

Toxicologie générale

La toxicologie correspond à une discipline vaste qui étudie l'impact des xénobiotiques (substances étrangères) sur les organismes vivants. C'est un des trois piliers de l'évaluation du risque comme il est expliqué ailleurs. Sa spécificité réside dans les possibilités qu'elle offre pour aborder les mécanismes d'action. Rappelons que ce n'est pas le rôle de la toxicologie d'élucider un mécanisme de pathogenèse associée à une exposition. Cependant, dans la mesure où il s'agit d'une science expérimentale, nos connaissances mécanistiques influencent grandement les tests mis au point pour étudier la dangerosité d'une substance.

Bien sûr, avant d'étudier les dommages que peuvent subir les organes et les tissus, il nous faut étudier comment les substances toxiques pénètrent, diffusent et éventuellement s'accumulent dans des compartiments précis du corps.

Faire la part entre la dangerosité (propriétés intrinsèques d'une substance) et le risque qu'entraîne l'exposition (probabilité de développer une pathologie)

- ▶ Introduire les notions d'approches expérimentales permettant d'aborder les mécanismes d'action
- ▶ Aborder les aspects qualitatifs (pathogénèse) et quantitatifs (relation dose-effet)
- ▶ Essayer d'établir le lien entre les seuils d'effet biologiques et les seuils d'exposition réglementaires

Prérequis : [L'organisme face aux agressions](#)

Voir aussi : [les bases de données toxicologiques](#), dans la rubrique documentation.

Le champ d'investigation de la toxicologie

La toxicologie s'intéresse particulièrement à l'identification du danger et à l'analyse du risque lié à l'exposition des organismes vivants aux xénobiotiques [1] (agents chimiques, physiques, et d'origine biologique) dans le but de définir la sécurité sanitaire des populations. A cet effet, la toxicologie développe et utilise des modèles expérimentaux moléculaires, cellulaires et intégrés ainsi que des modèles bio-informatiques.

GATOX, Septembre 2001.

L'évaluation des risques suit un processus en 4 phases (voir santé -environnementale). La toxicologie s'intéresse à la première phase du processus, à savoir la caractérisation du danger et la recherche d'une relation dose-effet. Rappelons que le danger est une propriété intrinsèque du produit, alors que le risque est la probabilité que ce danger se réalise.

Les dangers potentiels qu'entraîne l'utilisation de certaines substances ou l'exposition à celles-ci sont apparus au cours des années à la suite d'observations effectuées sur une population particulière, définie soit par le milieu professionnel soit par le mode de vie (voir aussi pour plus de précisions : [Facteurs inclus ou exclus d'une définition \(\)](#)), ou encore par

la proximité à une source d'émission environnementale. Les manifestations qui peuvent déclencher des investigations concernant une substance sont très diverses, soit consécutives à des accidents (contamination massives) soit à des expositions à plus long terme. Si la première approche est épidémiologique : comparaison de la population exposée au risque à une population témoin, pour établir le lien de la cause à l'effet, il est important de définir des mécanismes d'action et d'établir des modèles expérimentaux pour des études plus fines.

Nous verrons tout au long de ce chapitre qu'il existe plusieurs façons de définir la toxicité d'un produit. Le but ici est de donner un aperçu des moyens à notre disposition pour mettre en perspective certaines procédures réglementaires, mises en place dans l'optique de protéger les populations exposées, en particulier dans le milieu professionnel. Nous aborderons dans un deuxième temps les aspects qui concernent les recherches autour d'une substance dont on ne connaît pas encore les propriétés.

Quelques précisions sur les définitions

Pour éviter toute ambiguïté nous allons essayer de donner un sens précis à des termes qui sont utilisés plus particulièrement dans le cours de toxicologie, mais qui se rencontrent aussi dans d'autres chapitres. Le terme que nous allons employer le plus souvent est celui de **xénobiotique**. Son étymologie (xenos=étranger) indique qu'il s'agit de toute substance étrangère au corps. Un xénobiotique n'est donc pas nécessairement toxique.

La classification des toxiques, dont les effets néfastes peuvent être immédiats ou différés n'est pas facile. Ils peuvent être :

- ▶ Des agents physiques, chimiques ou biologiques,
- ▶ De nature organique ou minérale,
- ▶ Actifs sur le plan systémique (toutes les cellules peuvent être touchées) ou spécifiques d'organe (agents neuro- ou immunotoxiques par exemple).

Ce dernier point, intimement lié à notre connaissance du mécanisme d'action, occupera une partie importante du cours. En effet, cette spécificité d'organe (on parle d'organe cible) peut être due aux propriétés **toxicocinétiques** [1], mais peut également être liée à une sensibilité propre à une population cellulaire présente dans un organe (qui exprimerait un récepteur capable de lier le xénobiotique [2]).

Un type de toxicité mérite une mention particulière. Il s'agit de la **génotoxicité**, terme qui exprime la faculté des xénobiotiques à interagir sur le matériel génétique (altération de gènes ou de chromosomes). Les lésions génotoxiques peuvent, dans le meilleur des cas, être réparées ou aboutir à la mort cellulaire par apoptose, mais elles peuvent également être fixées lors de la division cellulaire et initier un processus de cancérogénèse. Nous verrons plus loin qu'il existe des cancérogènes non génotoxiques ou mutagènes, ce qui justifie la classique distinction entre substances cancérigènes et mutagènes.

Il nous faut également distinguer les substances dénommées **toxines**, responsables d'effets toxiques, parfois graves, mais qui sont produites par des agents biologiques, bactéries (les microcystines des cyanobactéries) ou champignons (l'aflatoxine produite par certains *aspergillus*). Il s'agit d'une distinction importante dans la gestion du risque et les mesures de contrôle de l'exposition.

Les voies d'exposition

Les xénobiotiques se trouvent dans notre environnement sous différents états physiques qui conditionnent leur contact avec l'organisme. Nous pouvons globalement envisager trois grandes voies d'absorption :

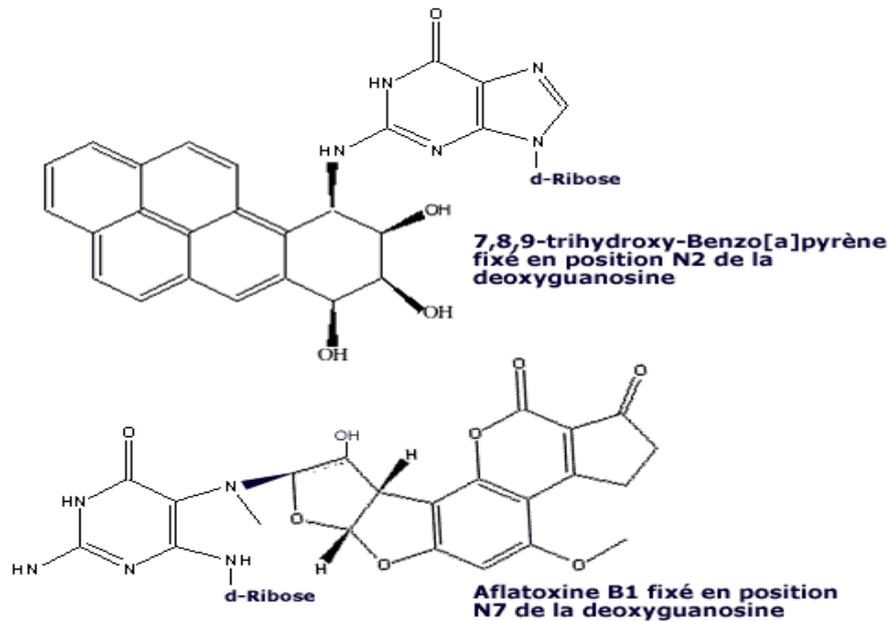
- ▶ La voie digestive, pour toute substance ingérée ;
- ▶ La voie respiratoire pour les substances gazeuses, mais aussi pour les particules en suspension ou les aérosols, qui contaminent l'environnement et les milieux de travail ;
- ▶ La voie percutanée pour les substances capables de traverser la peau.

La définition de ces voies est capitale dans la caractérisation toxicologique d'une substance et conditionne la recherche de celle-ci dans les différents milieux (air, eau, aliments). Bien évidemment, nous pouvons être exposés au même toxique par différentes voies, avec des effets potentiellement cumulatifs.

Nous nous intéresserons ici plus particulièrement aux voies digestive et respiratoire que nous illustrerons par des exemples, dans le cadre d'expositions aiguës ou chroniques. Une substance ingérée (un pesticide ou une toxine sécrétée par un champignon qui contamine les aliments), cheminera le long du tube digestif. Elle pourrait théoriquement avoir un effet dans la bouche, l'œsophage, l'estomac et ainsi de suite. L'absorption est traitée plus loin. Les xénobiotiques produisent leurs effets sur les tissus directement au contact, à condition que l'étape d'activation [1] ne nécessite pas le passage dans un organe précis, le plus souvent le foie. En conséquence, un xénobiotique inspiré (un gaz radioactif comme le radon ou des poussières d'amiante par exemple) aura d'abord un effet sur les voies respiratoires, ce qui n'empêche pas que des effets puissent intervenir après le passage dans le sang et la diffusion dans le corps.

Une bonne illustration peut être apportée par l'étude des effets des substances cancérigènes. Par exemple, les composés contenus dans la fumée de tabac agissent au niveau des voies aériennes. Non seulement ceci est confirmé par les données épidémiologiques (cancers du poumon), mais la présence de dommages de l'ADN des cellules alvéolaires ([Les adduits comme bioindicateurs](#)), sous forme d'adduits [2], démontre leur génotoxicité sur le plan moléculaire. De tels adduits ont été démontrés pour les HAP [3] comme le benzo[a]pyrène. En revanche, les HAP qui passent dans le tube digestif [4] auront plutôt tendance à former des adduits et à provoquer des cancers au niveau de l'œsophage.

Exemples d'adduits



Substances, doses et effets : considérations générales

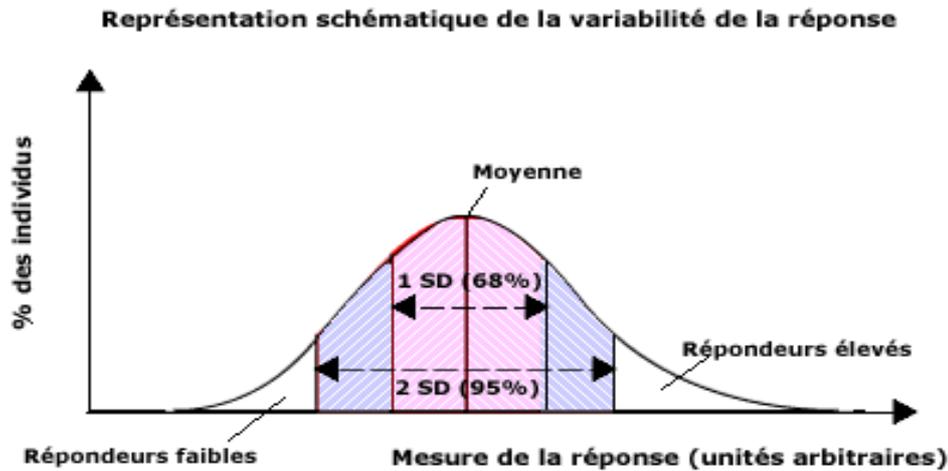
Face à des manifestations de toxicité après l'exposition à une substance, une de nos interrogations centrales sera de définir la **dose** qui les a provoquées. Si la relation **dose-effet** est un aspect important dans la recherche de la causalité, il nous faut garder à l'esprit que nous sommes face à des processus biologiques. La dose peut être vue comme une quantité totale ingérée à un instant t pouvant induire des effets toxiques immédiats. Le facteur temps est également très important. Face à l'agression que constitue l'exposition à une substance toxique, l'organisme dispose de moyens de défense. Ces moyens permettront à l'individu de faire face à une certaine dose, même en cas d'exposition répétée.

Bien entendu, comme il est représenté schématiquement ci-contre, la réponse des individus présente une certaine **variabilité**, exprimée sous forme d'une distribution avec une moyenne et un écart-type (mesure de la dispersion). Ici nous nous contentons de décrire la variabilité, ce qui a des conséquences sur la définition des normes d'exposition. Quelques unes des raisons de cette variabilité seront abordées dans la suite.

Historiquement, les essais toxicologiques conduits sur des animaux définissaient une DL50 (**dose létale 50**), c'est à dire la dose (administrée par exemple en une fois) qui provoque la mort de 50% des animaux. Ce paramètre est abandonné depuis l'application de la règle des 3R [1]. Le principal paramètre recherché est la **dose sans effets nocifs observables** (DSENO), exprimée en dose par unité de poids corporel et de temps, typiquement en mg/kg/j. Bien entendu la durée de l'essai sera définie en fonction du type de toxicité que l'on cherche à mesurer : aiguë ou chronique. Il existe aussi des situations intermédiaires (toxicité subchronique par exemple), que l'on essaiera de préciser en fonction de notre connaissance du délai d'apparition des manifestations de la toxicité.

Dans les exemples ci-dessus, il était implicitement admis que la toxicité intervient au delà d'un certain seuil. Ceci correspond à de nombreux processus. Il existe cependant des

exceptions. Pour des dommages qui interviennent avec une certaine probabilité il ne peut y avoir d'effet seuil car l'effet toxique peut se produire même aux expositions les plus faibles. C'est notamment le cas pour la génotoxicité et la cancérogénicité qui lui est associée.



Première étape critique : l'absorption

Il s'agit du processus par lequel les xénobiotiques sont introduits dans l'organisme, à partir du site de contact jusqu'à la circulation sanguine générale. Toutes les substances inhalées ou ingérées sont toujours dans le milieu extérieur tant que les barrières physiologiques n'ont pas été franchies. Il n'y aura donc pas de manifestations toxiques, à l'exception de certains symptômes locaux de type irritatif par exemple. L'efficacité de l'absorption varie avec les substances (propriétés physico-chimiques), leur concentration ou la voie d'exposition et dépend de leur forme (en suspension, en solution, adsorbée à la surface d'aliments). Ainsi, le fait de manipuler une substance toxique (ex : un pesticide) peut n'occasionner qu'une faible pénétration transcutanée. Si les mains souillées sont portées à la bouche, l'exposition peut être bien plus importante. Pour ces raisons, la définition du danger, sous forme de **valeurs toxicologiques de référence**, peuvent être déclinées en fonction de la voie d'exposition.

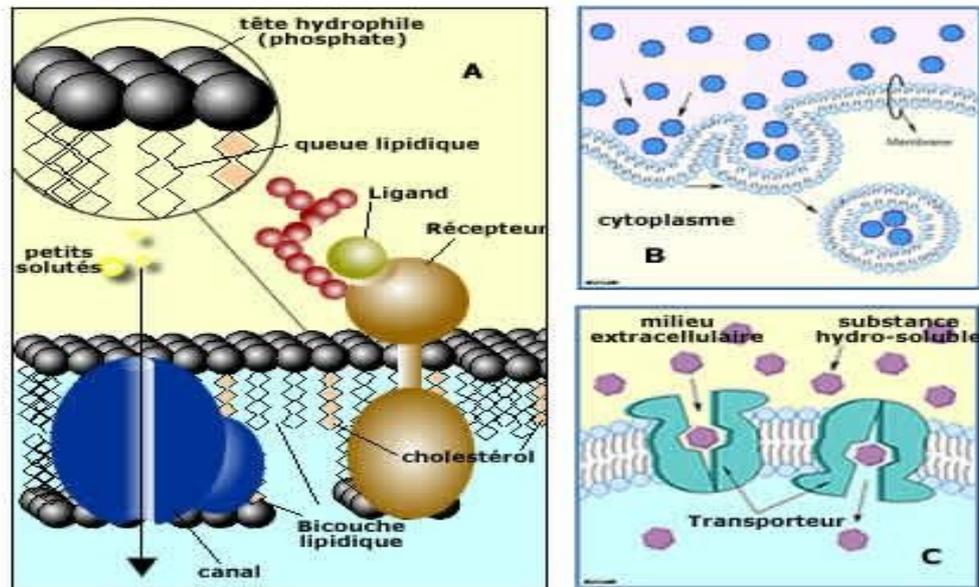
Il nous faut avant tout procéder à quelques rappels concernant le formidable obstacle qu'oppose le franchissement des membranes biologiques à tout élément à l'exception de ceux indispensables à la survie. La bicouche lipidique ne peut être franchie par les molécules polaires (plus ou moins hydrosolubles). Par contre les molécules liposolubles les traversent par diffusion passive qui ne dépend que du gradient de concentration (pas d'énergie nécessaire et pas saturable). Trois propriétés déterminent la capacité d'une molécule à passer à travers la membrane :

- ▶ Sa polarité (degré d'ionisation, pH, pK),
- ▶ Sa liposolubilité,
- ▶ Son poids moléculaire.

Ce dernier est critique pour pouvoir emprunter les pores d'un diamètre d'environ 4 Å, ce qui correspond à un poids moléculaire de 100 à 200 Da. Seules les cellules des capillaires et des reins possèdent des pores 10 fois plus grands, qui laissent passer des molécules d'environ

50000 Da (un peu moins que la taille de l'albumine (PM 60 kDa). Néanmoins, le transport de certaines substances met en jeu des mécanismes passifs ou actifs, nécessitant ou non une dépense d'énergie, spécifiques de certaines substances ou de familles de substances. Quelques exemples sont indiqués sur la figure ci-contre (voir aussi la légende de la figure [1]).

Différents modes de passage à travers la membrane cellulaire



L'absorption au niveau de l'appareil digestif

Toute substance étrangère ingérée doit être absorbée à travers les muqueuses digestives avant de diffuser dans le corps. Comme il a été dit précédemment, l'absorption peut avoir lieu tout au long du tube digestif (bouche, œsophage, estomac et intestins), mais son efficacité varie en fonction du site. Trois paramètres sont déterminants :

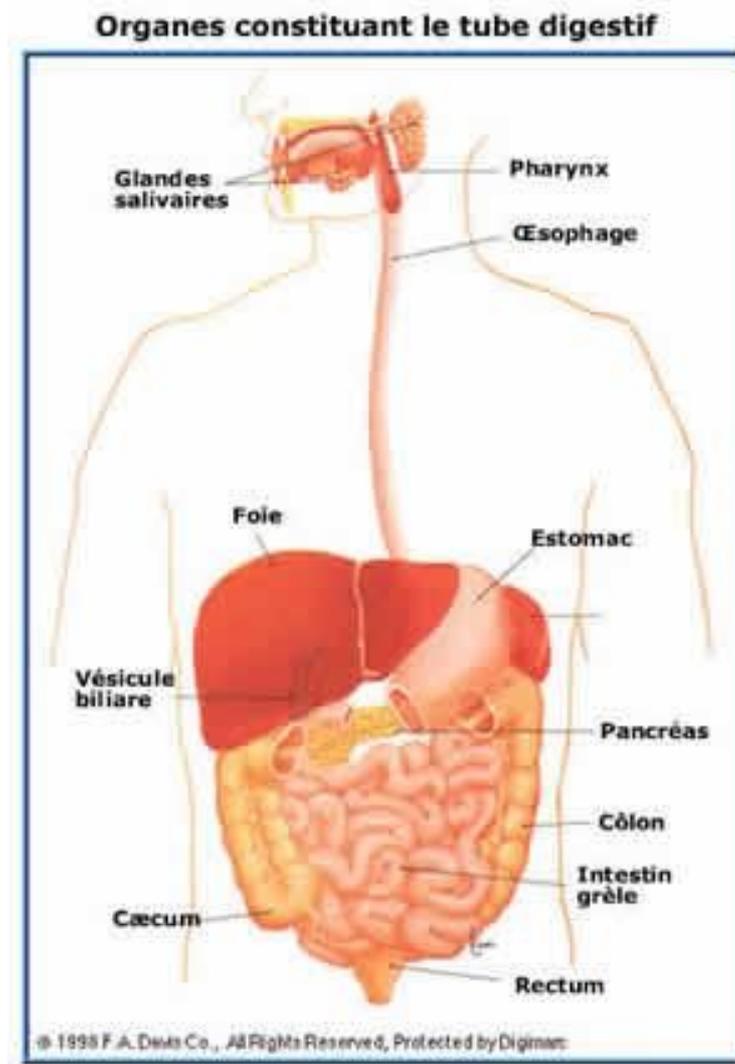
- ▶ La composition en cellules du site en question (il existe différents types de cellules spécialisées),
- ▶ Le temps de contact au niveau du site en question,
- ▶ Le pH local ou le reste du contenu présent en même temps que le xénobiotique.

Dans les conditions normales, il y a peu d'absorption de xénobiotiques au niveau de la bouche et de l'œsophage, largement en raison du transit rapide (faible temps de contact). Il existe cependant des exceptions comme la nicotine, absorbée au niveau de la muqueuse buccale ou certains médicaments administrés en sublingual (muqueuse peu épaisse et richement vascularisée). La forte acidité de l'estomac (pH 1 - 3) favorise l'absorption des acides faibles (non-ionisés et plus facilement diffusibles), plutôt que les bases faibles. D'un autre côté, l'acidité peut induire la dégradation (et l'inactivation) de certaines substances. La quantité d'aliments ingérés en même temps que le xénobiotique peut aussi modifier l'absorption au niveau de l'estomac.

Proportionnellement, la majeure partie de l'absorption intervient au niveau intestinal (muqueuse de type glandulaire, offrant une très grande surface du fait de son organisation en villosités et un long temps de contact du fait de la longueur de l'intestin grêle). Son pH voisin

de la neutralité est compatible avec le passage transmembranaire des acides et des bases faibles. Les petites molécules liposolubles peuvent pénétrer facilement par la voie intestinale par simple diffusion passive. La flore intestinale peut également modifier l'absorption en agissant sur certains xénobiotiques (biotransformation). Dans certains cas les produits peuvent être beaucoup plus toxiques (oxydation des amines en nitrosamines, cancérigènes). L'essentiel de l'absorption intervient dans l'intestin grêle et peu dans le côlon et le rectum.

Le riche réseau vasculaire intestinal converge vers la veine porte qui arrive au niveau du foie, un organe qui assure d'importantes fonctions (détoxification, biotransformation).



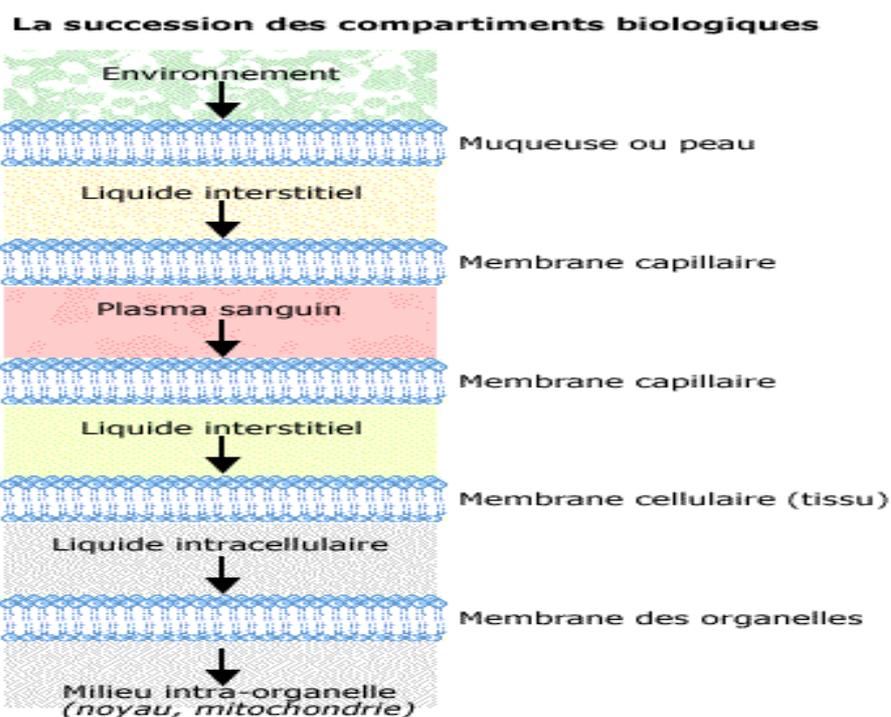
La distribution dans l'organisme

A partir du site d'absorption, le xénobiotique diffuse dans l'organisme selon un processus qui obéit à des règles biophysiques. Les paramètres cinétiques dépendent de la concentration et des propriétés physicochimiques de la substance. Nous considérons ici plutôt les situations d'expositions chroniques à des doses faibles pour lesquelles il s'agit de décrire le passage à travers les différents compartiments, en insistant sur :

- ▶ La diffusion dans le corps,
- ▶ L'influence de la voie d'absorption (et d'exposition),
- ▶ Le rôle des propriétés physicochimiques sur la mobilité, la persistance, l'élimination plus ou moins rapide.

Une fois les barrières physiologiques franchies, le xénobiotique pénètre dans le liquide interstitiel (celui qui entoure les cellules). Ce compartiment représente 15% du poids corporel total, à comparer à 40% pour le liquide intracellulaire et seulement 8% pour le plasma sanguin. Tous ces compartiments communiquent entre eux, mais seul le plasma sanguin est en mouvement et possède de ce fait une capacité de transport. Une fois dans le liquide interstitiel, le xénobiotique peut diffuser localement vers les organes voisins. Pour atteindre les organes distants, il doit franchir la membrane capillaire et rentrer dans la circulation sanguine. De cette façon, sous forme libre ou liée (voir section suivante), il peut y avoir une diffusion rapide dans tous les organes. Le système lymphatique pourrait constituer une voie alternative de diffusion. Cependant son mouvement lent fait qu'il contribue peu à la distribution des xénobiotiques.

Le principal obstacle à la distribution de toute substance est la nécessité de franchir une succession de membranes cellulaires (celles des cellules endothéliales des vaisseaux, puis celles des cellules des organes cibles). Rappelons qu'il existe plusieurs façons de traverser les membranes (diffusion passive ou facilitée, transport actif) en fonction du gradient de concentration, du poids moléculaire, de la polarité (hydro- ou liposolubilité). Globalement, une petite molécule non-polaire, présente en forte concentration, pénétrera dans les cellules plus rapidement. Pour ce qui concerne le devenir à l'intérieur de la cellule : diffusion cytoplasmique, liaison avec des récepteurs, stimulation de voies de signalisation cellulaire, concentration dans des compartiments subcellulaires (mitochondries, noyaux) et les dommages produits sur les constituants macromoléculaires, il sera traité dans le chapitre sur la toxicologie cellulaire.



Quelques paramètres influençant la distribution

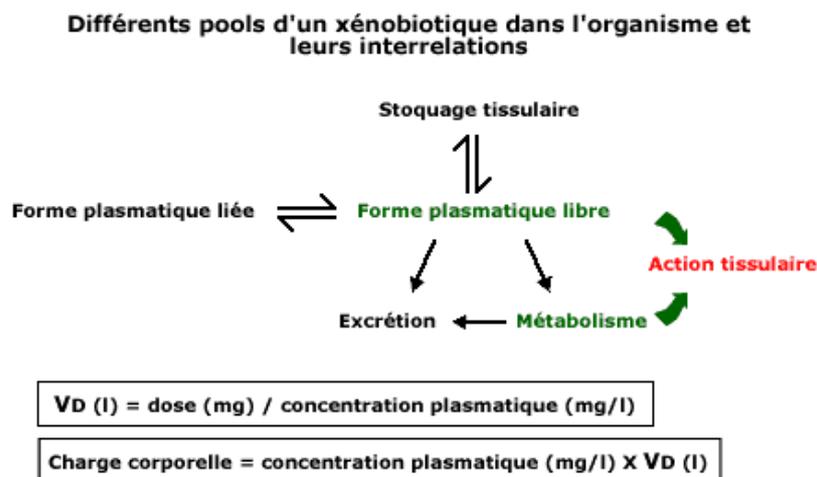
La distribution dans le corps est fortement influencée par la liaison du xénobiotique à des transporteurs plasmatiques (des protéines peu spécifiques comme l'albumine par exemple, mais il en existe de beaucoup plus spécifiques) qui modifie la biodisponibilité. Les formes libre et liée sont à tout moment en équilibre et seule la première peut interagir avec les membranes cellulaires. La liaison à des transporteurs est un facteur qui détermine la demi-vie et le seuil de toxicité du xénobiotique.

La bonne connaissance de ces paramètres nous aidera à interpréter les concentrations plasmatiques et leur relation avec la concentration au niveau du site d'action. Ce sont les gradients de concentration entre les différents compartiments qui détermineront la diffusion passive. Le **volume apparent de distribution ou V_D** (exprimé en litres) représente le volume total de liquide corporel dans lequel le xénobiotique se distribue, la formule est donnée sous la figure ci-contre. Son ordre de grandeur apporte des renseignements sur le comportement de la substance. Un V_D élevé peut indiquer une distribution particulière avec un stockage important (dans le tissu adipeux par exemple). **La charge corporelle** est le produit de la concentration plasmatique et du V_D .

La forme plasmatique libre peut :

- ▶ Etre excrétée directement,
- ▶ Etre stockée (en particulier pour les substances liposolubles),
- ▶ Subir des transformations.

Les métabolites peuvent eux- mêmes être excrétés ou s'ajouter aux réserves corporelles. Ils peuvent être plus actifs que le forme parentale. Cette dynamique dépend de la substance et des concentrations, en fonction des interactions avec les enzymes du métabolisme des xénobiotique ([Les enzymes impliquées dans le métabolisme des \(...\)](#)).



Le devenir des substances et l'opportunité d'exercer l'action biologique

Chaque substance, en fonction de ses propriétés physicochimiques, sera transportée, subira des transformations, jusqu'à produire son effet biologique ou être éliminée par les défenses de l'organisme. Nous avons déjà examiné certains paramètres qui influencent la distribution. Il existe cependant un grand nombre de situations différentes.

Un exemple de séquence est fourni par l'aflatoxine qui est une mycotoxine d'origine alimentaire, produite par un *Aspergillus* (moisissure) dans des conditions de mauvaise conservation de certains aliments (fruit secs).

1. Elle est absorbée par l'épithélium intestinal, pour passer ensuite via la veine porte au niveau du foie.
2. C'est dans le foie qu'intervient son activation par les enzymes de phase I et la formation des adduits caractéristiques sur l'ADN.
3. L'intervention des enzymes de phase II (voir la [section sur le métabolisme des xénobiotiques](#)) conduira aussi à des formes (conjuguées) qui pourront ainsi être éliminées (par la voie urinaire par exemple).

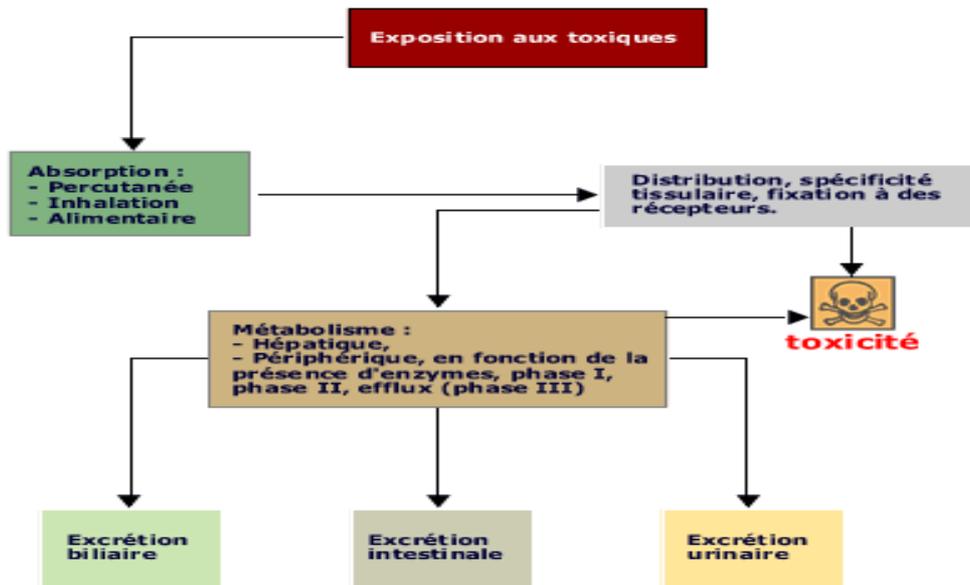
Nous avons donc un système cohérent, puisque dans les populations exposées à l'aflatoxine, on observe un excédent de carcinomes hépatocellulaires (fortement aggravé en cas d'infection par HBV ou HCV [1]), qui de plus présentent une mutation caractéristique du gène p53, un bon exemple de marqueur d'épidémiologie moléculaire.

Sur le plan toxicocinétique, divers paramètres gouvernent les temps de transit et les passages d'un compartiment à l'autre. La dose et la durée d'exposition sont évidemment importantes, en particulier par rapport à l'équilibre métabolique (production de métabolites toxiques versus formes inactivées qui seront excrétées). Pour revenir à l'exemple de l'aflatoxine, ses métabolites sont bien décelables dans les urines (exemple de biomarqueur) alors que l'on n'observe pas de toxicité majeure pour le système urinaire.

Dans les cas de circonstances d'exposition à des mélanges, la situation est plus complexe.

Chez le fumeur, le site primaire sera bien le poumon (action directe des HAP sur les muqueuses bronchiques), mais d'autres substances comme les amines aromatiques passeront dans la circulation. Leur élimination par excrétion urinaire les fait bien transiter par la vessie, un site connu pour présenter un excédent de carcinomes de la vessie chez les fumeurs.

Diffusion, activation et élimination des toxiques



Élimination des toxiques par excrétion

Une élimination rapide des toxiques (ou de leurs métabolites) par les moyens physiologiques de l'organisme est une façon d'empêcher les effets néfastes de se produire.

Il existe trois principaux types d'élimination :

- ▶ L'élimination rénale (urines),
- ▶ L'élimination par voie digestive (fèces),
- ▶ L'élimination par voie respiratoire.

1. Le rein est la principale voie d'excrétion des déchets métaboliques non volatils, certains d'entre eux étant potentiellement toxiques (urée, acide urique, créatinine, acide oxalique). Le rein élimine aussi de nombreux xénobiotiques, médicaments ou toxines et leurs métabolites. Par ailleurs il participe au catabolisme des protéines de petit poids moléculaire et régule la composition ionique des fluides biologiques. L'anatomie du rein est schématisée sur la figure ci-contre, afin de pouvoir localiser les trois fonctions principales : filtration, excrétion et réabsorption, qui interviennent sur des sites différents et concernent des éléments spécifiques.

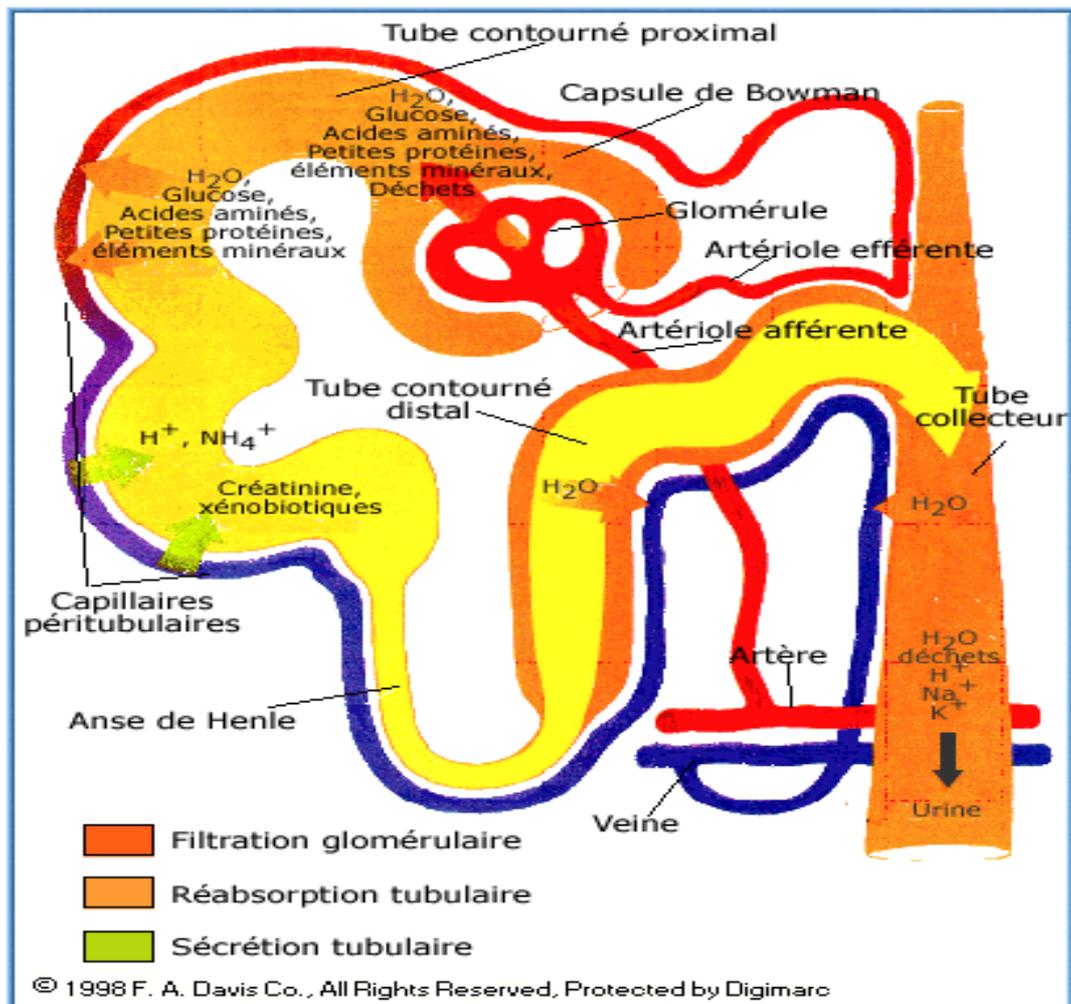
C'est le poids moléculaire et la polarité des substances qui déterminent pour l'essentiel la capacité du rein à les éliminer. Les petites molécules liposolubles peuvent être filtrées au niveau du glomérule. Celles de plus grande taille (y compris des toxiques fixés sur des protéines) peuvent être secrétées de façon passive à travers les cellules endothéliales des capillaires et la membrane des cellules du tube pour entrer dans l'urine. Les substances chargées resteront dans l'urine et seront éliminées. Par contre les toxiques non polaires peuvent être réabsorbés et retourner dans la circulation sanguine, augmentant ainsi la demi-vie et la toxicité potentielle.

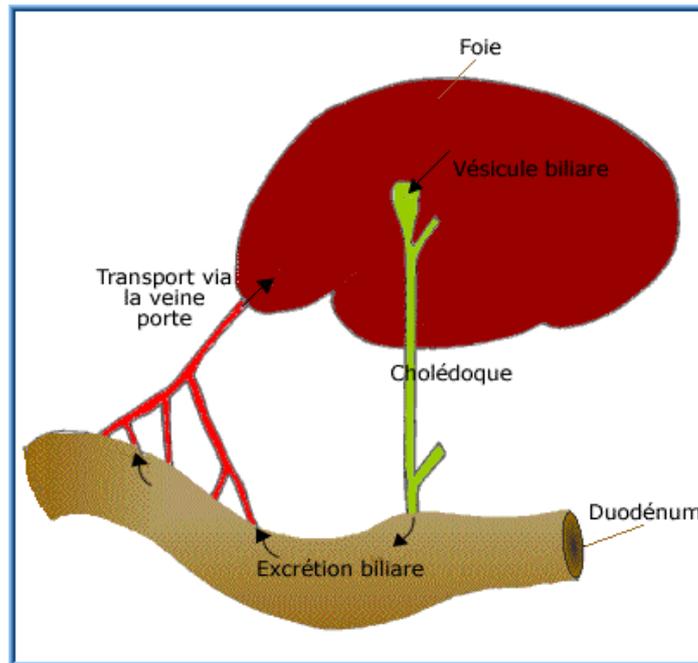
Toute atteinte à la fonction rénale, d'origine infectieuse ou toxique, éventuellement liée à l'âge, peut entraîner une diminution de la capacité d'élimination des xénobiotiques et rendre les individus particulièrement vulnérable en cas d'exposition à des substances toxiques.

2. La voie d'élimination fécale est importante pour les xénobiotiques et leurs métabolites. Elle concerne de nombreuses substances conjuguées, excrétées par la voie hépato-biliaire, comme le montre le schéma. Il s'agit de processus de transport actif pour des molécules polaires. Les molécules qui arrivent au niveau intestinal sont hydrosolubles et seront éliminées dans les selles. Cependant, il peut y avoir hydrolyse des molécules conjuguées (glucuronides ou sulfates par l'action de la flore intestinale) et donner lieu à une réabsorption, prolongeant ainsi la demi-vie du xénobiotique : il s'agit du cycle entéro-hépatique.

3. L'élimination par voie respiratoire est la plus simple et ne concerne que quelques substances polaires et volatiles.

4. Enfin il faut savoir qu'il existe d'autres voies d'élimination, comme l'élimination par le lait (diffusion passive concernant les substances basiques, les substances liposolubles et les substances suivant la cinétique du calcium), la salive, la sueur, les larmes, les cheveux et la peau. Ces voies d'élimination peuvent avoir une importance en termes analytiques.





Biotransformations des xénobiotiques

Après leur absorption, les xénobiotiques peuvent subir toute une série de transformations par des processus biochimiques. Le phénomène est aussi qualifié de métabolisme, dans la mesure où il s'agit de processus physiologiques (vitaux) en réponse à la détection des xénobiotiques. D'ailleurs les mêmes voies interviennent dans le métabolisme de molécules endogènes comme les hormones stéroïdes.

L'essentiel du métabolisme a lieu dans le foie, organe le plus riche en enzymes spécialisés, au niveau de la fraction dite microsomale. Dans la mesure où les molécules lipophiles peuvent plus aisément traverser les membranes cellulaires et se retrouver à l'intérieur des cellules, il existe des enzymes responsables de l'introduction de groupes qui leur confèrent une certaine hydrophilicité (**phase I**) et facilitent la deuxième phase. Celle-ci est à mettre au compte d'une autre catégorie d'enzymes (**phase II**) qui conjuguent des groupements spéciaux sur des sites prévus à cet effet (résultats des réactions de phase I), aboutissant à de grosses molécules hydrophiles pouvant facilement être éliminées.

Quelques exemples de réactions catalysées par des enzymes de phase I :

► Oxydations ;

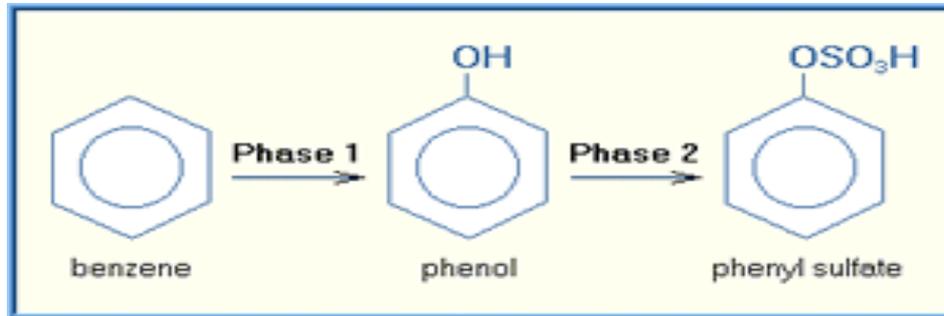
- Hydroxylation alkyl- et aromatique (assurée par la famille de cytochromes P450),
- Alcool déshydrogénation,
- N-déamination ;

► Réductions :

- Déhalogénéation,
- Réduction des ponts disulfure,

► Hydrolyses ;

Les réactions de phase II (phase de conjugaison) consistent à transférer des groupements glucuronide (généralement de l'acide glucuronique), sulfate, glutathion ainsi que certains aminoacides sur des sites réactifs introduits par les enzymes de phase I (principalement -OH, -NH₂ et -COOH). La polarité des complexes conjugués déterminent la voie d'excrétion. Les produits glucuronidés sont éliminés dans la bile, alors que les sulfatés le sont par l'urine.



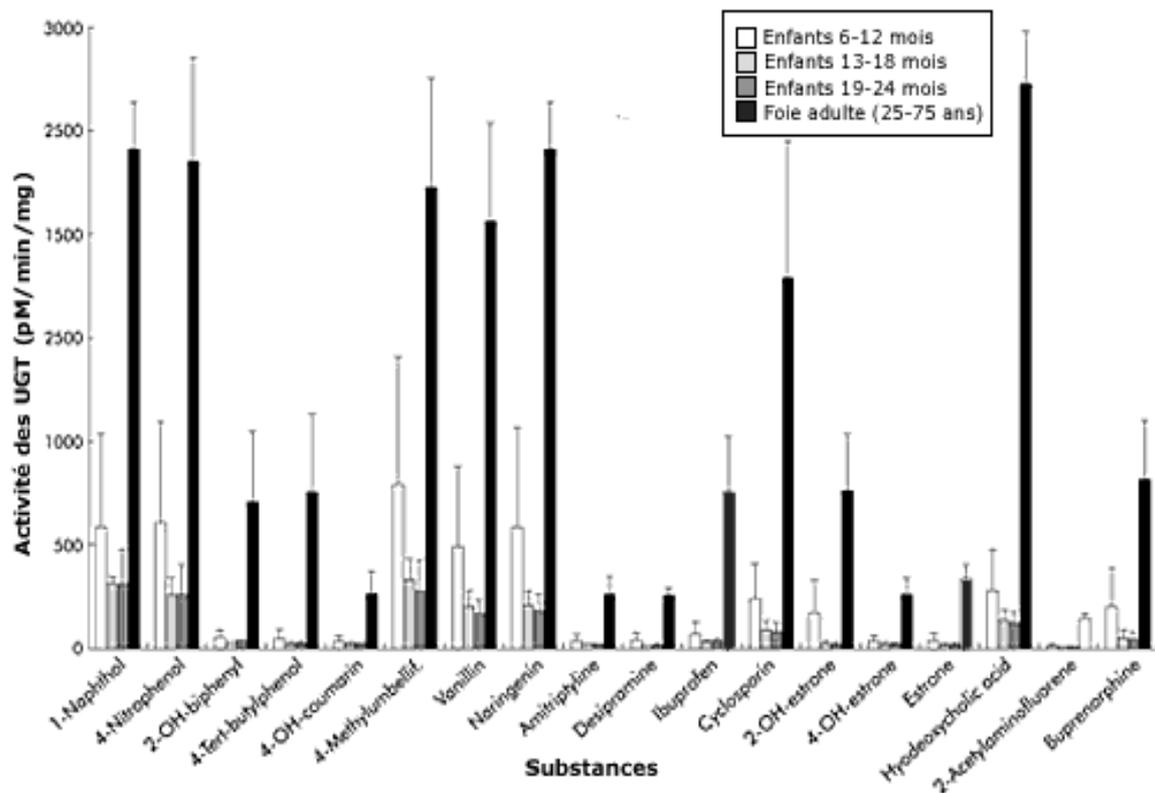
Capacité de biotransformation et toxicité

Comme pour certains médicaments, il existe des xénobiotiques qui sont absorbés sous forme inactive. Ce n'est qu'après le passage par le foie que des formes toxiques seront produites. Le plus souvent c'est la dose qui provoque l'activation des formes toxiques par saturation des enzymes de détoxification.

Nous avons déjà précisé que le foie possède la plus forte concentration d'enzymes de phase I, au niveau de structures cellulaires spécialisées (vésicules du réticulum endoplasmique ou microsomes). Ceci lui confère un fort pouvoir de biotransformation, mais en même temps le rend vulnérable à cause de l'accumulation potentielle de métabolites toxiques. D'autres tissus possèdent un potentiel de biotransformation moindre mais significatif : il s'agit des reins et des poumons.

Tous les individus n'ont pas le même niveau d'activité enzymatique et donc disposent d'un potentiel de biotransformation variable. Comme pour d'autres gènes, cette variabilité est largement génétique à cause de substitutions sur un seul nucléotide pour laquelle on observe un degré de polymorphisme dans la population. Certains polymorphismes ont été répertoriés et corrélés avec des activités enzymatiques augmentées ou diminuées. De cette façon il a été possible de définir l'influence du génotype des individus sur leur sensibilité à certains xénobiotiques et leur tendance à développer certaines pathologies. Nous touchons ici le domaine de la susceptibilité génétique, traité dans un autre chapitre.

Des variations dans les activités enzymatiques existent également avec l'âge. Les voies métaboliques, immatures chez le fœtus et le nouveau-né, n'atteignent un niveau d'activité significatif que vers l'âge de 6 mois. L'effet du métabolisme diminué est parfois imprévisible puisque l'étape d'activation, produisant des métabolites toxiques est déficiente. Il a été néanmoins décrit des cas de grande vulnérabilité, en particulier pour des déficits en enzymes de type hydrolases ou encore d'enzymes de phase II, comme les UDP-glucuronosyltransferases (figure ci-contre), dont l'activité est toujours loin d'atteindre les niveaux significatifs des tissus adultes vers 24 mois.



Médicament	Action	Défaut métabolique	Effet toxique
Isoniazid	Antituberculeux	Acétylation lente par la NAT	Effets neuro- et hépatotoxiques
Hypralazine	Agent antihypertensif	Défaut en mono-oxygénases (phase I)	Chute de la tension artérielle
Dapsone	Agent antibactérien	Acétylation lente par la NAT	Lupus érythémateux systémique
Primaquine	Agent anti-malaria	Défaut en G6PD (glucose-6-phosphate déshydrogénase)	Anémie hémolytique aiguë

Spécificité de la toxicité : quelles cellules et quels organes ?

L'hépatotoxicité correspond à l'atteinte du système hépatique, c'est à dire le foie et la vésicule. Elle peut se manifester par (liste non exhaustive) :

- ▶ Une nécrose des hépatocytes (plusieurs origines possibles, chimiques, virales) ;
- ▶ Une stéatose (accumulation de graisses dans les hépatocytes) ;
- ▶ Une cholestase intra hépatique (accumulation de sels biliaires dans les hépatocytes) ;

- ▶ Une cirrhose (fibrose hépatique) ;
- ▶ Un carcinome hépatocellulaire (cancer primitif du foie).

La toxicité d'un xénobiotique est généralement définie par rapport à son site d'action (neurotoxicité, cardiotoxicité, hépatotoxicité, etc.). Nous ne pouvons ici fournir que quelques exemples pour illustrer le principe des organes cibles. Comme le montre la liste ci-contre la toxicité au niveau d'un organe peut prendre des formes différentes par rapport à la population cellulaire touchée ou la fonction spécifiquement altérée.

La spécificité peut être d'origine toxicocinétique. Un exemple est fourni par le cadmium (Cd), dont la toxicité majeure s'exprime vis-à-vis du rein. Comme beaucoup d'ions métalliques le cadmium est pris en charge par des protéines (albumine plasmatique, ou métallothionéines [1]) qui exercent un effet protecteur. La fraction liée à l'albumine est éliminée par la voie hépatique. Quant à la fraction liée aux métallothionéines (protéines de petite taille), elle est normalement filtrée au niveau du rein. Il est actuellement admis que quand la dose de cadmium excède la capacité de fixation aux groupes -SH des métallothionéines, la fraction libre d'ions cadmium peut se fixer sur des protéines de membrane et perturber fortement les capacités fonctionnelles des cellules du tube proximal du rein. Donc la toxicité du cadmium s'exprime au niveau du site d'excrétion. Dans ces conditions nous qualifierons le cadmium de néphrotoxique [2].

Cependant, les conséquences de l'exposition au cadmium ne se limitent pas au rein. Le cadmium perturbe le métabolisme du calcium, un autre ion divalent et augmente la concentration urinaire (hypercalciurie). Des données animales montrent qu'il agirait aussi au niveau de l'os (stimulation de cellules appelées ostéoclastes). Ces éléments pourraient expliquer l'association de l'exposition au cadmium avec l'augmentation de la prévalence des fractures osseuses (fragilisation), ou de la diminution de la densité osseuse (ostéoporose). Ils sont également compatibles avec l'épidémie d'ostéomalacie (littéralement maladie des os mous), observée au Japon dans une population consommant du riz contaminé au cadmium.

Un autre exemple de spécificité d'organe est fourni par le plomb, dont les conséquences (empoisonnement au plomb) sont connues depuis l'antiquité. Le plomb (Pb^{2+}) affecte les fonctions supérieures du système nerveux central (diminution de la croissance du cerveau et altération des fonctions cognitives et comportementales). Les ions Pb^{2+} passent facilement la barrière hémato-encéphalique (protection physiologique du cerveau contre les substances néfastes) et se concentrent dans le cerveau. Bien que les mécanismes cellulaires de cette neurotoxicité soient complexes et pas complètement élucidés, certaines protéines calcium-dépendantes et des récepteurs de neuromédiateurs sont des cibles des ions Pb^{2+} .

Approche systématique des manifestations toxiques : le facteur temps

Toute manifestation toxique est indicative de la défaillance d'un organe (au moins) à la suite de dommages à une ou plusieurs populations cellulaires occasionnés par le toxique. Nous pouvons aborder l'étude de ces manifestations de plusieurs façons. La première concerne le facteur temps. Les **effets aigus** sont ceux qui interviennent immédiatement après l'exposition (doses unique ou répétées sur 24 heures), sans distinction de gravité ou de réversibilité. Les manifestations immédiates (aiguës) sont généralement liées à des expositions massives (de ce fait elles sont souvent graves), dont l'origine est plutôt accidentelle. L'exemple historique est

fourni par l'explosion d'une usine à Bhopal (Inde) en 1989, provoquant l'émanation massive de méthyl-cyanate et occasionnant 5000 morts et 30000 autres cas d'infirmité permanente.

Les **effets chroniques** sont d'apparition différée, encore une fois sans distinction de gravité. Ils sont plus difficiles à appréhender dans la mesure où ils peuvent survenir après une exposition unique à une dose élevée ou une exposition répétée à des doses plus faibles. Pour une même substance, il n'y a pas nécessairement de concordance ou de similitudes entre les effets aigus ou chroniques. Si nous prenons le cas de la dioxine [2], le symptôme immédiat classique est la chloracné (manifestation dermatologique sous forme d'acné très persistante, touchant préférentiellement les régions malaires de la face, le cuir chevelu, la base du cou), alors qu'à long terme ont été rapportées, une atteinte hépatique, des troubles de la reproduction, un effet immunosuppresseur et un excédent de cancers variés (liste non exhaustive). De la même façon, il n'y a pas nécessairement de lien direct entre les lésions initiales et la pathologie chronique. La consommation d'alcool peut occasionner une souffrance hépatique sans symptômes manifestes. Par contre, il y aura une nécrose des hépatocytes, suivie de lésions de fibrose alternant avec des plages de régénération cellulaire qui ne respectent plus l'organisation initiale (cirrhose hépatique). La cirrhose peut évoluer vers une insuffisance hépatique et favorise l'apparition de cancers hépatocellulaires.

Il nous faut aussi distinguer les effets **subchroniques** qui correspondent à des situations intermédiaires. Cette distinction est importante dans les expositions professionnelles portant sur des périodes de quelques semaines à quelques mois. Nous verrons par la suite quelles sont les conséquences sur le choix et la conduite des expérimentations animales.

L'importance de la relation dose-effet

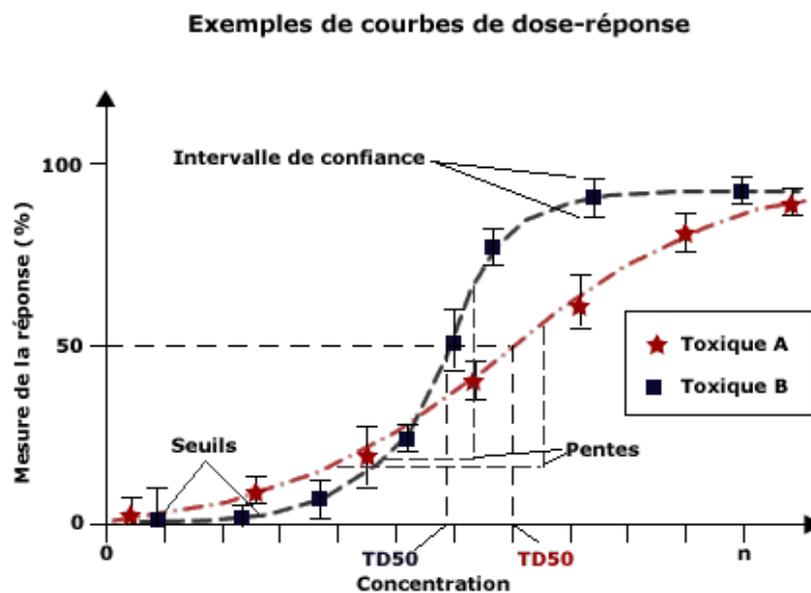
Il s'agit d'une notion centrale en toxicologie, selon laquelle on s'attend à observer une toxicité d'autant plus sévère que la dose absorbée est élevée. Elle se traduit par des courbes établies parfois à partir de données cliniques mais le plus souvent sur la base de résultats expérimentaux issus de modèles animaux ou de cultures de cellules appropriés.

L'existence d'une relation dose-effet est généralement considérée comme indicative de la causalité (confirmation de suspicions à partir d'observations partielles). La courbe tracée à partir des points expérimentaux permet aussi :

- ▶ De déduire un seuil à partir duquel se manifestent les effets toxiques,
- ▶ D'obtenir une information sur le taux d'accumulation d'effets toxiques avec la dose, dont la pente de la courbe est une mesure.

Différentes mesures déduites des courbes exprimeront la toxicité d'une substance. Typiquement la mesure utilisée est celle de la dose qui provoque des manifestations toxiques chez 50% des individus testés. Si l'effet mesuré se traduit par la mort de l'animal, il s'agira de la dose létale 50 (**DL50**). De la même façon il est possible de déduire une DL10 ou une DL90 (doses provoquant respectivement la mort de 10% ou 90% des individus). Sans présumer du type de toxicité mesurée, on peut utiliser le terme générique de **TD50** (dose toxique pour 50% des individus - voir la légende de la figure [1]). Précisons qu'il est parfois utile d'exprimer l'exposition par une concentration plutôt qu'une dose (CL50 plutôt que DL50). C'est notamment le cas pour l'exposition par inhalation (concentration dans l'air ambiant).

L'examen des courbes est aussi l'occasion de faire une importante distinction. La notion de seuil (et sa mesure approchée) est en fait extrapolée à partir de la forme de la courbe ajustée aux mesures expérimentales. Par contre les doses sans effets nocifs observables qui seront utilisées pour l'établissement des normes d'exposition doivent correspondre à des points expérimentaux. S'il n'existe pas de point expérimental pour déterminer une DSENO (NOAEL dans la terminologie anglo-saxonne), il est possible d'utiliser la dose pour laquelle on observe la manifestation toxique la plus faible, (LOAEL dans la terminologie anglo-saxonne). Le type de mesure déduite des données expérimentales, NOAEL ou LOAEL, (éventuellement de données cliniques) aura une influence sur les marges de sécurité et donc les facteurs de correction qui sont présentés dans la suite.



Les cas de toxicité systémique

Un **cancérogène ou cancérigène** [*] est un facteur provocant, aggravant ou sensibilisant l'apparition d'un cancer. Il peut être un produit chimique simple ou complexe, mais aussi une exposition professionnelle, des facteurs de risque liés au mode de vie ou encore un agent physique et biologique.

Les agents **mutagènes** [*] induisent des mutations. La mutation est un phénomène spontané, dû à des erreurs dans le processus de réplication de l'ADN. Cependant, dans certaines circonstances, le taux de mutations peut être augmenté considérablement par des facteurs physiques ou chimiques, appelés agents mutagènes.

Le terme de toxicité systémique s'applique à toutes les situations où l'effet peut se produire en de multiples sites, voire l'ensemble des cellules de l'organisme. Ceci serait le cas d'un poison agissant sur un processus biologique essentiel comme la chaîne respiratoire mitochondriale irréversiblement inhibée par le cyanure, la traduction des protéines sur laquelle agit le chloramphénicol, mais aussi d'un agent induisant des altérations de la séquence de l'ADN comme les rayonnements UV par exemple. En pratique, l'exposition à un de ces toxiques induit des effets délétères sur certains types cellulaires. Souvent, les populations cellulaires à

renouvellement rapide manifestent une sensibilité accrue : le chloramphénicol induit une leucopénie (toxicité vis-à-vis de la moelle osseuse).

Certains agents sont dits **généotoxiques** car ils sont à l'origine d'un ensemble d'altérations du matériel génétique dont les mutations (changement de la séquence nucléotidique) ne sont qu'un cas de figure (voir définition ci -contre). Les anomalies chromosomiques de nombre ou de structure peuvent être les produits d'agents généotoxiques. De nombreux agents réagissent directement avec l'ADN, en formant par exemple des adduits (HAP, aflatoxine). Il s'ensuit des perturbations de la transcription des gènes au voisinage de l'adduit. Lors de la division cellulaire, les altérations du matériel génétique peuvent être fixées et transmises à la descendance.

La **cancérogénicité** est un type de toxicité systémique particulièrement préoccupante par ces conséquences et le délai d'apparition des symptômes. Le cancer est une maladie multifactorielle qui se développe en plusieurs étapes plus ou moins distinctes (initiation, promotion, progression). Il existe de nombreux agents environnementaux qui peuvent agir comme inducteurs ou facilitateurs. Ils peuvent être directement généotoxiques (induisant des modifications de la séquence de l'ADN). Ils peuvent aussi entretenir des conditions tissulaires favorables (inflammation chronique par exemple) à l'émergence d'un clone cancéreux. Le processus multi étape se caractérise par la durée qui peut être très longue (20-30 ans) entre les premiers dommages et l'apparition d'une lésion cliniquement décelable.

La **toxicité développementale** est une autre forme grave de toxicité systémique. Dans ce cas la cible est l'embryon ou le fœtus (organisme en développement). La toxicité peut être à l'origine d'une fausse couche (léthalité) ou d'un retard de croissance ; le terme de **tératogénicité** s'applique aux cas où elle se traduit par des malformations à la naissance.

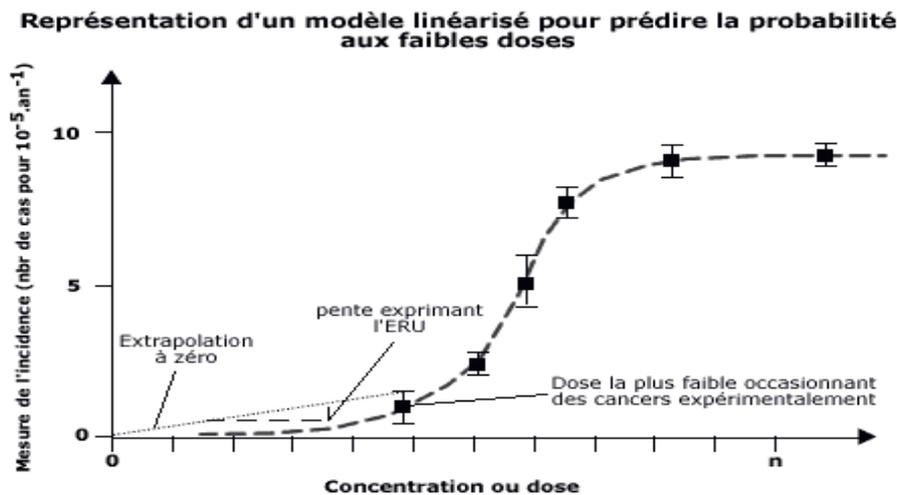
Mesures et extrapolations en cas d'effets sans seuil

Dans l'interprétation des courbes de dose -réponse nous admettons implicitement l'existence d'une relation entre l'étendue de l'exposition et la gravité des symptômes. Pour certaines pathologies, dont le cancer, l'échelle de gravité n'a aucun sens. Ce qui varie avec la dose c'est la probabilité de survenue de la maladie. Cette notion d'événements délétères (lésions généotoxiques) probabilistes est qualifiée de **stochastique**. C'est l'analyse des données historiques des survivants de Nagasaki et d'Hiroshima qui a permis de vérifier qu'il n'est pas possible de définir une dose associée à un risque nul.

Comme précédemment, des courbes de dose- probabilité de développement d'une pathologie sont obtenues soit expérimentalement, soit sur la base d'études épidémiologiques. Pour établir des normes d'exposition, il faut estimer la probabilité aux faibles doses. Il existe différents modèles, dont nous présentons ici le plus simple qui consiste à tracer la droite entre la limite supérieure de l'intervalle de confiance de la plus faible dose causant le cancer et l'origine. La pente de cette droite exprime le différentiel de risque (excès de risque) par unité de dose. C'est cet **excès de risque unitaire** qui sert à déterminer la VTR pour les situations sans seuil. Il exprime la dose pour laquelle le risque correspond à un nombre de cas rapportés à une mesure de l'incidence, c'est-à-dire pour prendre l'exemple du cancer, nombre de cas attribuables à l'exposition pour 100000 individus et par année. On peut aussi utiliser l' **excès de risque individuel** (ERI) = le produit de l'ERU par la dose effectivement reçu par

l'individu. Cette dernière est à rapprocher au **quotient de danger (QD)** [4] = Dose effectivement reçue / VTR (effet à seuil de dose).

Cette approche est celle qui est actuellement utilisée. Elle comporte des limites. Ainsi, il n'y a pas de consensus sur le modèle mathématique permettant d'obtenir le risque aux faibles doses. Le passage de l'animal à l'homme se fait en considérant que le risque est équivalent. Par contre des facteurs correctifs peuvent être appliqués, notamment pour l'âge au moment de l'exposition (sensibilité augmentée pendant les premières années de la vie).



Etude de la toxicité : le choix du modèle expérimental

La toxicité peut être abordée sur le plan expérimental soit dans des modèles cellulaires *in vitro*, soit *in vivo* en utilisant différentes espèces animales. Les indications ne sont pas les mêmes et les informations obtenues non plus.

Les cellules en culture (en suspension ou en monocouche) constituent un modèle de manipulation facile. Il peut s'agir de lignées cellulaires (immortalisées spontanément ou par manipulation génétique) ou de cellules en primo-culture. Il est aussi possible de modifier le patrimoine génétique par introduction ou délétion d'un gène pour la dissection moléculaire des mécanismes. Dans la mesure où l'on s'adresse à des systèmes homogènes, il est facile d'étudier des paramètres simples : fixation à un récepteur (affinité), mécanismes d'activation par le ligand (complexes multimoléculaires), réponses biologiques (constitution de complexes transcriptionnels, transcription de gènes cibles). Néanmoins, il faut noter que les cultures classiques en monocouche, même s'il s'agit de cellules non transformées, constituent des conditions artificielles. Ainsi, il a été montré que certaines voies intervenant dans la détoxification n'étaient pas exprimées dans les hépatocytes cultivés sur boîtes de Pétri. Par contre, la reconstitution de cultures tridimensionnelles (en utilisant des matrices de collagène) permettent de récupérer un fonctionnement plus proche du normal. Une autre limite concerne l'impossibilité de tenir compte des interactions entre types cellulaires qui peuvent exister dans les tissus, ou dans le cadre d'un système précis.

Certaines étapes ont été traditionnellement étudiées dans des organes perfusés, comme l'activation de molécules dans le foie. Pour ce cas, il est aussi envisageable d'utiliser un fractionnement subcellulaire pour étudier la biotransformation des xénobiotiques par la fraction microsomale, qui contient les enzymes nécessaires (surnageant d'une centrifugation à 9000g).

Les modèles *in vitro* sont souvent complémentaires de ceux réalisés sur animal, ces derniers étant nécessaires pour l'étude de l'ensemble des paramètres toxicocinétiques, absorption, diffusion, métabolisation et, bien évidemment, les manifestations toxiques. Sur le plan réglementaire, les études animales sont obligatoires. Selon la toxicité étudiée, une ou deux espèces devront être utilisées, presque toujours des rongeurs (souris, rat). Cependant, il faut garder en tête que les variations entre espèces [1] peuvent être considérables. Prenons par exemple le cas de la TCDD [2] et son interaction avec l'Ahr, molécule pivot dans la réponse cellulaire aux xénobiotiques. Les DL50 (dose létale 50) présentent une différence d'un facteur 1000 entre le cochon d'inde (espèce la plus sensible) et le hamster (espèce la plus résistante). La souris, espèce la plus couramment utilisée pour les tests *in vivo*, est 100 fois plus sensible que le hamster. Ces différences peuvent être dues à l'affinité du récepteur, sa capacité à s'associer avec ses co-facteurs et la modulation de l'activation transcriptionnelle (inductibilité des enzymes de biotransformation par exemple). La situation peut encore être compliquée en cas de mise en présence de mélanges de substances qui rentrent en compétition pour le même récepteur (Ahr). Selon le type de toxicité étudiée, des modèles animaux différents peuvent être préconisés.

Variabilité de la sensibilité entre espèces

L'extrapolation des résultats expérimentaux à l'homme n'est pas toujours immédiate. Plusieurs particularités physiologiques, propres à une espèce peuvent influencer les conclusions d'un modèle expérimental. Le cas est bien illustré par l'analyse d'un système simple d'interaction d'une molécule de xénobiotique avec son récepteur. Si l'on se base sur le cas des réponses suscitées par la TCDD via l'Ahr, les résultats peuvent être qualifiés d'ambigus. Le récepteur humain aux hydrocarbures aromatiques présente une constante de dissociation (kd) similaire à celle de la souris résistante DBA/2. Il peut être qualifié comme ayant une faible affinité. Pour autant, l'étude de la séquence du gène humain montre une plus forte homologie avec celui du cochon d'Inde, espèce la plus sensible. Insistons aussi sur le fait que la capacité du récepteur à médier une réponse biologique peut également varier en fonction de la molécule (dérivés simples, analogues de structure) et de l'espèce.

Avec l'amélioration de nos connaissances sur les récepteurs nucléaires dits xéno-détecteurs (tentative de traduction du terme anglais de xenosensors), c'est-à-dire des récepteurs de type CAR ou PXR (voir aussi le cours sur les agressions cellulaires), nous commençons à avoir de nombreux éléments pour aborder les bases moléculaires de la variabilité entre espèces et la comparaison avec la situation chez l'homme. Ces récepteurs activent en général l'expression de gènes de biotransformation (la famille CYP [1] par exemple), avec un fort impact sur l'équilibre entre activation (augmentation potentielle de la toxicité) et détoxification. Les profils d'activation des enzymes de phase I et II varient d'une espèce à l'autre, un facteur qu'il faut garder à l'esprit pour l'interprétation des données animales.

Les études des populations humaines exposées, associant les bioindicateurs (mesure plus précise de l'exposition), les manifestations cliniques et éventuellement, si le matériel est disponible, des tests fonctionnels sur cellules prélevées *in vivo* et analysées *in vitro*, sont rares.

Une façon de contourner la difficulté et de modéliser (partiellement) le système humain a été obtenu grâce au développement d'animaux transgéniques de type "knock-in". Il s'agit d'animaux dont le gène *AhR* murin a été remplacé par le gène humain. Cette démarche n'en est qu'à un stade de preuve de principe. Cependant quelques résultats intéressants laissent entrevoir de grandes possibilités par rapport aux tests de toxicité et plus particulièrement la tératogénicité. En effet, si la réponse transcriptionnelle au niveau hépatique des animaux *hAhR* +/+ ressemble plus à celle des animaux "résistants" DBA/2, en cohérence avec l'affinité du récepteur, la tératogénicité rénale reste élevée chez les animaux "humanisés", montrant que l'extrapolation nécessite des études plus complexes.

En conclusion, le paramètre variabilité entre espèces est loin d'être maîtrisé, rendant la transposition délicate. De ce fait, l'application d'un facteur de conversion de 10 au titre de cette extrapolation à l'homme est largement justifié [voir la page sur les marges de sécurité](#).

La susceptibilité individuelle

Le fait que seule une minorité de fumeurs développe un cancer du poumon a conduit à l'hypothèse de l'existence d'une susceptibilité génétique individuelle. Ce paradigme de l'influence de la constitution de l'hôte sur l'effet cancérigène de la fumée du tabac est à l'origine d'une multitude d'études cherchant à établir une corrélation entre le polymorphisme des enzymes de détoxification : famille CYP (cytochromes P450), famille GST (glutathion S-transférases), famille NAT (N-acétyl transférases), pour ne citer que quelques exemples. L'autre catégorie de gènes pouvant contribuer à la susceptibilité sont ceux qui codent pour des enzymes de réparation des dommages de l'ADN, XRCC1 étant un exemple.

Quelques résultats positifs ont été publiés et ce pour des cancers très différents, hémopathies et tumeurs solides, comme pour d'autres pathologies, cardiovasculaires ou respiratoires. Les génotypes GST M1 (ou T1) nul et NAT2 lent reviennent régulièrement.

Les SNP (polymorphisme d'un seul nucléotide) constituent les plus fréquentes variations de la séquence (environ un SNP pour 1000-1200 bases). De cette modification minime, jusqu'aux réarrangements/délétions, les répercussions sur le fonctionnement de la protéine peuvent être très variables. De plus, le phénotype, susceptible ou non, n'est pas nécessairement déterminé par la modification d'un seul gène. Pour cette raison, d'autres investigateurs ont préféré s'adresser aux variations de l'activité enzymatique ou tout autre indicateur fonctionnel.

Si la susceptibilité est assimilée à un trait pathologique, il faut insister sur le fait que la variabilité phénotypique peut masquer l'influence du polymorphisme génique. Ainsi, des variations d'expression considérables pour un marqueur enzymatique donné peuvent s'observer à génotype égal. Quelques avantages/inconvénients supplémentaires, comme l'influence de facteurs épigénétiques, figurent sur le tableau ci-contre. En tout état de cause la notion de susceptibilité individuelle doit être présente à l'esprit dans toute discussion concernant des valeurs limites de toute exposition.

La susceptibilité par le génotype ou le phénotype

	Polymorphisme génétique	Mésures phénotypiques
Proximité par rapport à la cause	Plutôt distale	Plus proximale
Puissance de la liaison	Relativement faible	Plus puissante
Effet de l'exposition (bioindicateur)	Non	Oui
Mécanismes épigénétiques	Non intégrés	Intégrés
Régulation post-transcriptionnelle, post-traductionnelle	Non	Oui
Stabilité temporelle	Bonne	Dépendante de la conservation des échantillons
Intégration de processus multigéniques	Non	Oui
Automatisation, réalisation à grande échelle	Possible	Difficile

Retour sur les paramètres déterminés dans les études toxicologiques

SOMMAIRE [1]

- ▶ 1. Généralités
- ▶ 2. Paramètres d'évaluation de l'exposition
 - 2.1 Paramètres physico-chimiques
 - 2.2 Comportement
 - 2.3 Persistance
 - 2.4 Bioaccumulation et métabolisme
- ▶ 3. Données toxicologiques
 - 3.1 Devenir dans l'organisme
 - 3.2 Toxicologie aiguë
 - 3.3 Toxicologie chronique
 - 3.3.1 Effets systémiques
 - 3.3.2 Effets cancérigènes
 - 3.3.3 Effets sur la reproduction et le développement
 - 3.4 Valeurs toxicologiques de référence
- ▶ 4. Données écotoxicologiques

- 4.1 Paramètres d'écotoxicité aiguë
- 4.2 Paramètres d'écotoxicité chronique

► 5. Valeurs sanitaires et environnementales

- 5.1 Etiquetage - Milieu de travail
- 5.2 Nomenclature installations classées
- 5.3 Valeurs utilisées en milieu de travail - France
- 5.4 Valeurs utilisées pour la population générale
- 5.5 Concentrations sans effets prévisible pour l'environnement

► 6. Méthodes de détection et de quantification dans l'environnement

► 7. Bibliographie

Source : Base de données de l'INERIS

La lecture d'une fiche toxicologique d'une substance, comme dans l'encadré ci-dessus, nous montre qu'il existe un découpage standardisé, dont le plan figure ci contre. La toxicocinétique (chez l'homme et l'animal, selon la voie d'exposition si les données sont disponibles) occupe une part importante, en relation avec les données sur l'exposition. Les sections qui nous intéressent ici concernent la toxicité aiguë et chronique ([voir aussi pour](#) une présentation synthétique des paramètres déterminées).

La toxicité aiguë concerne tous les symptômes rapportés en cas d'inhalation, ingestion ou simple contact cutané. Ils vont des simples manifestations irritatives aux cas de décès. Bien entendu toutes les données de toxicité spécifique d'organe seront listées, ainsi que les résultats d'études comportementales. Il s'agit toujours d'un recueil exhaustif de tous les effets rapportés, mêmes mineurs.

La section sur la toxicité chronique est souvent la plus longue et complexe. Elle comprend au minimum une DL50 et la dose sans effets nocifs observables ou NOAEL [*]. ~~Il existe de~~ multiples possibilités concernant les études additionnelles en fonction de la substance :

- hématotoxicité (diminution de l'hématocrite, baisse des populations de globules blancs), immunotoxicité (sur le thymus, la rate ou les ganglions), sensibilisation ;
- impact sur les fonctions endocrines (diminution des taux sériques d'insuline, d'hormone thyroïdienne ou de LH par exemple) ;
- Une analyse histologique de divers tissus peut être pratiquée sur les animaux morts.

Nous préférons consacrer des pages spécifiques à l'analyse des études de la cancérogénicité et les effets sur la reproduction et le développement compte tenu de leur importance sur le plan réglementaire.

Enfin, la section sur les **valeurs toxicologiques de référence** (VTR) est d'une importance capitale. Les données sont issues de différents organismes internationaux (EPA, OMS, ATDSR par exemple - [Introduction-type de la section sur les VTR \(...\)](#)) et sont référencées séparément avec les arguments expérimentaux ayant servi à les établir. Ainsi il est spécifié si les données expérimentales ont permis d'obtenir une NOAEL ou non et les facteurs d'incertitude appliqués pour obtenir la VTR ou RfD en anglais. Il est toujours précisé s'il s'agit de valeurs avec ou sans effet de seuil.

Familles, mélanges et interactions

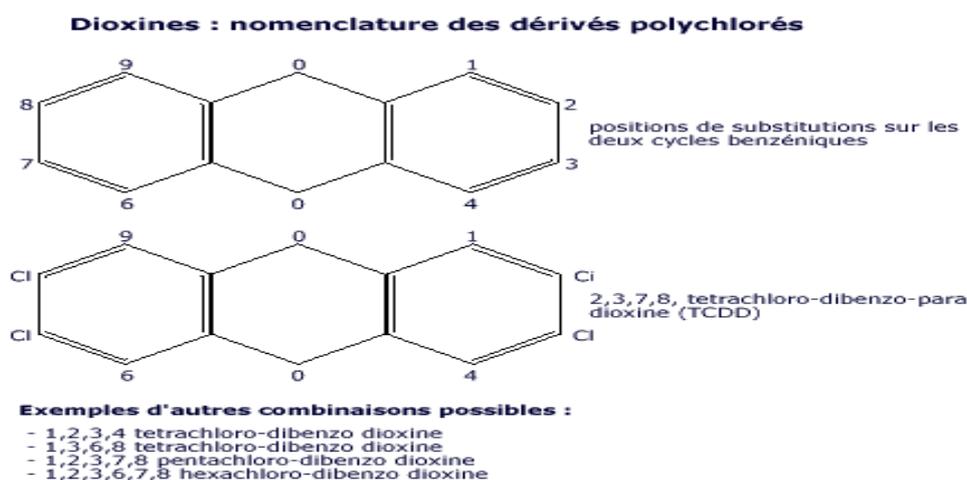
Dans la procédure d'évaluation des risques il est plus simple de procéder en considérant les substances isolément. Cependant, dans la réalité, les individus sont exposés à plusieurs substances simultanément. Il faut donc considérer différents types de situations d'interactions :

- ▶ Effets additifs
- ▶ Effets antagonistes (effet antidote)
- ▶ Effets potentialisant (par exemple en influençant le métabolisme), voire synergique (ce dit si les effets cumulés dépassent largement la simple addition des effets des substances administrées séparément).

Ces précisions théoriques sont mentionnées pour mémoire. En pratique nous disposons de peu de moyens pour faire face à la complexité des expositions aux mélanges et d'évaluer correctement toutes les interactions possibles. Considérons qu'il s'agit d'une source d'incertitudes supplémentaire.

Une mention spéciale doit être faite dans le cas où différents membres d'une famille de molécules coexistent et donnent lieu à des expositions complexes. L'exemple classique est fourni par les dioxines, constituées d'un mélange de molécules portant 2, 3 et jusqu'à 8 atomes de chlore sur chaque cycle benzénique. Le terme utilisé pour ces mélanges est celui de **congénères**, car ils sont produits dans le même processus, généralement involontaire, la combustion par exemple. Si la toxicité de chaque molécule peut être déterminée expérimentalement, les expositions concernent toujours des mélanges, mais dans ce cas il existe une approche permettant d'évaluer les effets du mélange.

Les dioxines possédant 4 atomes de chlore en position latérale sont les plus toxiques (2, 3, 7,8-TCDD). Pour caractériser la toxicité d'un mélange il sera possible de l'exprimer en **TEQ**, c'est à dire en toxicité équivalente par rapport au congénère le plus toxique. En fait un facteur de pondération est attribué à chaque congénère (**TEF=toxicity equivalence factor**), qui représente une fraction de la toxicité du congénère le plus toxique (auquel on attribue un TEF=1). La somme des indices pondérés (TEF x concentration de chaque congénère) pour l'ensemble des congénères présents dans le mélange représente l'I -TEQ (équivalents toxiques internationaux).



Facteurs d'incertitude et coefficients correctifs

Valeurs pour le chrome (VI) pour des effets avec seuil [*]

Substances chimiques	Source	Voie d'exposition	Facteur d'incertitude	Valeur de référence
Chrome [VI] (aérosol)	ATDSR	Inhalation	100	$5.10^{-6}/\text{mg}/\text{m}^3$ (subchronique) [1]
Chrome [VI] (particulaire)	ATDSR	Inhalation	30	$1.10^{-3}/\text{mg}/\text{m}^3$ (subchronique) [1]
Chrome [VI] (aérosol)	US EPA	Inhalation	90	$8.10^{-6}/\text{mg}/\text{m}^3$ [2]
Chrome [VI] (particulaire)	US EPA	Inhalation	300	$1.10^{-4}/\text{mg}/\text{m}^3$ [2]
Chrome [VI]	US EPA	Orale	900	$3.10^{-3}/\text{mg}/\text{kg}/\text{j}$ [3]

Typiquement, les études toxicologiques sont conduites sur des animaux de laboratoire ([voir aussi](#)), bien qu'il existe des cas basés sur les résultats d'études épidémiologiques. Des modèles dits *in vitro*, c'est-à-dire sur des cellules en culture, viennent compléter la panoplie des outils. Chaque modèle présente des particularités, avantages ou inconvénients, avec par exemple [une variabilité d'une espèce à l'autre](#), bien complexe et pas toujours élucidée. Une première difficulté apparaît immédiatement. Ces résultats expérimentaux sont-ils transposables à l'homme en situation réelle ?

En l'occurrence, le terme consacré qui s'applique pour l'établissement de normes d'exposition ou de valeurs toxicologiques de référence est celui de **facteurs de sécurité**. En clair, il est admis que les données expérimentales ne constituent qu'une approche imparfaite et on cherche à minimiser la probabilité de passer à côté d'une exposition entraînant un risque inacceptable. Il a été décidé que pour obtenir les VTR il faudrait diviser les NOAEL ou LOAEL par le produit de facteurs correctifs, introduits au titre des différentes sources d'incertitude identifiées.

Outre le passage de l'animal à l'homme (applicable si les VTR sont issues de résultats sur l'animal), une autre source d'incertitude provient de notre connaissance incomplète des paramètres d'une exposition. Admettons que l'on ait mis au point une modélisation dans le cadre de circonstances précises, pour une voie d'exposition donnée par exemple. Les conséquences d'une exposition moins bien connue ou non caractérisée seront considérées par analogie à celle qui est déjà connue.

Ces incertitudes ont conduit à l'introduction de facteurs de sécurité [1], qui consistent à appliquer, par exemple, un facteur 10 au seuil défini expérimentalement, qui reste malgré tout

une mesure un peu arbitraire. D'autres facteurs correctifs sont parfois proposés pour tenir compte de la sensibilité des individus sur la base de la variabilité génétique (facteur 10), voire de facteurs de vulnérabilité, comme c'est le cas pour les enfants (un facteur 10 aussi). Evidemment, les facteurs s'appliquent s'il y a une probabilité d'exposition. Ainsi, sur le tableau ci-contre, les VTR pour les expositions par inhalation ont été élaborées à partir d'études réalisées chez les travailleurs (de façon continue sur 8 heures par jour, 5 jours par semaine). Différents facteurs de conversion peuvent aussi s'appliquer, par exemple un rapport de 3 pour le passage d'une LOAEL à une NOAEL, ou encore un facteur de 3 pour passer des résultats subchroniques à l'exposition chronique (3x3x10x10 de la dernière ligne du tableau ci-contre).

La relation dose-effet revisitée

La contribution de la toxicologie est largement fondée sur la construction de la courbe dose-effets [1]. Le fait même qu'il existe une relation est un des arguments en faveur de la causalité (voir les critères de Bradford-Hill dans le cours d'épidémiologie). Nous souhaitons néanmoins souligner que certaines situations ne cadrent pas bien avec une vision simpliste du problème. Deux points peuvent être mis en avant :

- ▶ Les effets aux faibles doses,
- ▶ Les effets complexes (plusieurs types d'effets pour le même agent).

Typiquement, la relation dose-effets est considérée comme monotone [2], la zone d'intérêt couvrant généralement un intervalle de dose d'environ 3 ordres de grandeur (un facteur 1000). Dans certaines expériences d'effets développementaux portant sur l'interférence avec l'action des hormones sexuelles, il a été mis en évidence des effets biologiques à des doses plusieurs ordres de grandeur plus faibles que celles des expériences toxicologiques classiques. Ainsi est né le concept d'**une courbe de dose-effets en forme de U**, les effets étant exacerbés dans les faibles doses. Précisons aussi que dans ces conditions, il est parfois difficile de parler d'effets délétères (toxiques), alors que les expériences mettent clairement en évidence des réponses biologiques attribuables à ces faibles doses de xénobiotiques.

Les effets des perturbateurs endocriniens sur la reproduction ont été historiquement les premiers rapportés. Cependant, les hormones sécrétées par les glandes endocrines, qui participent plus généralement à l'homéostasie de l'organisme, contrôlent de multiples fonctions (métabolisme, comportement), bien au-delà de la différenciation et le bon fonctionnement des organes génitaux. Ainsi, l'action de certains xénobiotiques pourrait perturber le métabolisme lipidique et contribuer à l'obésité (le terme d'obésogènes est apparu dans la littérature en 2005).

La toxicité développementale des perturbateurs endocriniens a toujours aujourd'hui le statut d'hypothèse à vérifier, malgré l'accumulation des données dans les années récentes (en particulier depuis 2003). La complexité des manifestations apporte une difficulté supplémentaire. Prenons l'exemple du **syndrome de dysgénésie testiculaire**, proposé par Niels Skakkebaek et col, qui est composé de la baisse de la qualité du sperme, des malformations génitales (cryptorchidie, hypospadias) et le cancer du testicule. Chacune de ces manifestations est un facteur de risque pour l'autre ; les trois présentent une augmentation de l'incidence dans les années récentes, attribuée à l'action d'anti-androgènes [3] environnementaux.

Ce domaine représente un défi scientifique de premier plan par sa complexité. D'un autre côté, l'omniprésence des substances concernées justifie le fait qu'il soit considéré prioritaire que ce soit au niveau de l'OMS ou de l'UE.

Précisions sur la signification de certains termes et leurs implications

L'utilisation des termes génotoxicité, cancérogénicité, mutagénicité peut être un facteur de confusion. Il est préférable de bien préciser la signification des termes et leur utilisation dans l'évaluation de la dangerosité.

1. *Stricto sensu* une mutation représente une modification de la séquence génétique, transmissible à la descendance, alors que le terme génotoxique s'applique à toute forme de lésion sur le génome, y compris certaines qui seront rapidement réparées ou qui entraîneront la mort de la cellule endommagée.
2. Pour ce qui concerne la cancérogénicité, nous avons déjà précisé qu'il existe des agents qui favorisent l'apparition de cancers sans provoquer les mutations ou toute autre lésion du génome.

Les conséquences de ces précisions portent sur les moyens choisis pour mettre en évidence les différents types d'effets.

1. Historiquement, la mutagénicité est étudiée par le test d'Ames, qui utilise des bactéries initialement déficitaires dans la voie de synthèse de l'histidine ou du tryptophane. Les substances mutagènes induiront une mutation réverse dans les souches bactériennes, leur permettant de synthétiser l'histidine ou le tryptophane dans leur milieu d'ensemencement.
2. Les mutations chromosomiques peuvent s'étudier :
 - in vitro, par des tests sur cellules de mammifères, par :
 - le test du lymphome de souris (MLA) : HGPRT et TK
 - le test d'analyse de métaphase (mise en évidence des aberrations chromosomiques)
 - in vivo, sur des cellules hématopoïétiques de rongeur, par le test du micronoyau (également utilisé pour mettre en évidence l'aneugénie)
3. Il existe d'autres tests complémentaires pour étudier les mutations géniques et chromosomiques :
 - le test de synthèse non programmée de l'ADN (test UDS)
 - le test des comètes
4. La cancérogénicité s'étudie *in vivo* après exposition de rongeurs aux substances étudiées (selon une voie donnée). La recherche de lésions tumorales sur les animaux sacrifiés se fera à intervalles réguliers sur une période de deux ans et pour tous les organes cibles.

De ce qui précède, on peut déduire que les différents tests apportent des informations légèrement différentes et complémentaires. La génotoxicité ne fait référence qu'aux mécanismes d'action qui peuvent initier le développement de cancers, et est donc un indicateur de danger.

Les expositions peuvent être uniques (toxicité aiguë) ou répétées (toxicités subchroniques et chroniques). La chronicité et la subchronicité sont définies par rapport à l'espérance de vie de l'animal. Ainsi, nous trouvons dans les textes les préconisations de tests sur 28 ou 90 jours, ce qui pour des souris, dont la durée de vie moyenne est de 900 jours, représente 1/30 à 1/10 (2-7 ans si on fait l'analogie avec l'homme). Il s'agit donc respectivement de situations d'expositions subchroniques et chroniques.

La toxicité développementale en général et plus particulièrement celle contre le système nerveux

Pour comprendre la notion de toxicité développementale nous avons à quelques reprises fait appel à la notion de fenêtre de sensibilité. Celle-ci n'est pas unique et repose sur plusieurs aspects des processus biologiques qui se mettent en place à des moments différents de la vie fœtale, néonatale, parfois les premières années de la vie. Certaines règles générales ont déjà été citées concernant la sensibilité due à la prolifération active ou à l'immaturité des systèmes de détoxification. Ici nous insisterons sur les aspects du développement du système nerveux et des conséquences de toute forme d'atteinte à sa bonne mise en place.

Contrairement à d'autres tissus, l'organisation du système nerveux ne nécessite pas de prolifération, au contraire, il y a plutôt des phénomènes de mort cellulaire. Par contre, il y a établissement de nombreuses connexions qui doivent être stabilisées, avec :

- ▶ Croissance des prolongements nerveux,
- ▶ Mise en place de synapses, les structures spécialisées qui permettent la transmission de signaux nerveux d'un neurone à l'autre,
- ▶ Recouvrement des neurones par une substance isolante, la myéline, grâce à l'intervention des populations cellulaires dites gliales.

En résumé, le développement harmonieux du système nerveux implique que les neurones croissent et migrent selon un schéma précis, pour établir des connexions proches et distantes, pouvoir communiquer entre eux par le biais des bons messagers chimiques et propager les signaux à distance par la conduction d'impulsions électriques précisément contrôlées. Il est évident que le nombre de points sensibles qui peuvent affecter ce développement est très important. Plus grave, les manifestations des atteintes précoces ne sont pas immédiates et de plus sont très difficiles à déceler sur le plan clinique. Elles affecteront le comportement, avec des délais variables, dans des conditions qui ne permettent pas facilement de faire le lien de cause à effet. Cependant, compte-tenu de la sensibilité aux faibles doses, le nombre d'individus potentiellement atteints pourrait être très élevé. Pour donner un ordre de grandeur, aux Etats-Unis, un enfant sur six est considéré atteint d'une trouble développemental.

Effets neurotoxiques à l'échelle de la population en fonction de l'âge au moment de l'exposition

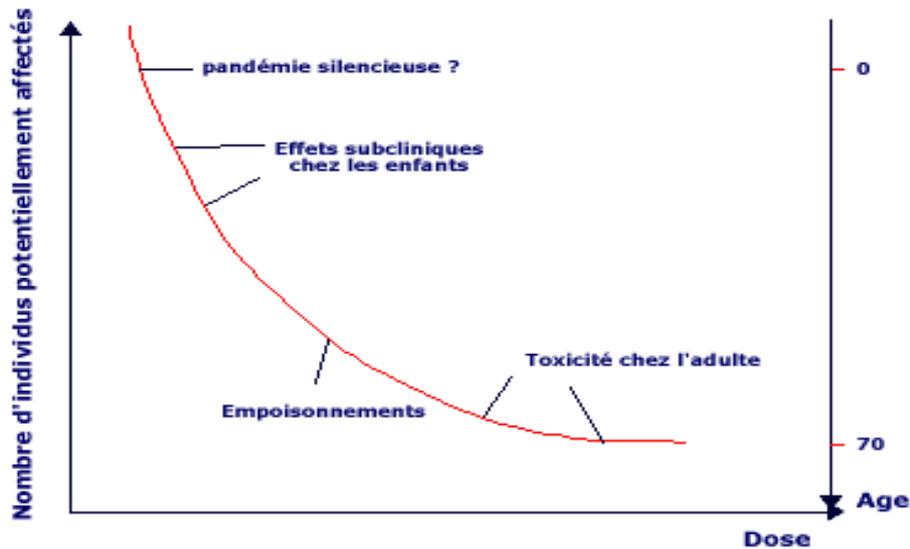


figure inspirée librement de Grandjean et Landrigan :
publié en ligne dans le *Lancet* le 8/11/2006

Précisions sur la signification de certains termes et leurs implications (suite)

L'utilisation des termes de toxicité développementale et toxicité pour la reproduction nécessite aussi une clarification. La distinction concerne le moment de l'exposition :

- ▶ La toxicité développementale se limite à l'exposition pendant la gestation (ou la grossesse) et peut se prolonger en phase néonatale (exposition fœtale au méthyl-mercure associée à une atteinte ultérieure des fonctions cognitives).
- ▶ La toxicité pour la reproduction concerne les atteintes de la fonction reproductrice quel que soit le moment de l'exposition. Il existe un chevauchement pour ce qui concerne les manifestations fœtales ou néonatales, mais pour des expositions avant la conception. Bien entendu la toxicité pour la reproduction concerne l'exposition des animaux des deux sexes.

Les 3 segments :

- ▶ étude de fertilité et de développement embryonnaire précoce
- ▶ étude de développement embryonnaire et fœtal
- ▶ étude de développement pré et post-natal et de comportement maternel

Il ne faut pas négliger un autre aspect important concernant les cellules cibles des effets toxiques. Il existe une seule population dans le corps qui porte le potentiel de reproduction des individus. Il s'agit des ovules et des spermatozoïdes (y compris leurs précurseurs). Ces cellules, dites germinales, peuvent être la cible de l'action toxique de certains agents. Dans ce cas les lésions peuvent affecter le potentiel de reproduction : baisse de la fertilité par exemple, mais peuvent aussi se transmettre à la descendance avec des effets qui se manifesteront dans les générations successives.

Cette toxicité vis-à-vis des cellules germinales est à distinguer de celles qui concernent toutes les autres populations cellulaires, dites somatiques. En effet, une altération génétique transmissible au niveau d'une cellule somatique n'affectera que les cellules filles, localisées dans un tissu. A l'inverse une mutation germinale sera présente dans toutes les cellules de la descendance.

La toxicité développementale : conséquences immédiates et tardives

Diverses anomalies peuvent intervenir au cours du développement fœtal. Celles-ci peuvent donner lieu à des malformations, plus ou moins graves, qui seront constatées à la naissance et parfois sont visibles par l'imagerie au cours de la grossesse. Les phases de l'organogenèse déterminent la sensibilité des différents tissus et organes au cours de la grossesse. Sur la figure ci-contre sont représentées les phases de sensibilité, le degré de gravité et les sites concernés. Le développement précoce est plus sensible et certaines fenêtres de sensibilité sont excessivement courtes et peuvent durer à peine deux semaines.

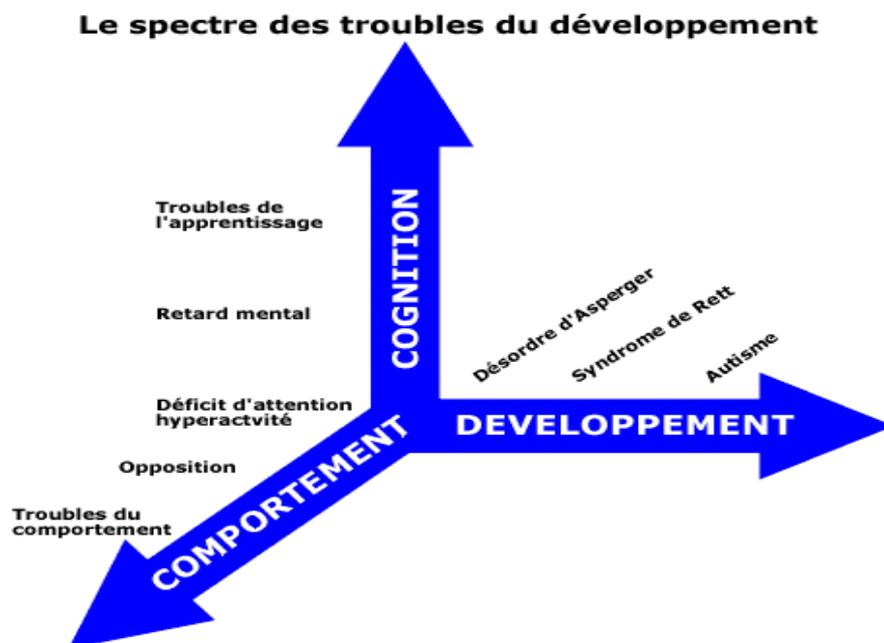
Certaines substances peuvent interférer avec le développement des tissus et organes. En cas de malformation grave, on parle d'agents tératogènes. L'étude de ce type de toxicité fait partie des obligations pour l'évaluation d'une substance, en particulier pour les médicaments. L'histoire dramatique du thalidomide nous a fourni un exemple d'évaluation inappropriée d'un médicament de confort, administré au cours de la grossesse, responsable du développement défectueux (total ou partiel) des membres. Avant de pouvoir faire le lien avec le thalidomide, quelques 15000 enfants atteints sont nés. Dans ce cas précis, la fenêtre de sensibilité se limite aux semaines 6-8.

D'autres conséquences d'atteintes développementales peuvent ne pas être immédiatement visibles. C'est le cas des [neurotoxiques](#), mais aussi des perturbateurs endocriniens. Dans certains cas, les conséquences pathologiques n'interviendront qu'à l'âge adulte, d'où le terme de **maladies adultes d'origine fœtale**. L'exemple fourni dans le cours concerne la fonction de la [reproduction masculine](#). D'autres types de toxicité ont été mis en évidence dans les années récentes :

- ▶ Interférence avec le métabolisme, en particulier des graisses ;
- ▶ Dysfonctionnement de l'axe thyroïdien, dont les conséquences peuvent être multiples.

Certaines pathologies apparaissant à l'âge adulte, comme des maladies cardiovasculaires ou le diabète, peuvent avoir des origines fœtales, sans que l'on puisse incriminer des substances spécifiques. Dans ce cas il s'agit essentiellement de conséquences de carences nutritionnelles. C'est ce qui est regroupé sous le vocable de **syndrome métabolique**.

substances potentiellement neurotoxiques. Cette longue liste et les impacts neurodéveloppementaux potentiels à des doses faibles a conduit à une alerte au sujet d'une possible épidémie silencieuse [1] qui pourrait être prévenue en diminuant les expositions au moins au cours de la grossesse et de la vie néonatale.



Les atteintes de la fonction reproductive

La fonction reproductive peut être affectée par de multiples facteurs, entre autres, âge, nutrition, modes de vie, infections. Dans les années récentes, plusieurs études ont rapporté des liens entre des troubles de la reproduction et les expositions à des polluants environnementaux. Le tableau ci-contre en fournit un petit échantillonnage. Ces résultats viennent, le plus souvent, corroborer les conclusions des études effectuées sur des modèles expérimentaux, ou encore des observations d'espèces sauvages dans les milieux naturels.

Les données à l'échelle de la population sont aussi des sources d'inquiétude :

- ▶ Augmentation du nombre de couples consultants pour des difficultés de procréation
- ▶ Baisse de la qualité du sperme

Bien entendu, des facteurs de confusion peuvent être à l'origine de ces observations, mais les chiffres sont jugés suffisamment préoccupants pour justifier la priorité accordée à la recherche de la reprotoxicité des substances auxquelles nous sommes potentiellement exposés. Il est important ici de spécifier que ce type de toxicité n'existe pas nécessairement de façon isolée :

- ▶ Certains composés altèrent la capacité reproductrice en interférant avec les hormones sexuelles (perturbation endocrinienne). Il s'agit de composés à action œstrogénique ou anti-œstrogénique, androgène ou anti-androgène
- ▶ D'autres expriment leur capacité uniquement sous forme de reprotoxicité développementale, comme c'est le cas pour le DES [1]. Effectivement, seuls les individus exposés in utero, principalement les filles, présentent des risques de malformations, de fausses couches, mais

aussi de cancers d'une forme autrement extrêmement rare (adénocarcinome à cellules claires du vagin ou de l'utérus). [2]

Aujourd'hui nous n'avons pas pu établir des règles concernant les mécanismes d'action des différentes substances incriminées :

- ▶ agonistes ou antagonistes d'hormones stéroïdes
- ▶ substances persistantes (PCB) ou non (BPA)

Ce qui reste cependant en question est, quelles altérations interviennent pendant une fenêtre précise du développement pour se manifester longtemps après sous forme d'atteintes à la reproduction ? Quelques unes de ces manifestations seront traitées dans la suite.

Expositions à l'âge adulte ayant un impact sur la fécondité et/ou la fertilité

Bisphénol A, monomère rentrant dans la composition de plastiques	anomalies chromosomiques des cellules sexuelles, fausses couches, baisse de la qualité du sperme
Hydrocarbures halogénés : dioxines/furanes, PCBs	modifications hormonales, baisse de la fertilité, mort fœtale, endométriose, baisse de la qualité du sperme
Métaux lourds : plomb, mercure, manganèse, cadmium	mort fœtale, baisse de la fertilité, modifications hormonales, irrégularités du cycle menstruel, anomalies du sperme
Ethers de glycol : peintures, vernis, encres d'imprimerie	mort fœtale, baisse de la qualité du sperme
Solvants : benzène, toluène, xylène, perchloréthylène, trichloréthylène	baisse de la fertilité, mort fœtale, modifications hormonales, irrégularité du cycle menstruel, baisse de la qualité du sperme

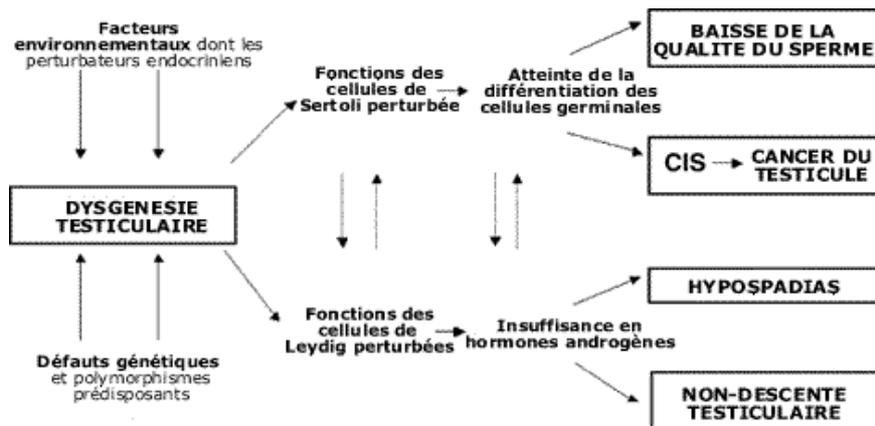
Une vision globale des atteintes de la reproduction masculine

Le syndrome de dysgénésie testiculaire a déjà été cité en évoquant les difficultés qu'il pose par rapports aux concepts conventionnels des types de toxicité ou de la toxicité d'organes. Les travaux de Niels Skakkebaek et de son équipe permettent aujourd'hui d'avoir une vision assez claire et biologiquement cohérente des mécanismes de pathogenèse de l'ensemble des manifestations. C'est ce que montre le schéma ci-contre reproduit à partir d'une récente publication.

En insistant sur les événements initiaux portant sur les cellules germinales embryonnaires, il est possible de comprendre que de simples perturbations des équilibres hormonaux (manifestations sub-cliniques) pendant la phase de maturation (différentiation) du testicule peuvent conduire à l'ensemble des atteintes caractérisant le syndrome, en fonction du type cellulaire affectée : les cellules de Sertoli, à l'origine de la spermatogenèse ou les cellules de Leydig qui fabriquent les hormones mâles, c'est à dire la testostérone.

La première conséquence que l'on peut tirer de ce schéma concerne la nécessité de mettre en œuvre des tests toxicologiques capables de déceler la reprotoxicité développementale sous forme de perturbation endocrinienne. Ce type de modèle animal est en cours d'élaboration par

l'OCDE. Il reste à définir dans quelles circonstances ou pour quel type de substances il doit être préconisé. La deuxième, plus complexe, correspond à notre capacité d'attribuer une part de la responsabilité pour les atteintes à un facteur de donné. Rappelons que la toxicologie étudie une substance à la fois, éventuellement les interactions entre deux substances, mais au delà nos outils s'avèrent insuffisants. Or, les expositions aux perturbateurs endocriniens sont typiquement multiples et les effets interviendraient plutôt à des doses très faibles. Dans ces circonstances, trouver le facteur explicatif, par exemple de la baisse de la qualité du sperme qui est une réalité incontestable dans certains pays, semble hors de portée de la science. Pour autant, la reconnaissance de cette atteinte sanitaire ne devrait-elle pas nous conduire à prendre des mesures pour diminuer les expositions aux substances potentiellement incriminées ?



Les effets complexes des organostanneux

Le tributylétain (TBT) est un composé toxique que l'on trouvait autrefois dans la plupart des peintures antisalissures (qui servent à prévenir l'incrustation des balanes et d'autres organismes marins sur la coque des navires, les parcs à poissons et d'autres surfaces exposées aux eaux marines). Il a été commercialisé dans les années 1960 pour remplacer les renforçateurs organomercuriques, arsenicaux et plombiques dans les peintures à base de cuivre. Il devint évident, à la fin des années 1970, que non seulement le TBT subissait une lixiviation à partir des surfaces peintes, mais qu'il avait des effets néfastes sur des formes de vie marine autres que celles visées.

Pendant les années 1980, des concentrations dangereuses de TBT ont été détectées dans de nombreux estuaires et secteurs côtiers de par le monde. Dans certains cas, elles atteignaient des milliers de nanogrammes par litre dans l'eau. Actuellement, il n'existe des pays comme le Canada qui ne disposent pas de lignes directrices fixant des limites acceptables aux concentrations des composés organostanniques chez les poissons, les coquillages et crustacés destinés à la consommation humaine, ni de recommandations pour la qualité des eaux à cet égard. Certains organostanneux sont inscrits à l'annexe II de la directive 76/464/CEE et sont repris comme substances prioritaires de la directive cadre sur l'eau.

Des effets délétères sont observés chez de nombreuses espèces d'organismes marins. Deux de ces effets, l'effet « imposex » ([L'effet imposex](#)) et l'épaississement de la coquille [1], sont des indicateurs de la contamination de la faune et de la flore marines.

Le TBT est dangereux du fait de son potentiel de bioaccumulation dans les tissus animaux et de l'incapacité de la plupart des organismes de le métaboliser. Il peut également s'accumuler

dans les sédiments. Là où il y a contamination par le TBT, celui-ci peut avoir une faible concentration dans les échantillons d'eau, mais à cause de la bioaccumulation, les tissus animaux ou les sédiments en contiendront beaucoup plus.

La France a été le premier pays à limiter l'emploi du TBT dans les peintures antisalissures, des scientifiques français ayant observé, dès 1975, une baisse des taux de croissance des huîtres dans certaines zones littorales de l'Atlantique. Au début des années 1980, on a établi un lien entre le TBT et les effets observés sur les huîtres dans le bassin d'Arcachon et, en 1982, la France interdisait l'emploi des peintures antisalissures contenant du TBT sur les bateaux de moins de 25 mètres de longueur.

Si nous avons mis l'accent ici sur le caractère perturbateur endocrinien du TBT de par les symptômes observés dans les espèces aquatiques, n'oublions pas qu'à l'intérieur des cellules il se lie aux récepteurs des lipides et que son action sur le métabolisme des graisses pourrait favoriser l'obésité.

La toxicité du DEHP à la loupe et l'évaluation des risques encourus

La large diffusion des produits contenant des phthalates (donc du DEHP [1] qui est le plus utilisé) suscite toujours des débats. L'industrie continue à déclarer que le produit est sûr, bien que de nombreuses publications rapportent des effets toxiques. Sur le plan économique, les intérêts en jeu sont considérables ([Le PVC et les plastifiants](#)). Nous allons essayer d'analyser un peu plus cette controverse.

Dans le tableau ci-contre sont présentées quelques données issues de publications récentes. Celles-ci se focalisent essentiellement sur la toxicité reproductive des rongeurs, souvent sur la base d'études multi-générationnelles. Toutes les études concluent à des toxicités importantes, mais avec des NOAEL très variables et parfois élevées. Les NOAEL issues des études de Poon (1997) puis de Wolfe et Layton (2003) ont été utilisés pour calculer les marges de sécurité selon l'approche des comités scientifiques européens (voir aussi la page suivante).

La démarche consiste, comme d'habitude à évaluer les effets (mesure du danger), sur la base des études expérimentales. Dans la seconde étape on évalue les niveaux d'exposition selon différents scénarios. Ainsi, pour les adultes, le rapport d'évaluation du risque de 2004 (CSTEE du 8 janvier 2004) cite des valeurs d'exposition environnementale de 7,1 µg/kg/j et de 52,1 µg/kg/j pour des adultes. Les marges de sécurité seraient dans ces conditions de 92 - 676. La méthodologie du calcul des expositions est classique. Il s'agit de mesurer les concentrations urinaires de certains métabolites (5-OH-MEHP, 5oxo-MEHP), sachant qu'il existe des différences dans la valeur accordée à chacun de ces métabolites. Les facteurs de conversion des concentrations urinaires en exposition réelles, ont été obtenus dans une étude sur deux volontaires sains qui ont reçu des injections de doses données de DEHP. Ces facteurs de conversion varient de 10-47% ce qui introduit un niveau d'incertitude élevé.

Des mesures ont été aussi effectuées sur des échantillons de lait maternel. La concentration en DEHP la plus élevée était de 160 µg/kg de lait, ce qui correspond à une exposition "au pire cas" [2] de 21 µg/kg/j pour les nourrissons de 0 - 3 mois et de 8 µg/kg/j pour ceux de 3 - 12 mois. La même procédure a été appliquée à des échantillons de formulations commerciales de laits maternisés, avec une concentration maximale de 440 µg/kg de matières sèches et une

exposition de 13 µg/kg/j pour les nourrissons de 0-3 mois. Sur la base de ces expositions il est possible de calculer que les marges de sécurité pour les nourrissons seraient de 229 pour la toxicité testiculaire (avec comme données de base une exposition de 21 µg/kg/j et une NOAEL de 4,8 mg/kg/j). Dès lors une discussion s'engage parmi les experts pour savoir si ce facteur représente une sécurité acceptable, avec d'importantes questions à trancher :

- ▶ La toxicité testiculaire représente une atteinte particulièrement grave et est très sensible à ce stade du développement ;
- ▶ Il existe d'autres voies d'exposition au DEHP ;
- ▶ Il y a potentiellement des co-expositions à d'autres phthalates à mécanisme d'action similaire ;
- ▶ Il y a des incertitudes considérables dans l'évaluation des expositions.

Quelques résultats de toxicité du DEHP choisis dans la littérature internationale

ETUDE	Type d'atteinte	NOAEL
Poon et al. 1997	Vacuolisation des cellules de Sertoli	3,7 mg/kg/j
Schilling et al. 2001	Performance reproductive et fertilité	340 mg/kg/j
idem	Toxicité développementale	113 mg/kg/j
Wolfe et Layton 2003	Toxicité testiculaire et développementale	4,8 mg/kg/j

Quelques enseignements essentiels à partir de l'histoire du DEHP

Les impacts sanitaires potentiels attribués aux phthalates ont déjà été évoqués il y a une trentaine d'années ([La chronologie des préoccupations concernant \(\)](#)). La littérature sur le sujet est particulièrement abondante. Le DEHP est cancérigène chez l'animal. Il induit des tumeurs hépatiques suite à l'activation de PPAR α , un mécanisme que l'IARC n'a pas retenu comme pertinent chez l'homme. C'est un exemple à retenir pour ce qui est de la non transposabilité de l'animal à l'homme, sur la base d'un mécanisme de physiopathologie moléculaire considéré comme élucidé.

Les organes cibles, sur la base des résultats expérimentaux sont le foie, le rein et le testicule, avec des NOAEL relativement différentes. Evidemment, il y a actuellement un consensus sur l'existence d'une vulnérabilité particulière au cours des phases fœtale et néonatale.

Une question que l'on peut se poser est : est-ce que le DEHP est finalement un perturbateur endocrinien ? La réponse semble être oui, car il interagit avec des enzymes de la biosynthèse des stéroïdes, y compris avec l'aromatase, l'enzyme pivot dans la production des œstrogènes. L'aromatase catalyse la conversion de la testostérone (hormone male) en œstradiol (hormone femelle), un phénomène qui joue un rôle important dans la différenciation du cerveau (il existe des parties dites dimorphiques, c'est à dire dont la structure dépend du sexe). Son action anti-androgène semble également clairement reconnue. Des résultats récents obtenus

chez le rat tendent à montrer des effets complexes sur l'activité aromatasase, en fonction de la dose (inhibition aux doses les plus faibles et stimulation aux doses plus élevées), de l'âge et du sexe. En conséquence, il convient que l'on s'interroge sur les effets biologiques qu'il faudrait d'étudier, au delà de la toxicité développementale [1].

Une deuxième question semble inévitable. Elle concerne les niveaux d'exposition qu'il est possible d'obtenir par des méthodes directes (biomarqueurs) ou indirectes. Pour le DEHP l'exposition moyenne a été estimée par des méthodes indirectes à 5,8 - 8,2 µg/kg/j avec des intervalles de 3-30. Les données sur les métabolites urinaires indiquent une moyenne de 1-2 µg/kg/j, avec un 95 percentile de 7 - 17 µg/kg/j (quelques variations sont à noter en fonction du métabolite utilisé). Ces chiffres sont à comparer à la RfD [2] (équivalent de la VTR aux Etats-Unis) de 20 µg/kg/j et la TDI [3] de 37 µg/kg/j. Cependant, notons qu'ils n'existent pas de données d'exposition pour des enfants de moins de 6 ans, sans que l'on puisse dire si cette tranche de la population pourrait avoir une exposition différente, en dehors de certains traitements médicaux (par exemple pour les enfants prématurés) pour lesquels il conviendrait de procéder à une évaluation bénéfices-risques. Néanmoins, les résultats de l'étude de Swan [1], montrent qu'il est possible de déceler des effets à des doses d'exposition de la population tout à fait courantes.

Les notions à retenir de ce cours

Dans ce cours nous avons parcouru à la fois les principes de :

1. La **toxicocinétique** : absorption, distribution, métabolisme, excrétion des substances toxiques, tout en abordant des aspects comme le transport membranaire ou les compartiments biologiques dans lesquels ils peuvent s'accumuler
2. La **toxicodynamique** : modes d'action des substances toxiques au niveau des principaux organes et systèmes susceptibles d'être atteints.

Nous avons essayé de compléter par des connaissances de physiologie et d'anatomie, de manière à bien comprendre le contexte de l'exposition et de l'élimination des toxiques, en particulier autour de la fonction du foie. L'implication des enzymes de métabolisation/inactivation/élimination a également été détaillée.

Différentes manifestations de toxicité sont abordées :

- ▶ Mutagénèse/Cancérogénèse,
- ▶ Effets développementaux,
- ▶ Reprotoxicité,
- ▶ Effets neurotoxiques et comportementaux.

Nous avons insisté sur le lien entre la perturbation (effet biologique) ou la lésion (dommage de l'ADN) et la manifestation de toxicité au niveau d'une cellule (mutagénèse/cancérogénèse) ou des organes et systèmes (reproduction, système nerveux). Bien sûr nous ne pouvons pas être exhaustifs. Il existe d'autres types de toxicité importants : néphrotoxicité (touchant le rein), immunotoxicité (altérant les défenses immunitaires) par exemple. Les enjeux représentés par l'exposition à certaines substances a été illustré au travers de quelques substances aux propriétés de perturbateurs endocriniens (TBT et DEHP).

Enfin, notons l'importance accordée à la relation dose/effets, dont il faut retenir à la fois les paramètres quantitatifs à déterminer des courbes (DL50, DSENO pour les effets avec seuil ou ERU pour les effets sans seuil), que les informations que recèle la forme des courbes. En effet, si la courbe en forme de S représente le cas général, la démonstration de l'existence d'effets aux faibles doses, en particulier pour certains perturbateurs endocriniens, doit être retenue.