

Résidus et contaminants des denrées alimentaires : 25 ans de progrès dans leur analyse

II. MÉTHODES BIOLOGIQUES DE DÉPISTAGE

SCIPPO M.-L., MAGHUIN-ROGISTER G.

Laboratoire d'Analyse des Denrées alimentaires (LADA)

Centre d'Analyse des Résidus en Traces (CART), Département des Sciences des Denrées alimentaires, Faculté de Médecine vétérinaire, Université de Liège, Boulevard de Colonster, 20 - bât. B43b, 4000 Liège

Texte d'une conférence donnée le 11 mai 2005 dans le cadre de la célébration des 25 ans d'existence du Laboratoire d'Analyse des Denrées alimentaires, de l'Université de Liège. Les diapositives des exposés sont disponibles sur le site de la section Wallonie-Bruxelles de la WAVFH (World Association of Veterinary Food Hygienists) : <http://www.wavfh.ulg.ac.be/>

Correspondance : Prof. G. Maghuin-Rogister Email : G.Maghuin@ulg.ac.be

RESUME : Cet article présente une synthèse des différentes méthodes biologiques utilisées pour dépister des résidus ou des contaminants dans les denrées alimentaires, en insistant sur leur évolution au cours de ces 25 dernières années et en l'illustrant avec de nombreux exemples. Les méthodes biologiques sont basées sur la mise en évidence d'un effet biologique de l'analyte recherché. Dans les années '60-70, cet effet était détecté au moyen de coupes histologiques. Actuellement, les tests biologiques utilisent des cellules en culture génétiquement modifiées pour contenir un gène rapporteur, témoin de l'activité biologique recherchée.

Par opposition aux méthodes physico-chimiques qui permettent de « voir » la molécule d'intérêt au travers d'un spectre d'absorption ultraviolet, infrarouge ou Raman, d'un spectre RMN ou de masse ou encore d'une tache sur un chromatogramme en couche mince, une méthode biologique permet de « voir » un effet biologique de cette molécule. Certains de ces effets sont très simples : prise de poids d'un animal ou d'un organe prélevé sur cet animal suite à l'administration de la substance. D'autres sont plus complexes, comme dans le cas des essais basés sur des cellules génétiquement modifiées par exemple.

MÉTHODES HISTOLOGIQUES

Les premières méthodes utilisées pour détecter chez un animal un traitement au moyen de substances à activité hor-

monale de type œstrogène étaient des méthodes histologiques. L'examen de coupes de prostate de veaux suspects d'avoir été traités par des hormones interdites permettait dans les années '60-70 et début '80 de mettre en évidence ces traitements illégaux (Groot, 1992 ; Schilt *et al.*, 1998). Ces méthodes sont simples, elles ne nécessitent pas d'équipement important mais elles sont maintenant considérées comme obsolètes.

DOSAGES IMMUNOCHIMIQUES

Ensuite dans les années '80, on a vu se développer des méthodes radio-immu-

nologiques (RIA) pour le dépistage de résidus d'hormones dans des échantillons. Ici c'est la reconnaissance d'une molécule par un anticorps qui est détectée. Une compétition est organisée pour une liaison à des anticorps entre l'antigène non marqué, à savoir la molécule à rechercher dans l'échantillon, et un antigène de nature similaire mais marqué par un isotope radioactif (tritium, carbone 14) (figure 1).

Dans cette technique, on mesure la radioactivité liée aux anticorps après avoir éliminé la radioactivité libre. Grâce à une courbe de calibration (figure 2), on peut déterminer la

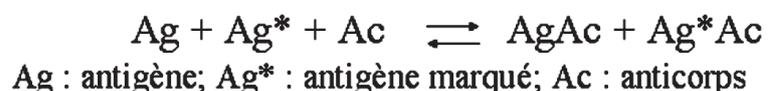


Figure 1 : équation de base des dosages immuno-chimiques par compétition

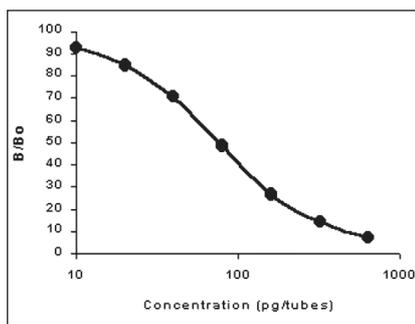


Figure 2 : courbe de calibration d'un dosage immunochimique par compétition. B représente la radioactivité liée aux anticorps aux différentes concentrations en antigène non marqué, Bo représente la radioactivité liée aux anticorps en absence d'antigène non marqué

concentration de la substance dans l'échantillon.

Ces méthodes permettent de détecter des concentrations en résidus de l'ordre du ppb (microgramme par kg) (Duchatel *et al.*, 1985 ; Gaspar *et al.*, 1985 ; Evrard *et al.*, 1986). Les anticorps sont généralement très spécifiques. Dans certains cas, par exemple pour les bêta-agonistes ou certains antibiotiques comme les tétracyclines, il existe des anticorps capables de réactions croisées avec plusieurs

substances différentes d'une même famille. Dans ce cas, un dépistage multianalyte est possible.

Ces méthodes sont moins utilisées actuellement, mais plusieurs kits sont encore disponibles commercialement. Les ELISA (*Enzyme-linked ImmunoSorbent Assays*) de type « compétition » (par opposition aux ELISA de type « sandwich ») sont analogues aux RIA. Cette fois l'antigène est marqué par un enzyme dont l'activité liée aux anticorps peut être mesurée grâce à une coloration correspondant à la transformation du substrat de l'enzyme en produit.

Dans les ELISA de type « sandwich », l'analyte recherché est capturé par un premier anticorps et détecté grâce à un deuxième anticorps qui lui est marqué au moyen d'un enzyme (l'analyte est véritablement pris en sandwich entre les deux anticorps). La réponse est ici directement proportionnelle à la concentration en analyte dans l'échantillon (et non inversement proportionnelle comme dans le cas de l'ELISA de type « compétition »).

De nombreux kits de dosage ELISA pour les résidus et les contaminants ont été développés pour des substan-

ces à activité hormonale (Degand *et al.*, 1989), des bêta-agonistes (Degand *et al.*, 1993), des antibiotiques (Renson *et al.*, 1993), des tranquillisants, des coccidiostatiques, des mycotoxines et phycotoxines...

Les avantages des RIA et ELISA pour le dépistage des résidus d'hormones sont énumérés dans le tableau I, ils sont semblables pour les deux méthodes. L'ELISA est cependant dépourvu des inconvénients liés à l'utilisation de la radioactivité.

RÉCEPTEURS ESSAIS

Des récepteurs essais pour les principales hormones stéroïdes (oestrogènes, androgènes, progestagènes et glucocorticoïdes) ont été mis au point. Tous ces récepteurs sont des protéines qui appartiennent à une superfamille de facteurs transcriptionnels (Evans, 1988) qui présentent une organisation commune en domaines (figures 3 et 4) (Jenster *et al.*, 1992).

Les hormones stéroïdes exercent leur action au niveau cellulaire en se liant à des récepteurs intra-cellulaires. Le complexe hormone-récepteur entre ensuite dans le noyau où il va interagir

Tableau I :

	AVANTAGES	INCONVÉNIENTS
RIA	<ol style="list-style-type: none"> 1. rapide 2. « bon marché » 3. « sensible » 4. permet de traiter un grand nombre d'échantillons 5. avec un anticorps « non spécifique » : permet de mettre en évidence de nouvelles molécules 	<ul style="list-style-type: none"> • radioactivité : équipement « coûteux » • élimination des déchets
EIA	<ol style="list-style-type: none"> 1. rapide 2. bon marché 3. « sensible » 4. permet de traiter un grand nombre d'échantillons 5. trousse de dosage « générique » qui permet de mettre en évidence de nouvelles molécules 	
RRA	<ol style="list-style-type: none"> 1. méthode rapide 2. « bon marché » 3. permet de traiter un grand nombre d'échantillons 4. permet de mettre en évidence de nouvelles molécules 	<ul style="list-style-type: none"> • radioactivité : équipement « coûteux » • élimination des déchets

Comparaisons des avantages et inconvénients de trois méthodes biochimiques de criblage (« screening ») d'échantillons : le RIA (dosage radioimmunologique), le EIA (dosage immunoenzymatique) et le RRA (dosage radioactif au moyen de récepteurs ou radiorécepteur essai).

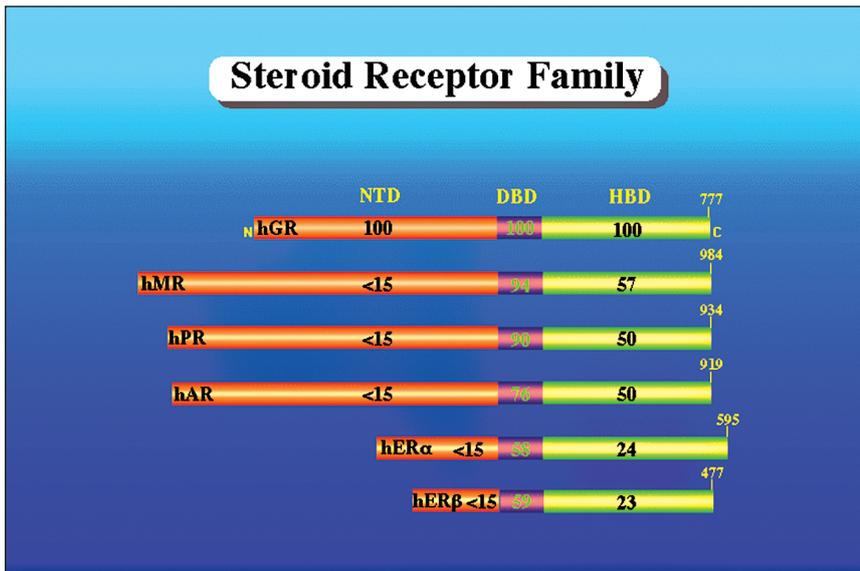


Figure 3 : représentation schématique des différents membres de la famille des récepteurs humains aux hormones stéroïdes G : « Glucocorticoid », M : « Mineralocorticoid », P : « Progesterone », A : « Androgen », E : « Estrogen », R : « Receptor ». NTD : « N-Terminal Domain ». DBD : « DNA Binding Domain ». HBD : « Hormone Binding Domain ». Pour chaque domaine, le pourcentage d'homologie avec le récepteur hGR est indiqué

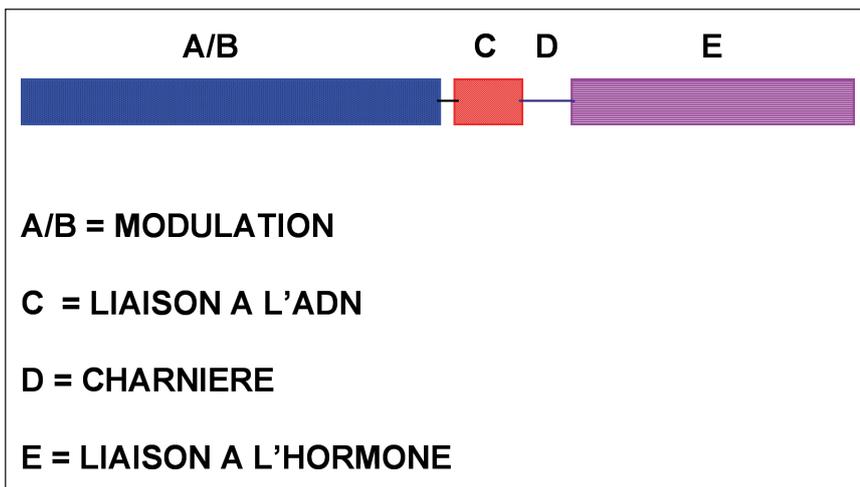


Figure 4 : structure en domaines des récepteurs des hormones stéroïdes

avec le génome et stimuler ainsi la transcription de gènes cibles et finalement leur traduction en protéines cibles (figure 5).

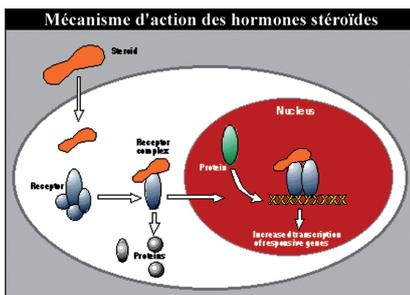


Figure 5 : mécanisme d'action des hormones stéroïdes

Des fragments de récepteurs, correspondant à la partie carboxy-terminale siège de la liaison au stéroïde (partie E dans la figure 3), ont été produits par des techniques de génie génétique. Ces fragments de récepteurs sont utilisés dans des radio-récepteurs essais qui utilisent les mêmes principes que les RIA décrits plus haut mais où les anticorps sont remplacés par les récepteurs, avec l'avantage de pouvoir détecter tous les ligands du récepteur utilisé. À titre d'exemple, le récepteur aux œstrogènes reconnaît non seulement le 17β -œstradiol mais aussi, avec quasi la même affinité, d'autres substances à activité œstrogène telles que l'éthi-

nylœstradiol, le diéthylstilbœstrol, diœnoestrol, hexœstrol et zœranol, et beaucoup moins bien des métabolites de l'œstradiol comme le 17α -œstradiol et l'œstrone (Scippo *et al.*, 2002).

Les avantages et inconvénients des radio-récepteurs essais sont donnés dans le tableau I.

Un autre récepteur essai a été mis au point en partant d'un récepteur bêta-adrénergique humain exprimé en bactéries. Cette fois il s'agit d'un récepteur membranaire. Un radio-récepteur essai pour les bêta-agonistes et antagonistes a été développé en utilisant ces bactéries comme source de récepteur (Helbo *et al.*, 2000 ; Danyi *et al.*, 2004). Ce récepteur essai permet de détecter divers beta-agonistes (clenbutérol, mabutérol, terbutaline, ractopamine, phénotérol, salbutamol, cimatérol, carbutérol, ritodrine) et le carazolol (bêta-bloquant) avec des limites de détection plus ou moins basses selon la nature de la substance. Pour le clenbutérol et le mabutérol, une limite de détection de l'ordre du $\mu\text{g}/\text{kg}$ est possible.

Un des buts d'une technique de dépistage est de détecter des nouvelles molécules : associée à la spectrométrie de masse, ce dépistage basé sur les récepteurs a permis à Nielen et collaborateurs (2003) d'identifier un bêta-agoniste nouveau dérivé du clenbutérol dans des aliments pour bœtail.

Une autre application des récepteurs essais est la détection des perturbateurs endocriniens (Scippo *et al.*, 2004) accusés de nombreux maux : augmentation de certains cancers, diminution de la fertilité masculine, modification du sex-ratio dans la faune sauvage...

L'accumulation de résidus de pesticides dans l'environnement ou d'autres produits industriels est probablement à l'origine de ces perturbations. Ces substances miment l'action de certaines hormones (œstrogènes) ou inhibent l'action d'autres hormones (androgènes). Le récepteurs essai pour les œstrogènes détecte une telle activité au niveau de pesticides (bêta-endo-sulfane, aldrine, lindane) ou de métabolites (p,p'-DDT), du bisphénol A présent dans le revêtement de boîtes de conserve, de polymères utilisés en dentisterie...

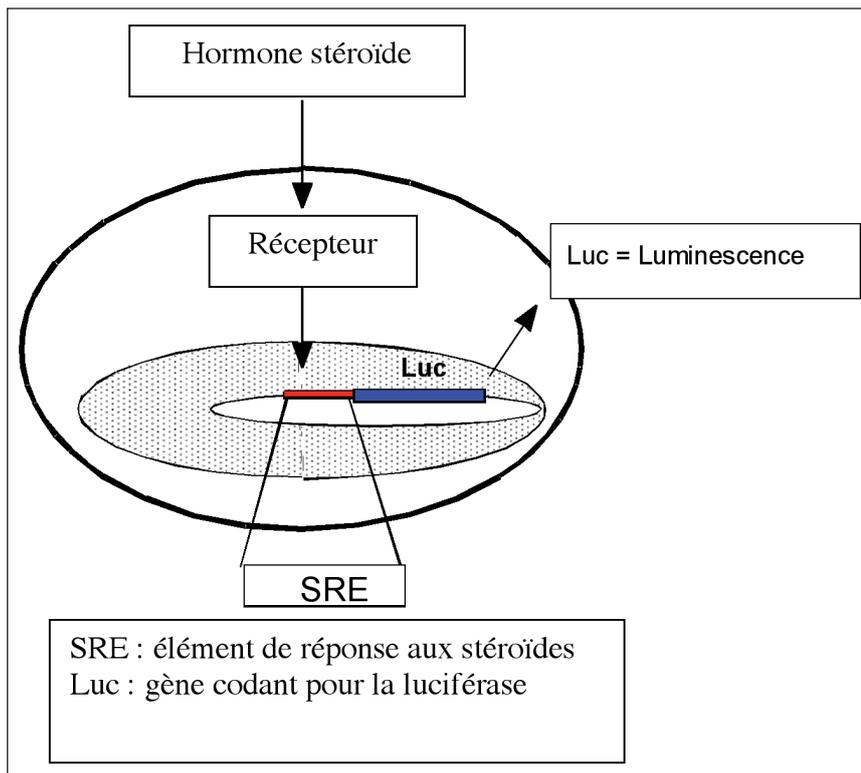


Figure 6 : Principe du test cellulaire avec le gène de la luciférase comme gène rapporteur.

ESSAIS CELLULAIRES

On peut mettre à profit le mode d'action des hormones stéroïdes pour créer des cellules sensibles à ces substances. Des cellules sont manipulées génétiquement pour produire, en présence d'hormone, de la luciférase, enzyme qui catalyse la production de lumière par transformation de luciférine. Les cellules sont donc équipées d'un gène codant pour la luciférase (gène rapporteur) sous le contrôle d'un élément de réponse aux stéroïdes (SRE : *Steroid Response Element*) qui agit comme promoteur du gène rapporteur lors de la fixation du complexe stéroïde-récepteur (figure 4).

Donc en présence d'hormones stéroïdes présentes dans un extrait d'échantillon, les cellules produiront de la luciférase dont l'activité est mesurée grâce à un luminomètre. Quatre lignées cellulaires ont été mises au point pour la détection des oestrogènes, androgènes, progestagènes, et glucocorticoïdes (Willemsen *et al.*, 2002 ; 2004 ; 2005). La limite de détection de ces tests cellulaires est de l'ordre du $\mu\text{g}/\text{kg}$ voire plus bas.

Il existe aussi des tests cellulaires pour le dosage des dioxines et des subs-

tances apparentées : le DR-CALUX (*Dioxin Responsive-Chemically Activated Luciferase gene eXpression*) fonctionne d'une manière analogue aux tests cellulaires développés pour les hormones stéroïdes. Les substances de type dioxine entrent dans la cellule, se lient au récepteur Ah (*Aryl hydrocarbon*). Le complexe dioxine-récepteur se lie à un élément de l'ADN qui sert de promoteur au gène codant pour la luciférase. Il existe deux tests commerciaux : l'un est commercialisé par la firme BDS (BioDetection System, Pays-Bas) et est basé sur des hépatocytes de rats équipés du gène rapporteur luciférase sous le contrôle d'un élément de réponse aux dioxines (Aarts *et al.*, 1993), l'autre est produit par la firme XDS (Xeno Detection System, Etats-Unis), qui utilise des hépatocytes de souris (Murk *et al.*, 1996). Enfin, un troisième système basé sur des hépatocytes ou des cellules mammaires d'origine humaine a été élaboré au Centre d'Analyse des Résidus en Traces (CART), à l'université de Liège.

Un autre test biologique bien connu pour détecter les dioxines et les ligands du récepteur Ah en général est le test EROD. Praticqué *in vitro*, des hépa-

toocytes en culture produisent, sous l'action des dioxines, une enzyme, l'éthoxyresorufin-O-dééthylase (EROD) dont l'activité de transformation de l'éthoxyresorufine en résorufine se traduit par une émission de fluorescence (Sanderson *et al.*, 1996). *In vivo*, l'EROD est le biomarqueur le plus connu au niveau des tissus provenant d'organismes (des poissons par exemple) qui ont été exposés à l'action de dioxines dans l'environnement (Wu *et al.*, 2001).

Un autre exemple de biomarqueur, cette fois pour détecter un perturbateur endocrinien de type oestrogène, est la vitellogénine qui peut être dosée par ELISA chez des poissons (Okuyama and Hatano, 2004).

TESTS RAPIDES DE DÉTECTION DES ANTIBIOTIQUES

Le test « rénal », officiel en Belgique comme test de dépistage des résidus d'antibiotiques dans une carcasse (arrêté ministériel du 19 juin 1995 modifiant l'arrêté ministériel du 18 décembre 1973 déterminant les techniques de laboratoire pour la recherche des résidus de substance à effet bactériostatique) (Ministère de la Santé publique et de l'Environnement, 1995), est basé sur l'inhibition de la croissance de bactéries *Bacillus subtilis*. Ce test est réalisé au moyen de boîtes de Pétri contenant une géloseensemencée avec la souche *Bacillus subtilis*. Les zones d'inhibition dépourvues de colonies bactériennes autour des points de dépôts des échantillons (morceau de rein ou papier filtre imbibé d'exsudat de cortex rénal) sont révélatrices de la présence potentielle d'antibiotiques.

Un autre format de ce test d'inhibition de croissance microbienne est le DELVOTEST (DSM, Pays-Bas) appliqué à l'examen du lait. Dans ce cas le changement de pH engendré par la multiplication des bactéries produit un changement de couleur d'un indicateur. La présence d'antibiotiques dans le lait inhibe le changement de couleur.

D'autres tests, biochimiques cette fois, de détection d'antibiotiques sont basés

sur la liaison de résidus d'antibiotiques à des récepteurs. Il en existe pour les antibiotiques de type bêta-lactame (β -STAR, distribué par NEOGEN, USA) et pour les tétracyclines (TETRASENSOR, distribué par UNISENSOR, Belgique). Ces tests sont très simples à utiliser : ils se présentent sous forme de bandelettes à plonger dans l'échantillon (lait ou un extrait liquide d'échantillon de tissus) préincubé avec des récepteurs marqués à l'or colloïdal. Après migration du liquide par capillarité le long de la bandelette, la présence d'une seule bande rouge au niveau supérieur (contrôle de validité du test qui doit être présent dans tous les cas) indique la présence d'antibiotiques. Alors qu'en absence de ces substances, deux bandes colorées sont visibles. Ces tests peuvent être calibrés pour réagir à des concentrations en antibiotiques correspondant aux limites maximum de résidus (règlement n°2370/1990/CE) (Conseil des Communautés européennes, 1990).

CONCLUSION

Les méthodes biologiques/biochimiques de dépistage des résidus et des contaminants sont généralement rapides et peu coûteuses. Elles permettent de traiter un grand nombre d'échantillons. Elles doivent avoir des limites de détection suffisamment basses (inférieures aux LMR ou aux niveaux

minimum de performance requise). Comme toute méthode de dépistage, elles ne doivent engendrer qu'un faible nombre de faux négatifs (échantillons faussement conformes) et un nombre limité de résultats faussement positifs pour rester attrayantes d'un point de vue économique, les résultats « positifs » enregistrés en pratiquant ces méthodes biologiques de dépistage devant être nécessairement confirmés par des méthodes chromatographiques plus fiables comme celles qui associent chromatographie (en phase gazeuse ou liquide) couplées à la spectrométrie de masse.

Les méthodes biologiques devraient aussi permettre la mise en évidence de nouvelles molécules et déboucher sur des méthodes de dépistage rapides utilisables sur le terrain par le vétérinaire. Les domaines d'applications de ces méthodes sont nombreux et variés :

- 1 le dépistage d'échantillons dans les programmes de surveillance et de contrôle des résidus dans les denrées alimentaires ;
- 2 la surveillance de la contamination de l'environnement ;
- 3 les analyses toxicologiques de produits industriels en tant qu'alternatives aux méthodes sur animaux vivants de laboratoire ;
- 4 le contrôle du dopage chez les sportifs ou les chevaux de course.

REMERCIEMENTS

Nous remercions les organismes sui-

vants qui nous ont fait confiance en subsidiant nos recherches: le FNRS, la DGTRE et la DGRNE du Ministère de la Région wallonne, la Commission européenne, le FEDER, le FSE, l'IEV, l'IRSIA Agriculture, le Ministère fédéral de l'Agriculture, et les SSTC (SPO).

SUMMARY

This article presents a synthesis of the various biological methods used to detect residues or contaminants in foods, by insisting on their evolution during these last 25 years and by illustrating with numerous examples. The biological methods are based on the detection of a biological effect of the analyte of interest. In the years 60-70, this effect was detected by means of histology. At present, the biological tests use cells in culture genetically modified to contain a reporter gene, activated when the analyte of interest is present in the culture medium.

BIBLIOGRAPHIE

- AARTS J.M.M.J.G., DENISON M.S., DE HAAN L.H.J., SCHALK J.A.C., COX M., BROUWER A. Ah receptor-mediated luciferase expression : a tool for monitoring dioxin-like toxicity. *Organohal. Compd.*, 1993, **13**, 361-364.
- CONSEIL DES COMMUNAUTÉS EUROPÉENNES Règlement (CEE) n°2377/90 du Conseil du 26 juin 1990 établissant une procédure communautaire pour la fixation des limites maximales de résidus de médicaments vétérinaires dans les aliments d'origine animale. *J. Off. Comm. Eur.*, 1990, **L 224**, 1.
- DANYI S., DEGAND G., GRANIER B., ELLIOTT C.T., MAGHUIN-ROGISTER G., SCIPPO M.-L. Development of non radioactive multi-analyte methods, based on the use of a recombinant human β_2 -adrenergic receptor, for the detection of β -agonists and antagonists residues in food-producing animals. In : Van Ginkel L.A., Bergwerff A.A. (Eds), Proceedings of the Euroresidue V Conference : conference of residues of veterinary drugs in foods, Noordijkerhout, The Netherlands, 10-12 May 2004, 159-164.
- DEGAND G., SCHMITZ P., MAGHUIN-ROGISTER G. Enzyme immunoassay screening procedure for the synthetic anabolic estrogens and androgens diethylstilbestrol, nortestosterone, methyltestosterone and trenbolone in bovine urine. *J. Chromatogr.*, 1989, **489**, 235-243.
- DEGAND G., BERNES-DUYCKAERTS A., DELAHAUT P., MAGHUIN-ROGISTER G. Determination of β -agonists in urine by an enzyme immunoassay based on the use of an anti-salbutamol antiserum. *Anal. Chim. Acta*,

- 1993, **275**, 241-247.
- DUCHATEL J.P., MAGHUIN-ROGISTER G. Free and conjugated zeranol residues determined by radio-immunoassay in urine and plasma of calves treated with Forplix. *Ann. Rech. Vet.*, 1985, **16**, 93-97.
- EVANS R. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science*, 1988, **240**, 889-895.
- EVRARD P., GASPAR P., MAGHUIN-ROGISTER G. A specific radioimmunoassay for the detection of 19-nortestosterone residues in urine and plasma of cattle. *J. Immunoassay*, 1986, **7**, 353-363.
- GASPAR P., MAGHUIN-ROGISTER G. Rapid extraction and purification of diethylstilboestrol in bovine urine hydrolysates using reversed-phase C18 columns before determination by radioimmunoassay. *J. Chromatogr.*, 1985, **328**, 413-416.
- GROOT M. Histological screening for illegal administration of growth promoting agents in veal calves (PhD Thesis). Universiteit Utrecht : Utrecht, 1992, 214 p.
- HELBO V., DEGAND G., DUYCKAERTS A., SCIPPO M.L., MAGHUIN-ROGISTER G. Development of a multiresidue screening method using receptors produced by genetic engineering for the detection of β adrenergic residues. In : Van Ginkel L.A., Bergwerff A.A. (Eds), Proceedings of the Euroresidue V Conference : conference of residues of veterinary drugs in foods, Noordijkerhout, The Netherlands, 10-12 May 2004, 537-541.
- JENSTER G., VAN DER KORPUT J.A., TRAPMAN J., BRINKMANN A.O. Functional domains of the human androgen receptor. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, 1992, **41**, 671-675.
- MINISTÈRE DE LA SANTÉ PUBLIQUE ET DE L'ENVIRONNEMENT Arrêté ministériel du 19 juin 1995 modifiant l'arrêté ministériel du 18 décembre 1973 déterminant les techniques de laboratoire pour la recherche des résidus de substance à effet bactériostatique. *Monit. Belg.*, 1995, 20368-20370.
- MURK A.J., LEGLER J., DENISON M.S., GIESY J.P., 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.
- NIELEN M.W.F., ELLIOTT C.T., BOYD S.A., COURTHEYN D., ESSERS M.L., HOOIJERINK H.H., VAN BENNEKOM E.O., FUCHS R. E.M. Identification of an unknown b-agonist in feed by liquid chromatography/bioassay/quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry with accurate mass measurement. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2003, **17**, 1633-1641.
- OKUYAMA A., HATANO Y. ELISA and EIA systems for the measurement of environmental pollutants. (2004) (en ligne) Adresse URL : http://www4.amershambiosciences.com/APTRIX/upp01077.nsf/Content/lsn_online_article_300104_c
- RENSON C., DEGAND G., MAGHUIN-ROGISTER G., DELAHAUT P. Determination of sulphamethazine in animal tissues by enzyme immunoassay. *Anal. Chim. Acta*, 1993, **275**, 323-328.
- SANDERSON J.T., AARTS J.M., BROUWER A., FROESE K.L., DENISON M.S., GIESY J.P. 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 hydrocarbons. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1996, **137**, 316-325.
- SCHILT R., GROOT M.J., BERENDE P.L.M., RAMAZZA V., OSSENKOPPELE J.S., HAASNOOT W., VAN BENNEKOM E.O., BROUWER L., HOOIJERINK H. Pour on application of growth promoters in veal calves : analytical and histological results. *Analyst*, 1998, **123**, 2665-2670.
- WU W.Z., LI W., SCHRAMM K.W., KETTRUP A. Evaluation of PCDD/F toxicity in fish livers from Ya-Er Lake, China : chemical analysis compared with *in vivo* and *in vitro* EROD bioassays. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 2001, **67**, 376-384.
- SCIPPO M.L., VAN DE WEERDT C., WILLEMSSEN P., FRANÇOIS J.M., RENTIER-DELRUE F., MULLER M., MARTIAL J.A., MAGHUIN-ROGISTER G. Detection of illegal growth promoters in biological samples using receptor binding assays. *Analytica Chimica Acta*, 2002, **473**, 135-141.
- SCIPPO M.L., ARGIRIS C., VAN DE WEERDT C., MULLER M., WILLEMSSEN P., MARTIAL J.A., MAGHUIN-ROGISTER G. Recombinant human estrogen, androgen and progesterone receptors for detection of potential endocrine disruptors. *Anal Bioanal Chem.* 2004 Feb;378(3):664-9.
- WILLEMSSEN P., SCIPPO M.L., MAGHUIN-ROGISTER G., MARTIAL JA, MULLER M. Use of specific bioluminescent cell lines for the detection of steroid hormone (ant)agonists in meat producing animals. *Analytica Chimica Acta*, Volume 473, Issues 1-2, 25 November 2002, Pages 119-126.
- WILLEMSSEN P., SCIPPO M.L., KAUSEL G., FIGUEROA J., MAGHUIN-ROGISTER G., MARTIAL J.A., MULLER M. Use of reporter cell lines for detection of endocrine-disrupter activity. *Anal Bioanal Chem.* 2004 Feb;378(3):655-63
- WILLEMSSEN P., SCIPPO M.L., MAGHUIN-ROGISTER G., MARTIAL J.A., MULLER M. Enhancement of steroid receptor-mediated transcription for the development of highly responsive bioassays. *Anal Bioanal Chem.* 2005 Jun;382(4):894-905.