

Études de toxicologie *in vivo*¹

L'évaluation des effets des substances ou produits chimiques sur le développement est réalisée à partir d'études expérimentales sur l'animal selon des protocoles standardisés. Les premiers tests standardisés ont été proposés par la FDA (*Food and Drug Administration*) en 1966 suite aux malformations congénitales initiées par la thalidomide. Ces premiers tests avaient pour but d'identifier les propriétés tératogènes des composés testés. Depuis, plusieurs organismes internationaux ont développé des tests standardisés (EPA, ICH, FDA, OCDE).

L'ICH (*International Conference for Harmonization*) et la FDA (*Food and Drug Administration*) établissent des protocoles pour évaluer les propriétés toxicologiques des médicaments. La FDA élabore également des tests pour les additifs et les colorants alimentaires.

L'EPA (*US Environmental Protection Agency*), l'EPA-OPPTS (*Office of Prevention, Pesticides and Toxic Guidelines*) et l'OCDE (*Organisation de Coopération et de Développement Économiques*) s'intéressent aux produits chimiques. De plus en plus, une harmonisation est en cours entre l'OCDE et l'EPA.

Un certain nombre d'auteurs ont tenté de valider les résultats expérimentaux obtenus chez l'animal par rapport aux données humaines, principalement avant les années 1980. Aucun n'a pu le faire de manière complète, cependant il est admis qu'un effet positif dans une étude *in vivo* de toxicité du développement est révélateur d'un effet possible chez l'humain (OCDE, 2008). La prédictivité exacte ne peut se faire qu'à partir d'un faisceau de résultats convergents à partir de diverses études, des différences entre espèces pouvant néanmoins persister.

Les lignes directrices de l'OCDE étant retenues par la réglementation européenne sur les produits chimiques, seules ces dernières méthodes seront présentées.

Méthodes OCDE

Les méthodes OCDE sont au nombre de 6 (plus une 7^e dont la validation est en cours) en ce qui concerne l'impact des produits chimiques sur la reproduction (tableau I).

33. Texte extrait de : INRS (dir. Lafon D.). Grossesse et travail. Quels sont les risques pour l'enfant à naître ? EDP Sciences, Collection Avis d'Expert, 2010 : 562 p

Le but de ces tests est de détecter un éventuel effet sur la reproduction. Pour cela, il est nécessaire d'étudier la toxicité de la substance à tous les stades du développement : de la conception à la maturation sexuelle.

On distingue donc plusieurs stades :

- avant accouplement jusqu'à la conception : fonction de reproduction chez le mâle et la femelle adulte, développement et maturation des gamètes, accouplement, fertilité ;
- conception jusqu'à l'implantation : fonctions de reproduction de la femelle adulte, développement pré-implantatoire, implantation ;
- implantation jusqu'à fermeture du palais : fonctions de reproduction de la femelle adulte, développement embryonnaire, formation des organes ;
- fermeture du palais jusqu'au terme de la grossesse : fonctions de reproduction de la femelle adulte, développement et croissance du fœtus, développement et croissance des organes ;
- naissance jusqu'au sevrage : fonctions de reproduction de la femelle adulte, adaptation des nouveau-nés à la vie extra-utérine, développement et croissance des nouveau-nés ;
- sevrage jusqu'à maturité sexuelle : développement et croissance après sevrage, adaptation à la vie indépendante, maturité sexuelle.

Tableau 1 : Lignes directrices OCDE pour l'étude de la toxicité de la reproduction

Ligne directrice 414	Étude de toxicité pour le développement prénatal
Ligne directrice 415	Étude de toxicité pour la reproduction sur une génération
Ligne directrice 416	Étude de toxicité pour la reproduction sur deux générations
Ligne directrice 421	Essai de dépistage de la toxicité pour la reproduction et le développement
Ligne directrice 422	Étude combinée de toxicité à doses répétées et de dépistage de la toxicité pour la reproduction et le développement
Ligne directrice 426	Étude de neurotoxicité pour le développement

Le lecteur pourra retrouver une description de ces différentes méthodes en annexe 3.

Il existe également des méthodes OCDE pour évaluer les risques des produits chimiques vis-à-vis des effets de perturbation endocrinienne. Quatre sont validées :

- Ligne directrice 407 : Toxicité orale pendant 28 jours sur les rongeurs (nouvelle méthode révisée qui inclut entre autres une évaluation de certains effets endocriniens) ;
- Ligne directrice 440 : Bio-essai utérotrophique chez les rongeurs : essai de dépistage à court terme des propriétés œstrogéniques ;
- Ligne directrice 441 : Bio-essai de Hershberger chez le rat : essai de dépistage à court terme de propriétés (anti)androgéniques ;

- Ligne directrice 455 : Essai d'activation transcriptionnelle faisant intervenir le récepteur d'œstrogène alpha humain hER α transfecté de façon stable pour la détection de l'activité œstrogénique agoniste des substances testées.

Ces lignes directrices ne seront pas décrites dans ce document.

Stratégie d'utilisation des tests

Diverses stratégies

Un certain nombre de stratégies d'utilisation de ces tests ont été proposées par diverses instances. Aux États-Unis, l'EPA a publié un guide pour l'évaluation des risques des substances vis-à-vis de la reprotoxicité (EPA, 1991). L'Union européenne a également publié un document (ECB, 2003). Il a été récemment remplacé par un nouveau texte dans le cadre de REACH (ECHA, 2008). L'OCDE propose de même un document de synthèse sur l'évaluation du risque toxique sur la reproduction (OCDE, 2008).

Du fait de ces implications réglementaires, seule la stratégie proposée par l'Union européenne sera présentée.

Stratégie de l'Union européenne

Objectif

L'objectif poursuivi par l'Union européenne est d'évaluer la toxicité sur la reproduction d'une substance chimique en couvrant tous les stades de la reproduction que ce soit la fonction et la capacité de reproduction chez l'homme et la femme, l'induction d'effets non héréditaires dans la descendance, tels que la mort, les retards de croissance, les effets structuraux ou fonctionnels.

Dans le document guide européen (ECB, 2003), les objectifs généraux des tests de toxicité sur la reproduction étaient d'établir :

- si une exposition humaine à une substance donnée avait été associée à des effets néfastes sur les fonctions ou les capacités de reproduction ;
- si dans des études animales, l'administration d'une substance à des mâles ou des femelles avant la conception et durant la grossesse ou la lactation entraîne des effets néfastes sur la fonction ou la capacité de reproduction ;
- si l'administration d'une substance chez l'animal avant ou après la naissance entraîne des effets néfastes non héréditaires sur la progéniture ;
- si la femelle gravide est potentiellement plus sensible à une toxicité générale ;
- s'il existe des relations doses-réponses pour tout type d'effets néfastes sur la reproduction.

Dans le cadre du règlement REACH, les objectifs ont été modifiés ; les alinéas 1, 4 et 5 sont globalement les mêmes, par contre les 2 et 3 sont remplacés par le suivant : « si sur la base d'informations autres que les données humaines, il peut être prédit que la substance entraînera une toxicité sur la reproduction chez l'être humain. ».

Cette phrase permet d'ouvrir les sources d'information à d'autres données que celles issues des études expérimentales sur l'animal. Dans tous les cas, l'objectif est bien de vérifier si des effets néfastes sont anticipés.

À noter que les substances mutagènes sur les cellules germinales (catégories 1 et 2) et cancérogènes génotoxiques (catégorie 3 mutagène et catégories 1 et 2 cancérogènes) ne sont généralement pas testées vis-à-vis de la reproduction. Elles sont considérées d'emblée comme potentiellement toxiques pour la reproduction. Une substance génotoxique sur les cellules germinales est en effet susceptible d'entraîner avortements, malformations et maladies héréditaires. De plus, on ne peut exclure qu'une substance génotoxique sur cellules somatiques puisse engendrer des cancers.

Données minimales requises

Afin de pouvoir correctement évaluer les propriétés dangereuses d'une substance, le TGD (*Technical Guidance Document*) préconisait de disposer au minimum de trois études :

- une étude sur deux générations (EU annexe V B 35 ou OCDE 416) ;
- une étude de toxicité sur le développement prénatal (tératogénicité) sur 2 espèces (EU annexe V B 31 ou OCDE 414).

Cette position était présentée dans la réglementation antérieure à REACH. Dans REACH, cette position n'apparaît plus clairement.

Dans la réglementation antérieure, il était cependant précisé que ces études pouvaient être réduites si l'on disposait de données le justifiant.

Les études pouvant être utilisées pour évaluer le potentiel toxique d'une substance sont listées dans les guides concernant la réglementation avant REACH (que nous appellerons ancienne réglementation) puis REACH (que nous appellerons nouvelle réglementation) ; dans la nouvelle réglementation apparaissent les SAR et les modèles R(Q)SA (relations structures activités quantitatives).

Évaluation d'une dose seuil

La toxicité pour la reproduction est généralement considérée comme un effet avec un effet seuil. Il est donc important de déterminer si possible une NOAEL (*No Observable Adverse Effect Level*), voire une LOAEL (*Lowest Observed Adverse Effect Level*) et de pouvoir calculer une *Benchmark dose* ou non.

Principes généraux

Le TGD proposait la démarche par étape suivante :

- commencer par collecter toute information sur les caractéristiques physico-chimiques de la substance, sa toxicocinétique et les informations sur des substances équivalentes (relations structure-activité) ;
- choisir les espèces animales à utiliser. En règle générale, le rat est l'espèce de premier choix pour les études sur deux générations. Les études sur la toxicité sur le développement sont généralement conduites sur le rat et le lapin du fait de l'importance des données disponibles sur ces deux espèces. On ne doit utiliser d'autres espèces que si des informations claires sur leur meilleure indication sont disponibles ;
- choisir la voie d'exposition en fonction des conditions d'exposition humaine, des caractéristiques physico-chimiques de la substance, de sa toxicité et des contraintes techniques du test. Idéalement, les données de toxicocinétique et de métabolisme devraient guider ce choix. En règle générale, la voie orale est largement utilisée sauf s'il est démontré qu'elle est inappropriée. Il est recommandé de ne pas utiliser la voie intrapéritonéale ni des voies parentérales. La voie dermique peut entraîner des effets de stress.

Le principe de base de cette stratégie est de fonctionner étape par étape en attendant les résultats de la première étude avant de commencer la seconde.

Il est recommandé que le premier des tests de reproduction effectué soit le test sur deux générations. Ce test devrait démarrer après une étude sub-chronique 90 jours afin de déterminer les doses à utiliser, et éventuellement orienter vers certains types de toxicité à étudier plus précisément ou des effets spécifiques comme la neurotoxicité. L'étude sur la toxicité du développement intervient ensuite et doit tenir compte des relations dose-réponse et de la toxicité maternelle. Il est préférable de commencer par le rat, espèce déjà utilisée dans l'étude sur deux générations. L'utilité de la deuxième étude sur le lapin est fonction des résultats de la première étude chez le rat.

REACH propose également un fonctionnement par étape. Dans l'étape 1, deux questions doivent être posées :

- la substance est-elle déjà classée toxique pour la reproduction (fertilité et développement : catégorie 1 ou 2 R60 et catégorie 1 ou 2 R61), ou mutagène catégorie 1, 2 ou 3, ou cancérigène catégorie 1 ou 2 (mais avec en sus une classification mutagène catégorie 3) ?
- la substance est-elle peu toxique, son absorption systémique est-elle négligeable et l'exposition humaine nulle ou non significative ?

Si la réponse est positive à une de ces questions, aucun test spécifique pour la reproduction n'est généralement exigé.

L'étape 2 s'applique à partir d'un tonnage mis sur le marché supérieur à 10 tonnes par an : recueillir l'ensemble des données toxicologiques disponibles afin de décider si la substance ne présente pas de danger pour la reproduction ou que des données supplémentaires ne permettraient pas de

changer une classification catégorie 3. Si les données sont insuffisantes ou s'il existe des signaux d'alerte, les questions suivantes vont se poser :

- Y a-t-il des signaux d'alerte de toxicité pour la reproduction ?
- Les données sont-elles suffisantes et adéquates pour évaluer la classification, l'étiquetage et le risque ou des tests complémentaires sont-ils nécessaires ?
- Si non, quels tests supplémentaires sont nécessaires ?

L'étape 3 consistera à réaliser les tests spécifiques chez l'animal pour répondre à ces questions.

Les 4 tests qui permettent de faire une évaluation robuste sont : OCDE 421 ou 422 ; OCDE 414 ; OCDE 416.

Il n'est cependant pas toujours nécessaire de réaliser les 4. Les tests demandés sont fonction du tonnage tel que retranscrit dans le tableau II.

Niveau de dose

La dose maximale administrée ne doit pas excéder 1 000 mg/kg/j. Elle doit entraîner si possible une légère toxicité chez les parents, notamment une légère perte de poids mais ne pas entraîner plus de 10 % de mort maternelle (il est recommandé qu'il n'y ait pas de mort maternelle). Les doses les plus faibles doivent être choisies avec l'objectif de pouvoir établir une relation dose-réponse et un niveau sans effet.

Claire Beausoleil

Anses³⁴, Unité Toxicologie / Direction Santé Environnement Travail

Tableau II : Obligations de tests vis-à-vis de la reproduction selon REACH et l'ancienne réglementation sur les substances nouvelles

REACH					Ancienne réglementation sur les substances nouvelles
Substances fabriquées ou importées en quantités :	Tests exigés vis-à-vis de la toxicité pour la reproduction	Conditions d'exonération de ces tests	Règles spécifiques	Délais d'enregistrement	Tests exigés vis-à-vis de la toxicité pour la reproduction
<1 tonne	Aucun		Procédure d'autorisation ou de restriction possible si substance connue comme étant CMR catégorie 1 ou 2, PBT (Persistantes, Bioaccumulables et Toxiques) ou vPvB (Très persistantes, très bioaccumulables)	Pas d'enregistrement	Aucun
≥1 tonne	Aucun		Cette annexe ne s'applique pas aux substances mises sur le marché entre 1 et 10 tonnes par an et ayant déjà été mises sur le marché (en quelque quantité que ce soit) avant 1981 (soit 100 204 substances), et possédant un numéro EINECS ou mises sur le marché après 1981 et retirées depuis le 1^{er} juin 1992. Elle ne s'applique pas non plus aux substances pour lesquelles sur la base de modèles RQ(S)A ou par d'autres moyens une classification CMR catégorie 1 ou 2, PBT ou vPvB ne peut être anticipée. Pour ces substances, il y a uniquement obligation de fournir toute autre information disponible pertinente d'ordre toxicologique, écotoxicologique et physico-chimique. Elle s'appliquerait donc, pour les substances chimiques, uniquement aux substances mises sur le marché depuis 1981 (soit 4 381 substances) (sauf si retirée du marché depuis le 1^{er} juin 1992) avec un tonnage supérieur à 10 tonnes et aux substances nouvellement mises sur le marché avec un tonnage compris entre 1 et 10 tonnes par an et non considérées comme notifiées conformément à l'article 8, paragraphe 1, premier tiret, de la directive 67/548/CEE.	1 ^{er} juin 2018	Évaluation de la reprotoxicité sur des critères particuliers

REACH					Ancienne réglementation sur les substances nouvelles
Substances fabriquées ou importées en quantités :	Tests exigés vis-à-vis de la toxicité pour la reproduction	Conditions d'exonération de ces tests	Règles spécifiques	Délais d'enregistrement	Tests exigés vis-à-vis de la toxicité pour la reproduction
≥ 10 tonnes	En cas d'absence de signal d'alerte (sur la base d'analogie de structure, d'estimations R(Q)SA ou de méthodes <i>in vitro</i>), faire un test de dépistage (OCDE 421 ou 422).	- Cancérogène génotoxique et mesures appropriées de gestion des risques mises en œuvre - Mutagène sur cellules germinales et mesures appropriées de gestion des risques mises en œuvre - Si une exposition humaine peut être exclue - Étude de toxicité disponible au stade du développement prénatal ou pour la reproduction sur deux générations	Dans les cas où les effets nocifs potentiels sur la fertilité ou le développement suscitent de sérieuses préoccupations, le déclarant peut proposer de remplacer l'étude de dépistage par une étude de toxicité sur le développement prénatal ou une étude de toxicité pour la reproduction sur deux générations. Si une substance est connue pour avoir des effets néfastes sur la fertilité, répond aux critères de classification des catégories 1 ou 2 pour la classe R60, et que les données disponibles conviennent à une évaluation robuste des risques, il ne sera pas nécessaire de procéder à d'autres essais en matière de fertilité. Il faut, toutefois, envisager des essais portant sur la toxicité au stade du développement. Si une substance est connue pour être à l'origine d'une toxicité sur le développement, répond aux critères de classification des catégories 1 ou 2 pour la classe R61, et que les données disponibles conviennent à une solide évaluation des risques, il ne sera pas nécessaire de procéder à d'autres essais en matière de toxicité au stade du développement. Il faudra toutefois envisager des essais concernant les effets sur la fertilité.	1 ^{er} juin 2018	Si les risques de la substance le justifient

REACH					Ancienne réglementation sur les substances nouvelles
Substances fabriquées ou importées en quantités :	Tests exigés vis-à-vis de la toxicité pour la reproduction	Conditions d'exonération de ces tests	Règles spécifiques	Délais d'enregistrement	Tests exigés vis-à-vis de la toxicité pour la reproduction
≥ 100 tonnes	Étude de toxicité sur le développement prénatal, une espèce, voie d'administration la plus appropriée, compte tenu de la voie probable de l'exposition humaine Étude de toxicité pour la reproduction sur deux générations, une seule espèce, mâle et femelle, voie d'administration la plus appropriée, compte tenu de la voie probable de l'exposition humaine, si l'étude de 28 jours ou de 90 jours fait apparaître des effets nocifs sur les organes ou les tissus reproductifs.	- Cancérogène génotoxique et mesures appropriées de gestion des risques sont mises en œuvre - Mutagène sur cellules germinales et mesures appropriées de gestion des risques mises en œuvre - Si la substance a une faible activité toxicologique (si aucun des tests disponibles n'a fourni de preuves de toxicité), si des données toxicocinétiques permettent de prouver qu'aucune absorption systémique ne se produit par les voies d'exposition prises en considération (par exemple : concentrations plasma/sang inférieures à la limite de détection en cas d'utilisation d'une méthode sensible, et absence de la substance et de métabolites de la substance dans l'urine, la bile ou l'air exhalé), et s'il n'y a pas d'exposition humaine ou pas d'exposition humaine importante.	L'étude est effectuée initialement sur une espèce. En fonction du résultat du premier essai et de toutes les autres données pertinentes disponibles, il peut être décidé d'effectuer une étude sur une deuxième espèce à ce niveau de quantité ou au suivant.	1 ^{er} juin 2013	- Étude de tératogénèse : 1 espèce. En cas de résultats douteux, une étude sur deux générations est nécessaire. - Étude de fertilité : 1 espèce, 1 génération

REACH					Ancienne réglementation sur les substances nouvelles
Substances fabriquées ou importées en quantités :	Tests exigés vis-à-vis de la toxicité pour la reproduction	Conditions d'exonération de ces tests	Règles spécifiques	Délais d'enregistrement	Tests exigés vis-à-vis de la toxicité pour la reproduction
≥ 1 000 tonnes	Étude de toxicité au stade du développement, une espèce, voie d'administration la plus appropriée, compte tenu de la voie probable de l'exposition humaine (OCDE 414) Étude de toxicité pour la reproduction sur deux générations, une seule espèce, mâle et femelle, voie d'administration la plus appropriée, compte tenu de la voie probable de l'exposition humaine, sauf si ces données sont déjà fournies en vertu des prescriptions de l'annexe IX.	- Cancérogène génotoxique et mesures appropriées de gestion des risques mises en œuvre - Mutagène sur cellules germinales et mesures appropriées de gestion des risques mises en œuvre - Si la substance a une faible activité toxicologique (si aucun des tests disponibles n'a fourni de preuves de toxicité), si des données toxicocinétiques permettent de prouver qu'aucune absorption systémique ne se produit par les voies d'exposition prises en considération (par exemple : concentrations plasma/sang inférieures à la limite de détection en cas d'utilisation d'une méthode sensible, et absence de la substance et de métabolites de la substance dans l'urine, la bile ou l'air exhalé), et s'il n'y a pas d'exposition humaine ou pas d'exposition humaine importante.	Si une substance est connue pour avoir des effets néfastes sur la fertilité, répond aux critères de classification des catégories 1 ou 2 pour la classe R60, et que les données disponibles conviennent à une évaluation robuste des risques, il ne sera pas nécessaire de procéder à d'autres essais en matière de fertilité. Il faudra toutefois envisager des essais portant sur la toxicité sur le développement. Si une substance est connue pour être à l'origine de toxicité sur le développement, répond aux critères de classification des catégories 1 ou 2 pour la classe R61, et que les données disponibles conviennent à une évaluation robuste des risques, il ne sera pas nécessaire de procéder à d'autres essais en matière de toxicité sur le développement. Il faudra, toutefois, envisager des essais concernant les effets sur la fertilité.	1 ^{er} décembre 2010	- Étude de toxicité liée au développement concernant les effets péri-et postnataux - Étude de tératogénèse (autre espèce) - Étude de fertilité (étude sur 2 générations) : seulement si un effet sur la fertilité a été constaté précédemment.

BIBLIOGRAPHIE

ECB (EUROPEAN CHEMICALS BUREAU). Technical Guidance Document on Risk Assessment in support of Commission Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for new notified substances. Commission Regulation (EC) No 1488/94 on Risk Assessment for existing substances. Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council concerning the placing of biocidal products on the market. Part 1. EUR 20418 EN/1. Luxembourg : Office for Official Publications of the European Communities. 2003, 311p

ECHA (EUROPEAN CHEMICALS AGENCY). Guidance on information requirements and chemical safety assessment. Chapter R.7a. Endpoint specific guidance. Guidance for the implementation of REACH. Helsinki. 2008, 428p

EPA (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY). Environmental Protection Agency Guidelines for Developmental Toxicity Risk Assessment. EPA/600/FR-91/001. Washington DC. 1991, 83p

OECD (ORGANISATION DE COOPÉRATION ET DE DÉVELOPPEMENT ÉCONOMIQUES). Organisation for Economic Co-operation and Development. Guidance document on mammalian reproductive toxicity testing and assessment. OECD Environment, Health and safety Publications. Series on Testing and Assessment N° 43. Paris. 2008, 88p