
Document de Référence

pour

**La construction d'une valeur toxicologique de référence fondée
sur des effets reprotoxiques**

RAPPORT

Du Groupe d'Experts « VTR reprotoxiques »

Décembre 2006

GROUPE D'EXPERTS

Organismes

- AFSSA représentée par M. Sébastien GARRY, unité d'évaluation des risques physico-chimiques ;
M. François BORDET, analyste et physicochimiste, unité toxines, polluants organiques et pesticides, laboratoire d'études et de recherche sur la qualité des aliments et sur les procédés agro-alimentaires ;
- CAP-TV représentés par M. Robert GARNIER, toxicologue, centre antipoison de Paris ;
- CNAM représenté par M. Maurice RABACHE, toxicochimiste, laboratoire de biologie ;
M. André PICOT, Directeur de recherche honoraire ;
- ENSP représentée par M. Denis BARD, épidémiologiste et évaluateur de risques ;
- INERIS représenté par Mme Blandine DOORNAERT, toxicologue, unité d'expertise toxicologique des substances chimiques ;
- INRS représenté par M. Dominique LAFON, toxicologue, département études et assistance médicales ;
- INSERM représenté par M. Luc MULTIGNER, épidémiologiste, U625, groupe d'études sur la reproduction de l'homme et des mammifères ;
- InVS représenté par M. Frédéric DOR, évaluateur de risques, département santé environnement ;
M. Pascal EMPEREUR-BISSONNET, évaluateur de risque, département santé environnement ;
- UIC représenté par M. Patrick LEVY, toxicologue, médecin conseil de l'union des industries chimiques.

Coordination scientifique

Mme Nathalie BONVALLOT – Afsset

Appui scientifique de l'Afsset et participation à la rédaction

Mme Nathalie BONVALLOT, toxicologue

M. Cédric Duboudin, statisticien

Mme Cécilia SOLAL, toxicologue

Prestations pour la phase de test

Mme Dominique Parent-Massin et M. Bertrand Jehannin, Université de Bretagne Occidentale, laboratoire de toxicologie alimentaire, Brest.

M. Vincent Nedellec, Vincent Nedellec Consultants (VNC), Paris.

Mmes Blandine Doornaert et Michèle Bisson, INERIS, direction des risques chroniques, expertise toxicologique des substances chimiques, Verneuil en Halatte.

Secrétariat administratif de l'Afsset

Mme Séverine BOIX

Mme Romy COLLET

ADOPTION DU RAPPORT

Le rapport a été approuvé par les membres du groupe de travail le 13 novembre 2006.

Ce rapport a été soumis au CES « Substances Chimiques » le 29 septembre 2006 et adopté le 1^{er} décembre 2006.

PREAMBULE

Ce document a été rédigé dans le cadre du groupe de travail « VTR & reprotoxicité » coordonné par l'Afsset et composé d'experts appartenant aux principaux organismes français ayant compétence d'expertise et de veille en sécurité sanitaire, mettant en œuvre ou enseignant la démarche de l'évaluation quantitative du risque sanitaire (Afssa, CAP/TV, Cnam, ENSP, Ineris, INRS, Inserm, InVS, UIC¹). Il vise à organiser les connaissances scientifiques nécessaires aux choix argumentés qui sont faits lors de la construction de valeurs toxicologiques de référence fondées sur les effets sur la reproduction et le développement, qui seront appelées dans la suite du document « VTR reprotoxiques ».

Il est destiné aux experts compétents dans les domaines de la toxicologie, de la biologie de la reproduction et du développement, de l'épidémiologie et des biostatistiques, qui auront la tâche de constituer un document de synthèse en vue de la construction d'une VTR reprotoxique.

Ce document méthodologique est provisoire. Dans la mesure où les connaissances évoluent et où la possibilité de construire des VTR entraîne l'acquisition d'une expérience, il sera amélioré au vu des nouveaux éléments portés à la connaissance de la communauté scientifique. Il a déjà bénéficié d'un premier retour d'expérience qui a consisté à tester la méthode proposée sur six substances possédant ou non des VTR.

Ce document détaille la méthode d'élaboration de VTR fondées sur des effets reprotoxiques, quand bien même une VTR numériquement plus faible existe ou pourrait être développée sur des effets non reprotoxiques. La construction d'une VTR pour un effet spécifique reprotoxique se justifie par :

- la mise en évidence d'effets sur le développement survenant pour des durées d'exposition particulières (fenêtre d'exposition courtes) ;
- la nécessité de disposer d'une réponse spécifique aux effets reprotoxiques dans le cadre de la protection de la santé publique.

¹ Afssa : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments ; CAP/TV : Centres Anti-poison et de Toxicovigilance ; Cnam : Conservatoire National des Arts et Métiers ; CNRS : Centre National de la Recherche Scientifique ; ENSP : Ecole Nationale de la Santé Publique ; Ineris : Institut National de l'environnement et des risques industriels ; INRS : Institut National de Recherche et de Sécurité ; Inserm : Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale ; InVS : Institut de Veille Sanitaire ; UIC : Union des Industries Chimiques.

Ce rapport est découpé en plusieurs parties : la première, comprenant les chapitres 1 à 4, est destinée à expliciter la méthode de construction des VTR reprotoxiques telle qu'elle existe aujourd'hui, à en explorer les termes et les démarches sous-jacentes, et à identifier l'ensemble des éléments utiles à l'organisation des connaissances et à la construction de VTR. Cette partie regroupe ainsi un chapitre sur les postulats identifiés dans la construction d'une VTR reprotoxique (chapitre 1), un chapitre sur la définition des effets néfastes reprotoxiques (chapitre 2), deux chapitres sur l'analyse de la qualité des études épidémiologiques et toxicologiques, et des données complémentaires (chapitres 3 et 4).

La seconde partie, comprenant le chapitre 5, est destinée à organiser les connaissances de la meilleure façon afin de retirer tous les éléments nécessaires à la construction d'une VTR reprotoxique. Elle est organisée à la façon d'un « cahier des charges » qui s'appuie sur les éléments de connaissances de la première partie.

Enfin, la troisième partie, au chapitre 6, explicite les choix à faire pour la construction de la VTR reprotoxique. Cette phase de la démarche nécessite une expertise collégiale qui s'appuie sur les éléments fournis au chapitre 5.

SOMMAIRE

LISTE DES TABLEAUX.....	VIII
LISTE DES FIGURES.....	VIII
CONTEXTE.....	1
ACRONYMES.....	3
GLOSSAIRE.....	5
INTRODUCTION.....	7
1. POSTULATS DANS LA CONSTRUCTION D'UNE VTR REPROTOXIQUES.....	9
1.1. Relation dose – effet et dose – réponse.....	9
1.2. Effets à seuil de dose.....	9
1.3. Transposition de l'animal à l'homme.....	9
1.4. Durée et période d'exposition : validité de la VTR.....	10
2. EFFETS NEFASTES REPROTOXIQUES A PRENDRE EN COMPTE.....	12
2.1. Définition des effets reprotoxiques.....	12
2.1.1. Effets sur la reproduction.....	12
2.1.1.1. Effets sur la reproduction masculine.....	12
2.1.1.2. Effets sur la reproduction féminine.....	12
2.1.2. Effets sur le développement.....	13
2.1.2.1. Malformations.....	13
2.1.2.2. Altérations de la croissance.....	13
2.1.2.3. Déficiences fonctionnelles.....	13
2.2. Evaluation des effets néfastes.....	14
2.3. Choix des effets critiques reprotoxiques.....	14
3. EVALUATION DE LA QUALITE DES ETUDES : CHOIX POUR LA CONSTRUCTION D'UNE VTR REPROTOXIQUE.....	15
3.1. Qualité des études chez l'homme.....	15
3.1.1. Apport de l'épidémiologie dans l'étude des relations dose – réponse.....	15
3.1.2. Critères de qualité à prendre en compte.....	16
3.1.2.1. Mesures des expositions.....	16
3.1.2.2. Choix de l'effet analysé.....	17
3.1.2.3. Puissance.....	17
3.1.2.4. Prise en compte des biais, des facteurs de confusion et d'interaction.....	17
3.1.2.5. Existence ou suspicion d'un lien causal entre l'exposition et l'effet.....	18
3.2. Qualité des études chez l'animal.....	19
3.2.1. Bonnes pratiques de laboratoire.....	19
3.2.2. Lignes directrices de l'OCDE établies pour les effets reprotoxiques.....	20
3.2.2.1. Effets sur la reproduction.....	20
3.2.2.2. Effets sur le développement.....	21
3.2.2.3. Effets sur la reproduction et le développement.....	22
3.2.2.4. Autres effets.....	23
3.2.3. Aide à l'évaluation de la qualité des études ne suivant pas les protocoles standardisés.....	23
3.3. Effectuer le choix de l'étude.....	26
4. DONNEES COMPLEMENTAIRES.....	27
4.1. Etudes de toxicocinétique.....	27
4.1.1. Etudes chez l'animal.....	27
4.1.2. Etudes chez l'homme.....	28
4.1.3. Modèles mathématiques.....	28
4.2. Autres données.....	29

4.2.1.	Etudes à doses répétées	29
4.2.2.	Etudes <i>in vitro</i>	29
4.2.3.	Cas particulier des perturbateurs endocriniens	29
4.2.4.	Propriétés physico-chimiques	30
4.2.5.	Relations structure – activité	30
5.	ORGANISATION DES CONNAISSANCES : LE PROFIL TOXICOLOGIQUE	31
5.1.	Informations générales	31
5.2.	Toxicité sur la reproduction et le développement	36
5.3.	Mécanismes d'action proposés	40
5.4.	Analyse de la cohérence des données animales et humaines	40
5.5.	Discussion	41
6.	CONSTRUCTION DE LA VTR REPROTOXIQUE	42
6.1.	Choix de la dose critique	42
6.1.1.	Identification et construction des doses repères	42
6.1.1.1.	LOAEL / NOAEL	42
6.1.1.2.	MAXSD	45
6.1.1.3.	Benchmark dose	46
6.1.2.	Retour d'expérience de l'étude de faisabilité	54
6.1.3.	Présentation des doses repères	57
6.2.	Choix des facteurs d'incertitude	58
6.2.1.	Les facteurs proposés dans les ouvrages de référence	59
6.2.1.1.	Facteurs d'incertitude lié à la variabilité inter-espèces	59
6.2.1.2.	Facteur d'incertitude lié à la variabilité inter-individuelle	61
6.2.1.3.	Facteur d'incertitude lié à l'usage d'un LOAEL ou d'une BMD / BMC	65
6.2.1.4.	Facteur d'incertitude lié à une transposition subchronique à chronique	65
6.2.1.5.	Autres facteurs d'incertitude	66
6.2.2.	Recommandations pour les facteurs d'incertitude à appliquer	67
6.2.2.1.	Facteurs d'incertitude lié à la variabilité inter-espèces	67
6.2.2.2.	Facteur d'incertitude lié à la variabilité inter-individuelle	67
6.2.2.3.	Facteur d'incertitude lié à l'usage d'un LOAEL ou d'une BMD / BMC	67
6.2.2.4.	Facteur d'incertitude lié à une transposition subchronique à chronique	68
6.2.2.5.	Autres facteurs d'incertitude	68
6.2.2.6.	Bilan des UF	69
	CONCLUSION	71
	PERSPECTIVES DE RECHERCHE	72
	ACCOMPAGNEMENT OPERATIONNEL	74
	RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	75

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Application des différents types d'études en épidémiologie	16
Tableau II : Critères pour la cotation de Klimisch (1997)	25
Tableau IIIa : Exemple de tableau récapitulatif des VTR proposées dans les bases de données.....	35
Tableau IIIb : Exemple de tableau récapitulatif des études épidémiologiques.....	39
Tableau IIIc : Exemple de tableau récapitulatif des couples NOAEL / LOAEL proposés dans la littérature analysée.....	39
Tableau IV : Hypothèses testées contre réalité et probabilités associées	43
Tableau V : Hypothèses testées et risques associés pour le calcul d'une MAXSD	45
Tableau VI : Etudes utilisées pour tester l'approche BMD	55
Tableau VII : Facteurs d'incertitude proposés dans la littérature pour la construction de VTR.....	58
Tableau VIII : Valeurs d'UF _A proposées en théorie dans les documents guides	60
Tableau IX : Valeurs d'UF _A utilisées en pratique.....	61
Tableau X : Valeurs d'UF _H proposées dans les documents guides et utilisées en pratique	64
Tableau XI : Valeurs des facteurs d'incertitude à appliquer pour la construction de la VTR reprotoxique	69

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Relation dose – réponse et recherche du LOAEL.....	42
Figure 2 : Relation dose – réponse et définition de la BMD	46
Figure 3 : Relation dose – réponse sur données quantales.....	50
Figure 4 : Relation dose – réponse et définition de la BMDL	53

CONTEXTE

En 2002, un groupe d'experts du Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France (CSHPF) a conduit une évaluation quantitative des risques sanitaires liés à l'exposition de la population aux éthers de glycol au travers des produits de consommation². Au terme de cette démarche, le groupe précisait notamment que la recherche de valeurs toxicologiques de référence (VTR) pour les effets sur la reproduction et le développement embryofœtal avait été peu fructueuse. D'une manière générale, peu de VTR pour ces effets sont proposées, même lorsque des informations scientifiques sont disponibles. Ce travail a montré combien devait être soignée la démarche de caractérisation des dangers, exercice qui exige une analyse critique approfondie de l'ensemble de la littérature scientifique, et l'adoption de règles de jugement claires et explicites. Il s'agit là d'un domaine de toxicologie qui doit être développé en priorité. La mise en lumière de ces difficultés d'ordre scientifique a conduit le groupe d'experts mis en place à envisager une réflexion sur les VTR au sein des instances nationales compétentes. Par ailleurs, le CSHPF, dans son avis du 7 novembre 2002, précisait que d'importantes améliorations devaient être apportées au dispositif d'évaluation des risques liés aux substances chimiques et insistait sur l'urgence d'organiser et de renforcer en France l'expertise dans ce domaine, celle-ci devant pouvoir bénéficier de l'appui scientifique et technique d'une instance publique spécialisée³.

La connaissance des méthodes de construction des valeurs toxicologiques de référence (VTR)⁴ permet aujourd'hui d'avoir un avis plus éclairé sur l'utilisation de la toxicologie au sein de la démarche d'évaluation des risques sanitaires. L'élaboration des VTR suit une démarche très structurée et exigeante qui implique des évaluations collectives par des groupes de spécialistes. C'est une procédure lourde, aux conséquences majeures en terme de gestion des risques.

L'Afsset a pour mission de contribuer à assurer la sécurité sanitaire dans le domaine de l'environnement, notamment en mobilisant l'expertise scientifique et technique nécessaire à l'évaluation du risque. La qualité de cette expertise nécessite la production continue de connaissances et de développements méthodologiques variés recouvrant de nombreux champs de compétences scientifiques. Par ailleurs, le développement d'outils pour mieux évaluer les risques sanitaires des substances chimiques ou biologiques fait partie des actions du plan national santé environnement (PNSE) 2004-2008 (action n°21).

² Les éthers de glycols dans les produits de consommation et la santé. Groupe d'experts du CSHPF, section des milieux de vie. Rapport d'avancement au Directeur Général de la Santé. 21 juin 2002.

³ Avis du Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France relatif aux éthers de glycol dans les produits de consommation. Section des milieux de vie. Séance du 7 novembre 2002. <http://www.sante.gouv.fr/>

⁴ Bonvallot N, Dor F. Valeurs toxicologiques de référence : Méthodes d'élaboration. InVS. 2002. 84p.

Ainsi, en accord avec le plan national santé environnement, l'Afsset a proposé, dans le cadre de ses missions⁵ et dans un souci de transparence et de cohérence, d'établir un programme national sur les VTR visant à la constitution d'une expertise française solide et partagée par les différentes instances compétentes. L'Afsset a donc proposé à ses partenaires d'initier cette réflexion par la mise en place d'un groupe de travail regroupant l'Ineris, l'INRS, l'Afssa, l'InVS, l'ENSP, le Cnam, l'Inserm, le CNRS, les CAP-TV et l'UIC. Le très vaste domaine que recouvre la notion de VTR a contraint l'Afsset à déterminer une priorité d'action. Conformément à la demande originelle du CSHPF, et compte tenu des préoccupations nationales et internationales actuelles, le domaine des substances chimiques toxiques sur la reproduction et le développement embryofœtal dans les milieux de vie a été proposé. Cette réflexion, qui s'inscrit dans le paysage européen, vise principalement à porter un regard critique et constructif sur le choix et la construction de VTR pour les substances chimiques reprotoxiques préoccupantes. Elle a pour vocation, à plus long terme, de s'intégrer dans le dispositif de santé publique (proposition de valeurs guides de qualité des milieux, etc.).

Après une analyse de la littérature internationale sur les VTR et une revue critique des effets sur la reproduction et le développement, une approche générale d'élaboration de VTR reprotoxiques a été définie, suivie d'une phase pilote de test ayant pour objectif de s'assurer que la méthode proposée, en l'état, est adaptée pour la construction de VTR reprotoxique et de réaliser un premier retour d'expérience pratique. Pour cette étape, des équipes scientifiques pluridisciplinaires ont construit, sur la base de la méthode proposée, des VTR reprotoxiques pour six substances (le 2-éthoxyéthanol, le linuron, le di-n-butylphtalate, le benzylbutylphtalate, le nonylphénol, le toluène). Les résultats de cette phase pilote sont détaillées dans les annexes 2 et 3.

Parallèlement, un groupe de travail intitulé « VTR Cancer » a été mis en place. Les réflexions issues de ces deux groupes ont permis un enrichissement mutuel des travaux réalisés.

⁵ Rassembler les informations scientifiques pertinentes en évaluation des risques sanitaires *par ses moyens propres ou ceux de ses partenaires* ; informer, former et diffuser l'information scientifique ; encourager et s'assurer de la coordination de la production de connaissances dans le domaine de la santé environnementale.

ACRONYMES

ADELFF : Association des Epidémiologistes de Langue Française.

ADME : Absorption, Distribution, Métabolisation, Elimination.

AFNOR : Association Française de Normalisation et de Certification.

ATSDR : Agency for Toxic Substances and Disease Registry.

BMD : BenchMark Dose.

BMDxLy : Limite inférieure de l'intervalle de confiance à y % de la dose correspondant à un niveau de réponse de x %.

BMR : BenchMark Response.

BUA : Beratergremium für Umweltrelevante Altstoffe (Advisory Committee on Existing Chemicals of Environmental Relevance, German Chemical Society).

CERHR : Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction.

DART : Developmental and Reproductive Database.

DIN : Deutsches Institut für Normung (Institut allemand pour la normalisation, Allemagne).

EC : European Commission.

ECB : European Chemical Bureau.

ECETOC : European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals.

EQRS : Evaluation Quantitative des Risques Sanitaires.

FDA : Food and Drug Administration (Etats-Unis).

GEE : Generalized Estimating Equations.

HAP : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques.

HSDB : Hazardous Substances DataBank.

IARC : International Agency for Research on Cancer.

ICH : International Conference on Harmonisation.

IEH : Institute of Environmental Health (Medical Research Council, UK).

IPCS : International Programme on Chemical Safety.

IRIS : Integrated Risk Information System.

JECFA : Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives.

JMPR : Joint Meeting on Pesticide Residues.

LOAEL : Lowest Observed Adverse Effect Level (Dose minimale entraînant un effet néfaste observé).

MAXSD : MAXimum Safety Dose.

NCEA : National Center for Environmental Assessment (US EPA).

NIESH : National Institute of Environmental Health Sciences.

NOAEL : No Observed Adverse Effect Level (Dose maximale sans effet néfaste observé).

NTP : National Toxicology Programme.

OCDE : Organisation de Coopération et de Développement Economique.

OEHHA : Office of Environmental Health Hazard Assessment (EPA California).

OMS : Organisation Mondiale de la Santé.

PBPK : Physiologically-Based Pharmacokinetic.

PCB : PolyChloroBiphénylÉthers.

REACH : Registration, Evaluation and Authorization of Chemicals.

TGD : Technical Guidance Document.

UF : Uncertainty Factors (facteurs d'incertitude, autrement dénommés FS pour facteurs de sécurité).

US EPA : United State Environmental Protection Agency.

VTR : Valeur Toxicologique de Référence.

GLOSSAIRE

BMD (Benchmark Dose) : dose correspondant à un niveau de réponse fixé a priori (généralement 1, 5 ou 10 %), calculée à partir de la relation dose – réponse chez l'animal ou l'homme.

BMDL : limite inférieure de l'intervalle de confiance généralement à 95 % de la BMD.

BMR (Benchmark Response) : niveau de réponse associé à la Benchmark dose.

Doses repères : les doses repères correspondent aux différents niveaux de toxicité définis dans les expérimentations animales, tels que les NOAEL, LOAEL, BMD, BMDL ou MAXSD.

Dose critique : la dose critique est définie comme la dose repère retenue pour la construction de la VTR.

Effet critique : effet néfaste observé, choisi pour définir la dose critique.

Effet néfaste : tout changement dans la morphologie, la physiologie, la croissance, le développement ou la durée de vie d'un organisme, résultant soit d'une détérioration de la capacité fonctionnelle ou de la capacité à compenser un stress additionnel, soit d'une augmentation de sensibilité.

Facteurs d'incertitude : nom générique donné par le groupe de travail aux facteurs appliqués à la dose critique lors de la construction d'une VTR à seuil. Ils correspondent aux facteurs utilisés pour tenir compte d'une part de la variabilité dans les transpositions intra- et inter-espèces et d'autre part des incertitudes dans les bases de données toxicologiques. Ces facteurs sont autrement dénommés « facteurs de sécurité ».

LOAEL (Lowest Observed Adverse Effect Level) : dose minimale entraînant un effet considéré comme néfaste statistiquement significatif par rapport au témoin.

MAXSD (Maximum Safe Dose) : dose maximale n'entraînant pas un effet supérieur à un seuil fixé par rapport au témoin.

NOAEL (No Observed Adverse Effect Level) : dose maximale n'entraînant pas d'effet néfaste statistiquement significatif par rapport au témoin, issue de l'identification du LOAEL. Autrement dit, c'est la dose testée qui précède directement le LOAEL.

Parturition : action, fait d'accoucher, de mettre bas (expression fréquemment utilisée pour les animaux de laboratoire dans les lignes directrices pour les essais de toxicité).

Relation dose – effet : relation entre la quantité totale d'une substance administrée, reçue ou absorbée par un organisme, système biologique ou (sous-)population et l'amplitude d'un effet toxique observé (intensité et durée de l'effet).

Relation dose – réponse : relation entre la quantité totale de substance administrée, reçue ou absorbée par un organisme, système biologique ou (sous-)population et l'incidence ou la fréquence d'un effet toxique observé. L'identification de la relation dose – réponse constitue l'une des étapes – clés de l'évaluation de risques (caractérisation du danger).

Réponse continue : mesure quantitative d'un effet observé sur un organisme dans un test toxicologique. Il s'agit souvent d'un indicateur biologique ou d'une variation morphologique d'un organe.

Réponse quantale : réponse dichotomique de type « présence » ou « absence » d'effet dans un test toxicologique, ou réponse qualitative ordonnée (dénombrement en classe de type sévérité forte, modérée ou faible). Ce type de réponse est utilisé lorsque l'effet considéré n'est pas observé dans des conditions de non exposition. Elle est décrite par une variable discrète.

Transposabilité : il s'agit de la possibilité de transposer des données animales à des données humaines.

VTR (Valeurs toxicologiques de référence) : valeurs établies par des instances nationales ou internationales, caractérisant le lien entre une exposition à une substance toxique et l'occurrence d'un effet néfaste observé.

INTRODUCTION

Les valeurs toxicologiques de référence (VTR) sont des valeurs permettant d'établir une relation quantitative et qualitative entre une exposition à une substance chimique et un effet sanitaire chez l'homme. Elles sont spécifiques d'une substance, d'une durée d'exposition (aiguë, de quelques heures à une semaine ; intermédiaire, d'une semaine à plusieurs mois ; chronique, de quelques années⁶ à la vie entière) et d'une voie d'exposition (voies orale et respiratoire). Leur construction diffère en fonction de l'hypothèse formulée ou des données acquises sur les mécanismes d'action toxique de la substance. En l'état actuel des connaissances et des conventions, on considère généralement qu'il n'existe pas de seuil de dose pour les effets cancérogènes génotoxiques et que la toxicité ne s'exprime qu'au-delà d'un seuil de dose pour les autres effets. Ce postulat peut être remis en cause dans les cas où des informations montrant le contraire sont disponibles. Pour les VTR construites à partir d'un effet critique reprotoxique, l'hypothèse par défaut est donc de considérer l'existence d'un seuil. Dans ce cas, elles s'expriment soit en quantité de substance par kilogramme de poids corporel et par jour (par exemple, $\text{mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$) pour la voie orale, soit en quantité de substance par mètre cube d'air (par exemple, mg.m^{-3}) pour la voie respiratoire. Il n'existe pas, à l'heure actuelle, de méthode conventionnelle pour élaborer des VTR spécifiques à la voie cutanée.

Les VTR sont construites à partir de données sur les relations dose – réponse ou dose – effet obtenues lors d'expérimentations animales ou directement chez l'homme lors d'études épidémiologiques. Bien que l'utilisation d'études chez l'homme soit privilégiée pour la construction de VTR, les études animales sont en pratique la source majeure de données toxicologiques pour la construction de VTR, d'une part car les études épidémiologiques exploitables pour construire une VTR ne sont pas nombreuses, d'autre part car l'utilisation de doses élevées chez l'animal permet d'observer des signes manifestes de toxicité et assure une meilleure appréciation de l'organe cible et d'un effet spécifique.

Mathématiquement, la construction d'une VTR pour une substance dont les effets sont considérés à seuil est définie de la manière suivante :

$$VTR = \frac{\text{Dose critique}}{UF}$$

⁶ Pour l'ATSDR, la notion de VTR chronique s'applique dès que l'homme est exposé quotidiennement pendant plus d'une année. Pour l'US EPA, elle s'applique dès que l'homme est exposé quotidiennement pendant plus de 7 années (correspondant au dixième de la durée de vie fixée à 70 ans).

La dose critique peut être un NOAEL, un LOAEL ou une BMD définis comme tels :

- le LOAEL (*Lowest Observed Adverse Effect Level*) est la dose minimale entraînant un effet néfaste statistiquement significatif par rapport au témoin ;
- le NOAEL (*No Observed Adverse Effect Level*) est la dose maximale n'entraînant pas d'effet néfaste statistiquement significatif par rapport au témoin, située directement sous le LOAEL dans les doses du protocole ou dans les expositions identifiées ;
- la BMD (*Benchmark Dose*) est une dose produisant un niveau ou un pourcentage défini de réponse.

UF représente le facteur d'incertitude global appliqué.

La notion de MAXSD explicitée plus tard dans ce document, malgré son intérêt, n'est pas utilisée dans la pratique actuelle pour la construction de VTR.

Aussi, la construction de la VTR comprend les quatre étapes suivantes :

- **définir les différents effets** spécifiques de la substance et qui se produisent pour différents types d'exposition, retenir ceux qui semblent être une manifestation directe d'une toxicité et **choisir** celui qui est mis en évidence pour les plus faibles doses administrées : c'est l'effet critique ;
- **retenir une étude** de bonne qualité scientifique permettant généralement d'établir une relation dose – réponse (ou dose – effet) ;
- **identifier une dose critique** à partir des doses expérimentales et/ou des données épidémiologiques ;
- **appliquer des facteurs d'incertitude** à la dose critique pour obtenir une VTR.

Après un rappel de la construction d'une VTR, le présent document structure la réflexion de la démarche sur ces 4 étapes.

1. POSTULATS DANS LA CONSTRUCTION D'UNE VTR REPROTOXIQUES

1.1. Relation dose – effet et dose – réponse

En l'état actuel des connaissances, l'hypothèse par défaut est de considérer une relation monotone entre l'exposition, ou la dose, et l'effet, ou la réponse.

1.2. Effets à seuil de dose

Il est *a priori* admis qu'il existe un seuil de dose pour les substances chimiques induisant un effet sur la reproduction et/ou le développement, sauf si des données tendent à montrer qu'il n'y a pas de seuil [Moore *et al.*, 1995 ; US EPA, 1991, 1996]. Il s'agit donc d'une hypothèse par défaut. De ce fait, la VTR se calcule en divisant la dose critique choisie par un certain nombre de facteurs d'incertitude.

Dans le cadre où une absence de seuil aurait été mise en évidence, la méthode de construction de VTR proposée dans ce document ne s'applique pas. L'évaluateur pourra se reporter au document spécifique sur la construction des VTR cancérogènes, qui explicite les choix à effectuer en cas d'absence de seuil⁷.

A noter que certaines substances peuvent avoir un potentiel reprotoxique découlant directement de leur caractère mutagène sur les cellules germinales. En fonction de l'effet mis en évidence et des connaissances sur ces mécanismes d'action, les VTR proposées pour ces substances pourront être des VTR sans seuil.

1.3. Transposition de l'animal à l'homme

La première étape de la transposition est d'étudier la plausibilité des effets chez l'homme, qui nécessite de s'assurer de la cohérence des effets entre l'animal et l'homme.

Bien que les études humaines soient privilégiées, en pratique, les études animales sont plus souvent utilisées pour la construction des VTR, pour tous les types d'effets. En effet, ces études animales permettent de mettre en évidence des signes de toxicité manifestes pour des expositions précises et sont plus nombreuses. Il est donc important de s'assurer de la validité des modèles animaux utilisés. Pour cela, l'idéal est d'utiliser des études expérimentales dont l'espèce et la souche ont une sensibilité la plus proche possible de celle de l'homme. Cette assertion n'étant pas toujours vérifiable, la plausibilité des effets d'une espèce à l'autre peut être renforcée par l'utilisation d'espèces différentes. Dans tous les cas, l'hypothèse par défaut est que **l'effet mis en évidence chez l'animal peut également se produire chez l'homme, à moins que l'analyse du mode d'action permette de démontrer le contraire** (dans ce cas, la construction d'une VTR n'est pas pertinente pour cet effet). Par ailleurs, concernant précisément les effets sur le

⁷ Construction de VTR pour les substances cancérogènes, Afsset, en cours de publication.

développement, toutes les manifestations de toxicité sont à prendre en compte : malformations, altérations de la croissance, et déficiences fonctionnelles. Les types d'effets observés peuvent être différents d'une espèce à l'autre. **Il est donc convenu que l'augmentation significative de toute manifestation toxique considérée comme néfaste sera prise en compte pour évaluer les effets sur le développement chez l'homme** [US EPA, 1991]. Il peut ainsi s'agir d'une augmentation d'incidence de malformations, d'anomalies fœtales ou tout autre type d'effet défini dans ce document.

La deuxième étape de la transposition nécessite de s'assurer de la cohérence entre les données toxicocinétiques et toxicodynamiques chez l'animal et chez l'homme.

Les différences de cinétique et de métabolisme d'une substance entre plusieurs espèces sont parfois reflétées par l'application d'un coefficient d'ajustement tenant compte, pour une exposition orale, de la surface corporelle (paramètre physiologique propre à chaque espèce), et, pour une exposition respiratoire, du taux d'inhalation (paramètre physiologique) et des coefficients de partage entre l'air et le sang (paramètres physicochimiques liés à la substance).

Par ailleurs, lorsque les données expérimentales de toxicodynamie ne sont pas disponibles, **l'hypothèse posée par défaut est de considérer l'homme plus sensible que l'animal**, aux variations allométriques près détaillées ci-dessus. Cette hypothèse se traduit par l'application du facteur d'incertitude inter-espèces détaillé dans le chapitre 6.2 et est valable quels que soient les effets étudiés (reprotoxiques ou non).

1.4. Durée et période d'exposition : validité de la VTR

Il s'agit ici de préciser les conditions d'application des VTR qui seront construites : les effets reprotoxiques surviennent après des durées d'exposition plus ou moins longues à des périodes différentes du cycle de la reproduction, chez l'homme et chez la femme. Par exemple, lors d'une grossesse, il peut suffire d'une exposition sur une seule journée pour provoquer une malformation ; pour la fertilité, les effets peuvent survenir pour des expositions de plusieurs semaines, voire plus. Il est donc important d'en tenir compte lors de la proposition de VTR. Toutefois il n'est pas possible actuellement d'établir un tableau exhaustif des validités des VTR en fonction des durées d'exposition, des périodes d'exposition et des types d'effets. L'utilisation et l'interprétation de ces VTR devra donc obligatoirement tenir compte de la durée d'exposition, de la période d'exposition et du type d'effet auquel elle est associée.

A titre d'exemple, trois types de VTR peuvent être construites :

- **des VTR aigus.** Par exemple, pour l'étude des effets **sur le développement embryofœtal** (dont les conséquences peuvent être révélées aussi bien à la naissance que plus tardivement), les durées d'exposition des rongeurs dans les études expérimentales peuvent

être de 1 jour à une dizaine de jours, pendant l'organogenèse⁸. En s'appuyant sur ces protocoles expérimentaux, sur les connaissances de l'organogenèse et sur la durée d'exposition critique nécessaire pour qu'une substance engendre un effet néfaste sur le développement, en absence d'éléments précis sur l'organogenèse, **les VTR aiguës construites seront valides pour des durées d'exposition d'une journée ;**

- **des VTR subchroniques.** Par exemple, pour l'étude des effets sur **le développement pré et post-natal**, les durées d'exposition dans les études expérimentales chez le rongeur sont d'une quarantaine de jours (la période d'exposition couvre la gestation et la lactation jusqu'au sevrage). En s'appuyant sur ces protocoles expérimentaux, **les VTR subchroniques construites seront valides pour des durées d'exposition de 28 jours à une année ;**
- **des VTR chroniques.** Par exemple, pour l'étude des effets **sur la fertilité**, les durées d'exposition des animaux dans les études expérimentales suivant les lignes directrices de l'OCDE (chez le mâle ou la femelle) sont généralement au moins égales à la durée d'un cycle de fertilité (une cinquantaine de jours pour le rongeur mâle, 4 à 5 jours pour le rongeur femelle) et peuvent se prolonger dans le cas des études multigénérationnelles. **En s'appuyant sur la connaissance des cycles de fertilité humaine⁹ et sur les protocoles expérimentaux, des VTR chroniques peuvent être construites, pour une durée d'exposition chez l'homme à partir d'une année.**

Au final, il est important de bien caractériser les types de toxicités liés à une substance et la durée d'exposition sur lesquels s'appuiera la construction des VTR, car leur domaine de validité ne sera pas le même. Il sera ainsi possible de construire, pour une même substance, des VTR reprotoxiques pour des durées d'exposition aiguë, subchronique ou chronique, en fonction des effets mis en évidence. Ces durées d'exposition devront être clairement explicitées pour chacune des VTR construites.

⁸ L'organogenèse chez le rat dure 10 jours. Elle est d'environ 80 jours chez l'homme.

⁹ Cycle de fertilité chez le mâle : la spermatogenèse est un processus cyclique d'une durée approximative de 72 jours chez l'homme (56 chez le rat et 70 chez le lapin), qui met en jeu trois grandes lignées constituant le testicule : les cellules germinales, les cellules de Sertoli et les cellules de Leydig. Dans les protocoles expérimentaux standardisés de l'OCDE (415 et 416), la durée d'exposition de l'étude doit être d'au moins un cycle pour les études sur une génération (donc 56 jours chez le rat et 70 chez le lapin pour la première génération, correspondant à 72 jours chez l'homme) et peut se poursuivre pendant le développement et la croissance de la progéniture mâle pour les études sur deux générations (exposition chronique pour la deuxième génération). Les VTR peuvent ainsi être valables pour des expositions humaines subchroniques ou chroniques (en fonction de l'effet mis en évidence chez le mâle, de la connaissance des lignées cellulaires atteintes, de la capacité à engendrer des effets cumulatifs et de l'étude utilisée pour les construire).

Cycle de fertilité chez la femelle : le cycle oestral est un processus d'une durée approximative de 28 jours chez la femme (4-5 jours chez le rat et la souris). De même que pour l'homme, en fonction de l'étude utilisée, la VTR proposée pourra être valable pour des expositions subchroniques ou chroniques.

2. EFFETS NEFASTES REPROTOXIQUES A PRENDRE EN COMPTE

2.1. Définition des effets reprotoxiques

2.1.1. Effets sur la reproduction

2.1.1.1. *Effets sur la reproduction masculine*

Ce sont les effets sur les organes reproducteurs, le système hormonal correspondant ou la conception de l'enfant, résultant d'une exposition à n'importe quel moment de la vie de l'individu masculin.

Les manifestations majeures de cette toxicité comprennent les effets sur l'initiation et le déroulement de la puberté et de la maturation sexuelle, sur la production ou le transport des spermatozoïdes (nombre, motilité, altérations morphologiques), le comportement sexuel (libido, érection...), la fertilité (la fertilité est la capacité biologique déterminée par les items précédents), l'activité hormonale ou la réponse physiologique qui perturberait la capacité de fécondation, la fécondation elle-même ou le développement de l'ovule fécondé jusqu'à, et y compris, l'implantation, un vieillissement prématuré des organes reproductifs ou une modification des fonctions de la progéniture dépendant de l'intégrité du système reproductif masculin [European Commission, 1967 ; US EPA, 1996].

2.1.1.2. *Effets sur la reproduction féminine*

Ce sont les effets sur les organes reproducteurs, le système hormonal correspondant ou la conception de l'enfant, résultant d'une exposition à n'importe quel moment de la vie de l'individu féminin.

Les manifestations majeures de cette toxicité comprennent les effets sur l'initiation et le déroulement de la puberté et de la maturation sexuelle, sur la production et le transport des ovules, le cycle menstruel, le comportement sexuel (libido...), la fertilité (la fertilité est la capacité biologique déterminée par les items précédents), la gestation, la parturition, la lactation, l'activité hormonale ou la réponse physiologique qui perturberait la capacité de fécondation, la fécondation elle-même ou le développement de l'ovule fécondé jusqu'à, et y compris, l'implantation, une ménopause prématurée ou une modification des fonctions de la progéniture dépendant de l'intégrité du système reproductif féminin [European Commission, 1967 ; US EPA, 1996].

Enfin, lorsque des effets reprotoxiques ont été mis en évidence dans les études humaines ou animales, et que leur caractère néfaste a été souligné dans la mesure du possible, la construction de la VTR nécessite de choisir un effet spécifique appelé effet critique.

2.1.2. Effets sur le développement

La toxicité sur le développement est considérée dans son sens le plus large, y compris tout effet perturbant le développement normal de l'enfant, aussi bien avant qu'après la naissance. Elle correspond aux effets sur l'enfant résultant d'une exposition des parents avant la conception, pendant le développement embryofœtal ou pendant la période de lactation.

Les manifestations majeures de cette toxicité diffèrent en fonction des fenêtres d'exposition et des cibles. Elles comprennent les effets embryo- ou fœtotoxiques, réversibles ou irréversibles, tels que mort prématurée, fausse couche précoce ou tardive, anomalies structurelles (effets tératogènes), altérations de la croissance intra-utérine, déficiences fonctionnelles (toxicité pour les organes et systèmes), les anomalies péri- ou post-natales ainsi que les anomalies du développement mental ou physique, de la naissance à la maturation sexuelle [European Commission, 1967 ; US EPA, 1991]. Il n'existe pas de définitions consensuelles pour chaque type d'effets sur le développement, aussi seront reprises ci-dessous celles proposées par l'US EPA [US EPA, 1991].

2.1.2.1. *Malformations*

Les malformations sont définies comme des altérations irréversibles qui affectent la survie de l'organisme, le développement ou une fonction particulière. Elles correspondent à la tératogénicité.

Il existe d'autres types d'effets malformatifs, appelés « variations », considérées comme des altérations mineures de la constitution structurelle de l'organisme. Notons que la différence entre une anomalie congénitale mineure et une variation n'est pas toujours évidente et qu'il est préférable de rester prudent lors de l'interprétation d'un résultat [CSHPF, 2002].

2.1.2.2. *Altérations de la croissance*

Les altérations de la croissance correspondent à une altération du poids ou de la taille des organes ou des mensurations de la progéniture. Cet effet peut être engendré par une exposition de la mère à n'importe quel moment du développement de l'enfant. Il peut être réversible ou non. Il peut être observé jusqu'à la maturation sexuelle de l'enfant.

A noter que le retard d'ossification peut être un signe de retard de croissance embryofœtale, mais peut également être considéré comme le signe d'une embryotoxicité s'il n'est pas associé à une baisse du poids fœtal ou à une toxicité maternelle [CSHPF, 2002].

2.1.2.3. *Déficiences fonctionnelles*

Les déficiences fonctionnelles correspondent à une altération ou un retard des capacités de l'organisme, d'un système ou d'un organe (par exemple, altération comportementale ou neurocognitive) et sont liées à une exposition pendant la période critique de développement du système ou de l'organe, ou à une exposition post-natale (pendant la lactation).

2.2. Evaluation des effets néfastes

Les effets analysés dans les études toxicologiques et qui sont considérés pour la construction d'une VTR sont les effets « néfastes ». Ils correspondent à tout changement dans la morphologie, la physiologie, la croissance, le développement ou la durée de vie d'un organisme, résultant soit d'une détérioration de la capacité fonctionnelle ou de la capacité à compenser un stress additionnel, soit d'une augmentation de sensibilité.

Cette définition générique est très vaste et il est parfois difficile de distinguer des effets néfastes d'autres effets qui ne correspondraient pas à une manifestation directe de la toxicité. Ceci est particulièrement vrai dans le domaine de la toxicologie de la reproduction et du développement, où la distinction entre des effets considérés comme des malformations ou ceux classés uniquement comme variation est délicate et repose principalement sur le jugement du responsable de l'étude. De même, déterminer les effets dus à une toxicité directe et spécifique d'une substance de ceux dus à une toxicité induite chez la mère n'est pas toujours aisé.

Ces points devront donc être particulièrement discutés et argumentés. Le document intitulé *Draft guidance document on reproductive toxicity testing and assessment*, édité par l'organisation de coopération et de développement économique (1^{ère} version, document provisoire) pourra y aider [OCDE, 2004].

Finalement, l'évaluation des effets reprotoxiques nécessite de connaître précisément les types d'effets susceptibles de se produire lors d'une exposition à une substance reprotoxique.

2.3. Choix des effets critiques reprotoxiques

On appelle effet critique reprotoxique le premier effet reprotoxique observé. Il est choisi pour l'élaboration d'une VTR. Le groupe de travail reste conscient qu'il pourrait y avoir un effet critique autre que reprotoxique apparaissant pour de plus faibles doses que celui retenu.

Cependant, construire une VTR pour un effet reprotoxique se justifie :

- d'une part car les effets sur le développement peuvent survenir pour des durées d'exposition particulières (fenêtre d'exposition courtes) ;
- d'autre part car une réponse spécifique aux effets reprotoxiques peut être sollicitée compte tenu de son importance en santé publique.

Il conviendra cependant, pour l'expert, lors du choix de l'effet critique reprotoxique, de s'assurer que la toxicité maternelle a bien été rapportée dans les études et que l'effet retenu est généralement observé en l'absence d'une toxicité maternelle.

Finalement, tous les effets reprotoxiques définis au chapitre 2.1. pourront être considérés comme effet critique reprotoxique.

3. EVALUATION DE LA QUALITE DES ETUDES : CHOIX POUR LA CONSTRUCTION D'UNE VTR REPROTOXIQUE

La qualité scientifique des études est un point important dans l'élaboration des VTR. Deux types d'études sont communément pris en compte : les études épidémiologiques réalisées chez l'homme et les études expérimentales menées chez l'animal. Le chapitre présente les différents critères de qualité à considérer pour l'évaluation de la validité et de la pertinence d'une ou de plusieurs études choisies pour la construction de la VTR.

3.1. Qualité des études chez l'homme

3.1.1. Apport de l'épidémiologie dans l'étude des relations dose – réponse

Lorsqu'elles sont disponibles et de bonne qualité, les études épidémiologiques présentent des intérêts majeurs pour l'étude des relations dose – réponse, telle que l'absence d'incertitude liée à la transposition entre espèces. Elles sont donc souvent appréciées et privilégiées, quand elles sont disponibles. A l'inverse, elles présentent également des limites particulières qu'il faut connaître et discuter si on souhaite les utiliser dans la construction d'une VTR reprotoxique.

Synthétiquement, les études épidémiologiques peuvent être classées en deux grands groupes : à visée étiologique et à visée descriptive. Parmi les études à visée étiologique (fournissant les arguments en faveur ou à l'encontre de l'hypothèse d'un rôle étiologique des facteurs de risque étudiés), on distingue les études de cohortes, les études cas-témoins et les études transversales. Les études à visée descriptive (fournissant des fréquences de maladies, des tendances temporelles ou géographiques) peuvent être réalisées à l'échelle individuelle ou populationnelle.

Les applications de ces différents types d'études sont résumées dans le tableau I. D'une manière générale, les cinq points-clés communs à toutes ces études, qui vont conditionner leur utilité dans le contexte de la construction de VTR, sont :

- la prise en compte des facteurs de confusion, d'interaction et des biais ;
- la mesure des expositions ;
- le choix de l'effet analysé ;
- la puissance ;
- le lien causal existant ou suspecté entre l'exposition et l'effet.

Tableau I : Application des différents types d'études en épidémiologie (adapté de « Environmental Health Risk Assessment, Guidelines for Assessing human Health Risks from Environmental Hazards, Department of Health and Ageing, Commonwealth of Australia – 2002)

	Ecologiques	Transversales	Cas-témoins	Cohortes
Investigation d'effets sanitaires rares	++++	–	+++++	–
Investigation d'expositions rares	++	–	–	+++++
Etude de plusieurs effets liés à une même exposition	+	++	–	+++++
Etude d'expositions multiples et de leurs déterminants	++	++	++++	+++
Etude de la relation temporelle exposition-effet	++	–	+	+++++
Mesure directe de l'incidence	–	–	+	+++++
Investigation d'effets sanitaires avec de longues périodes de latence	–	–	+++	+/- (+, si rétrospectif)

+ à +++++ : degré de pertinence, – : non pertinent

Les études écologiques, parce qu'elles ne reposent pas sur des mesures individuelles et ne considèrent pas les biais et les facteurs de confusion à l'échelle individuelle, ne permettent pas d'établir formellement une relation étiologique.

Seules les études analytiques (transversales, de cohorte et cas-témoin) peuvent contribuer à l'élaboration d'une VTR.

3.1.2. Critères de qualité à prendre en compte

3.1.2.1. *Mesures des expositions*

S'agissant *in fine* de retenir une dose critique, la plus grande attention devra être portée à la manière dont ont été mesurées les expositions (validité des outils de mesure et qualité de leur mise en œuvre), avec, notamment, des précisions sur :

- l'existence d'expositions multiples à des agents variés pouvant avoir chacun un rôle dans l'effet reprotoxique étudié ;
- l'application d'outils ou de techniques classiques de l'épidémiologie environnementale (budgets espace-temps moyens, relations exposition – biomarqueur) à des sous-groupes particuliers (femmes enceintes par exemple) ;
- la part des sources extérieures, professionnelles, intérieures et alimentaires dans l'exposition et leur articulation dans le temps (notion de fenêtre d'exposition critique pour certains effets reprotoxiques) ;
- l'éventuelle co-exposition des deux parents dans les études prenant en compte des effets sur la reproduction (toxicité maternelle, paternelle, effet synergique) ;

- l'importance des biais dans les études utilisant un questionnaire pour évaluer les expositions :
 - les biais de mémorisation différentiels entre les cas et les témoins liés à une mémorisation plus importante des événements pendant la grossesse et à un rappel potentiellement favorisé par une issue non souhaitée ;
 - les biais d'information liés à une négation d'une conduite connue ou suspectée comme « à risque » comme la consommation d'alcool par exemple.

3.1.2.2. *Choix de l'effet analysé*

Comme mentionné en début de document, l'effet reprotoxique retenu dans une étude épidémiologique devra faire l'objet d'une définition consensuelle et correspondre à un effet néfaste et critique. En outre, une attention particulière sera apportée à la méthode de recueil de cet effet et les mêmes conditions, standardisées, devront avoir été appliquées aux cas, aux témoins, aux personnes exposées et non exposées. Dans ce contexte, les cas rapportés en dehors d'un suivi systématique et standardisé seront interprétés avec prudence, notamment en raison de la difficulté de préciser la population source dont ils sont issus.

3.1.2.3. *Puissance*

Comme pour toute étude épidémiologique, en dehors des précautions énoncées ci-dessus, les résultats négatifs ne seront interprétés qu'en relation avec la puissance de l'étude, c'est-à-dire sa capacité à détecter de faibles excès de risque.

3.1.2.4. *Prise en compte des biais, des facteurs de confusion et d'interaction*

Tous les biais habituels des études épidémiologiques sont possibles dans les études de reprotoxicité et devront être discutés. En dehors de ceux cités précédemment, un type de biais est plus susceptible de se rencontrer : les biais de sélection, liés à l'inclusion de cas et/ou témoins non représentatifs de la population générale ou non comparables. On citera par exemple les cohortes de femmes exposées professionnellement qui risquent de ne pas prendre en compte celles cessant leurs activités en raison de leur grossesse ou d'une crainte *a priori* des effets de l'exposition professionnelle. On citera également le taux de refus ou de perdus de vue qui peut être différent selon l'issue de la grossesse ou les expositions anténatales et donc lié à l'effet mesuré et/ou à l'exposition.

Les facteurs de confusion à prendre en compte spécifiquement dans une étude épidémiologique concernant les effets reprotoxiques, afin de dissocier leur influence de celle de l'exposition suspectée, peuvent être (liste non limitée) :

- l'âge maternel et paternel ;
- la catégorie socio-professionnelle des parents ;
- l'exercice professionnel et les expositions professionnelles paternels et maternels ;

- les antécédents médicaux de la fratrie ;
- les habitudes tabagiques avant et pendant la grossesse ;
- les antécédents médicaux, chirurgicaux et reproductifs ;
- le style de vie (consommation d'alcool avant et pendant la grossesse, consommation médicamenteuse consommation de produits stupéfiants pendant la grossesse) ;
- le stress et les apports nutritionnels pendant la grossesse ;
- les susceptibilités génétiques (si décrites) ;
- pour les effets sur le développement post-natal : le terme de la grossesse, l'histoire obstétricale, l'allaitement, le niveau d'éducation parentale, les infections intercurrentes, les expositions domestiques possibles et plus généralement l'environnement familial.

3.1.2.5. *Existence ou suspicion d'un lien causal entre l'exposition et l'effet*

D'une manière générale, une conclusion causale n'est pas accessible à partir d'une seule enquête épidémiologique d'observation du type de celles pouvant être utilisées pour construire une VTR et le jugement de causalité doit intervenir principalement en amont, lors de l'analyse des dangers. Le choix d'une étude épidémiologique pour construire une VTR devra naturellement être effectué en cohérence avec les connaissances issues de cette analyse des dangers. Les critères de causalité les plus reconnus (critères de B. Hill, 1965) sont :

- la force de l'association (par exemple risque relatif ou odds ratio élevé) ;
- l'existence d'une relation entre la dose d'exposition (prenant en compte la durée et l'intensité de l'exposition) et l'importance et/ou la fréquence de l'effet ;
- la temporalité (l'exposition précède l'effet) ;
- la spécificité de l'association entre l'exposition et l'effet ;
- la reproductibilité des résultats ;
- la plausibilité biologique (l'interprétation causale de l'association doit être cohérente avec les connaissances biologiques générales) ;
- la cohérence biologique (l'interprétation causale de l'association doit être cohérente avec les connaissances disponibles sur l'histoire naturelle et la biologie de la maladie) ;
- l'existence de données expérimentales lorsque cela est possible ;
- l'analogie avec des connaissances disponibles sur d'autres agents.

Afin de disposer de clés de décision pour le choix des études épidémiologiques de bonne qualité, le groupe de travail recommande de se reporter au document de référence publié par l'ADEF [ADEF, 2003]. Des informations sont également disponibles à l'adresse <http://adelf.isped.u-bordeaux2.fr/>. Ces clés de décisions sont qualitatives : elles concernent notamment le contenu du

protocole et de la publication. Elles ne peuvent en aucun cas remplacer l'expertise épidémiologique réalisée au cas par cas et reposant sur une évaluation par les pairs.

3.2. Qualité des études chez l'animal

Les études toxicologiques constituent généralement la base de l'élaboration des VTR. Elles doivent permettre d'identifier les effets résultant de l'exposition à la substance, les caractéristiques histologiques et d'établir des relations dose – effet.

Depuis 1981, des principes ont été proposés par l'OCDE pour que les études mises en place soient reproductibles, comparables et de meilleure qualité. Il s'agit des Bonnes Pratiques de Laboratoire (BPL) et des lignes directrices pour les essais des produits chimiques. Une des thématiques du programme concerne les effets sur la santé. Des protocoles expérimentaux standardisés sont ainsi proposés par l'OCDE afin d'évaluer correctement les différents effets concernés et les relations dose – effet quand elles existent. Ces protocoles sont établis en fonction de la durée d'exposition (14 jours par exemple pour la femelle gestante), de la voie d'exposition (ingestion, inhalation ou voie cutanée) et du type d'effet recherché. Ces lignes directrices élaborées et publiées par l'OCDE sont généralement reprises par l'Union européenne.

En comparant les études disponibles à ces lignes directrices, il est possible d'évaluer leur qualité et de comparer plusieurs études entre elles afin de sélectionner celles considérées comme de meilleure qualité scientifique ou tout au moins de donner plus de poids à celle jugée la plus fiable.

Dans le cadre de la construction d'une VTR, il est souhaitable que les études expérimentales retenues suivent les bonnes pratiques de laboratoire et les lignes directrices de l'OCDE ou en soient proches. Elles peuvent également suivre d'autres lignes directrices proposées par des organismes reconnus dans le domaine de la toxicologie (par exemple, le *National Toxicology Program* ou le *International Conference on Harmonisation*).

Toutefois, les études disponibles dans la littérature peuvent être anciennes et ne pas forcément respecter les lignes directrices de l'OCDE. Devant cet état de fait, il convient alors de considérer la qualité des études sur la base de critères tels que la pureté de la substance testée, l'espèce des animaux étudiés, les conditions du test ou la durée de l'exposition. C'est ce que propose l'évaluation selon Klimisch *et al.*, issue d'une publication de 1997 [Klimisch *et al.* 1997], détaillée au chapitre 3.2.3.

3.2.1. Bonnes pratiques de laboratoire

Les principes relatifs aux BPL proposés en 1981 par l'OCDE forment un système de garantie de qualité portant sur le mode d'organisation des études non cliniques ayant trait à la santé et à l'environnement et sur les conditions dans lesquelles ces études sont planifiées, réalisées, contrôlées, enregistrées, archivées et diffusées. Elles ont pour objectif de promouvoir l'obtention

de données d'essai de qualité et comparables entre elles afin de permettre l'acceptation mutuelle de ces données par les Etats membres. Elles sont définies dans l'annexe 1 de la directive européenne 2004/10/CE concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives relatives à l'application des principes de bonnes pratiques de laboratoire et au contrôle de leur application pour les essais sur les substances chimiques. Elles définissent notamment les principes à respecter concernant l'organisation de l'essai, les appareils et matériaux utilisés les systèmes d'essai, les modes opératoires normalisés, le plan de l'étude et la rédaction du rapport d'évaluation

3.2.2. Lignes directrices de l'OCDE établies pour les effets reprotoxiques

Actuellement, cinq lignes directrices de l'OCDE permettent d'étudier les effets reprotoxiques d'une substance. L'ensemble de ces lignes directrices renseigne sur les effets néfastes pouvant être induits aux différentes étapes de la reproduction (effets sur la fertilité, effets tératogènes et effets péri et post-nataux).

Les cinq lignes directrices concernant les effets reprotoxiques sont les suivantes :

- **LD 414** : « Etude de la toxicité pour le développement pré-natal » (anciennement étude de tératogenèse) ;
- **LD 415** : « Etude de toxicité pour la reproduction sur une génération » ;
- **LD 416** : « Etude de toxicité pour la reproduction sur deux générations » ;
- **LD 421** : « Essai de dépistage de la toxicité pour la reproduction et le développement » ;
- **LD 422** : « Etude combinée de toxicité à doses répétées et de dépistage de la toxicité pour la reproduction et le développement ».

Pour plus de renseignements l'évaluateur pourra également se reporter au rapport (Draft de 2004) de l'OCDE intitulé « *Guidance document on reproductive toxicity testing and assessment* » et prendre appui sur la monographie n°31 de l'ECETO C (2002) ainsi que sur les publications de Mitchell *et al.* (2004) et de Moore *et al.* (1995).

3.2.2.1. *Effets sur la reproduction*

Deux lignes directrices concernent les effets sur la reproduction. La ligne directrice n°415 « Etude de toxicité pour la reproduction sur une génération » adoptée le 26 mai 1983 et la ligne directrice n°416 « Etude de toxicité pour la reproduction sur deux générations » mise à jour le 22 janvier 2001.

Ligne directrice n°415 « Etude de toxicité pour la reproduction sur une génération »

Cette ligne directrice est destinée à fournir des informations générales concernant les effets d'une substance à tester sur le fonctionnement de la reproduction chez le mâle et la femelle, tels que la fonction génitale, le cycle œstral, le comportement lors de l'accouplement, la conception, la gestation, la parturition, la lactation et le sevrage. Cette ligne directrice n'est pas destinée à déterminer la cause et les effets spécifiques dans chaque cas et, pour l'étude des substances administrées par inhalation, des modifications seront nécessaires. L'étude en question peut également fournir des informations préliminaires sur les effets toxiques de la substance à tester sur le développement, effets tels que la morbidité néonatale, la mortalité, le comportement et la tératogenèse ; cette étude peut servir de guide pour des essais ultérieurs.

Ligne directrice n°416 « Etude de toxicité pour la reproduction sur deux générations »

Cette ligne directrice est destinée à livrer des informations générales concernant les effets d'une substance sur l'intégrité et le fonctionnement des appareils reproducteurs mâles et femelles, notamment la fonction gonadique, le cycle œstral, le comportement à l'égard de l'accouplement, la conception, la gestation, la parturition, la lactation, le sevrage ainsi que la croissance et le développement de la descendance. L'étude peut aussi montrer les effets de la substance sur la morbidité et la mortalité néonatales, fournir des données préliminaires sur la toxicité prénatale et post-natale pour le développement et orienter des essais ultérieurs. Cette ligne directrice étudie non seulement la croissance et le développement de la première génération (F1), mais évalue aussi l'intégrité et le fonctionnement des appareils reproducteurs mâles et femelles, ainsi que la croissance et le développement de la deuxième génération (F2). Il est possible d'obtenir des informations supplémentaires sur la toxicité pour le développement et les déficits fonctionnels, en complétant le présent protocole d'après les lignes directrices se rapportant à la toxicité pour le développement et/ou la neurotoxicité pour le développement.

3.2.2.2. *Effets sur le développement*

La ligne directrice traitant particulièrement des effets sur le développement est la ligne directrice n°414 « Etude de la toxicité pour le développement prénatal » (anciennement étude de tératogenèse). Cette ligne directrice a été mise à jour le 22 janvier 2001 et est destinée à livrer des informations générales concernant les effets de l'exposition prénatale d'une femelle gravide, sur elle-même et sur l'organisme en développement qu'elle porte en elle. Ces informations peuvent être déduites, par exemple, de l'évaluation des effets sur la mère, des décès, des anomalies structurelles ou de l'altération de la croissance du fœtus. Les déficits fonctionnels, qui représentent cependant un aspect important du développement, ne sont pas étudiés dans cette ligne directrice. Leur recherche peut s'effectuer dans le cadre d'une autre étude ou en

complément à celle-ci, à l'aide de la ligne directrice se rapportant à la neurotoxicité pour le développement (ligne directrice n°426).

3.2.2.3. *Effets sur la reproduction et le développement*

Deux lignes directrices étudient à la fois les effets sur la reproduction et sur le développement. La ligne n°421 « Essai de dépistage de la toxicité pour la reproduction et le développement » adoptée le 27 juin 1995 et la ligne n°422 « Etude combinée de toxicité à doses répétées et de dépistage de la toxicité pour la reproduction et le développement » adoptée le 22 mars 1996.

Ligne directrice n°421 « Essai de dépistage de la toxicité pour la reproduction et le développement »

Cette ligne directrice peut être appliquée en vue d'obtenir une première série d'informations concernant les effets possibles d'une substance sur la reproduction et/ou sur le développement, soit au stade initial d'une évaluation toxicologique soit dans l'évaluation d'une substance particulièrement préoccupante. Elle peut avoir son utilité dans un ensemble d'essais de tri initial de produits chimiques existants pour lesquels les informations toxicologiques sont peu nombreuses ou absentes et peut donner des indications sur l'éventail de doses à utiliser dans des études plus complètes des effets sur la reproduction ou le développement.

Cet essai ne permet pas d'obtenir des informations complètes sur tous les aspects de la reproduction et du développement. En particulier, il n'offre qu'un moyen partiel de détecter des manifestations post-natales liées à des expositions prénatales ou des effets éventuellement liés à une exposition post-natale. Etant donné, entre autres raisons, le nombre relativement faibles d'animaux dans les groupes, la sélection des effets observés retenue et la brièveté de l'étude, cette méthode ne peut fournir toutes les preuves nécessaires à l'étayage d'une conclusion définitive sur les effets reprotoxiques.

Ligne directrice n°422 « Etude combinée de toxicité à doses répétées et de dépistage de la toxicité pour la reproduction et le développement »

Cette étude de toxicité à doses répétées comprend un test de dépistage de la toxicité pour la reproduction et le développement et peut être utilisée pour obtenir des informations initiales sur les effets possibles affectant les capacités reproductrices du mâle et de la femelle telles que la fonction gonadique, le comportement lors de l'accouplement, la conception, le développement de l'embryon et la parturition, soit à un stade précoce de l'évaluation des propriétés toxicologiques des substances chimiques, soit sur des substances chimiques préoccupantes. Cet essai ne fournit pas une information exhaustive sur tous les aspects de la reproduction et du développement. En particulier, il n'offre que des moyens limités pour déceler des manifestations post-natales d'une exposition prénatale ou des effets imputables à une exposition post-natale. En raison, entre autres, du choix des effets observés retenus et de la brièveté de l'étude, cette

méthode ne fournit pas toutes les preuves nécessaires à l'étayage d'une conclusion définitive sur les effets reprotoxiques.

Les lignes directrices n°421 et 422 permettent l'obtention d'informations sommaires sur les effets d'une substance sur les fonctions gonadiques, la conception ou encore le développement du nouveau-né, mais ne peuvent permettre une conclusion définitive concernant les effets reprotoxiques. De plus, compte tenu des protocoles utilisés (nombre d'animaux faible, brièveté de l'étude et observations courtes), **les résultats de ces deux lignes directrices n'apparaissent pas toujours suffisantes pour la construction d'une VTR.** Cependant, les études LD 422 donnent parfois un niveau d'information raisonnable sur l'accouplement, la gestation et la parturition. Les organes de la reproduction sont également étudiés au niveau histopathologique. Il existe par ailleurs de plus en plus d'études de ce type complétées par des études d'expositions en période de pré-accouplement ou une analyse de la progéniture. Il peut donc être envisagé de retenir ce type d'étude, au cas par cas, en fonction des données.

3.2.2.4. *Autres effets*

Etude de la toxicité sur le développement neurologique

La ligne directrice n°426 permet d'évaluer les effets sur le système nerveux de la progéniture après une exposition de la mère pendant la gestation, ou une exposition pendant la lactation. Le but est d'observer les changements comportementaux liés à des effets sur le système nerveux périphérique et central (par exemple, altération de la fonction motrice, apprentissage, mémoire, fonction sensorielle, etc.).

3.2.3. Aide à l'évaluation de la qualité des études ne suivant pas les protocoles standardisés

Lorsque les études toxicologiques ne suivent pas les protocoles standardisés de l'OCDE, ce qui peut être fréquent, il existe des critères permettant d'évaluer la qualité scientifique d'une étude expérimentale. De nombreuses publications existent sur le sujet [Squire 1984]. Toutefois, seule la proposition de Klimisch *et al.* (1997) sera exposée ici car elle est reconnue au niveau européen et international et est la plus utilisée en pratique dans le domaine de l'évaluation réglementaire des substances chimiques (TGD, documents de l'OCDE, US EPA, procédure REACH).

Cette approche systématique est fondée sur une harmonisation des procédés d'évaluation de qualité des études toxicologiques utilisés par différentes institutions (par exemple : ECB, IPCS, OCDE, BUA), permettant ainsi d'uniformiser les méthodes d'évaluation des données et d'homogénéiser la présentation des résultats. Elle a pour vocation d'identifier l'étude de meilleure qualité et non d'exclure *a priori* les données de faible validité. Dans cette approche, lorsque

l'étude ne répond pas aux protocoles standardisés de l'OCDE, sa fiabilité est déterminée selon la présence des informations suivantes :

- type d'animaux testés (espèces, souches, sexe, âge) ;
- composition, pureté et origine de la substance ;
- but des investigations (observations histopathologiques, cliniques, etc.) ;
- précision de la description des lésions observées ;
- présence d'un groupe contrôle ou contrôle historique ;
- description des conditions du test ;
- description des voies et doses administrées ;
- identification d'une relation dose réponse si possible ;
- description et pertinence des méthodes statistiques utilisées ;
- informations sur la période d'investigation pendant la vie de l'animal ;
- informations sur les conditions de vie des animaux (notamment alimentation).

Klimisch *et al.* (1997) ont alors établi un système de cotation des études expérimentales en prenant en compte la fiabilité des études (méthodes standardisées, B.P.L. (Bonnes Pratiques de Laboratoire)), le détail de description de la publication ainsi que la pertinence et l'utilité des données dans le cadre de l'évaluation du risque. Cette cotation est comprise entre 1 et 4. Le détail de ces cotations est rappelé ci-après et le tableau II présente les critères permettant cette cotation :

- Cotation 1 : Valide sans restriction ;
- Cotation 2 : Valide avec restrictions ;
- Cotation 3 : Non valide ;
- Cotation 4 : Non évaluable.

Les études les plus pertinentes décrivent avec précision la nature de l'effet toxique, le nombre et le pourcentage d'animaux concernés par les effets observés ainsi que les conditions de l'exposition (durée – concentration).

Tableau II : Critères pour la cotation de Klimisch (1997)

Cotation	Catégorie de validité
<p>1</p> <ul style="list-style-type: none"> - 1a - 1b - 1c - 1d 	<p>Valide sans restriction</p> <ul style="list-style-type: none"> - Etude BPL respectant les tests standardisés (OCDE, EC, EPA, FDA, <i>etc.</i>) - Comparable à des tests standardisés (« <i>guidelines</i> ») - Protocole en accord avec méthode standardisée nationale (AFNOR, DIN, <i>etc.</i>) - Protocole en accord avec d'autres méthodes standardisées scientifiquement acceptées, et suffisamment détaillé.
<p>2</p> <ul style="list-style-type: none"> - 2a - 2b - 2c - 2d - 2e - 2f - 2g 	<p>Valide avec restrictions</p> <ul style="list-style-type: none"> - Etude standardisée sans documentation détaillée - Etude standardisée avec restrictions acceptables - Comparable à une étude standardisée avec restrictions acceptables - Protocole en accord avec les méthodes standardisées nationales, avec restrictions acceptables - Etude bien documentée et en accord avec les principes scientifiques, acceptable pour l'évaluation - Méthode de calcul acceptée - Données provenant d'ouvrages de références et de collecte de données
<p>3</p> <ul style="list-style-type: none"> - 3a - 3b - 3c 	<p>Non valide</p> <ul style="list-style-type: none"> - Document insuffisant pour l'évaluation - Déficiences méthodologiques significatives - Protocole inconcevable
<p>4</p> <ul style="list-style-type: none"> - 4a - 4b - 4c - 4d - 4e 	<p>Non évaluable</p> <ul style="list-style-type: none"> - Résumé - Littérature secondaire - Référence originale non disponible - Référence originale dans un autre langage que le langage international - Documentation insuffisante pour l'évaluation

Si les études disponibles ne suivent pas les lignes directrices de l'OCDE, il est conseillé aux évaluateurs de vérifier que ces études répondent aux différents critères de fiabilité déterminés par Klimisch *et al.* (1997), et de réaliser une cotation des études selon la méthode décrite dans leur publication. Ces critères sont qualitatifs et non quantitatifs. Par exemple, le nombre minimum d'animaux à tester ou le degré de pureté minimum de la substance à étudier, ne sont pas précisés et relèvent d'un jugement d'experts. De ce fait, l'évaluateur devra également s'assurer qu'il existe bien une relation dose – réponse (allure, exploitation, nature) dans l'étude. **Le groupe de travail conseille de prendre en compte uniquement les études expérimentales cotées 1 et 2.**

Pour une aide à l'analyse des études toxicologiques, l'expert peut se reporter à un document australien intitulé « *Environmental health risk assessment, Guidelines for assessing human health risks from environmental hazards* » [Commonwealth of Australia, 2002].

3.3. Effectuer le choix de l'étude

La dernière étape sera de choisir la meilleure étude en fonction des effets critiques retenus. L'objectif n'est pas de classer l'ensemble des études selon un système de notation chiffrée mais plutôt de présenter de manière structurée et systématique les critères permettant d'arriver à un choix final fondé sur un jugement scientifique. En outre, si les informations complémentaires ne sont pas utilisées directement pour construire une VTR, elles servent à argumenter les choix qui sont faits.

Pour faciliter ce choix et le rendre transparent, il est conseillé d'utiliser des grilles de lecture pour les différents types d'études, comme précisé au chapitre 5.2.

Au final, le choix de l'étude support se fondera sur le raisonnement suivant :

- **privilégier les études épidémiologiques si elles sont de qualité suffisante et si les expositions sont suffisamment bien caractérisées ;**
- **utiliser en deuxième intention les études expérimentales qui suivent les protocoles standardisés de l'OCDE ou de tout autre organisme national ou supranational compétent dans le domaine ;**
- **utiliser les études expérimentales notées 1 ou 2 selon Klimisch *et al.* (1997) si aucune étude citée ci-dessus n'est disponible.**

4. DONNEES COMPLEMENTAIRES

4.1. Etudes de toxicocinétique

Les études de toxicocinétique permettent d'apporter des informations relatives à toutes les étapes du devenir des substances (profil ADME¹⁰) après administration/exposition par différentes voies. Les données d'absorption digestive, de fraction biodisponible et de cinétique d'élimination sont un préalable nécessaire à la réalisation et l'interprétation des études de toxicité proprement dites. Cela sous-entend d'avoir à disposition des études par voie orale et voie veineuse dans la mesure du possible.

Lorsque ces études sont réalisées sur différentes espèces, elles peuvent mettre en évidence des différences de modalité de biotransformation et d'élimination. Bien que le comportement toxicocinétique d'une substance soit différent chez l'homme et l'animal (de laboratoire), le plus souvent seules sont disponibles des données obtenues chez l'animal. En revanche et généralement, la cible toxicologique est identique chez l'homme et chez l'animal. Ainsi, les études de toxicocinétique permettent d'améliorer l'étape de transposition des données à l'homme par l'établissement d'une relation entre la dose/concentration plasmatique au niveau de la cible et l'effet toxique observé. Il est alors possible de déterminer un modèle reliant la concentration plasmatique en fonction du temps, et, si différentes doses ont été testées, les variations des concentrations en fonction des doses.

Des études de biotransformation *in vivo* ainsi que des études de métabolisme *in vitro* (par exemple sur hépatocytes humains avec ou sans inducteurs des enzymes de métabolisation) permettent d'aider à la transposition des données.

4.1.1. Etudes chez l'animal

Les études toxicocinétiques chez l'animal sont réalisées soit en tant qu'études singulières, soit sur des lots d'animaux appelés « groupes satellites » lors des études de toxicité à doses répétées. La ligne directrice OCDE n°17 précise ces études de toxicocinétique : elles peuvent être conduites chez une ou plusieurs espèces animales ; cependant, le choix doit être cohérent avec l'espèce animale utilisée dans les autres études toxicologiques. Pour ces raisons, les données de toxicocinétique sont majoritairement issues d'études conduites chez le rat. Il est conseillé d'utiliser des animaux des deux sexes, afin d'identifier une influence sexe-dépendante sur les paramètres toxicocinétiques. Le nombre moyen par groupe est en général de 4 animaux par sexe et par groupe de dose testée. Il ne doit jamais être inférieur à 2 animaux par groupe. Le type d'étude requis peut être soit à dose unique soit à doses répétées. Dans le cas d'une étude à

¹⁰ Profil des phases toxicocinétiques d'Absorption, Distribution, Métabolisation, Elimination

administration unique, deux niveaux de doses au minimum doivent être testés (une faible dose pour laquelle aucun effet toxique n'est observé et une dose plus élevée pour laquelle des effets toxiques peuvent être observés ou des modifications des paramètres toxicocinétiques supposés). Dans le cas d'une étude à doses répétées, un seul niveau de dose est généralement suffisant. La durée de l'étude correspond en général à 3 à 5 demi-vies de la substance, temps nécessaire pour identifier le profil ADME dans sa globalité. Le choix de la voie d'exposition doit être cohérent avec la voie utilisée dans les études toxicologiques et, au mieux, avec la voie d'exposition chez l'homme. La voie orale permet par ailleurs d'identifier les paramètres toxicocinétiques systémiques et est recommandée par la Directive 91/414/CEE modifiée [EC, 1991]. Les données de toxicocinétique sur la femelle gestante sont préconisées si cela s'avère justifié (Ligne OCDE 417).

4.1.2. Etudes chez l'homme

Les données de toxicocinétique humaine sont issues d'études menées chez des volontaires sains ou chez des travailleurs. Les dosages des substances et/ou des métabolites dans les urines, le plasma ou les fèces peuvent être utilisés pour identifier les voies métaboliques majeures chez l'homme. Ce type d'étude a l'avantage de fournir des résultats directement observés chez l'homme qui permettent, comparés aux données animales, de confirmer ou non les hypothèses de transposition inter-espèces et de renseigner des modèles mathématiques (voir paragraphe suivant).

4.1.3. Modèles mathématiques

Récemment, des modèles mécanistiques ont été développés pour quantifier le comportement toxicocinétique d'une substance dans un organisme complet : il existe des modèles pharmacocinétiques et des modèles toxicocinétiques physiologiques appelés PBPK (*Physiologically-Based Pharmacokinetic*). Ces modèles intègrent des paramètres physiologiques. Le corps est modélisé comme un ensemble de compartiments interconnectés entre eux, représentant les différents organes et les échanges sanguins. Le transport des substances peut être modélisé par un système d'équations différentielles liant principalement la quantité ou la concentration de substance dans les différents organes, le flux sanguin, le volume des organes, les coefficients de partage ou encore le taux de ventilation. La représentation des organes dans un tel modèle n'est pas nécessairement exhaustive, elle dépend de la substance étudiée et des organes cibles ou jouant un rôle dans le métabolisme ou le stockage de la substance. Ce type de modèle présente les avantages suivants :

- répondre à des problèmes d'extrapolation (inter-doses, inter-espèces, intra-espèce) et prendre en compte les spécificités liées à des organes précis ;

- simuler l'évolution temporelle de la concentration plasmatique ;
- quantifier les concentrations internes à l'organe cible.

Enfin, l'analyse et la comparaison des études de toxicocinétique conduites sur plusieurs espèces permettent d'identifier des particularités d'espèce, qui sont prises en compte dans le choix des facteurs d'incertitude inter-espèces (voir chapitre 6). L'étude comparée de la relation entre l'exposition et la dose atteinte à l'organe cible est importante pour la transposition inter-espèces.

4.2. Autres données

4.2.1. Etudes à doses répétées

Les études de toxicité à doses répétées sur 90 jours, orales, respiratoires ou cutanées, ainsi que les études de cancérogenèse sur 2 ans peuvent renseigner sur la reprotoxicité d'une substance dans le cas où les observations histopathologiques ont été faites sur les organes reproducteurs. L'évaluateur pourra se reporter aux lignes directrices n°407, 408, 409, 411, 413 et 453. Par ailleurs, il est de plus en plus fréquent de trouver ce type d'études complétées d'un spermogramme ou autre mesure de paramètres sexuels. **Toutefois, ces études seules ne suffisent pas à la construction d'une VTR. Il est préférable de les utiliser en complément d'études spécifiques.**

4.2.2. Etudes *in vitro*

Les études *in vitro* permettant de mettre en évidence les mécanismes d'action des substances étudiées peuvent être utilisées pour mieux comprendre la survenue des effets néfastes. Ces études ne mettent que rarement en évidence de relation dose – effet ou dose – réponse et ne peuvent donc être utilisées pour la construction de VTR. Toutefois, leur analyse reste très utile à la compréhension de la toxicité de la substance.

4.2.3. Cas particulier des perturbateurs endocriniens

Différents types de tests *in vivo* ou *in vitro* sont utilisés pour mesurer l'activité des perturbateurs endocriniens. La plupart sont détaillés dans des revues bibliographiques d'intérêt [Shelby *et al.* 1996 ; Odum *et al.* 1997]. L'OCDE a également publié en 2003 une monographie faisant le point sur les tests de réponse utéro-trophique (mode d'action, bases biologiques, évaluation) [OCDE, 2003].

4.2.4. Propriétés physico-chimiques

Les propriétés physico-chimiques d'une substance peuvent prédire son comportement dans l'organisme ou influencer les paramètres toxicocinétiques d'absorption par exemple. Ainsi, l'identification précise de ces propriétés doit être prise en compte lors de l'interprétation des études disponibles. L'évaluation du degré de pureté de la substance testée participe également à l'interprétation des résultats observés.

4.2.5. Relations structure – activité

Les données de QSAR (quantitative structure-activity-relationships) prédisent la toxicité d'une substance *in vitro* en corrélant statistiquement sa structure chimique au pouvoir reprotoxique de substances analogues connues (classe chimique, structure d'alerte, etc). Cependant, elles ne prennent pas en compte la possibilité de formation de métabolites toxiques de structure chimique différente de la substance mère.

5. ORGANISATION DES CONNAISSANCES : LE PROFIL TOXICOLOGIQUE

L'élaboration d'un profil toxicologique est un processus d'évaluation utilisant les données scientifiques actuelles disponibles dont l'objectif ultime est ici la construction d'une VTR. Cette évaluation permet de porter un jugement toxicologique rigoureux dans le but de définir les effets toxiques liés à différents types d'expositions à la substance (aiguë, chronique, voie orale, etc.). Dans le cadre de ces travaux, le profil toxicologique se concentrera principalement sur les effets reprotoxiques (effets sur la reproduction chez l'homme et chez la femme, effets sur le développement embryofœtal).

Ainsi, à partir des informations disponibles, l'évaluateur doit déterminer si les données humaines et/ou animales présentées peuvent raisonnablement être utilisées pour prédire des effets sur la reproduction ou le développement dans des conditions d'exposition particulières au sein de la population humaine. Les données exploitées sont celles issues des études expérimentales chez l'animal, des cas d'intoxications humaines, des études contrôlées chez l'homme (si elles existent) et des études épidémiologiques humaines réalisées au sein de diverses populations (en milieu professionnel, dans des groupes de populations sensibles, dans la population générale). La conclusion doit porter sur l'identification du (ou des) effet(s) critique(s) pertinent(s), des doses repères existantes (LOAEL, NOAEL, BMD...) ainsi que de l'étude la plus robuste en terme de qualité, pour chaque type d'exposition pertinente. Le profil toxicologique ainsi rédigé doit permettre d'étudier, si cela s'avère nécessaire, la cohérence et la pertinence d'une transposition de l'animal à l'homme. Pour cela, il est essentiel de réunir les informations concernant : i) les propriétés physico-chimiques de la substance et la plausibilité de l'exposition humaine ; ii) les effets chez l'animal et chez l'homme ; iii) l'éventuelle continuité d'effets entre des expositions aiguë, intermédiaire et chronique ; iv) la toxicocinétique des différentes espèces ; v) la toxicodynamie des différentes espèces, en fonction de l'organe ou du système cible. Ce chapitre est rédigé à la manière d'un cahier des charges, où l'ensemble des informations à fournir doit être présenté.

5.1. Informations générales

Les informations générales doivent permettre l'identification de la substance. Doivent figurer son nom, son numéro d'enregistrement au *Chemical Abstract Service* (CAS), sa formule et ses propriétés physico-chimiques, ses principaux métabolites chez l'homme et chez l'animal, sa toxicité générale (différents types d'effets pour différents schémas d'exposition) et les voies d'exposition plausibles chez l'homme. La mise en forme de tableaux pour les principales caractéristiques permet une bonne visibilité et une identification rapide.

L'identification et les propriétés physico-chimiques de la substance seront issues principalement d'ouvrages et de bases de référence, tels que l'Index Merck, les bases HSDB et Chemfinder¹¹. Pour les autres données, les informations peuvent provenir des documents publiés par les organismes nationaux ou internationaux reconnus : l'ATSDR (« *toxicological profiles* »), l'IPCS (« *environmental health criteria* »), Santé Canada (« *rapports d'évaluation des substances d'intérêt prioritaire* »), l'US EPA (IRIS « *toxicological review* »), l'ECB (« *risk assessment reports* »), l'OCDE (UNEP « *chemicals screening information dataset* »), l'IARC (« *monographs* »), le NCEA (« *risk assessments* »), etc¹².

Ces différents types d'informations pourront être regroupés sous forme de tableaux :

- Identification de la substance

Numéro CAS, ENEICS, etc.	
Nom	
Synonymes	
Formule brute	
Formule développée	
Appartenance à une liste reprotoxique	

- Propriétés physico-chimiques

Forme physique	<i>Ne pas oublier d'indiquer références et unités</i>
Poids moléculaire	<i>Si les données ne sont pas disponibles dans les profils toxicologiques analysés, indiquer « NR » pour « non renseigné »</i>
Point d'ébullition	
Point de fusion	
Pression de vapeur	
Densité	
Facteurs de conversion	
Solubilité	
Log Kow ¹³ , Koc ¹⁴	
BCF, BAF ¹⁵	
Produits de dégradation environnementale	

¹¹ Index MERCK : The Merck Index, an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. Thirteenth edition. Published by Merck Research Laboratories Division of Merck & Co., Inc. Whitehouse Station, NJ. 2001; HSDB et ChemFinder : <http://toxnet.nlm.nih.gov/>.

¹² ATSDR : <http://www.atsdr.cdc.gov/> ; IPCS/ OCDE/ IARC : <http://www.inchem.org/> lien EHC, SIDS et IARC ; Santé Canada : <http://www.hc-sc.gc.ca/> ; ECB : <http://ecb.jrc.it/> ; NCEA : <http://cfpub.epa.gov/ncea/>

¹³ LogKow : logarithme du coefficient de partage octanol-eau. Il correspond au ratio entre la concentration de la substance dans l'octanol et celle dans l'eau à l'équilibre. Il est corrélé à la solubilité dans l'eau et reflète indirectement les potentiels de bioconcentration et de bioaccumulation d'une substance.

¹⁴ Koc : Coefficient d'adsorption sur la matière organique. C'est le ratio entre la quantité de substance adsorbée par le sol par unité de poids de carbone organique et la concentration de la substance en solution, à l'équilibre. Il reflète donc la mobilité de la substance dans les sols.

¹⁵ *Bioconcentration factor* : facteur de bioconcentration, c'est le rapport entre la concentration de la substance dans un organisme aquatique et sa concentration dans l'eau. Il exprime donc l'accumulation de la substance dans un organisme aquatique, c'est-à-dire la capacité qu'a un organisme (en particulier aquatique) d'extraire et de concentrer les substances de l'environnement qui l'entoure (eau) ; *Bioaccumulation factor* : Facteur de bioaccumulation. La bioaccumulation est la capacité qu'a un organisme (généralement aquatique) d'extraire et concentrer les substances, à la fois directement à partir de l'environnement qui l'entoure (bioconcentration), mais aussi indirectement à partir de la nourriture.

- Plausibilité d'exposition humaine

Types d'utilisation	
Restrictions d'usages	
Tonnages (Europe, France)	
Médias de rejets dans l'environnement	
Vecteurs potentiels d'exposition humaine	
Groupes de populations concernées	

- Toxicocinétique

	Données chez l'animal	Données chez l'homme
Substance mère		
Voies de métabolisation possibles		
Métabolites principaux		
Absorption (% par voie)		
Distribution		
Stockage, accumulation (% et cible)		
Transferts barrière hémto-encéphalique, placenta, lait maternel		
Élimination (demi-vies)		

- Toxicité générale

Les données animales pertinentes sont généralement issues des études de toxicité aiguë et répétée sur 28 ou 90 jours. Les informations issues de cas d'intoxications ou de cas cliniques ainsi que d'études épidémiologiques sont également à prendre en compte. Les données de toxicité chez les animaux et chez l'homme peuvent permettre de mettre en évidence les différences d'espèces concernant la toxicité ou le type d'effet, et renseigner sur les relations dose – effet mises en évidence. Enfin, les informations sur la cancérogénicité (classification), la mutagénicité (screening et classification) et les phénomènes de sensibilisation sont également à prendre en compte.

Ces différents types d'informations pourront être regroupés sous forme de tableaux :

- Données chez l'homme

Données d'intoxications aiguës, subchroniques, chroniques	
Études contrôlées	
Études épidémiologiques	
Autres	

- Données chez l'animal

Toxicité aiguë	
Toxicité à doses répétées	
Génotoxicité	
Cancérogénicité	
Sensibilisation, irritation, etc.	

- VTR existantes

Pour plus de clarté, les VTR existantes pour la substance étudiée peuvent être regroupées dans un tableau récapitulatif (tableau III).

Toutes les valeurs présentées sont fournies selon le système international des unités et rédigées en écriture scientifique ; par exemple, une dose orale est présentée en $\text{mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$.

Tableau III : Exemple de tableau récapitulatif des VTR proposées dans les bases de données

Organisme (année)	VTR	Effet pris en compte dans la construction de la VTR	Voie d'exposition pour laquelle la VTR s'applique	Durée d'exposition pour laquelle la VTR est valable	Etude toxicologique utilisée	Espèces testée, voie et durée d'exposition du protocole	Dose critique	UF
Préciser le nom de l'organisme qui produit la VTR et la date de production	Valeur Numérique de la VTR (préciser les unités)		Orale, respiratoire ou cutanée	Aiguë, intermédiaire ou chronique	Référence bibliographique et année	Espèce Voie (si orale, préciser : gavage, <i>ad. lib. ...</i>) Durée	Valeur numérique et type (NOAEL, LOAEL, BMD...)	Nature et valeur numérique des UF appliqués

5.2. Toxicité sur la reproduction et le développement

Ce chapitre doit permettre d'identifier les effets reprotoxiques engendrés par des expositions à la substance étudiée et de renseigner sur la qualité des études toxicologiques et épidémiologiques présentées. Ici, il est nécessaire de détailler les études puisqu'un choix devra être fait pour la construction de la VTR. Les informations doivent être séparées selon que les effets sont étudiés chez l'homme ou l'animal, puis en fonction de l'organe ou du système cible. Enfin, un chapitre sur la toxicodynamie permet d'identifier les éventuels mécanismes d'actions proposés, en fonction de l'effet.

Les informations sont issues de plusieurs sources de données : des évaluations détaillées spécifiques, des évaluations synthétiques et des données primaires. Pour plus d'informations sur les moyens de recherche à utiliser, il est conseillé de se reporter à l'annexe 1. La présentation pourra se faire sous la forme de grilles de lecture pour chaque étude considérée comme suffisamment pertinente, comme précisé au chapitre 3. Une proposition de grilles¹⁶ est donnée à titre indicatif, pour les études chez l'homme et chez l'animal, afin de guider l'évaluateur sur la nature des informations à recueillir pour une bonne analyse de la qualité de l'étude et effectuer un choix éclairé.

Enfin, un tableau récapitulatif permettra d'identifier sur une page l'ensemble des couples NOAEL / LOAEL trouvés dans la littérature et issus d'études que l'on aura préalablement identifiées comme de bonne qualité.

¹⁶ L'évaluateur pourra se référer à la méthode de construction pour les VTR cancérogènes, Afsset (en cours de publication) pour avoir des grilles de lecture plus complètes quant à la qualité des données.

Ces différentes informations pourront être rassemblées sous forme de tableaux :

- Données humaines
 - Effets sur le développement

Référence simplifiée de l'étude humaine	Nom, année
Type d'étude	Cas témoin, <i>etc.</i>
Effet étudié	
Lieu	Industrie, habitats, <i>etc.</i> / pays
Nombre et type de personnes exposées	Effectifs, distribution par âge, sexe, <i>etc.</i>
Voie d'exposition	
Durée d'exposition	
Niveaux d'exposition et moyennes	
Type et durée de mesurages	
Critères de choix et effectif du groupe non exposé	
Force de l'association observée	
Relation dose réponse	
Qualité de l'étude	puissance, prise en compte de facteurs de confusion, qualité de l'analyse
Convergence avec autres études sur même effet et argumentation causale	

- Effets sur la fertilité

Référence simplifiée de l'étude humaine	Nom, année
Type d'étude	Cas témoin, <i>etc.</i>
Effet étudié	
Lieu	Industrie, habitats, <i>etc.</i> / pays
Nombre et type de personnes exposées	Effectifs, distribution par âge, sexe, <i>etc.</i>
Voie d'exposition	
Durée d'exposition	
Niveaux d'exposition et moyennes	
Type et durée de mesurages	
Critères de choix et effectif du groupe non exposé	
Force de l'association observée	
Relation dose réponse	
Qualité de l'étude	puissance, prise en compte de facteurs de confusion, qualité de l'analyse
Convergence avec autres études sur même effet et argumentation causale	

- Données animales
 - Effets sur le développement

Référence simplifiée de l'étude animale	Nom, année
Type d'étude	Une génération, plusieurs, toxicité chronique, <i>etc.</i>
Espèce / souche étudiée	
Sexe et nombre d'animaux par lot (groupes de doses)	
Voie d'exposition	
Temps d'exposition quotidien	
Fréquence et durée du traitement	
Pré-exposition éventuelle	Présence, durée et voie
Doses ou concentrations d'expositions	
Groupe témoin	Présence et nombre d'animaux
Tests statistiques utilisés	
Le(s) effet(s) critique(s) observé(s)	
Les autres effets mis en évidence	
Présence d'une toxicité maternelle / doses	
Le couple NOAEL / LOAEL pour l'effet critique (reprotoxique si c'est le cas)	Indiquer l'incidence ou le niveau de réponse correspondant au LOAEL
Qualité de l'étude	BPL/OCDE, autres lignes directrices ou Klimisch

- Effets sur la fertilité

Référence simplifiée de l'étude animale	Nom, année
Type d'étude	Une génération, plusieurs, toxicité chronique, <i>etc.</i>
Espèce / souche étudiée	
Sexe et nombre d'animaux par lot (groupes de doses)	
Voie d'exposition	
Temps d'exposition quotidien	
Fréquence et durée du traitement	
Pré-exposition éventuelle	Présence, durée et voie
Doses ou concentrations d'expositions	
Groupe témoin	Présence et nombre d'animaux
Tests statistiques utilisés	
Le(s) effet(s) critique(s) observé(s)	
Les autres effets mis en évidence	
Présence d'une toxicité maternelle/ doses	
Le couple NOAEL / LOAEL pour l'effet critique (reprotoxique si c'est le cas)	Indiquer l'incidence ou le niveau de réponse correspondant au LOAEL
Qualité de l'étude	BPL/OCDE, autres lignes directrices ou Klimisch

Tableau IIIb : Exemple de tableau récapitulatif des études épidémiologiques (pour les études retenues comme étant de qualité suffisante)

Auteur, date, référence	Lieu	Type d'étude	exposition	Origine et qualité des données sanitaires	Résultats	Interprétation & commentaires
-------------------------	------	--------------	------------	---	-----------	-------------------------------

Préciser les significativités statistiques : oui/ non/ p ?.

Tableau IIIc : Exemple de tableau récapitulatif des couples NOAEL / LOAEL proposés dans la littérature analysée (pour les études retenues comme étant de bonne qualité)

Espèces animales testées	Type d'étude (cf lignes directrices)	Voie d'exposition	durée	NOAEL	LOAEL	Effet néfaste observé	Source
lapin	ex : tératogénicité	Orale, gavage	ex : J18-21	X mg.kg ⁻¹ .j ⁻¹	Y mg.kg ⁻¹ .j ⁻¹		

NP : non présenté dans la source bibliographique.

ND : non déterminé.

5.3. Mécanismes d'action proposés

Il est important dans ce chapitre de préciser si les études exploitées ont été réalisées chez l'animal ou chez l'homme, ou si les résultats sont issus d'études *in vitro* ou *in vivo*. L'objectif est de mettre en exergue les hypothèses proposées sur les mécanismes d'action toxique des substances étudiées. Chaque information sur les mécanismes d'action a une importance majeure dans la compréhension de la survenue des effets néfastes et pour la transposition des données de l'animal à l'homme lors de la construction de la VTR.

5.4. Analyse de la cohérence des données animales et humaines

Ce chapitre doit permettre de déterminer la pertinence de l'utilisation d'un type de données, animales ou humaines, pour la construction de la VTR et de conclure sur les effets que l'on pourra retenir pour la construction de la VTR.

Dans la situation la plus favorable, les données observées chez l'homme peuvent suffire à expliciter un mécanisme d'action reprotoxique. Dans ce cas, la discussion sur la transposition de l'animal à l'homme n'a pas d'objet. En pratique, les données les plus courantes proviennent d'études conduites chez l'animal. La discussion sur la pertinence de transposer le mécanisme d'action de l'animal à l'homme prend ici tout son sens, afin notamment de considérer comme valides pour l'homme tout ou partie des données observées chez l'animal. La méthode présentée ci-après propose une liste de thèmes généraux à aborder pour guider l'évaluateur dans l'examen de la transposition du mécanisme d'action explicité chez l'animal :

- la toxicocinétique : la biodisponibilité est-elle identique chez l'animal et l'homme ? Le métabolisme est-il le même qualitativement ou quantitativement ?
- les effets : sont-ils identiques chez l'animal et l'homme ? Dans le cas d'une absence de données chez l'homme, est-il plausible que les effets observés chez l'animal puissent se produire chez l'homme (spécificité d'espèces, différences entre les espèces de laboratoire si plusieurs testées, etc.) ?
- les mécanismes d'action : sont-ils ou peuvent-ils être identiques chez l'animal et chez l'homme ?

Toutes les informations recueillies lors des étapes précédentes sont rassemblées et analysées qualitativement et quantitativement, afin de se prononcer sur la confiance à accorder sur la transposabilité du mécanisme d'action à l'homme.

En outre, d'autres informations sont utiles à intégrer à cette réflexion parmi lesquelles :

- les connaissances sur la nature et la fonction du système d'intérêt dont son développement ;
- sa structure (anatomique et histologique) et ses mécanismes de contrôle physiologique, cellulaire et biochimique ;

- l'existence de maladies humaines et animales procurant des indices sur la régulation de l'organe cible ;
- les réponses humaines et animales suite à l'administration de la substance chimique étudiée ou à une substance analogue pour des expositions courtes, intermédiaires et longues, en considérant les effets et organes cibles.

5.5. Discussion

A ce niveau, l'évaluateur doit conclure sur :

- l'identification des différents effets reprotoxiques néfastes (spécifiques à la reproduction et/ou au développement) ;
- l'identification des effets critiques reprotoxiques ;
- l'identification et la synthèse des études de bonne qualité ;
- l'identification des manques de connaissances.

Cette discussion permettra d'évaluer le caractère suffisant des informations analysées :

- absence de données ;
- études d'utilité limitée ;
- études acceptables pour la construction de VTR reprotoxiques ;
- études de bonne qualité pour la construction de VTR reprotoxiques.

6. CONSTRUCTION DE LA VTR REPROTOXIQUE

6.1. Choix de la dose critique

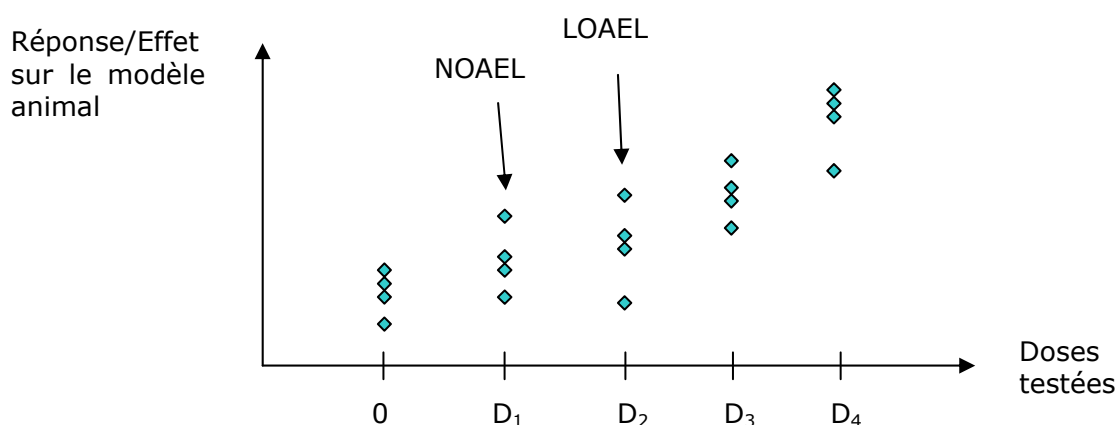
6.1.1. Identification et construction des doses repères

6.1.1.1. LOAEL / NOAEL

Le LOAEL et le NOAEL sont déterminés à partir d'une expérimentation animale grâce à un test statistique qui permet de détecter une différence significative dans les effets induits par une dose testée par rapport au témoin :

- le LOAEL est identifié à partir du test statistique parmi les doses testées. C'est la première dose testée, dans l'ordre croissant, qui produit un effet – considéré comme néfaste – d'une intensité ou d'une fréquence présentant une différence statistiquement significative avec le témoin (dose nulle). C'est donc la première dose du protocole pour laquelle on rejette l'hypothèse de départ. Il ne correspond pas à un seuil biologique mais à un seuil statistique qui dépend du protocole expérimental (figure 1) ;
- le NOAEL est défini comme la dose testée ne produisant pas d'effet significativement différent du témoin immédiatement inférieure au LOAEL. Lorsque la première dose testée (D_1) conduit déjà à un effet significativement différent du témoin, il n'est pas possible de définir un NOAEL. Le LOAEL défini dans une telle expérience ne devrait pas être accepté pour la construction d'une VTR car rien ne dit qu'une dose inférieure ne produit pas déjà un effet significatif.

Figure 1 : Relation dose – réponse et recherche du LOAEL



Un test statistique est un outil qui permet de choisir entre deux hypothèses, appelées respectivement hypothèse nulle et hypothèse alternative, au vu des résultats d'un calcul sur un échantillon. Dans notre cas, l'hypothèse nulle posée est l'égalité de réponse entre la dose D_i et le témoin, autrement dit

l'absence d'effet pour la dose D_i . On cherche la dose D_i pour laquelle cette hypothèse pourra être rejetée avec un risque au plus α de se tromper. α est appelé risque de première espèce ; il est choisi par l'opérateur. C'est la probabilité de conclure à tort en disant que la réponse produite par la dose D_i est différente du témoin (rejet de l'hypothèse nulle). Autrement dit, c'est la probabilité de dire que D_i produit un effet alors qu'elle n'en produit pas.

On appelle risque de deuxième espèce β la probabilité de se tromper en acceptant l'hypothèse nulle. Dans notre cas, c'est donc la probabilité de dire que D_i ne produit pas d'effet alors qu'elle en produit un (tableau IV).

Tableau IV : Hypothèses testées contre réalité et probabilités associées

Vérité (inconnue)	Hypothèse nulle H_0 : D_i ne produit pas d'effet	Hypothèse alternative H_1 : D_i produit un effet
Décision		
Hypothèse nulle H_0	$1 - \alpha$	β
Rejet de H_0 Hypothèse alternative H_1	α	$1 - \beta$

Si α est choisi par l'opérateur, en général dans les faibles valeurs : 0,1 ; 0,05 ; 0,01 ; β résulte de la valeur de α , du test choisi, de la taille de l'échantillon, du niveau et de la variabilité de la réponse et de l'hypothèse alternative. Si celle-ci n'est pas une égalité (et c'est notre cas), β n'est pas une valeur mais une fonction qui dépend du niveau d'effet inconnu mais réellement produit par la dose D_i . Pour se rendre compte du risque que l'on a de se tromper en rejetant l'hypothèse H_0 , on peut calculer la valeur de β correspondant au cas où l'effet réellement produit par la dose D_i est égal à celui observé lors de l'expérience. Dans tous les cas, plus on veut être sûr de ne pas se tromper en rejetant une hypothèse, plus on a de chance de l'accepter à tort. Autrement dit, β varie dans le sens inverse de α . $1 - \beta$ est appelé puissance statistique du test : le test est d'autant plus puissant que sa valeur est proche de 1.

Si la dose D_2 , par exemple, est la première dose qui produit un effet significatif au risque $\alpha = 0,05$ par rapport au témoin, on posera $LOAEL = D_2$ et on est assuré (à $1 - \alpha = 95\%$) qu'elle produit un effet. En revanche, on n'est pas assuré que la dose D_1 , qui sera alors par définition le NOAEL, ne produise pas déjà un effet et il y a même de fortes chances que ce soit le cas. Plus on se fixe un α petit et plus on est sûr que le LOAEL produit un effet, mais plus il est probable que le NOAEL en produise également déjà un. Le risque de deuxième espèce β étant rarement estimé dans la pratique, on ne connaît pas la probabilité que le NOAEL produise un effet ; c'est pourtant cette probabilité qui nous intéresserait en premier lieu lors de la construction d'une VTR.

La démarche utilisée nous assure donc que le LOAEL produit un effet sans qu'il soit quantifié, mais ne nous garantit rien concernant l'innocuité du NOAEL.

Ce type d'approche est en fait plus adapté à la situation inverse : quand on veut prouver l'effet bénéfique d'un traitement par rapport à un témoin, placebo ou autres. En effet, dans ce cas, le risque de première espèce α , qui est la probabilité de se tromper en disant que le traitement a un effet, est bien celle qui nous intéresse en premier lieu. Il convient d'éviter de dire qu'un médicament a un effet alors qu'il n'en a pas.

Dans ce cadre, on peut montrer que le fait de comparer séparément chaque dose du traitement au témoin avec un seuil α n'est pas très pertinent. En effet, si pour une dose la probabilité de se tromper en disant qu'il y a un effet est de $\alpha = 0,05$, sur 10 doses testées, la probabilité de se tromper au moins une fois est approximativement de $1 - (1 - 0.05)^{10} = 0.4$ (approximation pessimiste). En testant 10 doses, on a donc un risque de se tromper en disant que le traitement produit un effet supérieur au seuil que l'on s'était fixé.

Aussi, dès les années 50, des tests de multi-comparaisons permettant de pallier cet inconvénient ont été proposés. Ceux-ci garantissent que la probabilité de se tromper sur l'ensemble des doses est bien inférieure au seuil α défini par l'opérateur. Certains de ces tests comme le test de Dunnett et celui de Duncan sont également employés pour l'estimation du couple LOAEL / NOAEL [Waner, 1992].

Dans notre cas, ce type d'approches garantit, plus encore qu'un test deux à deux des concentrations, que le LOAEL produit bien un effet ; il conduit à des valeurs de LOAEL plus élevées et par conséquent augmente le risque que le NOAEL produise déjà un effet.

Les LOAEL et NOAEL ont été remis en cause ces dernières années par la communauté scientifique toxicologique pour les raisons suivantes [US EPA, 2000] :

- LOAEL et NOAEL font forcément parties des concentrations testées. Leurs valeurs numériques sont donc très dépendantes du protocole expérimental ;
- leurs valeurs dépendent aussi directement de la taille des échantillons. La capacité d'une expérimentation à distinguer un effet entre une dose et le témoin augmente avec la taille des échantillons. Plus les échantillons utilisés sont de faible taille, plus le NOAEL est élevé et, par conséquent, plus le risque que le NOAEL produise un effet (risque de deuxième espèce) est grand ;
- on constate en pratique que plus l'expérience est de faible qualité, plus le NOAEL est élevé, ce qui n'est pas protecteur pour la santé publique ;
- on ne dispose en aucun cas d'intervalle de confiance pour ces valeurs. On ne dispose pas non plus d'un niveau de précision ou d'un ordre de grandeur pour son incertitude, puisque bien

souvent les valeurs expérimentales qui ont conduit à la détermination du couple LOAEL / NOAEL ne sont plus disponibles ;

- le niveau d'effet produit réellement par le NOAEL n'est pas connu. D'après Allen *et al.* [1994], pour les effets sur le développement par exemple, le pourcentage de réponse (effet néfaste) associé à un NOAEL serait en moyenne compris entre 5 et 20 %.

C'est pourquoi Crump [1984] proposait la Benchmark dose (BMD), historiquement utilisée dans le domaine des VTR cancérogènes, comme démarche alternative. Deux approches alternatives à l'estimation du couple NOAEL / LOAEL sont présentées ci-dessous.

6.1.1.2. MAXSD

L'estimation d'une dose maximale sans effet néfaste MAXSD [Tamhane *et al.*, 2001] n'est pas fondée sur le rejet d'une hypothèse d'absence d'effet, mais sur le rejet d'une hypothèse d'effet néfaste produit. Le risque de première espèce α est, dans ce cas, la probabilité de dire que la MAXSD ne produit pas d'effet alors qu'elle en produit un (tableau V) ; c'est donc celle qui nous intéresse particulièrement pour la construction d'une VTR. Cette probabilité choisie par l'opérateur peut être définie aussi faible que voulu.

Tableau V : Hypothèses testées et risques associés pour le calcul d'une MAXSD

Vérité (inconnue)	Hypothèse nulle H_0 : D_i produit un effet supérieur à un seuil choisi	Hypothèse alternative H_1 : D_i ne produit pas d'effet supérieur au seuil choisi
Décision		
Hypothèse nulle H_0	$1 - \alpha$	β
Hypothèse alternative H_1	α	$1 - \beta$

Dans cette approche, il faut définir ce que signifie « produire un effet néfaste ». Concrètement, le toxicologue définit un pourcentage maximal δ d'écart tolérable par rapport à la réponse observée sur le témoin. Est considérée comme « sans effet néfaste » une réponse incluse dans un intervalle du type : $E_0(1 \pm \delta)$ où E_0 est la réponse associée au témoin et δ le pourcentage maximal d'écart toléré. δ doit être fondé sur des critères biologiques et toxicologiques, plus que statistiques. La MAXSD est alors définie comme la dose maximale testée pour laquelle l'effet est inclus dans l'intervalle $E_0(1 \pm \delta)$, avec un risque α de se tromper. Par exemple, si $\delta = 10\%$ et $\alpha = 0,05$, alors MAXSD a $1 - \alpha = 95\%$ de chance de ne pas produire plus de 10 % d'effet par rapport au témoin. L'hypothèse nulle testée à chaque dose D_i est qu'elle produit un effet néfaste, c'est-à-dire qu'elle conduit à un effet en dehors de l'intervalle $E_0(1 \pm \delta)$. Les doses étant testées dans l'ordre décroissant, la première dose qui permet de rejeter l'hypothèse nulle est la MAXSD.

Contrairement au NOAEL, on est assuré que l'effet engendré par la MAXSD ne dépasse pas un pourcentage δ par rapport au témoin. Son effet est donc borné et cette borne δ doit être définie par

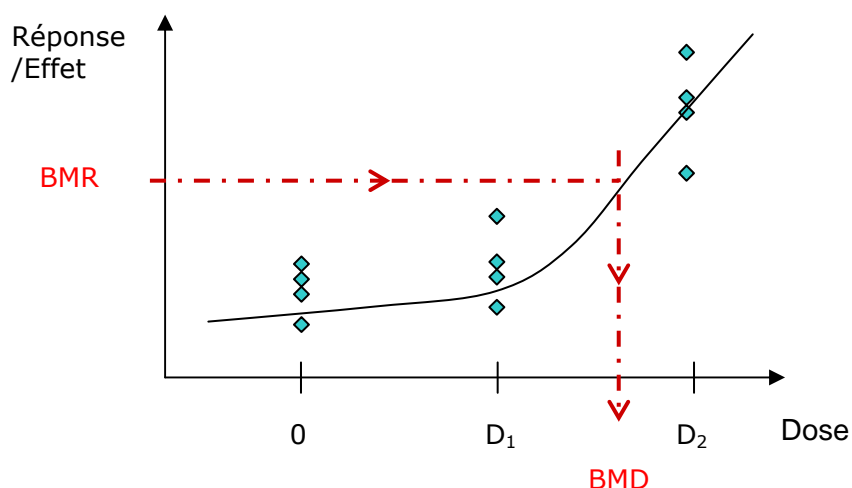
l'opérateur en explicitant la notion d'effet néfaste. En revanche et à l'instar du NOAEL, la MAXSD fait partie des doses testées. Si aucune dose ne permet de rejeter l'hypothèse nulle (hypothèse d'un effet néfaste), la MAXSD ne peut être déterminée.

D'un point de vue théorique, cette approche est donc plus satisfaisante que l'approche NOAEL / LOAEL ; d'un point de vue pratique également car si la MAXSD n'existe pas, l'expérience est inexploitable. On ne peut se trouver dans la situation ambiguë (et néanmoins fréquente) où l'on dispose d'un LOAEL sans NOAEL. Cette approche est manifestement très peu utilisée, ce qui est facilement explicable : l'incertitude et la variabilité conduisent dans celle-ci à baisser la valeur toxicologique et ce contrairement à ce qui se passe dans l'approche LOAEL / NOAEL. Par ailleurs, elle apparaît moins souple que l'approche BMD.

6.1.1.3. Benchmark dose

Une BMD peut être estimée à partir des mêmes résultats expérimentaux que les NOAEL / LOAEL ou la MAXSD. L'objectif de cette démarche est d'estimer la dose correspondant à un niveau de réponse défini ou à un pourcentage défini de réponse supplémentaire par rapport au témoin (figure 2). Ce niveau ou ce pourcentage est appelé BMR pour *Benchmark Response level*. Cette démarche se décline en différentes étapes succinctement décrites ci-dessous. C'est majoritairement la BMDL, autrement dit la limite inférieure de l'intervalle de confiance de la BMD, qui est considérée comme dose repère.

Figure 2 : Relation dose – réponse et définition de la BMD



Cette approche peut être employée sur des données de type quantale ou dichotomique (la réponse du test s'exprime sous la forme d'un nombre ou d'un pourcentage d'animaux affectés pour chaque dose) ou continue (la réponse du test est un paramètre continu mesuré sur les individus). Les données de reprotoxicité sur le développement (doses administrées sur les mères et effets observés sur la descendance) ont fait l'objet de développements particuliers pour prendre en compte l'effet

« portée », autrement dit le fait qu'à dose équivalente deux descendants issus d'une même portée ont plus de chance de produire une même réponse que deux descendants issus de deux portées différentes.

Des outils tels que *BMD Software* de l'US EPA et *PROAST* du RIVM ont été développés ces dernières années spécifiquement pour l'estimation des BMD / BMDL. Le concept de BMD est bien expliqué dans une synthèse récente de Filipsson *et al.* [2003].

Modèles théoriques de relation dose – réponse ou dose – effet

L'estimation d'une BMD s'appuie sur un modèle théorique de relation dose – réponse ou dose – effet. Les modèles fondés sur les mécanismes biologiques, quand ils existent, sont en général constitués de nombreux paramètres. Le nombre de paramètres devant toujours être inférieur au nombre de points expérimentaux, ce type de modèles est rarement utilisable dans la pratique. Des modèles mathématiques ou statistiques sont donc la plupart du temps employés. Il faut néanmoins être vigilant sur le fait qu'ils soient biologiquement acceptables [Slob, 2002], c'est-à-dire qu'ils n'aient pas des caractéristiques mathématiques en contradiction avec les phénomènes biologiques (réponse négative par exemple alors que l'on étudie un paramètre strictement positif), ou bien restreindre le domaine d'ajustement des paramètres.

Les modèles retenus pour les données quantales sont principalement fondés sur les fonctions de distribution de probabilité, telle que gamma, weibull, logistique, probit, *etc.* [Cal/EPA, 2004a ; Parham, 2005]. On distingue les modèles dans lesquels le risque à la dose zéro peut être choisi *a priori* par l'opérateur des modèles pour lesquels cela n'est pas possible (logistique et probit par exemple).

Les modèles mathématiques retenus pour les données continues sont variés : linéaire, polynomial, puissance, exponentiel, *etc.* [Cal/EPA, 2004b ; Slob 2002].

Les effets reprotoxiques sont considérés à seuil de dose, or les modèles précédemment cités sont sans seuil. On peut voir là comme un paradoxe. Il est naturellement possible de construire à partir des fonctions citées des modèles par morceaux prenant en compte explicitement un seuil de dose en dessous duquel aucun effet ne doit être observé chez aucun individu et au dessus duquel les effets apparaissent [Crump, 1984]. Ce seuil étant un paramètre du modèle, il est estimé comme les autres. Pourquoi alors considérer une BMD si on peut estimer (avec un intervalle de confiance) le paramètre que l'on recherche ? Il se trouve que l'ajustement d'un modèle par morceaux et la détermination des niveaux de confiance associés sont délicats et ce d'autant plus que le nombre de données est faible (en premier lieu déjà car cela ajoute un paramètre à un modèle qui en contient déjà pratiquement autant que le nombre de doses testées). L'estimation de ce seuil de dose par un tel modèle ne sera donc pas possible dans la majorité des cas, c'est-à-dire si on n'a pas testé plusieurs doses autour de cette valeur seuil. Il est donc préférable d'utiliser un modèle sans seuil et

d'estimer la dose correspondant à un certain niveau d'effet, faible. Il n'est pas à exclure dans certains cas, et ce d'autant plus que le niveau d'effet retenu est faible, que la BMD estimée soit inférieure au seuil d'effet réel, s'il existe (comme cela peut également se produire pour un NOAEL). Ainsi, dans la pratique, l'utilisation de l'approche BMD tend implicitement à omettre le principe du seuil sans effet au profit d'une dose dont le niveau d'effet, s'il n'est pas nul, est faible et contrôlé.

Spécificité des données sur le développement

Des approches permettant la prise en compte de l'effet « portée » (corrélation entre les individus d'une même portée) pour les données sur le développement ont été proposées dès la fin des années 70 [Williams, 1975] et sont l'objet d'une littérature importante. Elles nécessitent la modélisation d'une strate supplémentaire dans la démarche et augmentent *de facto* également le nombre de paramètres à estimer. Elles ne peuvent être employées que si on dispose des données complètes et non agrégées (comme c'est souvent le cas dans les publications) des résultats du test toxicologique et en particulier le nombre de descendants et celui des individus affectés de chaque portée (données quantales) ou l'effet observé sur chaque individu de chaque portée (données continues). Ces approches ont été initialement développées et sont encore largement fondées sur l'hypothèse d'une distribution bêta-binomiale (données quantales) du nombre d'individus affectés [Chen, 1989] : au sein d'une portée, le nombre d'individus affectés suit une loi de distribution binomiale de probabilité p , cette probabilité suivant elle-même une loi bêta dépendant de la dose considérée.

Cette approche s'est généralisée de plusieurs manières :

- l'hypothèse de loi bêta-binomiale est relâchée par l'emploi de la méthode « *Generalized Estimating Equations* » (GEE) [Liang and Zeger 1986 ; Fung *et al.* 1998] qui peut également être utilisée sur des données continues ;
- la corrélation inter-portée peut dépendre de covariables comme la taille de la portée [Rai and Van Ryzin 1985] ;
- plusieurs indicateurs relevés lors du test comme la mort prénatale et le taux de malformation chez les survivants peuvent être traités simultanément et non individuellement (*multiple outcomes approach*) [Chen and Kodell 1991 ; Fung *et al.* 1998 ; Gaylor *et al.* 1998].

Bien que plus complexe au niveau des calculs, la prise en compte de la corrélation inter-portée apparaît pertinente et recommandée par de nombreux auteurs et en particulier pour l'estimation correcte de l'incertitude qui est sous-estimée si l'effet « portée » n'est pas pris en compte [Kupper, 1986]. L'hypothèse de la loi bêta-binomiale peut néanmoins être préjudiciable [US-EPA, 2000] si elle n'est pas vérifiée, d'où l'utilisation accrue de l'approche GEE. Nous noterons que l'approche bêta-binomiale est implémentée dans le logiciel BMD *Software* de l'US EPA. Si on souhaite élaborer une dose repère prenant en compte différents indicateurs (données sur le développement), il est

préférable d'utiliser une approche conjointe (*multiple outcomes approach*) que de traiter séparément des différents indicateurs [Fung *et al.* 1998].

Ajustement du ou des modèles sur les données expérimentales

Le choix, *a priori*, d'un modèle mathématique ou d'une famille de modèles étant fait, il faut ajuster ce ou ces modèles sur les données expérimentales, autrement dit déterminer les valeurs des paramètres du modèle de manière à ce que celui-ci s'adapte le mieux aux données. Plusieurs approches sont possibles mais la plus courante est celle du Maximum de Vraisemblance. Les valeurs des paramètres retenues sont celles qui maximisent la probabilité d'occurrence des valeurs expérimentales observées. L'incertitude liée aux données expérimentales est à l'origine d'un intervalle de confiance sur ces paramètres. Nous ne décrivons pas plus cette approche car il existe de nombreux ouvrages traitant de ces questions et nous considérons que l'opérateur n'aura pas à programmer lui-même ces calculs.

Le modèle étant ajusté, se pose la question de sa légitimité : le modèle peut-il être considéré comme adapté à l'évolution des données. L'utilisation d'un test d'ajustement (*goodness-of-fit test*) comme le test du Chi² de Pearson permet de répondre à cette question. L'hypothèse H₀ de ce test est que le modèle est adapté aux données. Si cette hypothèse n'est pas rejetée, le modèle sera considéré comme valable. Néanmoins d'autres critères sont à prendre en considération : l'analyse des résidus (écarts entre la valeur prédite par le modèle et les valeurs observées) et de manière plus subjective l'analyse visuelle graphique du modèle [Cal/EPA, 2004].

Sélection du modèle le plus adapté aux données

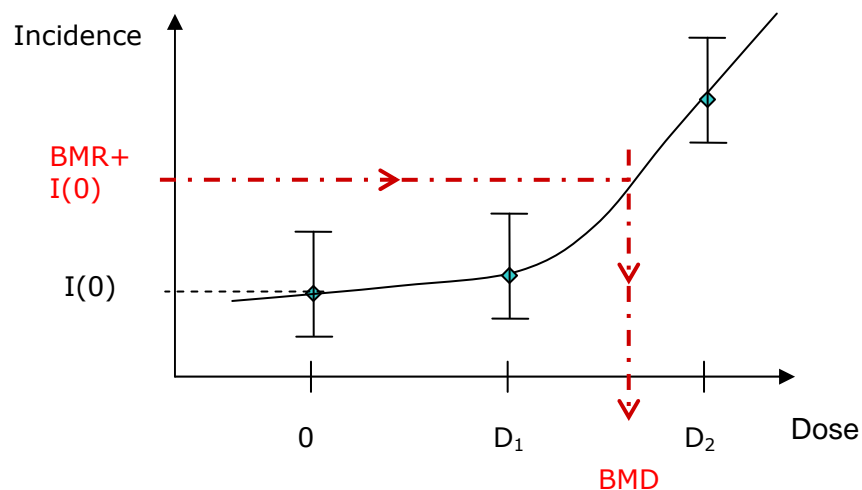
Le choix d'un modèle de relation dose – réponse ou dose – effet n'étant pas toujours évident, il peut être pertinent d'en ajuster plusieurs sur les données expérimentales et de décider au travers de critères statistiques lequel est le plus adapté aux données. Il n'y a malheureusement pas de critères universels et absolus pour faire ce choix. La *p-value* du test d'ajustement du Chi² qui mesure l'adéquation du modèle aux données expérimentales n'est pas à lui seul un critère suffisant pour choisir un modèle parmi plusieurs. En effet, plus un modèle contient de paramètres, plus il a de degrés de liberté, et donc plus il a de chance de bien s'ajuster à un jeu de données. En revanche, plus le nombre de paramètres du modèle est important, moins l'ajustement est robuste. D'autres critères comme celui d'Akaike [1973] appelé AIC (*Akaike Information Criterion*) contrebalancent la qualité d'ajustement du modèle par le nombre de paramètres. Ce critère est classiquement utilisé pour comparer des modèles qui sont ajustés par une même méthode d'ajustement (maximum de vraisemblance par exemple). Le modèle qui a la valeur du critère AIC la plus faible est retenu. Dans le cas particulier où les modèles testés appartiennent à une même famille de fonctions, un test fondé sur le ratio de vraisemblance peut être utilisé pour tester deux à deux les modèles.

Définition de la BMR

Dans le cas de données quantales (proportion d'animaux affectés), la BMD_x est définie comme la dose qui engendre une augmentation de $x\%$ de l'incidence par rapport au témoin. Cette augmentation de $x\%$ (appelée *BMR*) choisie par l'opérateur peut être définie de deux manières par rapport à la réponse du témoin :

1. comme un écart par rapport à l'incidence du témoin : $BMR = I(BMD) - I(0)$ où $I(BMD)$ est l'incidence de la dose correspondant à la BMD et $I(0)$ l'incidence au sein du groupe témoin. La BMD est donc obtenue de la manière suivante : $BMD = Dose[I(0) + BMR]$ (figure 3 ci-dessous). On parle alors d'*additional risk* ;

Figure 3 : Relation dose – réponse sur données quantales



2. comme un pourcentage par rapport à l'amplitude maximale de l'incidence observable :

$BMR = \frac{I(BMD) - I(0)}{1 - I(0)}$. Dans ce cas la BMD sera définie de la manière suivante :

$BMD = Dose[I(0) + (1 - I(0)) \times BMR]$. On parle alors d'*extra risk*. Ce cas de figure correspond à la situation où l'effet de base (*background*) et l'effet lié à la substance sont indépendants et additifs, ce qui justifie l'emploi prépondérant de cette approche *extra risk*. Qui plus est, à niveau de BMR équivalent, elle conduit mathématiquement à une BMD plus faible que l'approche *additional risk*.

Dans le cas des données continues, la BMR peut également être définie de plusieurs manières :

1. comme un écart absolu par rapport à l'effet observé sur le témoin : $BMR = E(BMD) - E(0)$ où $E(BMD)$ est l'effet engendré par la BMD et $E(0)$ est l'effet observé chez le contrôle [Allen *et al.*, 1994]. Dans ce cas la BMR a la même unité que l'effet mesuré ;
2. comme un écart relatif par rapport à l'effet observé sur le témoin : $BMR = \frac{E(BMD) - E(0)}{E(0)}$ [Slob, 2002]. Dans ce cas, la BMR est sans unité, mais ce n'est pas un pourcentage pour autant ;
3. comme un écart par rapport à l'effet observé sur le témoin standardisé par la variance de l'effet observé sur le témoin (σ) : $BMR = \frac{E(BMD) - E(0)}{\sigma}$ [Crump, 1995] ;
4. comme un écart rapporté à la plus grande variation possible de l'effet : $BMR = \frac{E(BMD) - E(0)}{E(\infty) - E(0)}$ [Murrell *et al.*, 1998]. Dans ce cas la BMR peut être assimilée à un pourcentage.

Suivant le choix effectué, la BMR est de nature différente. Qui plus est, le choix d'une approche est souvent difficile à justifier d'un point de vue biologique. Ces différentes définitions de la BMR rendent les BMD fondées sur des données continues peu comparables entre elles, et peu comparables également aux BMD issues de données quantales [Crump, 2002].

Approche hybride

Plusieurs auteurs dont Crump [2002] ont considéré qu'il était pertinent de rendre les estimations de BMD fondées sur des données quantales et continues méthodologiquement comparables et ont proposé une approche adaptée.

On appelle approche hybride la démarche qui consiste à modéliser à partir d'une réponse continue la probabilité d'observer un effet néfaste au sein du modèle animal. Pour cela, il faut préalablement se fixer le seuil à partir duquel on considère que l'effet est néfaste (comme dans l'approche MAXSD) où la probabilité d'observer un effet néfaste au sein du groupe non exposé. On transforme ainsi le problème continu en un problème quantal. C'est une autre manière de traiter les données continues. Crump [2002] a montré que l'approche hybride était plus pertinente en particulier dans l'estimation des intervalles de confiance que la transformation directe d'une variable continue en une variable quantale.

Choix du niveau d'effet

On distinguera clairement à cette étape les BMD élaborées sur données quantales des BMD sur données continues (approche hybride comprise). Dans le cas de données quantales, le choix du

pourcentage BMR revient à l'opérateur en fonction de considérations du type « sensibilité du test » ou « sévérité de l'effet étudié ». Les valeurs de 1 %, 5 % ou 10 % sont les plus classiquement proposées. Selon l'US EPA [US EPA, 2000] :

- un excès de risque de 10 % doit être pris par défaut pour les données quantales. Ces 10 % représentent la plupart du temps la limite de sensibilité des tests toxicologiques de cancérologie ou autres ;
- un excès de risque de 5 % est proposé pour certaines études dont la sensibilité est plus importante comme les études sur la reproduction et le développement ;
- un excès de risque de 1 % peut être proposé pour des résultats d'études épidémiologiques humaines qui ont en général la sensibilité suffisante.

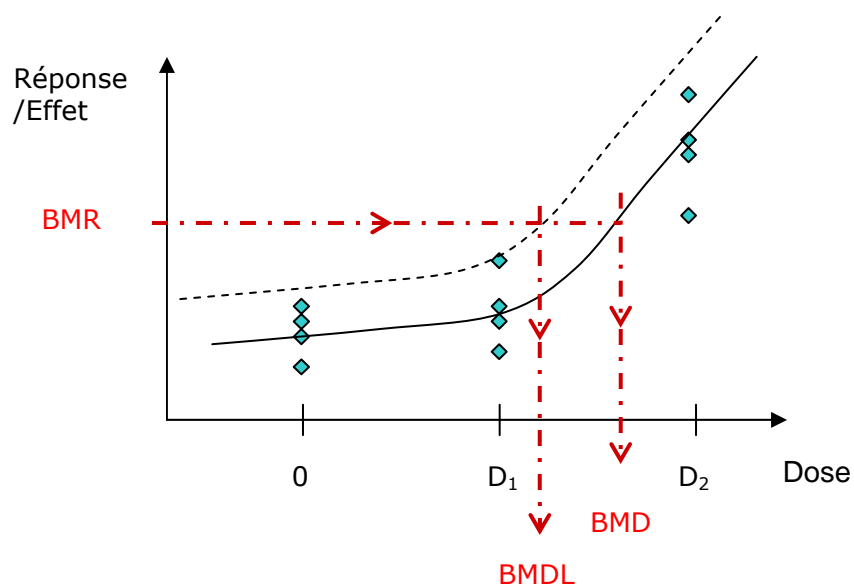
Les données continues forcent l'opérateur à définir le niveau d'effet à considérer comme néfaste sur des considérations biologiques ou par l'analyse des données de témoins historiques. En l'absence de seuil d'effet biologique considéré comme néfaste, Crump [1995], pour l'approche Hybride, considère comme seuil la valeur de la moyenne du témoin plus ou moins une fois l'écart type du témoin. Gaylor [2004] propose d'utiliser les valeurs des quantiles 1 % et 99 %. Il y a donc une certaine diversité dans les valeurs retenues [US EPA, 2000]. Ce problème rend le développement des BMD sur les données continues plus délicat.

Calcul de l'intervalle de confiance (IC) de la valeur estimée

La valeur retenue pour l'élaboration d'une VTR n'est pas la BMD, mais la plupart du temps, la borne inférieure de l'intervalle de confiance de la BMD (figure 4), appelée BMDL.

Plusieurs méthodes de calcul de l'intervalle de confiance de la BMD sont possibles, principalement : le ratio du maximum de vraisemblance et le Bootstrap [Crump, 1995]. Elle doit être dans tous les cas adaptée à l'approche initialement utilisée pour l'ajustement de la courbe dose – réponse ou dose – effet. L'approche fondée sur le ratio du maximum de vraisemblance était préconisée par Crump [Crump 1995].

Figure 4 : Relation dose – réponse et définition de la BMDL



Choix de la borne de l'IC pour la valeur retenue (BMDL)

La borne inférieure à 95 % est la plus classiquement retenue : par exemple, avec une $BMD_{10L_{95}}$, on est sûr à 95 % que l'effet de la BMDL ne dépasse pas 10 % par rapport au témoin. L'intervalle de confiance considéré rend compte de l'incertitude liée au caractère plus ou moins aléatoire de la réponse d'un individu à une dose de toxique dans le groupe d'animaux. Il dépend du modèle animal considéré, de l'effet observé et du protocole expérimental (nombre d'animaux, nombre de doses, etc.). Si on répète un grand nombre de fois la même expérience avec le même protocole et le même modèle animal, on s'attend à ce que la BMD calculée à chaque expérience soit 95 fois sur 100 supérieure à la valeur de la BMDL, telle que précédemment définie. Sur une population infinie du même modèle animal, on a, au plus, 95 % de chance que la BMDL produise 10 % d'effet.

Cet intervalle de confiance :

- ne rend pas compte d'une réelle variabilité intra-espèce, car la variabilité observée au sein d'un groupe d'animaux de laboratoire est très inférieure à la variabilité en milieu naturel (à espèce identique) ;
- n'indique rien concernant une possible transposition des résultats de l'animal à l'homme ;
- n'indique rien si le modèle animal ou le protocole expérimental sont modifiés (exposition, alimentation, etc.) ;
- ne dit pas que la BMDL est une valeur sans effet.

Prendre pour seuil de référence la borne inférieure de l'intervalle de confiance de la BMD, c'est s'assurer que le résultat fourni n'est pas uniquement celui de l'expérience en question, mais plus

généralement celui de toute expérience réalisée avec le même protocole et le même modèle animal pour le même effet.

Contrairement au NOAEL, plus la taille des échantillons et le nombre de doses testées sont faibles, plus la BMDL est faible ; la BMDL pénalise donc le protocole expérimental de moins bonne qualité et s'avère ainsi plus protectrice pour la santé publique que l'approche NOAEL / LOAEL.

Les comparaisons menées par Allen [1994] entre NOAEL et BMDL sur des résultats d'études de toxicité sur le développement font apparaître des ratios moyens respectivement de l'ordre de 1,2 et 0,7 entre NOAEL et BMD_{5L95} et NOAEL et BMD_{10L95} sur des données continues, mais des ratios moyens respectivement de l'ordre de 6 et 3 entre NOAEL et BMD_{5L95} et NOAEL et BMD_{10L95} pour des données quantales. Autrement dit, d'après l'étude d'Allen, les BMDL seraient du même ordre de grandeur que les NOAEL pour les données continues mais de plus faible valeur pour les données quantales.

La plupart des auteurs dont l'US-EPA proposent l'utilisation de la BMDL car l'un des apports de la démarche est justement le calcul d'un intervalle de confiance non disponible dans l'approche LOAEL / NOAEL et prenant en compte l'incertitude liée au protocole expérimental. En revanche, Murrell *et al.* [1998] la réfutent et considèrent que la dose de référence doit être fondée sur la BMD (estimation moyenne) représentative de la toxicité de la substance et ne pas dépendre du protocole expérimental, de la méthode de calcul de l'intervalle de confiance, *etc.* Par ailleurs, ils remarquent que, dans le cas de faible protocole expérimental, la BMDL peut être inférieure de plus d'un ordre de grandeur à la BMD, ce qui interroge sur la vraisemblance de son utilisation.

Bien que développée depuis les années 80, l'approche BMD est encore peu utilisée car elle apparaît plus complexe ; néanmoins elle permet entre autre :

- d'élaborer une relation dose – réponse en prenant en compte l'ensemble des résultats de l'expérimentation animale ;
- de rendre explicite des choix ou hypothèse (niveau d'effet jugé comme néfaste par exemple) bien souvent implicite dans l'approche NOAEL / LOAEL ;
- de quantifier le niveau d'effet de la dose retenue et de lui associer un intervalle de confiance ;
- d'être plus conservatoire pour la santé publique en produisant des valeurs d'autant plus basses que l'incertitude est importante (études de qualité moyenne).

6.1.2. Retour d'expérience de l'étude de faisabilité

La phase pilote présentée en annexe 2 a porté sur six substances : linuron, 2-éthoxyéthanol (EGEE), di-n-butylphtalate (DnBP), butylbenzylphtalate (BBP), nonylphénol et toluène. Cette étude nous a permis premièrement de constater que les informations statistiques relatives à l'estimation du couple

LOAEL / NOAEL n'étaient pas toujours explicites dans les articles, en particulier le test qui a mis en évidence le LOAEL et le niveau de significativité associé. Aucune BMD n'était disponible pour les substances et effets considérés. Une étude de faisabilité sur la construction de benchmark doses (BMD) a alors été réalisée pour trois substances : le Di-n-butyl phtalate, le linuron et le 2-éthoxy-éthanol concernant des effets sur le développement. Les études utilisées sont citées dans le tableau VI et les résultats sont présentés en détails en annexe 3.

Tableau VI : Etudes utilisées pour tester la construction de BMD

	DnBP	Linuron	EGEE
Etude utilisée	Lee <i>et al.</i> , 2004	McIntyre, 2000	Doe <i>et al.</i> , 1984
Effet critique	diminution des spermatoocytes	hypoplasie des testicules	foetotoxicité
Protocole d'échantillonnage	4 groupes de dose + témoin 8 animaux examinés par dose	3 groupes de dose + témoin 44-69 animaux examinés	3 groupes de dose + témoin 96-136 animaux examinés

Les BMD / BMDL ont été construites à partir du logiciel BMDS version 1.3.2., disponible gratuitement sur le site Internet de l'US EPA. Différents modèles mathématiques ont à chaque fois été testés. La méthode d'ajustement du modèle aux données est le maximum de vraisemblance. Le calcul de la BMDL est fondé sur la distribution asymptotique du ratio de vraisemblance (Chi2). Le niveau de confiance associé à la BMDL est systématiquement 95 %.

Les points à retenir de cette expérience sont développés ci-dessous.

Les modèles de BMD prenant en compte un effet « portée » n'ont pas pu être employés car les informations nécessaires (par portée) n'étaient pas disponibles dans les articles concernés.

L'analyse des données du **DnBP** fait apparaître une BMD_{10L} de plusieurs ordres de grandeur inférieure à la BMD₁₀, témoignant d'une grande incertitude qui est liée, d'une part, au faible nombre d'individus examinés par dose (8) et, d'autre part, au fait que la première dose testée (qui correspond d'ailleurs au LOAEL) produit déjà 50 % d'effet sur l'échantillon, alors qu'aucun effet n'est constaté sur le témoin. En l'absence de NOAEL et parce que la BMDL apparaît irréaliste, se pose alors la question de l'utilisation de la BMD versus le LOAEL. Faut-il rejeter l'utilisation de la BMD qui produit un effet faible mais incertain au profit d'un LOAEL dont l'effet est fort ? On constate en tout cas que la valeur du ratio « LOAEL / 10 » est encore supérieure à celle de la BMD estimée et naturellement très supérieure à la BMDL.

Pour cet exemple, le fait de rendre explicite les incertitudes dans l'approche BMD ne doit pas conduire au paradoxe qui consisterait à rejeter la BMD au profit du couple LOAEL / NOAEL pour lequel aucune confiance n'est estimable. Notamment, l'utilisation d'une BMD versus une BMDL ne

peut de toute façon se faire sans facteur de sécurité en sus, car, dans le cas contraire, cela favoriserait les faibles protocoles expérimentaux. En fait, dans un tel cas, la question principale consiste à savoir si les données disponibles sont suffisantes pour élaborer une VTR.

Pour le **Linuron**, BMD_{05} et BMD_{05L} sont très proches l'une de l'autre et proches également de la LOAEL, première dose testée et qui est associée à un faible pourcentage d'effet observé. Le choix de la BMD_{05L} plutôt que du LOAEL n'aura dans ce cas pas d'impact sur la valeur finale de la VTR proposée sauf si le LOAEL est divisé par 10. Néanmoins, l'interprétation est très différente : dans un cas (BMDL), c'est une valeur dont on est presque sûr qu'elle ne produit pas plus de 5 % d'effet et dans l'autre (LOAEL), c'est une valeur dont on est presque sûr qu'elle produit un effet sans le quantifier précisément. Pour l'évaluateur de risque, comme pour le gestionnaire, cette différence n'est pas anodine. Qui plus est, il serait possible d'estimer une BMDL correspondant à un niveau d'effet plus faible.

Ce cas amène également une discussion sur la pertinence toxicologique du modèle de relation dose – réponse employé et retenu sur des critères statistiques et ce pour deux raisons :

1. le modèle retenu conduit à un « bruit de fond » potentiel de 0,35 % d'effet (difficile à observer sur un échantillon de 50 individus) sachant qu'aucun effet n'est observé sur le témoin. Cette valeur, très éloignée du niveau d'effet auquel on s'intéresse (5 %) n'a évidemment pas ou très peu d'influence sur la valeur de la BMDL. Néanmoins on peut se poser la question de la crédibilité de l'existence d'un « bruit de fond » non nul pour ce type d'effet.
2. la dose la plus élevée a dû être retirée de l'analyse sans quoi aucun modèle ne pouvait être ajusté. Cette pratique est clairement proposée par l'US EPA [2000] dans une telle situation car, pour l'élaboration de la VTR, on s'intéresse en premier lieu aux données expérimentales se trouvant à proximité du niveau d'effet de la BMD que l'on souhaite estimer (généralement 1 à 10 %). Quelles sont néanmoins les limites de cette pratique ?

Pour l'**EGEE**, il est apparu impossible d'établir une BMD sur les effets de fertilité car seule une dose conduisait à un résultat différent du témoin. Le protocole expérimental est dans ce cas tout aussi inadapté à l'estimation d'une BMD qu'à celle du couple LOAEL / NOAEL. Les données de développement font apparaître un niveau d'effet sur le témoin de 50 % environ et une variabilité de l'effet (dents de scie) importante sur les premières doses. L'approche BMD / BMDL conduit dans ce cas à des valeurs bien plus faibles que l'approche LOAEL / NOAEL qui n'est pas adaptée à ce cas de figure. On peut s'interroger sur le choix de cet effet critique pour l'élaboration d'une VTR quel que soit le type de la dose repère retenue.

Comme on peut le constater, la construction de la BMD / BMDL conduit, systématiquement et explicitement, à se poser des questions sur le protocole expérimental, sur l'effet critique analysé et

les incertitudes / variabilités liées à l'estimation de la dose repère ainsi que sur son interprétation. Elle permet de renforcer les discussions entre toxicologues et statisticiens.

Cependant, les exemples ci-dessus ne prétendent pas illustrer l'ensemble des situations et révéler toutes les questions inhérentes au choix d'une dose critique. Ils font ressortir la nécessité de compléter un tel travail.

6.1.3. Présentation des doses repères

Afin qu'une discussion collective puisse s'engager sur le choix final de la dose repère à utiliser, le maximum d'informations sera présenté :

1. fournir le couple NOAEL / LOAEL pour chacun des effets critiques retenus et chaque type d'exposition pertinente. Un LOAEL seul sera discuté de manière plus contraignante. Avec le couple, il apparaît également nécessaire de fournir l'incidence de la réponse donnée, correspondant au LOAEL et au NOAEL ;
2. fournir le nom du ou des tests qui ont servis à déterminer ce couple NOAEL / LOAEL ainsi que la valeur du risque de première espèce α considérée ;
3. fournir la MAXSD si elle a été estimée (étude spéciale) ;
4. fournir une ou plusieurs BMD / BMDL, correspondant à une BMR de 5 et 10 % si cela est possible. Toutes hypothèses ou choix de calcul effectués au cours de la démarche seront décrits et justifiés, en particulier : (1) le logiciel utilisé pour l'ajustement et la méthode d'ajustement ; (2) les modèles de relation dose – réponse testés ; (3) le mode de calcul de la BMR et le ou les pourcentages d'effet retenus ; (4) la méthode de calcul et le niveau de confiance de la BMDL. Tous les résultats intermédiaires seront présentés, en particulier : (i) les résultats d'ajustement (valeurs et écart type des valeurs des paramètres, *p-value* du test du Chi² de Pearson) ; (ii) les résultats des comparaisons inter-modèles ; (iii) les valeurs des BMD et des BMDL conjointes. Une approche hybride peut être proposée pour les données continues pour comparaison ou en remplacement de l'approche directe.

Sont privilégiés, *a priori*, dans l'ordre :

- l'approche BMD / BMDL ;
- la MAXSD si elle existe ;
- le couple NOAEL / LOAEL ;
- enfin, en dernière intention, un LOAEL seul ou un NOAEL seul.

Néanmoins, et *in fine*, le choix de la dose critique résulte d'une discussion collégiale sur les différentes doses repères.

A ce stade, une présentation devant un groupe pluri-disciplinaire d'experts est donc nécessaire, afin de discuter des différentes doses repères possibles pour appréhender leur pertinence et leur signification. Cela permettra d'estimer la confiance à accorder à la VTR. Le débat contradictoire est ici indispensable.

6.2. Choix des facteurs d'incertitude

Les facteurs d'incertitude (UF) reflètent à la fois l'incertitude scientifique existante sur la transposition d'une espèce et d'un individu à l'autre comme sur la transposition d'une situation d'exposition à une autre ou sur la disponibilité des connaissances au moment de la construction de la VTR. Leur application suit certaines règles qui ne sont pas immuables, permettant d'apporter des modifications au cas par cas. La discussion avec des experts lors du choix de ces facteurs est donc nécessaire. Les différents facteurs d'incertitude proposés dans la littérature pour la construction des VTR [IPCS 1994 ; ECETOC, 1995, 2003 ; European Commission, 2001 ; Commonwealth of Australia, 2002 ; US EPA, 2002 ; IEH, 2003 ; OEHHA, 2003] sont présentés dans le tableau VII. Ces facteurs d'incertitude ne sont pas spécifiques des VTR reprotoxiques.

Tableau VII : Facteurs d'incertitude proposés dans la littérature pour la construction de VTR

Acronyme	Interprétation des UF	Valeurs des UF
UF _A	Variabilité inter-espèce cinétique/dynamie	1- 4/ 2,5 ou 1-3,16/3,16 (10)
UF _H	Variabilité inter-individuelle cinétique/dynamie	1- 3,16/ 3,16 (10)
UF _L	Usage d'un LOAEL plutôt que d'un NOAEL	1, 3 ou 10
UF _S	Transposition d'une exposition subchronique à chronique	1, 3 ou 10
UF _D	Insuffisance des données (en qualité et en quantité)	1, 3 ou 10
	Sévérité de l'effet	1, 3 ou 10

La valeur haute de 10 pour chaque UF est utilisée par défaut, lorsque aucune connaissance ne permet de la réduire. L'application d'une valeur plus faible doit être argumentée par des éléments scientifiques pertinents. Les valeurs de 10 pour ces UF sont fondées sur les méthodes d'évaluation internationales dont l'argumentaire est détaillé ci-après.

La valeur numérique finale de l'UF est un indicateur de la confiance que l'on peut avoir dans la VTR. Si l'ensemble de ces facteurs est appliqué, on peut se retrouver avec un UF global de 100 000 qui est considéré par les organismes d'expertise comme trop important pour accorder une confiance à la VTR [US EPA, 2002]. En règle générale, les scientifiques s'accordent pour dire qu'une VTR peut être construite s'il y a assez d'éléments pour que l'UF global ne soit pas supérieur à 3000 pour une exposition respiratoire et 10000 pour une exposition orale, ce qui se vérifie lors de la consultation des bases de données VTR. Ces différences de valeurs sont liées à la prise en compte, lors de la construction d'une VTR par inhalation, d'une concentration équivalente humaine ramenant le plus souvent l'UF_A à 3 (toxicodynamie).

6.2.1. Les facteurs proposés dans les ouvrages de référence

6.2.1.1. *Facteurs d'incertitude lié à la variabilité inter-espèces*

En théorie

Le facteur d'incertitude inter-espèces, nommé UF_A , est appliqué lorsqu'une étude animale est utilisée pour construire la VTR. Il est destiné à prendre en compte les différences de toxicocinétique et de toxicodynamie entre l'espèce testée et l'homme. Sa valeur maximale utilisée par défaut peut atteindre 10, postulant ainsi que l'homme est plus sensible que l'animal. Historiquement, ce facteur 10 provient de la décomposition du facteur de sécurité de 100 qui était utilisé dans le domaine de la sécurité alimentaire [Lehman and Fitzhugh 1952]. Par la suite ce facteur a été décomposé en deux (10×10) afin de tenir compte des transpositions inter et intra-espèces [FAO 1965 ; Barnes and Dourson 1988]. La valeur de 10 utilisée actuellement correspond à l'application de 2 composantes de 4 ($10^{0,6}$) et 2,5 ($10^{0,4}$) ou de 3,16 ($10^{0,5}$) et 3,16 ($10^{0,5}$) respectivement pour les différences de toxicocinétique et de toxicodynamie. Ces deux composantes ont été proposées au début des années quatre-vingt-dix pour permettre de séparer les considérations toxicocinétiques et dynamiques afin de les étudier séparément lorsque des données sont disponibles pour l'une ou l'autre [IPCS, 1994]. Le choix de ces composantes a récemment fait l'objet d'un document publié par l'OMS [WHO, 2005].

Les analyses effectuées sur la variabilité des métabolismes et de l'excrétion des xénobiotiques indiquent que la valeur 4 ($10^{0,6}$) utilisée par défaut pour la composante toxicocinétique couvrirait une bonne partie de la population générale adulte pour les voies métaboliques les plus renseignées [Renwick 1993]. Pour la voie orale, plusieurs études mentionnent que la transposition entre espèces des doses administrées serait proportionnelle à la surface corporelle, elle-même corrélée au poids corporel (rapport des poids moyens à la puissance $\frac{2}{3}$) [Mahmood 1999 ; Rhomberg and Lewandowski 2006]. Cela sous-entend que les différentes espèces auraient la même sensibilité à une dose donnée par unité de surface corporelle. L'OMS ou l'US EPA considèrent que lorsque l'ajustement des surfaces corporelles est réalisé, la valeur par défaut de 10 du facteur d'incertitude UF_A peut être réduite à 3. Toutefois, les scientifiques ne semblent pas d'accord sur la prise en compte de cet élément. Le JECFA et le JMPR estiment que le métabolisme des substances toxiques ne présente pas nécessairement une bonne corrélation avec le métabolisme général de l'organisme, reflétés par le poids et la surface corporelles, et que la conversion des surfaces corporelles n'est pas suffisamment étayée par des résultats expérimentaux. Ainsi, une importance particulière doit être accordée au jugement d'expert lors du choix de ce facteur d'incertitude.

Pour la voie respiratoire, un ajustement dosimétrique fondé sur des paramètres physico-chimiques et biologiques (flux sanguins, coefficient de partage, etc.) peut être réalisé si les connaissances sont suffisantes, permettant également de réduire au maximum la part toxicocinétique de l' UF_A [US EPA 1994]. En pratique, l'US EPA propose un UF_A de 3 lorsqu'un ajustement dosimétrique est réalisé.

Si l'ensemble de la communauté scientifique ne retient pas les mêmes hypothèses lors de l'application de l' UF_A , il semble qu'elle s'accorde sur la valeur 10 utilisée par défaut et sur les deux composantes, toxicocinétique et dynamique. Théoriquement, les valeurs possibles de l' UF_A sont étayées par les éléments du tableau VIII.

Tableau VIII : Valeurs d' UF_A proposées en théorie dans les documents guides

UF_A	Valeur numérique	
Composante toxicocinétique	Si absence de données	3 ou 4
	Si une partie de la toxicocinétique identique (absorption, distribution, élimination, etc.)]1- 3 ou 4[
	Si l'ensemble de la toxicocinétique sensiblement la même ou si coefficient d'ajustement de doses utilisé	1
	Si la toxicocinétique montre que les concentrations à la cible sont inférieures chez l'homme	<1
	Si modèle PBPK renseigné	—*
Composante toxicodynamique	Si utilisation d'une étude humaine	—*
	Si absence de donnée	2,5 ou 3
	Si la toxicodynamie est identique	1
	Si homme moins sensible	<1
	Si utilisation d'une étude humaine	—*

* — : facteur d'incertitude non appliqué

En pratique

La pratique des organismes élaborant des VTR a été évaluée au travers des bases de données et documents disponibles sur Internet, telles que celles de l'US EPA, l'ATSDR, Santé Canada, etc.

Il est rare que le facteur d'incertitude UF_A soit inférieur à 1, bien que cela soit précisé comme possible dans les ouvrages de référence, et même si l'homme est considéré comme moins sensible que l'animal. Un exemple *a contrario* a été identifié, dans la construction de la VTR de l'éthylène glycol butyl éther (EGBE) fondée sur des effets hématologiques (hémolyse), où l' UF_A utilisé par Santé Canada est égal à 0,5 alors que celui utilisé par l'US EPA est égal à 1, en dépit du fait que les éléments de toxicologie discutés par ces deux organismes étaient strictement les mêmes (les études *in vitro* ont montré que les hématies humaines étaient moins sensibles à l'action de l'EGBE que les hématies de rat).

Pour les VTR construites avant les années quatre-vingt-dix, la valeur de l' UF_A était très souvent égale à 10. Actuellement, l'évolution de sa valeur diffère selon les pratiques des organismes : l'US EPA tend à réduire le facteur d'incertitude UF_A lorsque des informations toxicocinétiques et/ou toxicodynamiques sont prises en compte, mais la règle théorique n'est que rarement suivie. Par exemple, pour l'acétate de vinyle, un ajustement dosimétrique a été appliqué en 1990 pour transformer une concentration chez l'animal en concentration équivalente humaine et l' UF_A a été réduit à 3 ($10^{0,5}$). Pour la même construction et la même concentration équivalente humaine, l'ATSDR a utilisé un UF_A de 10. Le même raisonnement (UF_A réduit à 3 après calcul d'une

concentration équivalente humaine) a été appliqué à la méthylisobutylcétone, au cyclohexane et au sulfure d'hydrogène pour les VTR par inhalation de l'US EPA.

Lorsqu'un modèle PBPK est disponible, ce qui est encore rare, le facteur est égal à 1 ou 3 en fonction des données de toxicodynamie disponibles : pour le chlorure de vinyle, l'US EPA applique un UF_A égal à 3 car les données de toxicodynamie ne sont pas suffisamment renseignées ; alors que pour l'EGBE, l' UF_A appliqué par l'US EPA est égal à 1 car les études *in vitro* montrent que l'homme est moins sensible que l'animal pour l'effet considéré.

Finalement, il est encore aujourd'hui fréquent que l' UF_A soit égal à 10 (cf bases de données). En résumé, les valeurs de l' UF_A utilisées en pratique sont étayées par les éléments du tableau IX.

Tableau IX : Valeurs d' UF_A utilisées en pratique

UF_A		Valeur numérique le plus souvent utilisée
Composante Toxicocinétique	Si absence de données	3
	Si une partie de la toxicocinétique est identique (absorption, distribution, élimination, etc.)	1 à 3
	Si l'ensemble de la toxicocinétique est sensiblement la même ou si coefficient d'ajustement de doses utilisé	1
	Si modèle PBPK renseigné	1
	Si utilisation d'une étude humaine	—*
Composante Toxicodynamique	Si absence de donnée	3
	Si la toxicodynamie est identique	1
	Si homme moins sensible	1
	Si utilisation d'une étude humaine	—*

*— facteur d'incertitude non appliqué

6.2.1.2. Facteur d'incertitude lié à la variabilité inter-individuelle

En théorie

Le facteur tenant compte de la variabilité inter-individuelle est appliqué pour prendre en compte la variation de sensibilité dans l'ensemble de la population humaine lorsque l'étude a été réalisée sur un groupe restreint (comme par exemple dans le cas d'une étude réalisée en milieu professionnel) ou sur l'animal de laboratoire, dont la variabilité inter-individuelle est réduite. Ce facteur devrait permettre de tenir compte des populations sensibles (enfants, personnes âgées, femmes enceintes, etc.) et des différences de réponses toxicocinétiques (polymorphismes dans les enzymes du métabolisme par exemple) ou toxicodynamiques (sensibilités différentes au niveau de la cible, par exemple différence de nombre de récepteurs), sans pour autant viser les sujets les plus sensibles (notion de sujets hypersensibles).

Quand les études proviennent d'expérimentations animales, cette variabilité n'est pas détectée en raison d'échantillons de petite taille et à la représentativité limitée. Historiquement, le facteur de 10 a été justifié au moyen d'une analyse des relations dose – effet issues d'un nombre important d'expériences de létalité aiguë chez l'animal (DL50), qui a montré que dans 92 % des cas, ce facteur

prenait en compte les individus les plus sensibles dans les expérimentations [Dourson and Stara 1983]. Toutefois, l'homogénéité génétique, la stabilité des conditions de vie et l'absence de maladie particulière chez les animaux de laboratoire ne reflètent qu'une très faible variation d'effets d'un individu à l'autre, par rapport à ce qui se passe chez l'homme : hétérogénéité génétique, modes de vie très différents d'une sous population à l'autre, facteurs de risque associés, présence de pathologies particulières, états hormonaux hétérogènes, présence de sous groupes sensibles, *etc.* Ce facteur de 10 est donc très théorique.

Les études réalisées chez l'homme l'ont été majoritairement pour les paramètres toxicocinétiques (devenir de la substance dans l'organisme), chez des adultes sains, issus de l'analyse des données cliniques sur les médicaments. Calabrese indiquent que le facteur 10 serait suffisant pour couvrir 80 à 95 % de la population humaine [Calabrese 1978, 1985, cité dans Thuret 2004]. Hattis et ses collaborateurs, qui ont analysé la variabilité de différents paramètres toxicocinétiques (AUC, demi-vies, concentrations plasmatiques, *etc.*) chez les adultes sains, indiquent que pour la médiane des substances étudiées, un facteur 10 correspondrait à 7 à 9 déviations standards dans la population adulte saine [Hattis *et al.* 1987]. Les équipes de Kalberlah et de Renwick ont montré que les facteurs de 10 et de 4,5 couvriraient respectivement plus de 99 % ou 95 % de la population adulte saine [Kalberlah and Schneider 1998 ; Renwick and Lazarus 1998]. D'après ces études, un facteur de 10 couvrirait donc les différences toxicocinétiques au sein d'une population adulte saine mais pas celles liées aux mécanismes toxiques, ni aux statuts variés [KEMI, 2003].

Plus tard, Renwick étudiait la variabilité toxicocinétique et la variabilité toxicodynamique de manière séparée, à l'aide de plusieurs études réalisées chez l'adulte sain. Il montrait que les différences toxicocinétiques étaient généralement plus importantes que les différences toxicodynamiques et qu'un facteur de 4 était suffisant pour prendre en compte la variabilité toxicocinétique de 99 % des individus adultes sains dans 80 % des substances étudiées. Ainsi, il proposait des facteurs de 4 et de 2,5 couvrant respectivement les différences de toxicocinétique et de toxicodynamie dans la population adulte saine [Renwick 1991]. A la suite, l'OMS proposait un facteur de 3,16 pour la part toxicocinétique (polymorphisme génétique sur les enzymes, différences de clairance liées à des différences physiologiques, *etc.*) et un facteur 3,16 pour la part toxicodynamique (différences de sensibilité à la cible, par exemple pour l'affinité à un récepteur), en précisant que les données n'étaient pas suffisantes pour identifier deux sous facteurs différents [IPCS, 1994].

Kalberlah et Schneider proposaient en 1998 un facteur inter-individuel de 25, composé d'un facteur pour la toxicocinétique de 8 et d'un facteur pour la toxicodynamie de 3. Le facteur de 8 pour la toxicocinétique était lui-même fondé sur un facteur de 5 issus des analyses de Hattis *et al.* (1987) et de Renwick (1991) et un facteur de 3 prenant en compte les polymorphismes enzymatiques. Selon les auteurs, ces paramètres toxicocinétiques étant dépendants, le résultat s'exprimait par une somme ($5+3=8$). Pour le facteur global, la toxicocinétique et la toxicodynamie étant indépendantes l'une de l'autre, ils proposaient de l'exprimer comme le produit des deux sous-facteurs ($4 \times 8=24$).

Enfin, ils précisait qu'il n'était pas nécessaire de considérer les enfants ou les personnes âgées comme plus sensibles, bien que dans certains cas, les enfants pouvaient montrer des sensibilités plus grandes. Pour les personnes âgées, ils précisait que les informations étaient insuffisantes pour conclure sur cette sensibilité particulière.

D'autres études [Renwick *et al.* 2000a, 2000b ; Dorne *et al.* 2001, 2002 ; Walton *et al.* 2001] ont ensuite évalué la validité du facteur de 3,16 proposé par l'OMS pour les différences toxicocinétiques, en utilisant des données humaines sur la cinétique de certains médicaments métabolisés par le cytochrome P450 1A2. Leurs conclusions étaient que si 99 % de la population adulte saine était couverte par ce facteur, il ne s'appliquait pas aux femmes enceintes, aux personnes âgées, aux enfants ou encore aux patients atteints de maladies hépatiques. Par ailleurs, il était totalement inadapté pour les nouveaux-nés (99 à 100 % des individus non couverts) et pour les femmes enceintes à terme (50 % non couverts). Les auteurs proposaient l'application d'un facteur supplémentaire pour les substances substrats du cytochrome P450 1A2 lorsque les populations cibles étaient les nouveaux-nés. De même pour les substances métabolisées par le cytochrome P450 2D6, ils précisait que pour couvrir 95 à 99 % des individus métaboliseurs rapides, métaboliseurs lents, des personnes âgées et des enfants, les facteurs variaient respectivement de 2,6 à 4,1, de 15 à 18, de 5 à 8,4 et de 22 à 45. Enfin, les analyses effectuées sur les variations dans la glucuronidation ont montré des différences moindres, puisque le facteur 3,16 couvrirait 99 % de la population générale, excepté les nouveaux-nés et les individus atteints de pathologies hépatiques ou rénales.

Enfin, le KEMI (Swedish Chemical Inspectorate) a proposé en 2003 une série de facteurs influençant les différences de sensibilité d'un individu à l'autre, avec des valeurs numériques associées. Ainsi, il a déterminé que l'âge, le polymorphisme génétique, le genre, les pathologies et le mode de vie influent de manière significative sur la sensibilité des individus. Pour l'âge, il propose un facteur de 1 à 10 si les enfants sont une population à prendre en compte et notamment si la substance étudiée est connue pour avoir comme organe cible un organe ou un système en développement chez l'enfant (systèmes nerveux, immunitaire, de la reproduction et endocrine). Pour le polymorphisme génétique, qui peut influencer sur la toxicocinétique (polymorphisme des cytochromes P450) et sur la toxicodynamie (maladie héréditaire entraînant une déficience des réparations de l'ADN), il est extrêmement difficile de connaître l'amplitude du facteur génétique influant sur les différences de sensibilités. Pour la prise en compte des modes de vie ou des pathologies, la diversité des possibilités ne permet pas non plus de proposer un facteur particulier. Les experts doivent juger ou non de la pertinence de l'application de la VTR aux populations sensibles en fonction de l'organe cible et de la pathologie identifiée, ainsi qu'en fonction des modes de vie identifiés. De ce fait, le KEMI propose qu'un facteur UF_H de 3 à 5 pour la toxicocinétique soit utilisé pour tenir compte de la variabilité de sensibilité dans la population adulte saine et que le facteur UF_H de 3,2 pour la toxicodynamie soit gardé car les connaissances ne sont pas suffisantes pour proposer une

alternative solide à cette valeur. En conclusion, il propose l'application d'un facteur UF_H de 10 à 16 comme minimum requis pour la construction d'une VTR à seuil, en précisant qu'il ne couvre pas l'ensemble des sous populations identifiées comme à risque. Par ailleurs, compte tenu du manque de connaissance lié aux facteurs génétiques, aux modes de vie ou aux pathologies, il est impossible de proposer une valeur par défaut qui tiendrait compte de ces éléments. Il est donc important d'avoir recours à un jugement d'expert qualitatif au cas par cas, en fonction du type d'effet étudié, du mécanisme de la substance et du type d'exposition.

Le KEMI précise enfin qu'une attention toute particulière doit être portée aux périodes critiques d'exposition où la susceptibilité des individus peut être exacerbée, à savoir au moment de la conception, pendant les périodes pré- et post-natales, l'enfance et l'adolescence, ainsi que pendant la grossesse. Il insiste sur la nécessité de conduire des expérimentations animales représentatives des expositions pendant la petite enfance (étude chez les animaux jeunes) [KEMI, 2003].

En pratique

Les aspects théoriques sont ici souvent respectés en pratique (tableau X). La plupart du temps, l' UF_H est égal à 10. En effet, les VTR sont fréquemment issues d'études animales et, dans ce cas, étant donné que la variabilité inter-espèces dans les lots d'animaux testés est limitée, le facteur 10 est toujours appliqué. Lorsque des données utilisées sont humaines, elles sont fréquemment d'origine professionnelle et le facteur 10 est dans ce cas le plus souvent respecté pour prendre en compte les populations sensibles.

Pour quelques substances, les données proviennent d'études chez des groupes d'individus sensibles (par exemple, chez des asthmatiques, quand on observe les effets sur la fonction respiratoire) et, dans ce cas, le facteur est souvent réduit (3 ou 1).

En pratique, les éléments de discussion plus récents présentés plus haut sur la sensibilité de groupes d'individus particuliers ne sont pas appliqués actuellement pour construire les VTR.

Tableau X : Valeurs d' UF_H proposées dans les documents guides et utilisées en pratique

UF_H		Valeur numérique
Composante TK	Si absence de données	3
	Si utilisation d'une étude réalisée sur le groupe sensible chez l'homme (fonction de l'effet)	1
Composante TD	Si absence de donnée	3
	Si utilisation d'une étude réalisée sur le groupe sensible chez l'homme (fonction de l'effet)	1

6.2.1.3. Facteur d'incertitude lié à l'usage d'un LOAEL ou d'une BMD / BMC

En théorie

Pour les effets toxiques considérés comme survenant au-delà d'un seuil de dose, la VTR correspond théoriquement à une dose d'innocuité : une exposition à la substance dangereuse ne dépassant pas cette valeur n'est pas censée produire d'effet dans la population exposée.

Ce facteur d'incertitude est appliqué lorsque la VTR est construite à partir d'un LOAEL. Actuellement, il peut également être utilisé lorsqu'une BMD ou une BMDL est appliquée. Il est issu de l'étude de ratios LOAEL / NOAEL déterminés pour différentes substances sur différents modèles animaux. L'ECETOC, en 1995, recommande d'utiliser dans la majorité des cas un facteur 3, valeur correspondant à une moyenne approximative des données existantes. Néanmoins, cette valeur ne peut être considérée comme protectrice, puisque dans 50 % des cas environ, un ratio LOAEL / NOAEL supérieur peut être observé [ECETOC, 1995].

En pratique

Le facteur utilisé lors de l'utilisation d'un LOAEL est le plus souvent de 3 ou 10, mais peu de justification est donnée quant au choix de l'une ou l'autre de ces valeurs. Elle est laissée au jugement d'expert, selon les cas, en fonction du type d'effet, ainsi que de l'aspect de la relation dose – réponse.

Pour le facteur utilisé lors de l'utilisation d'une BMD / BMDL, il est le plus souvent égal à 1. Il est parfois égal à 3 ou à 10, mais peu de justification est donnée quant à l'application de ces valeurs. D'ailleurs, l'exploitation des bases de données de l'US EPA et de l'ATSDR par le groupe de travail a montré qu'en pratique, il n'y avait pas de règle spécifique pour le choix de la valeur numérique de ce facteur : l'ATSDR a utilisé une valeur de 1 pour l'ensemble des 8 VTR construites sur la base d'une BMDL. L'US EPA, qui a construit 30 VTR à partir de BMDL, a utilisé la valeur de UF_B de 1 pour 13 RfD et 13 RfC, la valeur de UF_B de 3 pour 1 RfD et 2 RfC et la valeur de UF_B de 10 pour 1 RfC, sans qu'une règle d'utilisation claire soit dégagée de cette utilisation (étude par rapport à la sévérité de l'effet, au type de données quantales ou continues, au pourcentage de la réponse, etc.).

6.2.1.4. Facteur d'incertitude lié à une transposition subchronique à chronique

En théorie

Le facteur d'incertitude lié à une transposition de durée subchronique à chronique est appliqué lorsque la dose critique utilisée a été déterminée à partir d'une étude subchronique (90 jours chez les rongeurs) et que la VTR s'applique pour des expositions chroniques (ce qui est souvent le cas lors de l'étude de la toxicité générale). L'application de ce facteur suppose qu'un effet observé lors

d'expositions subchroniques le sera aussi pour des expositions chroniques, à plus faible dose. Il peut également être utilisé lorsque l'incidence ou la sévérité de l'effet augmente avec la durée d'exposition.

En pratique

Ce facteur prend généralement les valeurs de 3 ou de 10. Il n'y a pas de justification concrète à l'application de l'une ou l'autre des valeurs. Cette application est donc laissée au jugement d'expert, en fonction des cas.

A noter que certains organismes (tel que l'US EPA) appliquent un ajustement supplémentaire à la concentration critique obtenue lorsque les études sont réalisées par inhalation chez l'animal, afin de tenir compte des différences de durée d'exposition entre l'animal de laboratoire (qui est généralement exposé de 4 à 8 heures par jour) et l'homme, dans des circonstances d'expositions environnementales (exposé 24 heures sur 24, 7 jours sur 7) [US EPA 1994]. L'application de ce facteur d'ajustement est issue de la loi de Haber [Haber 1924] qui, sous une forme simplifiée, exprime que le produit de la concentration par le temps conduit à une constante en terme de toxicité. Cependant, cette équation correspond à un cas particulier de la relation plus générale $C \times t^m = K$, ou $m = 1$. De plus certains auteurs émettent des réserves quant à sa validité pour tous les types de substances [Bunce and Remillard 2003].

6.2.1.5. Autres facteurs d'incertitude

En théorie

Ces facteurs d'incertitude sont soit lié à l'insuffisance de données, soit lié à la sévérité de l'effet critique et n'est pas systématiquement utilisé.

Dans le premier cas, il tient compte de la confiance que l'on peut accorder aux études toxicologiques, notamment quand celles-ci ne sont pas suffisamment nombreuses ou qu'il manque l'analyse d'un type d'effet. Il n'est donc pas le reflet d'une variabilité, mais d'un manque de connaissances. Il s'agit donc d'un facteur de prudence utilisé lorsque les données toxicologiques sont incomplètes.

Dans le second cas, il recouvre la prise en compte de la sévérité de l'effet critique. C'est plus sur cet aspect, que sur le manque de connaissances, que ce facteur est appliqué en pratique.

En pratique

Lorsqu'ils sont employés, ces facteurs est généralement compris entre 3 et 10, mais aucune règle ne fixe la valeur à appliquer en fonction des données. Par exemple, pour le DEHP, Santé Canada ajoute un facteur 10 pour tenir compte de la sévérité de l'effet (développement), alors que l'ATSDR,

pour un effet sur la reproduction, n'en propose pas. De même, pour les effets neurotoxiques du plomb, l'OEHHA propose un facteur 3 alors que le JECFA n'en propose pas.

6.2.2. Recommandations pour les facteurs d'incertitude à appliquer

6.2.2.1. *Facteurs d'incertitude lié à la variabilité inter-espèces*

Etant donné que la plupart des organismes sont actuellement d'accord pour prendre en compte les composantes toxicocinétique et toxicodynamique, **les éléments présentés au chapitre 6.2.1.1 seront utilisés pour la construction d'une VTR reprotoxique.**

6.2.2.2. *Facteur d'incertitude lié à la variabilité inter-individuelle*

Dans le cas des substances reprotoxiques, il n'est actuellement pas possible d'avoir une idée précise de la différence de sensibilité des populations. **Il est donc recommandé d'utiliser la valeur par défaut de 10 pour le facteur d'incertitude intra-espèce.**

Notons que, comme l'a fait remarqué le KEMI, compte tenu du manque de connaissance lié aux facteurs génétiques, aux modes de vie ou aux pathologies, il est impossible de proposer une valeur par défaut qui tiendrait compte de ces éléments. Il est donc important d'avoir recours à un jugement d'expert qualitatif au cas par cas, en fonction du type d'effet étudié, du mécanisme de la substance et du type d'exposition.

6.2.2.3. *Facteur d'incertitude lié à l'usage d'un LOAEL ou d'une BMD / BMC*

On doit en premier lieu se poser la question de la pertinence d'un LOAEL isolé, car LOAEL et NOAEL sont théoriquement déterminés simultanément sauf si le LOAEL correspond à la première dose testée non nulle de l'expérimentation. **Dans ce cas de figure, le protocole expérimental ne peut être considéré comme pertinent et le LOAEL issu d'une telle expérience ne devrait pas être accepté pour la construction d'une VTR. La pratique montre cependant que, parfois, des exceptions peuvent exister en fonction des données (annexe 2). Pour la construction d'une VTR reprotoxique, le facteur UF_L ne s'appliquera qu'au cas par cas, dans des conditions spécifiques dont il faudra discuter de manière collégiale.**

Etant donné que la BMD n'est explicitement pas une dose sans effet, il paraît nécessaire de conserver un UF pour transformer la BMD / BMDL en « dose sans effet théorique ». Il s'agit ici d'un facteur de précaution. Le facteur proposé (UF_B) dépend de la BMR retenue. D'après la littérature, il semble que le NOAEL soit généralement encadré par la BMD_{10L95} et la BMD_{05L95} . Il ne faut donc pas surestimer la valeur du facteur. **Une valeur de 3 sera retenue lorsqu'une BMD_{10L95} sera utilisée et une valeur de 1 sera retenue lorsqu'une BMD_{05L95} sera utilisée.**

Compte tenu du recul insuffisant concernant ce facteur d'incertitude, il sera important, à l'issue des expériences menées, de le ré-évaluer, notamment dans les cas où la valeur du ratio « $BMD_{10L_{95}} / 3$ » est inférieure à la valeur « $BMD_{05L_{95}}$ ».

Un facteur d'incertitude doit également être envisagé dans le cas où une VTR serait construite à partir d'une BMD (et non d'une BMDL). Cette situation peut se produire si l'incertitude associée à l'estimation de cette BMD est importante et conduit à une valeur de BMDL de plusieurs ordres de grandeur inférieure à la BMD. Dans ce cas l'utilisation de la BMDL apparaît irréaliste, mais la BMD n'est pas nécessairement à rejeter face à un LOAEL par exemple. Un facteur de 10 pourrait être proposé dans ce cas.

6.2.2.4. Facteur d'incertitude lié à une transposition subchronique à chronique

Dans le cas des effets sur la reproduction et le développement, l'application d'un UF_S ne peut vraisemblablement pas se présenter car les études jugées pertinentes pour être exploitées pour la construction d'une VTR sont les études spécifiques à la reproduction et au développement. Pour les effets sur le développement, l'exposition n'est jamais chronique et la VTR ne le sera pas. Pour les effets sur la reproduction, les expositions dans les études expérimentales peuvent être chroniques (études sur une ou deux générations), **les VTR pourront donc a priori être construites sur cette base. Dans le cas où l'application d'un UF_S serait pertinente, c'est une discussion collégiale qui permettra de statuer au cas par cas en fonction des données.**

6.2.2.5. Autres facteurs d'incertitude

L'absence de données permettant de faire une évaluation complète de la reprotoxicité (absence d'étude sur plusieurs espèces, absence d'étude multigénérationnelle,...) fragilise les conclusions et un UF pour l'insuffisance des données pourrait être envisagé. Par ailleurs, on pourrait également faire preuve de prudence lorsqu'est étudié le cas des mélanges complexes de familles de substances (HAP, PCB, dioxines, etc.). Finalement, ce facteur d'incertitude serait applicable dans certains cas, mais qui sont difficiles à définir préalablement. **Cet UF_D sera appliqué au cas par cas. Les valeurs les plus courantes devraient être de 3 ou de 10 en fonction des données disponibles.**

Concernant la sévérité de l'effet, il n'est pas possible de déterminer a priori la similitude de cette sévérité entre l'animal et l'homme (on retient habituellement tout type d'effet reprotoxique montré chez l'animal). La sévérité de l'effet ne sera donc pas considérée dans l'application des UF.

6.2.2.6. Bilan des UF

Finalement, pour la construction de la VTR reprotoxique, les facteurs d'incertitude suivants seront appliqués à la dose critique retenue :

- un facteur pour la transposition inter-espèces UF_A (valeur variable selon les données), tenant compte de la variabilité existant d'une espèce à l'autre dans la réponse biologique ultime ;
- un facteur inter-individuel UF_H de 10 correspondant à la variabilité au sein d'une même espèce ;
- un facteur UF_B tenant compte de l'utilisation d'une BMDL, de 1 ou de 3 en fonction du type de BMDL calculée, de 10 dans le cas d'une BMD ou dans certains cas un facteur UF_L ;
- un facteur UF_D , tenant compte de l'exhaustivité des données toxicologiques et de la quantité des informations disponibles, dont l'application sera également proposée au cas par cas.

Enfin, au cas par cas, un facteur UF_S pourra être envisagé et sa valeur sera appréciée au regard des données toxicologiques.

Les valeurs de ces facteurs seront appliquées selon les éléments du tableau XI.

Tableau XI : Valeurs des facteurs d'incertitude à appliquer pour la construction de la VTR reprotoxique

Acronyme	Interprétation des UF		Valeurs des UF
UF_A	Variabilité inter espèces	Si absence de donnée	3
		Si une partie de la toxicocinétique est identique	1 à 3
		Composante toxicocinétique	
		Si l'ensemble de la toxicocinétique est sensiblement la même ou si utilisation d'un coefficient d'ajustement de doses	1 à 3
		Si modèle PBPK renseigné	1
		Si utilisation d'une étude humaine	–
UF_H	Variabilité inter individuelle	Composante toxicocinétique	3
		Composante toxicodynamique	
		Si toxicodynamie identique	1
		Si homme moins sensible	1
		Si utilisation d'une étude humaine	–
$UF_{B/L}$	Utilisation d'une BMDL / BMDL ou d'un LOAEL		1, 3 ou 10 au cas par cas
UF_D	Insuffisance des données (en qualité et en quantité)		1, 3 ou 10
UF_S	Transposition subchronique à chronique		Cas par cas

Les facteurs d'incertitude seront appliqués en fonction du type de données utilisées (animales ou humaines), des connaissances disponibles sur la toxicocinétique et la toxicodynamie, et en fonction de la nature des données utilisées.

Cette étape nécessite obligatoirement une discussion collégiale et un débat contradictoire sur la nature et les valeurs des facteurs d'incertitude à appliquer, sur la base de la méthode proposée. Ces choix devront être justifiés et rédigés clairement.

Enfin, les VTR produites seront présentées d'une manière synthétique sous forme d'un tableau, accompagnées d'une discussion sur les incertitudes qui leur sont associées et sur la confiance que l'on peut leur accorder. L'ensemble des hypothèses doit être décrit afin de discuter en toute transparence de la qualité de la VTR.

CONCLUSION

Ce document rassemble l'ensemble des éléments méthodologiques nécessaires à l'élaboration d'une VTR reprotoxique et notamment ceux liés aux choix qui sont effectués pour cette construction. Ainsi, la première partie regroupant les chapitres 1 à 4 rappelle les postulats fondamentaux pour la construction d'une VTR reprotoxique ; elle permet d'aider au choix des effets néfastes considérés et de l'effet critique reprotoxique à retenir pour la VTR ainsi qu'au choix d'une ou plusieurs études, animales ou humaines, qui seront exploitées. Le chapitre 5 permet de rassembler l'ensemble des éléments nécessaires à la construction de la VTR. Enfin, le chapitre 6, relatif à la méthode d'élaboration même de la VTR, permet d'une part l'identification et la construction des doses repères, et d'autre part l'application des facteurs d'incertitude adéquats, en fonction des données disponibles.

A partir de ces éléments, une VTR reprotoxique peut donc être proposée et argumentée, en accordant toujours une grande importance aux justifications des choix qui sont faits ainsi qu'à la durée et à la période d'exposition sur lesquelles elle s'applique. Ces éléments permettront en dernier lieu de conduire une discussion éclairée reprenant les différentes incertitudes entourant la valeur de la VTR proposée afin d'en avoir une utilisation optimale. Ces discussions d'experts sont indispensables et doivent être réalisées de manière collégiale. Elles pourront conduire à la proposition d'un indice de confiance pour la VTR, reflétant les incertitudes globales (comme le propose par ailleurs l'US EPA dans sa base de données IRIS et le RIVM). Cet indice de confiance tiendra donc compte de la nature et de la qualité des informations toxicologiques et épidémiologiques utilisées pour la construction de la VTR, de l'étendue des connaissances relatives à la substance, de la qualité de la dose critique proposée, ainsi que de la valeur des facteurs d'incertitude appliqués.

PERSPECTIVES DE RECHERCHE

Les travaux du groupe d'experts ont permis d'identifier les éléments nécessaires à la construction de VTR reprotoxiques. Au cours des discussions et réflexions, des insuffisances en terme de connaissances et de méthode ont été soulignées. Quatre thèmes ont été dégagés pouvant correspondre à autant de pistes de recherche qui développées permettraient d'améliorer les pratiques futures :

- le premier sur la problématique des ajustements allométriques dans le cadre de la transposition de l'animal à l'homme : ces facteurs allométriques, explicités dans la première partie du document, n'ont pas été repris dans la méthode proposée, du fait des manques de connaissances pour une application transparente, juste et satisfaisante. Dans le cadre des VTR à seuil, certains organismes utilisent ces facteurs pour la construction de VTR respiratoires, par l'application d'un coefficient dépendant des paramètres physiologiques des individus et physico-chimiques de la substance. Pour la voie orale, si un coefficient est proposé pour les VTR cancérigènes, fondé sur les différences en terme de surface corporelle entre l'animal et l'homme, il n'est pas utilisé pour les VTR à seuil (implicitement compris dans le facteur UF_A). Ces différences de traitement entre VTR sans seuil et VTR à seuil d'une part, et entre VTR orales et respiratoires d'autre part ne sont pas justifiées. La nécessité d'approfondir la compréhension des transpositions animal – homme et du facteur UF_A incite à recommander qu'une réflexion plus poussée soit faite en ce sens. **Le groupe de travail recommande que soit approfondie la notion des doses et concentrations équivalentes humaines, des facteurs allométriques, du UF_A et de leur utilisation dans la construction de VTR ;**
- le second concerne la problématique de l'ajustement des données toxicologiques dans le temps. En effet, dans les études réalisées par inhalation chez l'animal, les individus sont exposés de 4h, à tout au plus 8-10h par jour, 5 jours par semaine. Les doses repères (NOAEL, LOAEL, BMD ou BMDL) sont alors moyennées sur des durées continues afin d'être applicables chez l'homme pour des expositions continues (24h sur 24 et 7 jours sur 7). Cet ajustement, réalisé linéairement en fonction du temps, consiste à utiliser la loi de Haber simplifiée (concentration \times temps = constante en terme d'impact toxique). Ces ajustements conduisent à l'application systématique de $NOAEL_{ADJ}$ (pour « *adjusted* ») dont les fondements toxicologiques ne sont pas toujours compris voire opposés au principe d'effet à seuil de dose. **Le groupe de travail recommande qu'une réflexion soit menée pour mieux comprendre les possibilités d'application de tels ajustements ainsi que leur justification scientifique.**

- le troisième concerne le concept de la benchmark dose. Le travail réalisé sur les benchmark doses et les discussions inhérentes nécessitent de poursuivre une discussion sur le paradigme habituel retenu dans l'évaluation des risques. En effet, le choix et l'utilisation de BMD dans la construction de VTR (qui est souvent retenu actuellement au sein de l'US EPA) vont explicitement à l'encontre de la notion habituelle de « dose d'innocuité », bien que, comme évoqué dans ce document, les NOAEL ne soient pas véritablement des doses sans effet. **Le groupe de travail recommande qu'un retour d'expérience sur ce sujet soit mené ;**
- enfin, le quatrième concerne la validité des modèles animaux : en effet, il s'avère qu'au vu de l'ensemble des discussions au sein du groupe de travail « VTR reprotoxiques », les données comparatives sur l'anatomie, la physiologie et la physiopathologie des différents animaux de laboratoire par rapport à l'homme sont dispersées. Ces données sont pourtant connues et ils semblent intéressant à ce stade de réaliser une synthèse sur les différents modèles animaux utilisés en toxicologie (rats, souris, lapins, gerbilles, singes, chiens...), leurs principales caractéristiques, leur spécificité anatomique, *etc.* **Le groupe de travail recommande qu'une synthèse bibliographique soit réalisée. Cela permettrait par ailleurs d'avoir une analyse plus juste des informations recueillies dans le cadre de la construction d'une VTR, en fonction des études et des espèces testées.**

ACCOMPAGNEMENT OPERATIONNEL

A l'issue de ce travail, le groupe d'experts insiste sur l'importance de définir dès à présent les modalités d'accompagnement de la production des VTR reprotoxiques et leur cadre d'utilisation, notamment :

- le processus d'élaboration des VTR construites selon cette méthode : identification des compétences, organisation de l'expertise collective ;
- le processus de validation des VTR : légitimité des instances, critères de validation ;
- la codification et l'indexation de ces VTR, en particulier pour identifier leur origine, voie et durée d'exposition ;
- le mode de diffusion et l'accès aux VTR produites ;
- un processus régulier de révision des VTR déjà produites ;
- un document à l'attention des usagers, qui définit en particulier les conditions d'utilisation de ces VTR : domaine de validité, limites, interprétation ;
- l'évaluation de leur usage par un retour d'expérience.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Akaike H. **A new look at statistical model identification**. IEEE Transactions on Automatic Control. 1974; AU-19:716-722.
- Allen BC, Kavlock RJ, Kimmel CA, Faustman EM, **Dose – response assessment for developmental toxicity. II. Comparison of generic benchmark dose estimates with NOAELs**, Fundamental and Applied Toxicology, 1994, 23: 487-495.
- Association des épidémiologistes de langue française (ADELF). **Déontologie et bonnes pratiques en épidémiologie**. Révisions des recommandations de 1998. Proposition du groupe de travail *ad hoc* de l'ADELF. Décembre 2003.
- Barnes DG and Dourson M. **Reference dose (RfD): description and use in health risk assessments**. Regulatory Toxicology and Pharmacology. 1988;8:471-486.
- Bunce NJ, Remillard RBJ. **Haber's rule: the search for quantitative relationships in toxicology**. Human and Ecological Risk Assessment. 2003;9(4):973-985.
- Cal-EPA. DPR MT-1, 2004a. **Guidance for Benchmark Dose (BMD) Approach – Quantal Data**. Medical Toxicology Branch, Department of Pesticide Regulation, California Environmental Protection Agency, Sacramento, CA.
- Cal-EPA. DPR MT-2, 2004b. **Guidance for Benchmark Dose (BMD) Approach – Continuous Data**. Medical Toxicology Branch, Department of Pesticide Regulation, California Environmental Protection Agency, Sacramento, CA.
- Calabrese EJ. **Pollutants and high risk groups**. John Wiley and Sons. New York. 1978.
- Calabrese EJ. **Uncertainty factors of interindividual variation**. Regulatory Toxicology and Pharmacology. 1985;5(2):190-196.
- Chen JJ and Kodell RL. **Quantitative risk assessment for teratologic effects**. J. Am. Stat. Assoc. 1989;84:966-971.
- Chen JJ et al. **Analysis of trinomial responses from reproductive and developmental toxicity experiments**. Biometrics. 1991;47:1049-1058.
- Commonwealth of Australia. Department of Health and Ageing and enHealth Council. **Environmental health risk assessment, Guidelines for assessing human health risks from environmental hazards**. June, 2002. <http://www.health.gov.au/>
- Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France (CSHPF). **Les éthers de glycol dans les produits de consommation et la santé. Rapport du groupe d'experts**. CSHPF. Section des Milieux de vie. 2002.

- Crump KS and Howe RB. **A review of methods for calculating statistical confidence limits in low dose extrapolation.** In Toxicological Risk Assessment. Volume I. Biological and Statistical Criteria. Editeurs: Clayson DB, Krewski D and Munro I. CRC Press Canada, 1985.
- Crump KS. **Calculation of benchmark doses from continuous data.** Risk Analysis. 1995;15:79-89.
- Crump K. **Critical Issues in Benchmark Calculations from Continuous Data.** Critical Reviews in Toxicology. 2002;32(3):133-153.
- Doe JE. **Ethylene glycol monoethyl ether and ethylene glycol monoethyl ether acetate teratology studies.** Environmental Health Perspectives. 1984. 57:33-41.
- Dorne JL, Walton K, Slob W, Renwick AJ. **Human variability in polymorphic CYP2D6 metabolism: is the kinetic default uncertainty factor adequate?** Food and chemical toxicology. 2002;40(11):1633-1656.
- Dorne JL, Walton K, Renwick AG. **Uncertainty factors for chemical risk assessment. human variability in the pharmacokinetics of CYP1A2 probe substrates.** Food and Chemical Toxicology. 2001;39(7):681-696.
- Dourson ML, Stara JF. **Regulatory history and experimental support of uncertainty (safety) factors.** Regulatory Toxicology and Pharmacology. 1983;3(3):224-238.
- European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals (ECETOC). **Reproductive and General Toxicology of Some Inorganic Borates and Risk Assessment for Human Beings.** Technical Report N°63. Brussels, February 1995.
- European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals (ECETOC). **Recognition of, and differentiation between, nefaste and non-nefaste effects in toxicology studies.** Technical Report n°85, Brussels, December 2002. ISSN-0773-634 7-85. 56p.
- European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals (ECETOC). **Guidance on evaluation of reproductive toxicity data.** Monograph n°31, Brussels, February 2002. ISSN-0773-6347-31. 141p.
- European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals (ECETOC). **Derivation of assessment factors for human health risk assessment.** Technical Report n°86, Brussels, February 2003. ISSN-0773-6347-86. 86p.
- European Commission. **Council Directive 67/548/EEC** of 27 June 1967 on the approximation of laws, regulations and administrative provisions relating to the classification, packaging and labelling of dangerous substances. Official Journal of the European Communities 196, 16.8.1967, p. 1.

- European Commission. **Council Directive 91/414/EEC** of 15 July 1991 concerning the placing of plant protection products on the market. Official Journal of the European Communities L230, 19.8.1991, p. 1.
- European Commission. DG SANCO. **Draft Guidance Document. Guidance for the setting of acceptable operator exposure levels (AOELs)**. September, 2001. 16 p.
- Food and Agriculture Organization (FAO). **Evaluation of the toxicity of pesticide residues in food**. Joint report of the FAO working party on pesticide residues and the WHO Expert Committee on Pesticide Residues. 1965. FAO Meeting Report PL/1965/12, Rome.
- Filipsson AF, Sand S, Nilsson J, and Victorin K. **The benchmark dose method – review of available models, and recommendations for application in health risk assessment**. Critical Reviews in Toxicology. 2003;33(5):502-542.
- Fung K, Marro L, Krewski D. **A Comparison of Methods for Estimating the Benchmark Dose Based on Overdispersed Data from Developmental Toxicity Studies**. Risk Analysis. 1998;18(3):329-342.
- Gaylor D, Ryan L, Krewski D, Zhu Y. **Procedures for Calculating Benchmark Doses for Health Risk Assessment**. Regulatory Toxicology and Pharmacology. 1998;28:150-164.
- Gaylor DW. **An evaluation of benchmark dose methodology for non-cancer continuous-data health effects in animals due to exposures to dioxin (TCDD)**. Regulatory Toxicology and Pharmacology. 2004;40:9-17.
- Haber F. **Zur Geschichte des Gaskrieges**. In *Fuenf Vortraege aus den Jarhen 1920 – 1923*. Julius Springer. Berlin. 1924.
- Hattis B, Erdreich L, Ballew M. **Human variability in susceptibility to toxic chemicals – a preliminary analysis of pharmacokinetic data from normal volunteers**. Risk analysis. 1987;7(4):415-426.
- Hill Bradford. **The environment of disease: association or causation?** Proc. R. Soc. Med, 1965, 58:295-300.
- Institute for Environment and Health (IEH). **Uncertainty Factors: Their Use in Human Health Risk Assessment by UK Government**. The Interdepartmental Group on Health Risks from Chemicals (IGHRC). Leicester. UK. 2003.
- International Programme on Chemical Safety (IPCS). **Assessing human health risks of chemicals: derivation of guidance values for health-based exposure limits**. Environmental Health Criteria N°170. World Health Organization, Geneva. 1994.
- Kalberlah F and Schneider K. **Quantification of extrapolation factors**. Final Report Research Project N°16 06 113. Dortmund. Germany. BAU, Federal Environment Agency. 1998.

- KEMI, The Swedish National Chemicals Inspectorate. **Human Health Risk Assessment: Proposals for the Use of Assessment (Uncertainty) Factors.** Application to risk assessment for plant protection products, industrial chemicals and biocidal products within the European Union. Report n°1/03. January, 2003. Stockholm.
- Klimisch HJ, Andreae M, Tillmann U. **A systematic approach for evaluating the quality of experimental toxicological and ecotoxicological data.** Regulatory Toxicology and Pharmacology. 1997;25(1):1-5.
- Kupper LL, Portier C, Hogan MD, Yamamoto E. **The Impact of Litter Effects on Dose – Response Modelling In Teratology.** Biometrics. 1986;42(1):85-98.
- Lee KY, Shibutani M, Tagagi H, Kato N, Tagigami S, Uneyama C, Hirose M. **Diverse developmental toxicity of di-n-butyl phthalate in both sexes of rat offspring after maternal exposure during the period from late gestation through gestation.** 2004. Toxicology, 203:221-258.
- Lehman AJ, Fitzhugh OG. **100-fold margin of safety.** Q. Bull. Assoc. Food Drug. Off. U. S. 1954;18:33-35.
- Liang KY and Zeger SL. **Longitudinal data analysis using generalized linear models.** Biometrika. 1986;73(1):13-22.
- Mahmood I. **Allometric issues in drug development.** Journal of Pharmaceutical Sciences. 1999;88(11):1101-1106.
- McIntyre BS, Barlow NJ, Wallace DG, Maness SC, Gaido KW, Foster PM. **Effects of in utero exposure to linuron on androgen-dependent reproductive development in the male Crl:CD(SD)BR rat.** Toxicology and Applied Pharmacology 2000;167(2):87-99.
- Mitchell AE, Bakshi KS, Kimmel CA, Buck GM, Feuston MH, Foster PMD, Friedman JM, Holson JF, Hughes CL, Moore JA, Schwetz BA, Scialli AR, Scott Jr. WJ, Vorhees CV, and Zirkin BR. **Evaluating chemical and other agent exposures for reproductive and developmental toxicity.** Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A, 2004;67:1159-1314.
- Moore JA, Daston GP, Faustman E, Golub MS, Hart WL, Hughes Jr. C, Kimmel CA, Lamb IV JC, Schwetz BA, and Scialli AR. **An evaluative process for assessing human reproductive and developmental toxicity of agents.** Reproductive Toxicology, 1995;9(1):61-95.
- Murrel JA, Portier CJ, Morris RW. **Characterizing dose-response I: critical assessment of the benchmark dose concept.** Risk Analysis. 1998;13:177-182.
- Office of Environmental Health and Hazard Assessment (OEHHA). **Air toxics hot spots program risk assessment guidelines. The air toxics hot spots program guidance manual for preparation of health risk assessments.** Oakland, California. August, 2003.

- Odum J, Lefevre PA, Tittensor S, Paton D, Routledge EJ, Beresford NA, Sumpter JP, Ashby J. **The rodent uterotrophic assay: critical protocol features, studies with nonyl phenols, and comparison with a yeast estrogenicity assay.** Regulatory Toxicology and Pharmacology 1997;25:176-188.
- Organisation de Coopération et de Développement Economique (OCDE). **Lignes Directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques.** <http://www.oecd.org/> :
- 414. Guideline for teratogenicity studies (12 May 1981), mise à jour 22 janvie 2001 ;
 - 415. Etude de la reprotoxicité sur une génération (26 mai 1983) ;
 - 416. Etude de la toxicité pour la reproduction sur deux générations (26 mai 1983), mise à jour 22 janvier 2001 ;
 - 417. Toxicokinetics (Updated Guideline, adopted 4th April 1984) ;
 - 421. Essai de dépistage de la toxicité pour la reproduction et le développement (27 juillet 1995) ;
 - 422. Etude combinée de la toxicité à doses répétées et du dépistage de la toxicité pour la reproduction et le développement (22 mars 1996) ;
 - 426. Developmental neurotoxicity study (Draft new guideline – 2004).
- Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). OECD series on testing and assessment number 38. **Detailed background review of the uterotrophic bioassay. Summary of the available literature in support of the project of the OECD task force on endocrine disrupters testing and assessment to standardise and validate uterotrophic bioassay.** JT00141595. ENV/JM/MONO(2003)1. March, 2003. Paris. 217 p.
- Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). **Draft guidance document on reproductive toxicity testing and assessment.** Series on Testing Assessment N°43. November 2004.
- Parham F and Portier Ch. **Benchmark Dose Approach in Recent Advances in Quantitative Methods.** In Cancer and Human Health Risk Assessment. Edited by L. Edler and C. Kistos. 2005. Wiley and Sons.
- Rai K and Van Ryzin J. **A Dose-Response Model for Teratological Experiments Involving Quantal Responses.** Biometrics. 1985;41:1-9.
- Renwick AG, Symposium paper: **Safety factors and establishment of acceptable daily intakes,** Food Additives and Contaminants. 8(2), 1991: 135-150.
- Renwick AG. **Data derived safety factors for the evaluation of food additives and environmental contaminants.** Food Additives and Contaminants. 1993. 10:275-305.
- Renwick AG. **The use if safety or uncertainty factors in the setting of acute reference doses.** Food Additives and Contaminants. 2000a; 17(7):627-635.

- Renwick AG, Dorne JL, Walton K. **An analysis of the need for additional uncertainty factor for infants and children.** Regulatory Toxicology and Pharmacology. 2000b; 31(3):286-296.
- Renwick AG, Lazarus NR. **Human variability and noncancer risk assessment – an analysis of the default uncertainty factor.** Regulatory Toxicology and Pharmacology. 1998;27:3-20.
- Rhomberg LR, Lewandowski TA. **Methods for identifying a default cross-species scaling factor. Human and Ecological Risk Assessment.** 2006;12:1094-1127.
- Shelby MD, Newbold RR, Tully DB, Chae K, Davis VL. **Assessing environmental chemicals for estrogenicity using a combination of *in vitro* and *in vivo* assays.** Environmental Health Perspectives. 1996;104(12):1296-1300.
- Slob W. **Dose-Response Modeling of Continuous Endpoints.** Toxicological Sciences. 2002; 66(2):298-312.
- Squire RA. **Carcinogenic potency and risk assessment.** Food Additives and Contaminants. 1984;1(2):221-231.
- Tamhane AC, Dunnett CW, Green JW, Wetherington JD. **Multiple Test Procedures for Identifying the Maximum Safe Dose.** Journal of the American Statistical Association. 2001;96(455):835-843.
- Thuret A. **Evaluation des risques sanitaires et environnementaux : évaluation des incertitudes associées à la détermination des valeurs toxicologiques de référence.** Thèse présentée à la faculté de pharmacie de Dijon pour l'obtention du diplôme d'état de docteur en pharmacie. 25 juin 2004. Université de Bourgogne. Faculté de Pharmacie.
- US Environmental Protection Agency (US EPA). **Guidelines for developmental toxicity risk assessment.** Risk Assessment Forum. EPA/600/FR-91/001. December 1991. 70p.
- US Environmental Protection Agency (US EPA). **Methods for derivation of inhalation reference concentrations and application of inhalation dosimetry.** Environmental Criteria and Assessment Office. Office of Health and Environmental Assessment. EPA/600/8-90/066F. October 1994. 389 p.
- US Environmental Protection Agency (US EPA). **Guidelines for reproductive toxicity risk assessment. Risk Assessment Forum.** EPA/630/R-96/009. October 1996. 126p.
- US Environmental Protection Agency (US EPA). **A review of the reference dose and reference concentration processes.** Prepared for the Risk Assessment Forum. U.S. Environmental Protection Agency Washington, DC. December, 2002. Final Report EPA/630/P-02/002F.
- US Environmental Protection Agency (US EPA). **Benchmark dose technical guidance document.** External review draft prepared for Risk Assessment Forum. US EPA, Washington DC. October, 2002. Draft EPA/630/R-00/001.

-
- Walton K, Dorne JL, Renwick AG. **Uncertainty factors for chemical risk assessment: interspecies differences in the in vivo pharmacokinetics and metabolism of human CYP1A2 substrates.** Food and Chemical Toxicology. 2001;39(7):667-680.
 - Wanner T. **Current statistical Approaches to clinical pathological data form toxicological studies.** Toxicologic Pathology. 1992;20(3 Pt 2):477-479.
 - Williams DA. **The analysis of binary responses from toxicological experiments involving reproduction and teratogenicity.** Biometrics. 1975;31:949-952.
 - World Health Organization (WHO). Harmonization Project Document No. 2. **Chemical-specific adjustment factors for interspecies differences and human variability: guidance document for use of data in dose/concentration – response assessment.** WHO. Geneva. 2005. 96 pages.