce document est évolutif ; il pourra être modifié par le consortium BMH-Wal suite à des réflexions internes et/ou des avancées dans le domaine.

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier l'ensemble des participants au projet BMH-Wal ainsi que les institutions qui nous ont permis d'inclure ces participants et aussi toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à sa réalisation.

CONTACT: biomonitoring@issep.be

WEB : <http://environnement.sante.wallonie.be/biomonitoring-wallon>
<https://www.issep.be/biomonitoring/>

¹ Cellule Environnement-Santé, Direction des Risques Chroniques

² Unité de Toxicologie clinique, médico-légale, de l'environnement et en entreprise

³ UCLouvain Centre for Toxicology and Applied Pharmacology

⁴ Département des laboratoires cliniques, Laboratoire de Biochimie Analytique

⁵ Service Trace Elements and Nanomaterials

INTRODUCTION

L'objectif principal du projet BMH-Wal est la détermination de valeurs de référence d'exposition.

Une valeur de référence renseigne sur le niveau d'imprégnation d'une population particulière, à une substance chimique à un moment donné. Elle fixe une limite arbitraire entre le « bruit de fond » d'exposition à la substance d'intérêt dans la population d'étude et la partie supérieure des niveaux d'exposition. Elle reflète donc une concentration biologique seuil au-delà de laquelle le niveau d'exposition de la population est estimé élevé mais elle ne donne aucune information sur l'existence ou la possibilité de survenue d'un quelconque effet sanitaire associé à ce niveau d'exposition.

Les valeurs de référence sont nécessaires pour interpréter les données acquises lors de campagnes de biomonitoring humain : elles permettent la comparaison des données d'imprégnation des individus à celles d'une population de référence et l'identification d'individus surexposés par rapport à cette population de référence.

Le concept de valeur de référence, tel que nous venons de le définir, correspond à la « limite supérieure » de l'intervalle de référence défini par l'IFCC-LM (International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine).

Définitions de l'IFCC-LM (Solberg, 1987) :

- Un individu de référence est sélectionné à l'aide de critères bien définis, c'est-à-dire se trouvant dans un état de santé décrit avec précision (exemple : grossesse, en bonne santé, exempt de pathologies apparentes...);
- Une valeur de référence est le résultat d'un examen de laboratoire obtenu pour une grandeur particulière sur les individus de l'échantillon de référence ;
- La distribution de référence est la distribution de probabilité estimée à partir de l'échantillon de référence ;
- Les limites de référence sont calculées par des moyens statistiques appropriés à partir de la distribution de référence ;
- L'intervalle de référence est défini par les deux limites de référence ;
- Une valeur observée est la valeur d'une grandeur mesurée ou observée chez un individu. Elle est comparée aux limites de référence pour son interprétation.

L'intervalle de référence est un intervalle calculé statistiquement, englobant un pourcentage spécifié de la population. Par consensus, ce pourcentage est généralement fixé à 95%, ce qui correspond à des limites aux percentiles 2,5 et 97,5. Cependant, dans le cas des polluants environnementaux, qui n'ont aucun rôle essentiel pour l'Homme, l'intervalle de référence se retrouve déplacé vers la gauche et c'est alors le percentile 95 qui est souvent utilisé comme limite de référence supérieure.

Il existe trois types de critères à prendre en compte pour élaborer des valeurs de référence : les critères d'autorisation, d'exclusion et de partition.

Les **critères d'autorisation** garantissent la production de valeurs de référence fiables. Ainsi, pour pouvoir élaborer une valeur de référence fiable, l'échantillon doit être représentatif de la population, de taille suffisante et uniforme.

Les **critères d'exclusion** visent à définir la population d'étude concernée par l'élaboration des valeurs de référence. Ils permettent ainsi d'exclure les individus dont le comportement ou les pratiques dans les heures précédant le prélèvement modifient anormalement leur niveau d'imprégnation.

Les **critères de partition** permettent de diviser la population d'étude en sous-groupes différents.

TRAITEMENT DES DONNÉES PRÉALABLE AUX ANALYSES STATISTIQUES

VALEURS < LOQ

Les valeurs inférieures à la limite de quantification ont été remplacées par LOQ/2. Aucun pourcentage de valeurs inférieures à la LOQ limite n'a été défini pour pouvoir établir une valeur de référence. Cependant, la valeur de référence n'a pas été établie si la borne inférieure de l'intervalle de confiance du P95 était inférieure à la LOQ, comme recommandé par HBM4EU⁶ (délivrable D10.5).

VALEURS EXTRÊMES

Les valeurs extrêmes ont été identifiées, dans un logiciel tableur, à l'aide de la méthode de Tukey modifiée (formule : $P75 + 3,95*(P75-P25)$). Elles n'ont pas été systématiquement éliminées. L'exclusion a uniquement été réalisée en cas de problème analytique, d'exposition professionnelle ou extra-professionnelle (prise de compléments alimentaires pour les éléments traces par exemple). Les valeurs extrêmes exclues sont renseignées.

ANALYSES STATISTIQUES

STATISTIQUES DESCRIPTIVES

Pour chaque biomarqueur, la moyenne géométrique, le pourcentage de valeurs inférieures à la LOQ et les percentiles 5, 25, 50, 75 et 95 ainsi que les intervalles de confiance à 95% (IC95%) de la moyenne géométrique et du P95 ont été déterminés.

L'IC95% du P95 a été calculé dans un logiciel tableur à l'aide d'un test de rang suivant les formules :

- Rang de la borne inférieure de P95 = $N*0,95-1,96*RACINE(N*0,95*(1-0,95))$;
- Rang de la borne supérieure de P95 = $N*0,95+1,96*RACINE(N*0,95*(1-0,95))$.

Les statistiques descriptives ont été présentées pour l'ensemble de l'échantillon et pour les sous-groupes pertinents (voir comparaison d'échantillons indépendants).

Les résultats pour les biomarqueurs urinaires ont été exprimés à la fois en µg/L et en µg/g.créatinine, pour permettre la comparaison des résultats de BMH-Wal avec les résultats de précédentes études. Les échantillons dont les concentrations de créatinine urinaire sont inférieures à 0,3 et supérieures à 3,0 g de créatinine/L n'ont pas été exclus de l'analyse. Toutefois, les échantillons ayant une créatinine inférieure ou égale à 0,1 g/L ont été exclus.

⁶ Les efforts conjoints de 30 pays européens, de l'Agence européenne pour l'environnement et de la Commission européenne ont permis de créer un projet commun appelé HBM4EU (2017-2021) dont un des enjeux majeurs consiste à harmoniser les procédures de biomonitoring humain dans les pays participants, afin de fournir aux décideurs politiques des données comparables quant à l'exposition humaine aux produits chimiques en Europe et orienter les politiques communautaires.

COMPARAISON D'ÉCHANTILLONS INDÉPENDANTS

Etant donné qu'aucun biomarqueur ne se distribuait selon une courbe gaussienne, un test non paramétrique de comparaison d'échantillons non appariés (U de Mann-Whitney, si 2 catégories, ou Kruskal Wallis, si plus de 2 catégories) a été réalisé pour identifier les sous-groupes qui présentent des concentrations de biomarqueurs significativement différentes. Les résultats sont considérés comme significatifs au niveau d'incertitude de 5% ($p < 0,05$). Les tests de Mann-Whitney ont été réalisés, pour les biomarqueurs urinaires, sur les données exprimées en $\mu\text{g/L}$ ou, en $\mu\text{g/l}$ et $\mu\text{g/g.créat}$ en fonction du biomarqueur testé. Les résultats des Mann-Whitney sont susceptibles de différer en fonction de l'unité utilisée ($\mu\text{g/L}$ ou $\mu\text{g/g.créat}$).

Les variables qualitatives testées sont, au minimum, pour chaque biomarqueur, la catégorie d'âge⁷ et le sexe. En fonction du biomarqueur et des connaissances actuelles, d'autres variables ont été envisagées (tabagisme et consommation récente de poisson par exemple). Un tableau reprenant l'ensemble des variables testées par biomarqueur est renseigné dans les rapports. La multi-comparaison par âge et par sexe a été réalisée lorsqu'elle était pertinente.

CALCUL DE LA VALEUR DE RÉFÉRENCE

Le percentile utilisé pour établir la valeur de référence est le percentile 95 et son intervalle de confiance à 95%. Les valeurs de référence sont nommées VR95.

Le P95 a été arrondi en-dessous en conservant au moins deux chiffres significatifs en fonction de la précision de la méthode analytique utilisée (ex : si $P95 = 2732 \mu\text{g/L}$ alors $RV_{95} = 2700 \mu\text{g/L}$). Si la valeur arrondie sortait de l'IC à 95% du P95 alors la borne inférieure de l'IC a été utilisée (ex : si $P95 = 2732 \mu\text{g/L}$ mais que la borne inférieure de l'IC $_{95\%} = 2720 \mu\text{g/L}$ alors RV_{95} n'est pas $2700 \mu\text{g/L}$ mais $2720 \mu\text{g/L}$).

Critères de partition

Pour chaque biomarqueur, une VR95 a été établie pour l'échantillon total et pour chaque critère de partition. Afin d'identifier les critères de partition, et donc d'établir la pertinence d'établir des RV95 différentes pour les sous-groupes, un test z pour une proportion (test unilatéral) a été réalisé. Le seuil de significativité de ce test a été fixé à 0,001. Les critères de partition envisagés sont identiques aux variables qualitatives testées lors des comparaisons d'échantillons indépendants (sexe, catégorie d'âge pour tous les biomarqueurs et critères supplémentaires en fonction des biomarqueurs).

Critères d'exclusion

Les critères d'exclusion qui ont été envisagés sont le tabagisme⁸ (pour le Cd urinaire et les HAPs) et la consommation récente de poisson⁹ (pour l'As et le Hg sanguin). Quand cela était pertinent et que

⁷ Dans BMH-Wal-1, la catégorie des nouveau-nés a été systématiquement traitée à part et n'a pas été comparée aux 12-39 ans, en raison de la différence importante d'imprégnation observée chez cette catégorie d'âge.

⁸ Le tabagisme est déterminé au moyen de la question 26 (Êtes-vous fumeur ?). Les personnes qui ont arrêté de fumer ou qui fument moins d'une cigarette/jour sont considérées comme « non-fumeur », excepté pour le

l'effectif était suffisant, les critères d'exclusion ont d'abord été testés en tant que critères de partition (par exemple, une valeur de référence pour le cadmium pour les fumeurs et une autre pour les non-fumeurs), comme recommandé par HBM4EU (délivrable D10.5).

Critères d'autorisation

L'effectif minimum d'un sous-groupe qui permet d'établir une valeur de référence a été fixé à 120¹⁰. Avant d'établir une valeur de référence, une inspection visuelle de la distribution des valeurs a été réalisée pour vérifier qu'elle ne contient pas de sous-groupes de niveaux d'exposition différents.

COMPARAISON DES RÉSULTATS BMH-WAL À D'AUTRES ÉTUDES DE BIOSURVEILLANCE

Les résultats de BMH-Wal ont été comparés à d'autres études régionales, nationales et internationales sur base de la moyenne géométrique, de la médiane et du P95. Quand disponibles, les données correspondant aux groupes d'âge d'intérêt du projet BMH-Wal ont été renseignées. Les études de catégories d'âge semblables, proches géographiquement, récentes et incluant un grand nombre de participants ont été privilégiées.

COMPARAISON DES RÉSULTATS BMH-WAL AUX VALEURS DE RÉFÉRENCE SANITAIRE

Les valeurs de référence sanitaires (VRS) permettent d'apprécier le risque sanitaire associé à une exposition. Elles sont dérivées par des groupes d'experts à partir des résultats d'études épidémiologiques et/ou toxicologiques. Elles sont fondées sur les informations scientifiques disponibles au moment de leur élaboration et peuvent donc être revues. Il existe différents types de VRS et selon leur provenance, elles n'ont pas exactement la même signification.

Les valeurs HBM sont des VRS proposées par la Commission Nationale de Biomonitoring allemande. Elles sont dérivées au départ de données épidémiologiques ou toxicologiques selon des méthodes scientifiques clairement décrites et sont actualisées régulièrement en fonction de l'évolution des connaissances. Les valeurs HBM sont établies pour la population générale, pour une exposition vie entière à la concentration correspondante ou pour des groupes de population ou des périodes de vie (femme en âge de procréer, enfants, ados, etc).

cadmium urinaire. Pour le Cd urinaire, les adolescents, les adultes qui ont arrêté de fumer ou qui fument moins d'une cigarette/jour ont été exclus en raison d'un manque de précision. En effet, le cadmium urinaire est un biomarqueur d'exposition à long terme et l'arrêt du tabac ou la fluctuation de la consommation tabagique n'a pas d'impact immédiat sur la concentration urinaire en Cd.

⁹ La consommation récente de poisson est déterminée au moyen de la question 34 (Avez-vous mangé du poisson ou des crustacés ou fruits de mer ces 4 derniers jours ?).

¹⁰ Ce nombre, fixé par le Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), est le nombre minimum recommandé pour utiliser une méthode non paramétrique d'estimation des intervalles de confiance des limites de référence (IC90% du P97,5). HBM4EU recommande également un effectif de minimum 120 individus pour établir une valeur de référence (délivrable D10.5).

Il existe deux niveaux de valeurs HBM : les valeurs HBM I et les valeurs HBM II. Elles peuvent être utilisées pour interpréter des données individuelles et déterminent le besoin d'action. Elles sont définies de la manière suivante (Apel et al, 2017) :

- HBM I : concentration d'une substance dans une matrice biologique à laquelle et en dessous de laquelle, compte tenu des connaissances actuelles, il n'y a pas risques d'effets néfastes sur la santé et par conséquent pas de nécessité d'action ;
- HBM II : concentration d'une substance dans une matrice biologique à laquelle et au-dessus de laquelle des effets néfastes sont possible. Des conseils pour réduire l'exposition sont nécessaires ainsi qu'un avis médical.

Pour les niveaux de concentration situés entre les valeurs HBMI et HBMIII, les effets néfastes ne peuvent être exclus avec suffisamment de certitude. Des valeurs HBM existent pour le mercure sanguin et urinaire, le cadmium urinaire, le thallium urinaire, le bisphénol A urinaire, les PCBs sanguins (somme des PCBs 138-153-180), l'acide perfluorooctanoïque (PFOA) et l'acide perfluorooctanesulfonique (PFOS) dans le sang.

Les Biomonitoring Equivalent (BE) sont des VRS développées par Summit Toxicology (USA). Un BE se définit comme la concentration ou la plage de concentration d'un agent chimique ou de ses métabolites dans une matrice biologique, correspondant à une valeur guide sanitaire (comme l'apport quotidien tolérable ou la dose de référence). Des valeurs BE existent pour le sélénium urinaire et l'arsenic spécié urinaire.

Pour le sélénium, la valeur BE se base sur les besoins moyens estimés en Se établis pour assurer l'adéquation nutritionnelle au niveau de la population et les niveaux d'apport supérieurs tolérables destinés à protéger d'un effet toxique (sélénose), qui ont été estimés à respectivement 10µg/L et 90-110µg/L chez l'adulte (Hays et al, 2014).

Concernant le plomb, il n'existe pas de seuil au-dessous duquel l'exposition au plomb n'aurait pas d'effets nocifs (OMS). La valeur de référence sanitaire proposée dans le cadre de ce travail pour les adolescents et les adultes correspond à la valeur de vigilance en vigueur en France pour la gestion de la plombémie (25µg/L) (Oleko et al, 2020). Le dépassement de cette valeur de vigilance indique l'existence probable d'au moins une source d'exposition au plomb dans l'environnement et justifie une information des familles sur les dangers du plomb et les sources usuelles d'imprégnation ainsi qu'une surveillance de la plombémie. Pour les nouveau-nés, nous avons retenu la valeur de 12µg/L utilisées par l'EFSA comme valeur de référence pour la caractérisation du risque de déficit intellectuel chez l'enfant (EFSA, 2010).

Les différentes VRS utilisées dans le cadre du programme BMH-Wal figurent dans le tableau 1 ci-dessous.

Matrice	Substance	Unité	Valeur de référence sanitaire												
			HBM I				HBM II				BE				Source
			NN	Enfants	Ados	Adultes	NN	Enfants	Ados	Adultes	NN	Enfants	Ados	Adultes	
Sang	Mercure	µg/L	5		5	5	15		15	15					1
	PCBs $\sum(138+153+180) \times 2$		3,5		3,5	3,5	7		7	7					1
	Plomb										12		25	25	2
	PFOA	µg/L	2		2	2	10*		10*	10*					1
	PFOS		5		5	5	20*		20*	20*					1
Cadmium			0,5	0,5	1		2	2	4					1	
Thallium			5	5			/	/						1	
Mercure			7	7	7		25	25	25					1	
Urine	Sélénium												90-110	4	
	Bisphénol A		100	100	200		/	/	/					1	
	Asi+DMA+MMA											6,4		5	

Apel et al., 2017 ; (2) EFSA, 2010 ; (3) Oleko et al., 2020 ; (4) Hays et al., 2014 ; (5) Hays et al., 2010.

*Vu le petit nombre d'études disponibles, l'incertitude sur les résultats et la spécificité des groupes inclus dans les études utilisées pour établir les valeurs HBM II, elles ne sont pas destinées à quantifier le risque sur la santé d'un individu en raison de son niveau d'exposition, mais bien à mettre en évidence les individus pour lesquels des mesures sont à prendre afin de réduire leur exposition par application du principe de précaution (Schümann et al, 2021).

TABEAU 1 : VALEURS DE RÉFÉRENCE SANITAIRE (À LA DATE DU 27 FÉVRIER 2023).

COMPARAISON DES CATÉGORIES D'ÂGE DES DIFFÉRENTES PHASES DU PROJET BMH-WAL

Les différences éventuelles de distribution de concentrations entre les phases du programme BMH-Wal et entre les 5 classes d'âge (NN ; 3-5 ; 6-11 ; 12-19 ; 20-39 ; 40-59) ont été recherchées au moyen du test de Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis. Ensuite, un test non paramétrique de Dunn a été utilisé pour faire des comparaisons multiples par paires de catégories d'âge. Les seuils de significativité de ces tests sont fixés à 0,05. Ces comparaisons doivent être faites avec prudence, les collectes n'ayant pas été réalisées à la même période. Les résultats de ces comparaisons ne sont donnés qu'à titre indicatif.

BIBLIOGRAPHIE

Apel, P., Angerer, J., Wilhelm, M., Kolossa-Gehring, M.. New HBM values for emerging substances, inventory of reference and HBM values in force and working principles of the German Human Biomonitoring Commission. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 2017, 220, 152-166. doi:10.1016/j.ijheh.2016.09.007

European Food Safety Authority (EFSA), *Scientific Opinion on Lead in Food*. *EFSA Journal* 2010; 8(4):1570 (2010). Updated 2013.

Hays, S. M., Aylward, L. L., Gagné, M., Nong, A., & Krishnan, K. (2010). Biomonitoring Equivalents for inorganic arsenic. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 58(1), 1–9. doi:10.1016/j.yrtph.2010.06.002

Hays, S. M., Macey, K., Nong, A., & Aylward, L. L. Biomonitoring Equivalents for selenium. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 2014, 70(1), 333–339. doi:10.1016/j.yrtph.2014.07.017

HBM4EU. Vrijheid M, Montazeri P, Rambaud L, Vogel N, Vlaanderen J, Remy S, Govarts E, Schoeters G. *Statistical Analysis Plan. Deliverable Report D10.5. WP 10 Data management and analysis*. 136p.

Oleko, A., Fillol, C., Balicco, A., Bidondo, M.L., Gane, J., Saoudi, A., Zeghnoun, A. *Imprégnation de la population française par le plomb. Programme national de biosurveillance, Esteban 2014-2016*. Saint-Maurice : Santé publique France, 2020. 53 p. www.santepubliquefrance.fr

Organisation mondiale de la Santé (OMS). <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/lead-poisoning-and-health>

Schümann, M., Lilienthal, H., Hölzer, J., 2021. Human biomonitoring (HBM)-II values for perfluorooctanoic acid (PFOA) and perfluorooctane sulfonic acid (PFOS) - Description, derivation and discussion. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 121, 104868. doi:10.1016/j.yrtph.2021.104868

Solberg, H.E., 1987. Approved recommendation (1986) on the theory of reference values. Part 1. The concept of reference values. *Clin. Chim. Acta* 165, 111–118.