

Valeurs toxicologiques de référence (VTR)

Méthode de construction de valeurs toxicologiques de référence (VTR) pour les substances chimiques cancérogènes

- Avis de l'Afsset
- Rapport d'expertise collective



Le Directeur général

Maisons-Alfort, le 1^{er} mars 2010

AVIS

de l'Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail

Relatif à la méthode de construction de Valeurs toxicologiques de référence (VTR) pour les substances chimiques cancérogènes

Auto-Saisine Afsset n° « 2004/AS16 »

L'Afsset a pour mission de contribuer à assurer la sécurité sanitaire dans les domaines de l'environnement et du travail et d'évaluer les risques sanitaires qu'ils peuvent comporter.

Elle fournit aux autorités compétentes toutes les informations sur ces risques ainsi que l'expertise et l'appui technique nécessaires à l'élaboration des dispositions législatives et réglementaires et à la mise en œuvre des mesures de gestion du risque (article L.1336-1 du Code de la santé publique).

Contexte

La conduite d'une évaluation quantitative des risques sanitaires telle que préconisée par le *National Research Council* américain en 1983¹, implique une démarche en 4 étapes :

- Identification des dangers,
- Définition des relations dose-réponse,
- Evaluation de l'exposition,
- Caractérisation des risques.

Les 2 premières étapes qui visent à caractériser le danger ont pour objectif, lorsque les données disponibles sur les substances considérées le permettent, de proposer des Valeurs Toxicologiques de Référence ou VTR. Une VTR est un indice toxicologique permettant d'établir un lien entre une exposition à une substance toxique et un effet sanitaire néfaste. Les VTR sont spécifiques d'une durée d'exposition (aiguë, subchronique ou chronique), d'une voie d'exposition (orale, respiratoire ou cutanée), voire d'un sous groupe à risque (enfants par

¹ National Research Council (NRC) (1983) Risk Assessment in the Federal Government: Managing the Process. Washington D.C.: National Academies Press. 191 p.

exemple). La construction des VTR diffère en fonction des connaissances ou des hypothèses formulées sur le mode d'action des substances : « VTR sans seuil de dose » et « VTR à seuil de dose ». Ces VTR peuvent ensuite être utilisées pour établir des valeurs de référence (Valeurs guides de qualité d'air intérieur par exemple), ou dans le cadre d'évaluation des risques sanitaires dans un contexte d'exposition donné.

Une action spécifique relative au développement et à l'utilisation des VTR figurait dans le Plan National Santé Environnement² (PNSE 1) 2004-2008. Une action spécifique relative à l'analyse critique des VTR, à la réactualisation et/ou la sélection de VTR existantes pour des substances cancérogènes présentes dans l'environnement général était également inscrite dans le Plan Cancer (2003-2007). L'élaboration de VTR pour des substances cancérogènes non encore évaluées est également mentionnée.

La construction de VTR doit s'appuyer sur une démarche structurée qui implique des évaluations collectives par des groupes de spécialistes. L'Afsset a ainsi proposé à ses partenaires scientifiques, conformément à ses missions, d'établir un programme national sur les VTR visant à l'amélioration de l'expertise française dans ce domaine. L'Afsset a publié en avril 2007 un premier rapport sur la méthode de construction de VTR fondées sur des effets toxiques pour la reproduction et le développement.

Cette démarche a ensuite été étendue au domaine des substances chimiques cancérogènes qui constitue l'objet de cet avis.

Présentation de la question posée

L'Afsset s'est saisie en 2004 afin d'établir un document définissant un cadre méthodologique pour la construction de VTR spécifiques aux effets cancérogènes. Il est à noter que les critères permettant la sélection de VTR existantes pour une substance chimique donnée n'ont pas été abordés par le groupe de travail. Cette méthode s'applique donc en l'absence de VTR publiées ou jugées satisfaisantes dans un contexte donné.

Organisation de l'expertise

L'expertise a été réalisée dans le respect de la norme NF X 50-110 « Qualité en expertise – Prescriptions générales de compétence pour une expertise (Mai 2003) » avec pour objectif de respecter les points suivants : compétence, indépendance, transparence, traçabilité.

Cette problématique relève des compétences du comité d'experts spécialisés (CES) « Evaluation des risques liés aux substances chimiques ». L'Afsset a confié l'expertise au groupe de travail « Substances chimiques cancérogènes et construction de Valeurs toxicologiques de référence ». Les travaux ont été soumis régulièrement au CES tant sur les aspects méthodologiques que scientifiques et les conclusions ont été présentées et approuvées par le CES le 22 octobre 2009.

Dans le cadre du développement de la méthode de construction de VTR cancérogènes, une première version de la méthodologie de construction de VTR cancérogènes a servi de document de travail pour une « phase pilote ». Cette étude de faisabilité a été réalisée de

² Action 21 du PNSE 1 : « développer des outils pour mieux évaluer les risques sanitaires des substances chimiques ou biologiques »

manière à mettre en pratique la méthode élaborée sur 6 substances représentatives de différentes natures chimiques : éthanol, chlorure de vinyle, benzène, naphthalène, cadmium et composés et toxines de *Fusarium moniliforme* (fumonisine B1).

La sélection de ces substances proposée par le groupe de travail s'est appuyée sur plusieurs critères permettant de couvrir au mieux les cas de figure pouvant être rencontrés (corpus de données de toxicité important ou non, disponibilité de données épidémiologiques, mode d'action à seuil ou sans seuil, composés organiques, métaux,...). Des équipes prestataires extérieures au groupe de travail ont été sélectionnées sur la base d'un appel d'offres lancé par l'Afsset. Les équipes retenues ont régulièrement présenté leurs travaux devant les experts du groupe de travail. Cette phase pilote a ainsi permis d'identifier les améliorations à apporter à la méthode sur quelques substances modèles. A cette fin, l'Agence a fait appel à différents organismes d'expertise pour construire, selon le document de référence sur la base de la méthode établi et par le du groupe de travail, des VTR cancérigènes pour les voies orales et/ou inhalées des substances suivantes :

- Benzène,
- Ethanol,
- Chlorure de vinyle,
- Naphthalène,
- Cadmium et composés,
- Toxines de *Fusarium moniliforme* (fumonisine B1).

Le retour d'expérience sur cette phase pilote a conduit le groupe de travail à améliorer la méthodologie initialement proposée.

Le présent avis se fonde sur le rapport final « Valeurs toxicologiques de référence (VTR) pour les substances cancérigènes. Méthode de construction de VTR fondées sur des effets cancérigènes » (Janvier 2010) ainsi que sur les rapports de construction de VTR cancérigènes pour les 6 substances de la phase pilote.

Avis et recommandations

Après analyse des rapports du groupe de travail et de l'avis du CES, et considérant la méthode de construction des VTR, qui suit les étapes suivantes :

- Analyse du potentiel cancérigène et génotoxique ;
- Choix de l'hypothèse de construction de la VTR (à seuil ou sans seuil). Un schéma décisionnel permettant d'aboutir à la construction d'une VTR à seuil ou sans seuil de dose pour les substances cancérigènes est proposé ;
- Choix d'un effet critique cancérigène et d'une étude clé de bonne qualité scientifique permettant de définir une relation dose-réponse ;
- Identification d'une dose critique définie soit à partir de données expérimentales, soit de données épidémiologiques si celles-ci le permettent ;
- Pour les VTR à seuil de dose, exprimées en dose ou concentration : application d'un ajustement allométrique et/ou temporel puis de facteurs d'incertitude liés aux différences inter-espèces, interindividuelles ou aux conditions expérimentales ;
- Pour les VTR sans seuil de dose, exprimées en excès de risque unitaire : extrapolation linéaire aux faibles doses à partir de la dose critique ;

L'Agence :

- **Adopte la version finale du rapport « Valeurs Toxicologiques de Référence (VTR) pour les substances cancérogènes. Méthode de construction de VTR fondées sur des effets cancérogènes » (Janvier 2010)** comme document de référence pour la construction de VTR fondées sur des effets cancérogènes ;
- **Préconise l'application de** cette méthode pour la construction des futures VTR pour les substances cancérogènes jugées d'intérêt ;

Pour ce faire, l'Agence **se propose** :

- A moyen terme :
 - de promouvoir la diffusion de ce rapport au niveau national et européen ;
 - de poursuivre les travaux de construction de VTR cancérogènes pour les substances d'intérêt ;
 - de valider les VTR les plus abouties construites lors de la phase pilote ;
 - d'indiquer le cadre d'utilisation de ces VTR, notamment par la fixation de façon systématique d'une durée d'application, des conditions d'utilisation (évaluation de risques, proposition de valeurs de gestion...) et du niveau de confiance des VTR ainsi produites ;
 - de mettre en place un processus régulier de révision des VTR produites ;
 - de mettre en place un système d'évaluation de leur utilisation par des tiers, en favorisant les retours d'expérience ;
 - de mettre en place une réflexion sur la codification et l'indexation de ces VTR, en particulier pour identifier leur origine, voie et durée d'exposition ;
- A plus long terme :
 - de publier un document à l'attention des utilisateurs des VTR, sous forme de guide ou manuel d'utilisation, qui définit en particulier les conditions d'utilisation de ces VTR (domaine de validité, limites, interprétation) ;
 - d'engager une réflexion sur :
 - sur les critères permettant la sélection de la VTR la plus pertinente pour une substance chimique donnée dans le cadre de VTR existantes élaborées par d'autres organismes. Un guide méthodologique pourrait être élaboré en ce sens ;
 - les méthodes d'ajustement allométrique proposées par l'US EPA ;
 - la construction de VTR établies sur la base d'études épidémiologiques ;
 - l'utilisation et la construction de VTR lors d'une exposition à un mélange de substances afin de préconiser une approche adaptée aux substances cancérogènes ;
 - le développement d'une approche probabiliste d'élaboration de VTR conduisant non plus à une valeur unique, mais à une distribution de valeurs qui reflètent les choix méthodologiques pris lors de la construction de la VTR et la confiance qui lui est accordée ;

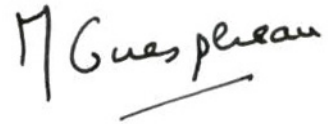
Par ailleurs l'Agence se propose de :

- promouvoir l'harmonisation des méthodes d'élaboration des VTR à l'échelle européenne ;

- faire évoluer la méthode en fonction de l'acquisition de nouvelles connaissances scientifiques et en s'appuyant sur l'expérience acquise lors la construction des VTR.

Fait en quatre exemplaires,

Le Directeur général

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'M Guespereau', with a horizontal line drawn underneath the name.

Martin GUESPEREAU

Valeurs toxicologiques de référence (VTR) pour les substances cancérogènes

Méthode de construction de VTR fondées sur des effets cancérogènes

Saisine n°2004/AS16

RAPPORT d'expertise collective

Comité d'experts spécialisés « Evaluation des risques liés aux substances chimiques »

Groupe de travail « VTR cancérogènes »

Mai 2010

Mots clés

Valeur toxicologique de référence, Cancer, Génotoxique, Mutagène, Mode d'action, Modélisation, Relation dose-effet, Substance

Présentation des intervenants

GROUPE DE TRAVAIL « SUBSTANCES CHIMIQUES CANCEROGENES ET CONSTRUCTION DE VTR »

Membres

M. Sébastien Garry - Afssa (a démissionné en juillet 2009)
M. Alain Baert – CAPTV Rennes (n'a pas participé aux travaux)
M. Philippe Saviuc – Centre de toxicovigilance de Grenoble (n'a pas participé aux travaux)
Mme Marie-Agnès Pelissier - Cnam / Inserm
M. Rémy Maximilien - CEA
Mme Fatiha El Ghissassi - Circ
Mme Blandine Doornaert - Ineris (a démissionné en juillet 2007)
M. Pascal Empereur-Bissonnet - InVS
M. Roger Rahmani - Inra
M. Michel Falcy - INRS
Mme Cécile Challeton de Vathaire - IRSN
M. Patrick Lévy – UIC (a démissionné en janvier 2008)
M. Jean-Ulrich Mullot - Ecole du Val de Grâce, Paris
Mme Marie-Odile Rambourg - Direction du Végétal et de l'Environnement, Afssa

Rapporteurs auprès du CES « Substances chimiques » (fin de mandat Décembre 2006)

M^{me} Christine Cézard - CAP Lille
M^{me} Brigitte Enriquez - Ecole nationale vétérinaire d'Alfort
M. Frank Karg - HPC Envirotec
M^{me} Florence Ménétrier - DSV, CEA

ADOPTION DU RAPPORT PAR LE COMITE D'EXPERTS SPECIALISES « EVALUATION DES RISQUES LIES AUX SUBSTANCES CHIMIQUES »

Ce rapport a été soumis pour commentaires au CES « Evaluation des risques liés aux substances chimiques » les 23 avril, 25 juin, 17 septembre et 22 octobre 2009.

Président

M. Michel GUERBET – Professeur des Universités en toxicologie, Université Rouen

Membres

M. Pierre-Marie BADOT – Professeur des Universités en biologie environnementale, Chrono-Environnement, CNRS, Université de Franche-Comté

Mme Claire BEAUSOLEIL – Pharmacien toxicologue responsable des évaluations européennes des substances chimiques au BERPC (a démissionné en septembre 2009)

M. Luc BELZUNCES – Directeur de recherche, responsable du laboratoire de toxicologie environnementale à l'INRA

Mme Christine CEZARD – Pharmacien toxicologue, centre antipoison de Lille

M. Michel DESLAURIERS – Médecin toxicologue, pôle de toxicologie industrielle, EDF

M. Pascal EMPEREUR-BISSONNET – Evalueur de risque en santé environnement, InVS

Mme Brigitte ENRIQUEZ – Professeur de pharmaco-toxicologie – Ecole nationale vétérinaire d'Alfort

M. Olivier FARDEL – Professeur des Universités en toxicologie

Mme Hélène FENET – Pharmacien, Maître de conférence, département sciences de l'environnement et santé publique

M. Luc FERRARI – Pharmacien toxicologue, centre antipoison de Nancy

M. Luc FONTANA – Maître de Conférences des Universités – Praticien hospitalier, Médecine, Santé au travail en médecine du travail

Mme Nathalie FOUILHE SAM-LAI – Pharmacien toxicologue en centre antipoison

Mme Barbara GOUGET – Chercheur en toxicologie des contaminants physico-chimiques, Toxicologue à l'AFSSA (a démissionné en juillet 2009)

Mme Dominique GUENOT – Chercheur en cancérologie et neurosciences

M. Cong Khanh HUYNH – Dr ès Science, Ingénieur chimiste spécialisé en santé au travail

M. Dominique LAFON – Médecin toxicologue, évaluation des risques liés à la femme enceinte en entreprise, INRS

Mme Béatrice LALERE – Docteur en chimie analytique et en environnement, LNE

Mme Annie LAUDET-HESBERT – Pharmacien toxicologue, retraitée

M. Jean-Pierre LEPOITTEVIN – Professeur des universités en dermatochimie

Mme Anne-Christine MACHEREY – Docteur en toxicologie, spécialisée dans la prévention du risque chimique

Mme Florence MENETRIER – Pharmacien, chef de projet dans le domaine de la toxicologie nucléaire, CEA

Mme Annie PFOHL-LESZKOWICZ – Professeur d'Université en toxicologie et sécurité alimentaire, Pharmacien-Toxicologue

M. Daniel PICART – Retraité de l'enseignement et de la recherche en chimie structurale

M. Alain-Claude ROUDOT – Enseignant chercheur en statistique et analyse de risque, Université de Brest

Mme Béatrice SECRETAN – Docteur en toxicologie au CIRC spécialisée dans l'évaluation de la cancérogénicité des substances

Mme Anne STEENHOUT – Chimiste, spécialiste en évaluation intégrée des risques sanitaires

M. Robert TARDIF – Chimiste et toxicologue, spécialisé en santé environnement et santé au travail

M. Eric THYBAUD – Ecotoxicologue, Ineris

Rapporteurs pour relecture finale du rapport

Mme Annie PFOHL-LESZKOWICZ – Professeur d'Université en toxicologie et sécurité alimentaire, Pharmacien-Toxicologue

Mme Dominique GUENOT – Chercheur en cancérologie et neurosciences

Mme Béatrice SECRETAN – Docteur en toxicologie au CIRC spécialisée dans l'évaluation de la cancérogénicité des substances

Le rapport a été adopté par le CES « Evaluation des risques liés aux substances chimiques » le 22 octobre 2009. Il a fait l'objet d'une relecture interne et de corrections mineures entre octobre 2009 et mai 2010.

PARTICIPATION AFSSET

Coordination scientifique

M. Laurent Bodin – Chef de projet scientifique – toxicologue

Mme Cécilia Solal – Chef de projet scientifique – toxicologue

Contribution scientifique

Mme Nathalie Bonvallot

M. Cédric Duboudin

Mme Cécile Michel

M. Christophe Rousselle

Secrétariat administratif

Mme Séverine Boix

Melle Romy Collet

PRESTATIONS POUR LA PHASE DE FAISABILITE (2008)

Vincent Nedellec Conseil

M. Vincent Nedellec

HPC Envirotec

Mme Lucie Robin-Vigneron

M. Maxime Eluin

M. Laurent Grimault

M. Stéphane Vircondelet

Ineris

Mme Michèle Bisson

Université de Brest occidentale

Mme Anne-Sophie Ficheux

Mme Nolwenn Hymery

Mme Dominique Parent-Massin

M. Bertrand Jehanin

RELECTEURS EXTERIEURS (2008)

M. Alain Botta – Chef de service de médecine et de santé au travail – Hôpital de la Timone, Faculté de médecine, Marseille

M. Daniel Marzin – Professeur – Institut Pasteur de Lille

SOMMAIRE

Présentation des intervenants.....	3
Expertise collective : synthèse et conclusions.....	9
Abréviations.....	15
Liste des tableaux	18
Liste des figures	18
Liste des annexes.....	18
1 Contexte, objet et modalités de traitement de la saisine.....	19
1.1 Contexte.....	19
1.2 Objet de l'auto-saisine et méthode de travail.....	20
1.3 Modalités de traitement : moyens mis en œuvre et organisation.....	21
2 Effets cancérigènes et mécanismes	22
2.1 Définitions	22
2.1.1 Substance cancérigène	22
2.1.2 Substance cancérigène génotoxique	22
2.1.3 Substance cancérigène non génotoxique	23
2.1.4 Caractérisation des effets cancérigènes	23
2.2 Principaux mécanismes biologiques cancérigènes	24
2.2.1 Mutagénicité et génotoxicité	24
2.2.2 Mécanismes non génotoxiques	25
3 Evaluation du potentiel cancérigène et génotoxique	27
3.1 Etudes épidémiologiques	27
3.1.1 Description	27
3.1.2 Critères de qualité	28
3.1.3 Cas particulier des études de cas chez l'homme	30
3.2 Etudes chez l'animal	30
3.2.1 Description	30
3.2.2 Critères de qualité	32
3.3 Tests de génotoxicité.....	35
3.3.1 Description	35
3.3.2 Critères de qualité	38
3.3.3 Interprétation des résultats	38
3.4 Etudes toxicologiques à doses répétées.....	40
3.5 Etudes de toxicocinétique	41
3.5.1 Chez l'animal	41
3.5.2 Chez l'homme	41
3.5.3 Modèles PBPK.....	42
3.6 Propriétés physicochimiques.....	42
3.7 Relations (quantitatives) structure-activité	42
3.8 Effets de synergie	42
3.8.1 Mécanismes principaux	43
3.8.2 Quantification des effets de synergie cancérigène.....	43
3.9 Omics.....	44
4 Hypothèses de validité et de construction d'une VTR cancérigène chez l'homme	45
4.1 Mode d'action : description et validité chez l'homme	45
4.1.1 Plausibilité du mode d'action chez l'animal	45
4.1.2 Plausibilité chez l'homme.....	46

4.1.3	Aide à la décision pour la transposition du mode d'action à l'homme	48
4.2	Hypothèse de construction de la VTR cancérogène	50
4.3	Sélection de l'effet critique cancérogène	52
4.4	Sélection de l'étude clé pour la construction de la VTR.....	52
5	Construction d'une VTR cancérogène à seuil de dose	54
5.1	Choix de la dose critique	54
5.1.1	Identification et construction des doses repères	54
5.1.2	Recommandations pour le choix de la dose critique	57
5.2	Ajustements temporel et allométrique.....	57
5.2.1	Ajustement temporel	57
5.2.2	Ajustement allométrique	58
5.3	Choix des facteurs d'incertitude	59
5.3.1	Détails des facteurs d'incertitude	60
5.3.2	Recommandations pour les facteurs d'incertitude à appliquer	64
5.4	Expression finale de la VTR	65
6	Construction d'une VTR cancérogène sans seuil de dose.....	66
6.1	Méthodes de construction des VTR cancérogènes sans seuil.....	66
6.1.1	US EPA.....	67
6.1.2	AESA.....	69
6.2	Recommandations pour la méthode de construction à appliquer.....	69
6.2.1	Choix des doses repères à considérer comme POD	70
6.2.2	Ajustement temporel et allométrique	70
6.2.3	Choix du modèle d'extrapolation aux faibles doses	71
6.2.4	Construction d'une VTR sans seuil à partir de données épidémiologiques	71
6.2.5	Cas particulier des enfants	71
6.3	Expression finale de la VTR	72
7	Organisation et présentation des connaissances.....	73
7.1	Synthèse des données toxicologiques.....	73
7.1.1	Identification et propriétés physico-chimiques	73
7.1.2	Plausibilité d'exposition humaine	75
7.1.3	Toxicocinétique	75
7.1.4	Toxicité générale.....	76
7.1.5	Cancérogénicité	76
7.1.6	Génotoxicité	76
7.1.7	VTR existantes.....	77
7.2	Elaboration de la VTR cancérogène pour la substance étudiée	77
7.2.1	Mode d'action proposé et cohérence des données animales et humaines.....	77
7.2.2	Hypothèse de construction de la VTR cancérogène	77
7.2.3	Choix de l'étude clé et de l'effet critique	78
7.2.4	Construction de la VTR cancérogène.....	78
7.2.5	Expression finale de la VTR.....	78
8	Conclusions et recommandations	79
9	Bibliographie.....	81
9.1	Références réglementaires.....	81
9.2	Documents guides	81
9.3	Publications scientifiques	84

Expertise collective : synthèse et conclusions



EXPERTISE COLLECTIVE : SYNTHÈSE ET CONCLUSIONS

Relatives à la méthode de construction de Valeurs toxicologiques de référence (VTR) pour les substances chimiques cancérogènes

Auto-Saisine Afsset n° « 2004/AS16 »

Ce document synthétise les travaux du groupe de travail « VTR cancérogènes » et présente les éventuels compléments du Comité d'Experts Spécialisés.

Contexte scientifique

La conduite d'une évaluation des risques sanitaires (ERS) telle que mise en place dans les années 1980 aux Etats-Unis, toujours en vigueur, implique une démarche en 4 étapes :

- Identification des dangers,
- Définition des relations dose-réponse,
- Evaluation de l'exposition,
- Caractérisation des risques.

Les 2 premières étapes qui visent à caractériser le danger ont pour objectif, lorsque les données disponibles sur les substances considérées le permettent, la proposition de valeurs toxicologiques de référence ou VTR. Une VTR est un indice toxicologique permettant d'établir un lien entre une exposition à une substance toxique et un effet sanitaire indésirable. Les VTR sont spécifiques d'une durée d'exposition (aiguë, subchronique ou chronique), d'une voie d'exposition (orale, cutanée ou respiratoire), voire d'un sous groupe à risque (enfants par exemple). La construction des VTR diffère en fonction des connaissances ou des hypothèses formulées sur le mode d'action des substances : « VTR sans seuil de dose » et « VTR à seuil de dose ». Ces VTR peuvent ensuite être utilisées soit pour établir des valeurs de référence (Valeurs guides de qualité d'air intérieur par exemple), soit dans le cadre d'évaluation des risques sanitaires dans un contexte d'exposition donné.

Une action spécifique relative au développement et à l'utilisation des VTR est inscrite dans le Plan National Santé Environnement¹ (PNSE) 2004-2008. Une action spécifique est également inscrite dans le Plan Cancer, relative à l'analyse critique des VTR, à la réactualisation et/ou la sélection de VTR existantes pour des substances cancérogènes présentes dans l'environnement général. La proposition de VTR pour des substances cancérogènes non encore évaluées est également mentionnée.

L'élaboration de VTR doit s'appuyer sur une démarche structurée qui implique des évaluations collectives par des groupes de spécialistes. L'Afsset a ainsi proposé à ses partenaires scientifiques, conformément à ses missions, d'établir un programme national sur les VTR visant à l'amélioration de l'expertise française dans ce domaine. L'Afsset a ainsi publié en avril 2007 un premier rapport sur la méthode de construction de VTR fondées sur des effets toxiques pour la reproduction et le développement. Cette démarche a ensuite été étendue au domaine des

¹ Action 21 du PNSE : « développer des outils pour mieux évaluer les risques sanitaires des substances chimiques ou biologiques »

substances chimiques cancérogènes. La méthode de construction de VTR pour ce type d'effet fait l'objet de la présente note d'expertise.

Organisation de l'expertise

L'Afsset a créé un groupe de travail « Substances chimiques cancérogènes et construction de Valeurs toxicologiques de référence » mis en place en février 2005. Ce groupe a été rattaché au Comité d'Experts Spécialisés (CES) « Evaluation des risques liés aux substances chimiques ». Le rapport du groupe de travail a été soumis au CES en avril, juin et septembre 2009 et tient compte des observations et éléments complémentaires transmis par les membres du CES.

La mission principale du groupe de travail était d'établir un document définissant le cadre méthodologique pour la construction de VTR spécifiques aux effets cancérogènes. Il est à noter que les critères permettant la sélection de VTR existantes pour une substance chimique donnée n'ont pas été abordés par le groupe de travail. Cette méthode s'applique donc en l'absence de VTR publiées ou jugées satisfaisantes dans un contexte donné.

Ces travaux d'expertise sont issus d'un collectif d'experts aux compétences complémentaires. Ils ont été réalisés dans le respect de la norme NF X 50-110 « qualité en expertise » avec pour objectif de respecter les points suivants : compétence, indépendance, transparence, traçabilité.

Description de la méthode

Un recensement bibliographique des différentes méthodes de construction de VTR cancérogènes a été réalisé. Cet état des lieux ainsi que l'analyse des VTR cancérogènes disponibles ont permis d'identifier les points critiques relatifs à la construction de VTR cancérogènes. Ces points critiques ont été discutés puis répartis en 3 catégories :

- Qualité scientifique des données collectées : études physicochimiques (spéciation, mélanges de composés), études toxicologiques et épidémiologiques,
- Transposition des données à l'homme (mécanisme d'action, transposition de voie, ajustement temporel, cas particulier des enfants, ...),
- Modélisation et extrapolation aux faibles doses (choix de l'hypothèse de construction à seuil / sans seuil, choix des modèles de transposition, expression finale de la VTR),

D'autres données seront à considérer au cas par cas comme par exemple les mélanges de substances, la spéciation des métaux, la métabolisation...

Une première version de la méthodologie de construction de VTR cancérogènes a servi de document de travail pour une phase pilote. Cette étude de faisabilité visant à mettre en pratique la méthode de construction de VTR pour les voies orales et/ou inhalées sur 6 substances: éthanol, chlorure de vinyle, benzène, naphthalène, cadmium et composés et toxines de *Fusarium moniliforme* (fumonisine B1).

La sélection de ces substances par le groupe de travail s'est appuyée sur plusieurs critères permettant de couvrir au mieux les cas de figure pouvant être rencontrés (corpus de données de toxicité important ou non, disponibilité de données épidémiologiques, mode d'action à seuil ou sans seuil, composés organiques, métaux,...). Des équipes prestataires extérieures au groupe de travail ont été sélectionnées sur la base d'un appel d'offres lancé par l'Afsset. Les équipes retenues ont régulièrement présenté leurs travaux devant les experts du groupe de travail. Cette phase pilote a ainsi permis d'identifier les améliorations à apporter à la méthode.

Une version préliminaire du rapport a également été adressée à plusieurs experts français et internationaux spécialisés dans les domaines de la cancérogenèse ou de la génotoxicité. Leurs commentaires ont également contribué à améliorer le rapport final.

Résultat de l'expertise collective

Après un rappel des définitions et des principaux mécanismes biologiques de la cancérogenèse, les types d'études permettant d'évaluer, dans un premier temps le potentiel cancérogène, puis dans un second temps le potentiel génotoxique ou non d'une substance, sont décrits et discutés : études épidémiologiques, études animales, tests *in vitro* et autres modèles (QSAR, PB-PK,...). Les hypothèses permettant de justifier la validité d'une construction d'une VTR cancérogène chez l'homme sont présentées, en particulier la plausibilité des mécanismes d'action supposés chez l'animal et leur validité pour l'homme. Enfin, un schéma décisionnel permettant d'aboutir à la construction d'une VTR à seuil de dose pour les substances cancérogènes non génotoxiques ou sans seuil de dose pour les substances cancérogènes génotoxiques (cf. schéma page suivante) est proposé.

L'application de la méthode implique les considérations suivantes :

- Analyse du potentiel cancérogène et génotoxique,
- Choix de l'hypothèse de construction de la VTR (à seuil ou sans seuil),
- Sélection d'une étude clé et d'un effet critique pour la construction de la VTR,
- Choix d'une dose critique (BMD ou couple LOAEL/NOAEL),
- Pour les VTR à seuil de dose exprimées en dose ou concentration : choix des facteurs d'incertitude proposés par l'Afsset liés aux différences inter-espèces, inter-individuelles, aux conditions expérimentales (temps exposition, voie d'exposition,...),...

Acronyme	Interprétation des UF	Valeurs des UF
UF _A	Différences inter-espèces, composante toxicocinétique ²	1 à 3
UF _A	Différences inter-espèces, composante toxicodynamique	1 à 3
UF _H	Variabilité inter-individuelle composante toxicocinétique	1 à 3
UF _H	Variabilité inter-individuelle, composante toxicodynamique	1 à 3
UF _L	LOAEL à NOAEL	1, 3 ou 10
UF _S	Subchronique à chronique	1, 3 ou 10
UF _D	Suffisance des données (en qualité et en quantité)	1, 3 ou 10
	Sévérité de l'effet	1, 3 ou 10

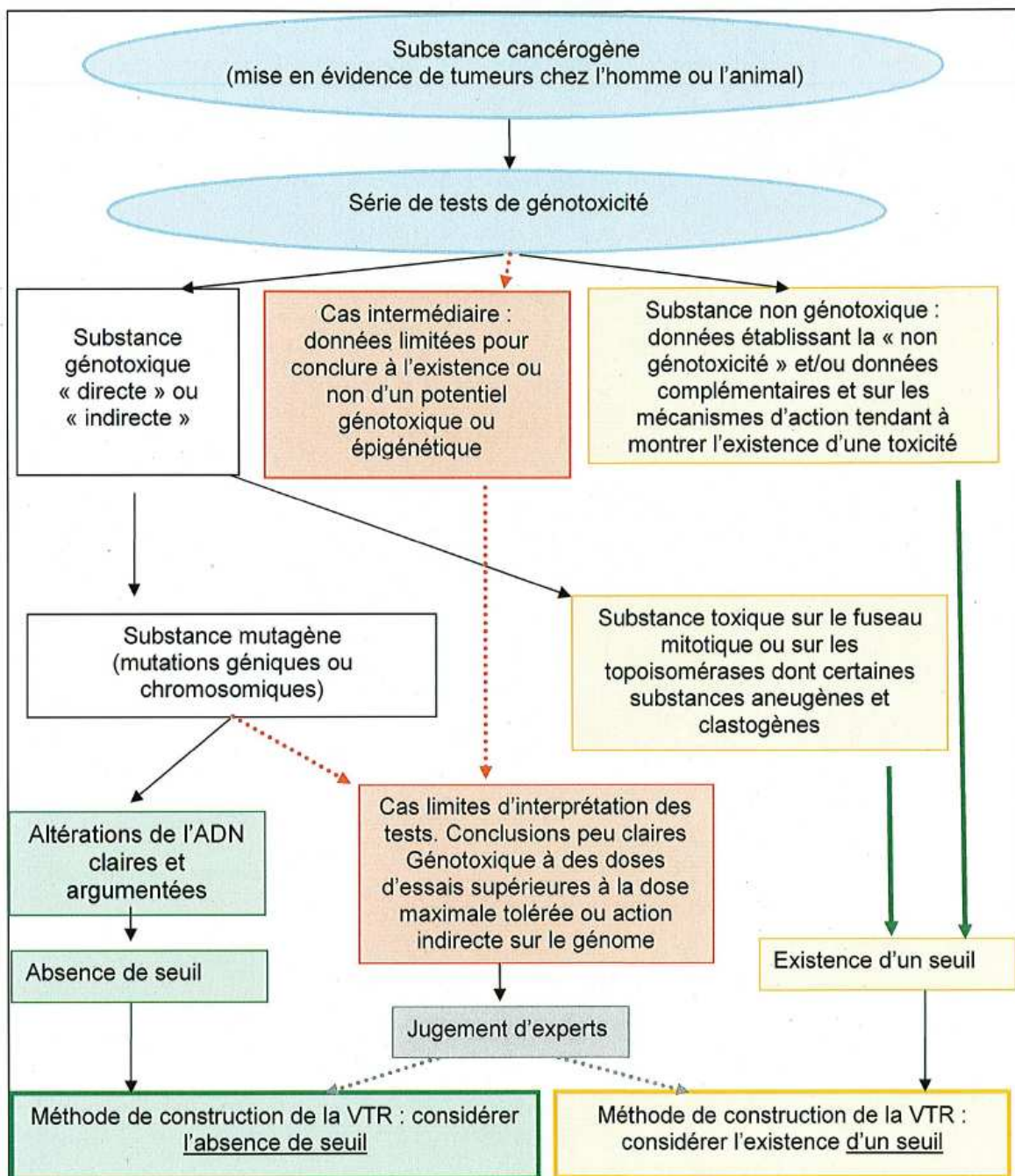
UF : Uncertainty Factors ou facteurs d'incertitudes

- Pour les VTR sans seuil de dose exprimées en excès de risque unitaire : choix du modèle d'extrapolation aux faibles doses à partir de la dose critique.

Enfin, un plan d'organisation des connaissances aboutissant à la présentation finale de la VTR et à sa discussion est proposé.

² Non appliqué si un ajustement allométrique est réalisé. Le groupe de travail a choisi d'utiliser, en l'état actuel des connaissances, les méthodes de calcul d'ajustement allométrique proposées par l'US EPA pour les voies orale et inhalée.

Le schéma d'aide à la décision sur l'hypothèse de construction des VTR cancérogènes est le suivant^{3, 4}:



³ La **génotoxicité directe** correspond à toutes réactions chimiques possibles entre une substance d'intérêt et l'ADN, comme des liaisons covalentes (adduits) ou des cassures du double brin (attaque électrophile). La **génotoxicité indirecte** correspond aux autres mécanismes conduisant à des modifications du matériel génétique (stress oxydatif par exemple). Un cancérogène non génotoxique ou épigénétique correspond à tous mécanismes aboutissant à un processus cancéreux, sans que la molécule d'ADN soit altérée (exemple des esters de phorbol).

⁴ Jugement d'expert: Processus intellectuel d'appréciation, d'évaluation, d'estimation ou d'explication conduisant à énoncer une opinion, sur un sujet ou un objet, fondée sur la compétence, l'indépendance et la probité d'une personne reconnue apte à effectuer des travaux d'expertise.

Le Comité d'Experts Spécialisés « Evaluation des risques liés aux substances chimiques » adopte le rapport d'expertise collective lors de sa séance du 30 Octobre 2009 et fait part de cette adoption à la direction générale de l'Afsset.

Recommandations de l'expertise collective

- Pour la construction de la VTR

Il serait pertinent d'engager une réflexion plus avancée sur les méthodes d'ajustement allométrique proposées par l'US EPA.

Dans le cas d'une substance pour laquelle il n'est pas possible de choisir un seul effet critique, il serait judicieux de construire plusieurs VTR pour différents types d'effets et de retenir *in fine* la VTR ayant la valeur la plus faible, à degré de confiance équivalent.

Lors de la construction d'une VTR établie sur la base d'études épidémiologiques, des spécificités liées à l'utilisation des données humaines sont à considérer, notamment sur la prise en compte des variabilités inter-individuelles (polymorphisme génétique), sur l'utilisation des données d'incidences de cancers d'une localisation géographique autre que la France par exemple,... Des réflexions devraient être engagées sur ce thème.

- Pour l'utilisation de la VTR

La durée d'application (aiguë, chronique,...), les conditions d'utilisation (évaluation de risque, fixation de valeurs réglementaires,...) et le niveau de confiance de ces VTR devraient être explicités de façon systématique. Une procédure de révision des VTR produites devrait également être mise en place.

Lors d'une exposition à un mélange de substances, une réflexion devrait être engagée afin de préconiser une approche adaptée aux substances cancérogènes. Plusieurs approches sont possibles : considérer la toxicité du mélange équivalente à celle de la forme prépondérante (exemple des toxines de *Fusarium moniliforme*), considérer la toxicité des composés par rapport à la toxicité d'une substance de référence (exemple des dioxines avec l'approche des facteurs équivalent toxiques), considérer la toxicité du mélange selon les modes d'action de chacune des substances composant le mélange (exemple des HAP).

- Perspectives

Il serait intéressant de développer l'approche probabiliste pour l'élaboration de VTR, conduisant non plus à une valeur unique, mais à une distribution et une médiane et des percentiles qui reflètent les choix méthodologiques pris lors de la construction de la VTR et la confiance qui lui est accordée.

Il conviendra donc de faire évoluer la méthode en fonction des nouvelles connaissances scientifiques, et en s'appuyant également sur l'expérience acquise lors la construction de nouvelles VTR. Une réflexion plus approfondie sur certains points critiques de la méthode pourra en particulier être envisagée (distinction à seuil / sans seuil par exemple). Il est souhaitable d'améliorer la connaissance sur les données d'exposition (quantification, durée exposition, voie d'exposition, expositions concomitantes...) en particulier pour les études épidémiologiques.

D'autre part, dans le cadre de VTR existantes élaborées par d'autres organismes, le CES estime nécessaire de définir les critères permettant la sélection de la VTR la plus pertinente pour une substance chimique donnée. Un guide méthodologique pourrait être élaboré en ce sens.

Enfin, le CES recommande que cette méthode de construction de VTR pour des substances cancérogènes soit largement diffusée et appliquée pour la construction de VTR pour les substances jugées d'intérêt. Le CES recommande également de promouvoir l'harmonisation au niveau européen des méthodes de construction de ces VTR.

Maisons-Alfort, le 30 Octobre 2009

Au nom des experts du CES
« Evaluation des risques liés aux substances chimiques »,

Le président du CES

M. Michel GUERBET



Abréviations

ADELFI	Association des épidémiologistes de langue française
ADME	Absorption, Distribution, Métabolisation, Elimination
AESA	Autorité européenne de sécurité des aliments
AFNOR	Agence française de normalisation
ALARA	As low as reasonably achievable
ATSDR	Agency for Toxic Substances and Disease Registry
AUC	Area under the curve (aire sous la courbe)
BAF	Bioaccumulation factor (facteur de bioaccumulation)
BCF	Bioconcentration factor (facteur de bioconcentration)
BHE	Barrière hémato-encéphalique
BMD	Benchmark dose (dose repère)
BMDxLy	Limite inférieure de l'intervalle de confiance à y% de la dose correspondant à un niveau de réponse de x%
BMR	Benchmark response
BPE	Bonnes pratiques en épidémiologie
BPL	Bonnes pratiques de laboratoire
BUA	Beratergremium für Umweltrelevante Altstoffe (Comité consultatif allemand sur les substances chimiques existantes)
Cal-EPA	California environmental protection agency
CHO	Chinese hamster ovary cells (cellules ovariennes de hamster chinois)
CSHPF	Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France
CIRC	Centre international de recherche sur le cancer
DMT	Dose maximale tolérée
ECB	European chemicals bureau
ECETOC	European centre for ecotoxicology and toxicology of chemicals
ECHA	European chemicals agency
ECVAM	European centre for the validation of alternative methods
FDA	Food and drug administration (administration américaine pour l'aliment et les médicaments)
HAP	Hydrocarbures aromatiques polycycliques
HEC/HED	Human equivalent concentration/dose
HSDB	Hazardous substances databank
ICD	International classification of diseases

IC	Intervalle de confiance
ICH	International Conference on Harmonization (conférence internationale d'harmonisation)
ILSI	International Life Sciences Institute
IPCS	International Programme on Chemical Safety
JECFA	Joint expert committee on food additives (comité mixte FAO/OMS pour les additifs alimentaires)
JMPR	Joint meeting on pesticide residues (OMS) (comité pour les résidus de pesticides)
KEMI	Kemikalieinspektionen (Inspection suédoise des substances chimiques)
LED	Lowest Estimated Dose (dose estimée la plus faible)
LMS	Linearised MultiStage (modèle multi-étapes linéarisé)
LOAEL	Lowest Observed Adverse Effect Level (dose minimale entraînant un effet néfaste observé)
MVK	Moolgavkar Vendson Knudson (modèle d'expansion clonal à deux étapes)
NACAD	North American control animal database
NCEA	National centre for environmental assessment (US EPA)
NHMRC	National health and medical research council (Australie)
NOAEL	No Observed Adverse Effect Level (dose maximale sans effet néfaste observé)
NTP	National toxicology programme (Etats-Unis) (programme national de toxicologie)
OCDE	Organisation de coopération et de développement économique
OEHHA	Office of environmental health hazard assessment
OMS	Organisation mondiale de la santé
PBPK	Physiologically-based pharmacokinetic (modèle pharmacocinétique)
PNSE	Plan National Santé Environnement
POD	Point of departure (point de départ)
QSAR	Quantitative structure-activity relationship (relation structure activité quantitative)
REACH	Registration evaluation and authorization of chemicals (Enregistrement, évaluation des produits chimiques)
RENI	Registry nomenclature information system (nomenclature des systèmes d'information)
RITA	Registry of industrial toxicology animal-data (registre des données expérimentales de toxicologie industrielle chez les animaux)
RIVM	Rijksinstituut voor volksgezondheid en milieu (Institut national hollandais pour la santé publique et l'environnement)
SCE	Sister chromatide exchange (échange de chromatides sœurs)
STP	Society of toxicologic pathology
TGD	Technical guidance document (Europe)

TRD	Tolerierbare resorbierte Dosis (dose résorbée tolérable)
UBA	Umwelt Bundesamt (Bureau fédéral de l'environnement allemand)
UDS	Unscheduled DNA Synthesis (synthèse non programmée de l'ADN)
UE	Union européenne
UF	Uncertainty Factor (facteur d'incertitude)
US EPA	United States Environmental Protection Agency (agence américaine de protection de l'environnement)
VTR	Valeur toxicologique de référence

Liste des tableaux

Tableau 1 : Points critiques prioritaires instruits par le groupe de travail	21
Tableau 2 : Applications des différents types d'études épidémiologiques	27
Tableau 3 : Etudes toxicologiques pour l'évaluation du potentiel cancérogène d'une substance	31
Tableau 4 : Critères pour la cotation de Klimisch	34
Tableau 5 : Tests pour l'évaluation du potentiel génotoxique d'une substance	36
Tableau 6 : Préconisation de tests pour les trois types effets génotoxiques	39
Tableau 7 : Etudes toxicologiques à doses répétées	40
Tableau 8 : Etudes de toxicocinétique	41
Tableau 9 : Exemples de tumeurs dues à des modes d'action <i>a priori</i> spécifiques à l'animal	48
Tableau 10 : Facteurs d'incertitudes proposés dans la littérature	60
Tableau 11 : Valeurs de UF_A proposés en théorie dans les documents guides	61
Tableau 12 : Valeurs de UF_A utilisées en pratique	62
Tableau 13 : Facteurs d'incertitude proposés par l'Afsset	64
Tableau 14 : Méthodes de construction des VTR cancérogènes sans seuil	67

Liste des figures

Figure 1 : Schéma d'aide à la décision sur la transposition du mode d'action de l'animal à l'homme	49
Figure 2 : Schéma d'aide à la décision sur l'hypothèse de construction des VTR cancérogènes	51
Figure 3 : Relation dose-réponse et recherche du LOAEL	55
Figure 4 : Relation dose-réponse et définition de la BMDL	56
Figure 5 : Arbre décisionnel pour l'application des facteurs allométriques par inhalation (US EPA, 1994)	59
Figure 6 : Détermination du POD et extrapolation linéaire aux faibles doses	68

Liste des annexes

Annexe 1 : Synthèse des déclarations publiques d'intérêts des experts par rapport au champ de l'auto-saisine	88
Annexe 2 : Grille de lecture des études épidémiologiques	93
Annexe 3 : Grille de lecture des études toxicologiques	96
Annexe 4 : Grille de lecture des tests de génotoxicité	98
Annexe 5 : Paramètres épidémiologiques	99

1 Contexte, objet et modalités de traitement de la saisine

La notion de *mode of action* est de plus en plus prise en compte par la communauté scientifique internationale dans la démarche d'évaluation des risques sanitaires pour les substances chimiques. La description de ce mode d'action est d'autant plus importante pour les substances ayant des effets cancérogènes qu'il permet d'identifier les étapes successives menant à la formation de tumeurs, le plus souvent à partir de données animales, et d'évaluer la transposition à l'homme. Dans l'objectif d'une évaluation quantitative des risques sanitaires (EQRS) pour une substance chimique cancérogène, la description des relations dose-effet / dose-réponse et la caractérisation de cette relation par l'élaboration d'une valeur toxicologique de référence (VTR) peuvent s'appuyer sur la description du mode d'action. En effet, la connaissance du mode d'action peut orienter le choix sur l'hypothèse de construction de la VTR, c'est-à-dire l'absence ou la présence d'un seuil de dose.

L'hypothèse historique et posée par défaut de l'absence de seuil pour les substances cancérogènes est toujours actuellement admise, bien qu'elle soit de plus en plus contestée. Elle est fondée sur le postulat qu'une seule molécule d'une substance cancérogène est capable de provoquer une mutation au niveau de l'ADN et de produire ainsi une cellule initiée, pouvant conduire après plusieurs étapes à l'apparition d'un cancer. Cependant, les mécanismes de réparation de l'ADN laissent supposer la possibilité de l'existence d'un seuil, même pour les substances cancérogènes génotoxiques. De surcroît, certains modes d'action cancérogènes reposent sur des processus biologiques non génotoxiques pour lesquels la présence d'un seuil apparaît biologiquement plus plausible.

Ainsi, l'objet du présent rapport est de rassembler et d'organiser les connaissances permettant de décrire la cancérogénicité, la génotoxicité et le mode d'action des substances chimiques cancérogènes, ainsi que les critères de sélection nécessaires au choix de l'hypothèse de construction (à seuil ou sans seuil). Selon le choix adopté, une méthodologie de construction de la VTR cancérogène en elle-même est proposée.

1.1 Contexte

La connaissance des méthodes de construction des VTR permet aujourd'hui de bien situer l'apport de la toxicologie à la démarche d'évaluation des risques (Bonvallot, 2002). L'élaboration des VTR suit une démarche structurée qui implique des évaluations collectives par des groupes de spécialistes. C'est une procédure lourde, aux conséquences majeures pour la gestion des risques.

En 2002, un groupe d'experts du Conseil supérieur d'hygiène publique de France (CSHPF) a réalisé une évaluation quantitative des risques sanitaires liés à l'exposition de la population générale aux éthers de glycol par des produits de consommation (CSHPF, 2002). Dans son avis du 7 novembre 2002, le CSHPF précisait que d'importantes améliorations devaient être apportées au dispositif d'EQRS liés aux substances chimiques, notamment sur l'élaboration de valeurs toxicologiques de référence, invitant ainsi à une réflexion au sein des instances nationales compétentes.

Peu après sa création, l'Agence française de sécurité sanitaire environnementale (Afsse) proposait à ses partenaires scientifiques, conformément à ses missions¹, d'établir un programme national sur les VTR visant à l'amélioration de l'expertise française dans ce domaine. Pour démarrer ce projet d'envergure, l'Afsse est partie d'une première thématique, positionnée au cœur des préoccupations sanitaires : le domaine des substances chimiques ayant des effets toxiques sur la reproduction et le développement embryofœtal.

S'appuyant sur les résultats concluants du travail réalisé (Afsset, 2007), l'Afsse a proposé d'étendre cette démarche au domaine des substances chimiques cancérogènes, conformément à la mission qui lui a été confiée dans le cadre du Plan Cancer². Priorité nationale de santé publique et priorité d'action du Plan National Santé Environnement (PNSE) pour la population générale comme pour le milieu professionnel³, le cancer reste l'une des premières causes de mortalité chez l'homme avec une contribution professionnelle substantielle (Imbernon, 2003).

1.2 Objet de l'auto-saisine et méthode de travail

Un groupe de travail « Substances chimiques cancérogènes et construction de Valeurs toxicologiques de référence » a été mis en place en février 2005. Coordonné par l'Afsset, ce groupe est composé d'experts appartenant à des organismes nationaux ou internationaux ayant compétence d'expertise et de veille en sécurité sanitaire, mettant en œuvre ou enseignant la démarche de l'évaluation quantitative du risque sanitaire, mais également spécialisés dans le domaine de la cancérogénèse.

L'objectif du groupe de travail était d'établir un document définissant le cadre méthodologique pour la construction de VTR spécifiques aux effets cancérogènes. Les critères permettant la sélection de VTR existantes, pour une substance chimique donnée, n'ont pas été abordés.

Dans ce but, le groupe a tout d'abord réalisé un recensement bibliographique des différentes méthodes de construction de VTR cancérogènes disponibles. Cet état des lieux ainsi que l'analyse des VTR cancérogènes existantes en partant de l'exemple du benzo[a]pyrène ont permis d'identifier des points critiques relatifs à la construction de VTR cancérogènes.

Ces points critiques ont été discutés puis répartis en 3 catégories :

1. Qualité scientifique des données collectées (études toxicologiques et épidémiologiques),
2. Transposition des données à l'homme (mode d'action, transposition à l'homme, transposition de voie, ajustement temporel, cas particulier des enfants, mélanges de substances, spéciation des métaux),

¹ Rassembler les informations scientifiques pertinentes en évaluation des risques sanitaires par ses moyens propres ou ceux de ses partenaires ; informer, former et diffuser l'information scientifique ; encourager et s'assurer de la coordination de la production de connaissances dans le domaine de la santé environnementale. www.afsset.fr

² Plan Cancer (2003-2007). Action 14.1 : Analyse critique des Valeurs toxicologiques de Référence. Travail de réactualisation et/ou de sélection de VTR existantes pour des substances cancérogènes présentes dans l'environnement général. Prise en compte des données nationales et internationales. Proposition de VTR pour des substances non encore évaluées. www.planancer.fr

³ PNSE. Action 21 : Développer des outils pour mieux évaluer les risques sanitaires liés aux substances chimiques – Outils utiles à l'élaboration de VTR et conditions d'utilisation de celles-ci.

3. Modélisation et extrapolation aux faibles doses (choix de l'hypothèse de construction à seuil / sans seuil, choix des modèles d'interpolation et d'extrapolation, expression finale de la VTR).

Pour des raisons opérationnelles, le groupe de travail a instruit, entre 2005 et 2007, une première série de points critiques « prioritaires » afin d'élaborer une première version de la méthodologie de construction de VTR cancérogènes (Tableau 1)

Tableau 1 : Points critiques prioritaires instruits par le groupe de travail

Catégorie de points	Points critiques
Qualité scientifique des données collectées	Etudes animales
	Différences inter-espèces et inter-individuelles
Transposition des données à l'homme	Mode d'action
	A seuil vs sans seuil, définition de la génotoxicité et mutagénicité
Modélisation et extrapolation aux faibles doses	Modèles

Dans un second temps, une phase de faisabilité a été initiée en 2008 auprès d'équipes prestataires extérieures au groupe de travail afin de mettre en pratique la méthode élaborée, sur des substances chimiques d'intérêt sélectionnées par le groupe de travail. Cette étape a permis d'identifier les améliorations à apporter à la méthode afin de finaliser le document méthodologique et d'instruire les points critiques restants en parallèle. Toutefois, le groupe de travail n'a pas pu apporter de réponses à l'ensemble des points critiques identifiés au préalable. Ces points de réflexion ont donc fait l'objet de recommandations par le groupe dans le présent document (paragraphe 8).

1.3 Modalités de traitement : moyens mis en œuvre et organisation

L'expertise a été réalisée dans le respect de la norme NF X 50-110 « Qualité en expertise – Prescriptions générales de compétence pour une expertise (Mai 2003) » avec pour objectif de respecter les points suivants : compétence, indépendance, transparence, traçabilité.

L'Afsset a confié l'instruction de cette saisine à un groupe de travail « Substances chimiques cancérogènes et construction de Valeurs toxicologiques de référence » mis en place en février 2005. Les missions de ce dernier ont été rattachées au Comité d'Experts Spécialisés (CES) « Evaluation des risques liés aux substances chimiques » en novembre 2004. La liste des experts impliqués dans cette auto-saisine ainsi que l'analyse de leurs liens d'intérêts sont répertoriées en Annexe 1 de ce rapport.

2 Effets cancérogènes et mécanismes

Dans le cadre de la construction de VTR pour une substance cancérogène, la connaissance de son mode d'action peut permettre d'orienter vers une hypothèse de construction avec ou sans seuil de dose. Afin de fonder ce choix sur des bases justifiées, il est nécessaire de définir précisément les termes propres aux mécanismes de la cancérogénèse et de rassembler les éléments de connaissance sur ces différents mécanismes.

2.1 Définitions

2.1.1 Substance cancérogène

Une substance **cancérogène** est une substance qui, par elle-même ou par un de ses métabolites, est capable d'augmenter, chez l'homme ou l'animal, l'incidence de tumeurs bénignes/malignes par rapport à un groupe témoin non exposé. Les mécanismes conduisant au cancer sont divers. Ils peuvent impliquer des mutations au niveau de l'ADN, des altérations des systèmes de réparation et de réplication fidèle de l'ADN, ou des effets sur des structures cellulaires comme le fuseau mitotique et le centrosome. Une distinction est établie entre les substances cancérogènes génotoxiques et les substances cancérogènes non génotoxiques.

Dans un souci de clarté pour la compréhension du document, il a été convenu de regrouper sous le terme de cancérogène génotoxique, toute substance qui altère le matériel génétique comprenant les composés génotoxiques directs (ou primaires) et les composés génotoxiques indirects (ou secondaires). Un composé cancérogène non génotoxique se définira comme une substance cancérogène qui n'entraîne pas d'altération de la molécule d'ADN (sont inclus dans cette définition les cancérogènes épigénétiques, cf. chapitre 2.2.2.1).

2.1.2 Substance cancérogène génotoxique

Une substance **cancérogène génotoxique** est une substance capable d'augmenter l'incidence de tumeurs bénignes/malignes en altérant la transmission fidèle du génome d'une génération de cellules à l'autre (altération du matériel génétique). Elle peut être mutagène, clastogène et/ou aneugène.

Une substance cancérogène **mutagène** est une substance qui, par elle-même ou par le biais d'un de ses métabolites, est capable de provoquer un cancer en induisant et en augmentant la fréquence des mutations. Une mutation est une modification permanente d'une séquence d'ADN conduisant à un changement du matériel génétique d'une cellule (gènes, chromosomes). Une substance mutagène peut induire des mutations sur des portions de gènes spécifiques critiques, le plus souvent des proto-oncogènes, des gènes suppresseurs de tumeurs et/ou des gènes de réparation de l'ADN.

Une substance génotoxique n'est mutagène qu'à la condition qu'elle soit capable d'altérer la structure du gène de façon permanente et transmissible aux cellules filles par mitoses successives (notion de fixation de la mutation). Les systèmes de défense permettant à la cellule de se protéger de l'induction de mutations permanentes sont alors dépassés et ne peuvent plus restaurer l'intégrité du matériel génétique ou empêcher la transmission de mutations.

Une substance cancérogène **clastogène** est une substance capable de provoquer l'apparition d'un cancer par des modifications structurales des chromosomes (cassure du matériel génétique).

Une partie de chromosome se retrouve à un emplacement différent dans le même chromosome, ou sur un autre, et peut être perdu ou en excès.

Une substance cancérogène **aneugène** est une substance capable de provoquer l'apparition d'un cancer en modifiant le nombre des chromosomes (aneuploïdie). Le mécanisme peut être soit l'altération des protéines constitutives de l'appareil mitotique, soit la formation d'adduits encombrant (*bulky adduct*) empêchant ainsi la bonne ségrégation des chromosomes.

2.1.3 Substance cancérogène non génotoxique

Une substance **cancérogène non génotoxique** est une substance capable de provoquer l'apparition d'un cancer sans action directe sur le matériel génétique. Le mode d'action non génotoxique inclut des effets qui n'impliquent pas des altérations de l'ADN, mais qui influencent l'expression génique, la communication entre cellules ou d'autres facteurs du processus cancérogène. Les effets cancérogènes épigénétiques reposent sur ce mécanisme (cf. chapitre 2.2.2.1). Il s'agit de substances dites « promoteurs » de tumeurs.

2.1.4 Caractérisation des effets cancérogènes

L'effet cancérogène d'une substance se caractérise par la formation de tumeurs ou néoplasmes (masses de cellules anormales provenant d'un tissu sain préexistant). Ces tumeurs sont le résultat d'une prolifération cellulaire excessive et non coordonnée. Les tumeurs bénignes se distinguent des tumeurs malignes, ces dernières ayant la capacité d'envahir les tissus voisins voire distants en disséminant des cellules cancéreuses par la circulation sanguine et lymphatique (métastases) (OCDE, 2002).

Lorsqu'une tumeur est mise en évidence chez l'homme ou chez l'animal, elle est systématiquement caractérisée, le plus précisément possible, selon sa localisation, sa morphologie et son histologie. Les termes employés sont généralement standardisés. A cet effet, des nomenclatures de classification des types de tumeurs chez l'animal ont été élaborées afin d'uniformiser les terminologies employées ainsi que les méthodes de caractérisation des types de tumeurs. Elles sont en règle générale disponibles sur internet et permettent d'accéder aux données par organe ou par système biologique :

- une nomenclature de classification et de critères de diagnostic a été proposée par le STP⁴ aux Etats-Unis dès les années 1980 ;
- l'OMS a établi en 1988 une nomenclature de classification et a créé à cet effet la base de données européenne RITA⁵ permettant d'accéder en ligne aux données histopathologiques historiques (rats et souris), à la nomenclature de classification et aux critères de diagnostic tumoral. La nomenclature et les critères de diagnostic ont été publiés par le Centre international de recherche sur le cancer (Circ) pour le rat et la souris (CIRC, 1992-1997 ; CIRC, 2001). Cette nomenclature attribue à chaque type de lésion une appellation spécifique : H = hyperplasie, B = tumeur bénigne, M = tumeur maligne, S = tumeur maligne systémique ;
- une nomenclature calquée sur le modèle RITA a été mise en ligne en 1996 aux Etats-Unis par des scientifiques du NACAD⁶, prenant en compte les classifications proposées par la

⁴ Society of Toxicologic Pathology www.toxpath.org/

⁵ Registry of Industrial Toxicology Animal-data <http://reni.item.fraunhofer.de/reni/public/rita/>

⁶ North American Control Animal Database

STP et RITA (Keenan, 2002 ; Ruehl-Fehlert, 2003 ; Kittel, 2004 ; Morawietz, 2004). La classification repose sur des appellations scientifiques : N = lésion non prénéoplasique, H = hyperplasie, B = tumeur bénigne, M = tumeur maligne, S = tumeur maligne systémique ;

- la base de données internationale RENI⁷ propose depuis 1998 le système de classification harmonisée « International Harmonization of Rat Nomenclature » d'après les principales classifications existantes (RITA/OMS, NACAD, STP). La classification des types de tumeurs proposée est identique à celle du NACAD,
- enfin, une classification standardisée des pathologies en général et des cancers en particulier, est proposée par l'OMS (ICD⁸). Une actualisation de cette base doit être rendue disponible en mai 2010.

2.2 Principaux mécanismes biologiques cancérigènes

Les exemples proposés ci-dessous n'ont pas pour vocation à être exhaustifs.

2.2.1 Mutagénicité et génotoxicité

Les mutations peuvent se produire sur un gène unique, un ensemble de gènes (mutations géniques) ou sur un chromosome entier (mutations chromosomiques). Celles portant sur un gène unique peuvent être ponctuelles (sur une seule base de l'ADN) ou sur plusieurs bases, conduisant ainsi à de profondes modifications. Celles portant sur les chromosomes peuvent être structurales ou numériques.

2.2.1.1 Altérations primaires de l'ADN

Des molécules électrophiles peuvent se lier de façon covalente à l'ADN et créer des adduits ayant un fort potentiel tumorigène.

Par exemple, les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) comme le benzo[a]pyrène sont transformés en époxydes, composés très électrophiles se fixant notamment sur le carbone C8 des guanines. Les adduits formés entraînent une distorsion de la structure hélicoïdale de l'ADN, perturbant gravement la réplication et la transcription. Ces adduits peuvent être promutagènes : s'ils sont présents au moment de la réplication de l'ADN (à la suite d'une réparation erronée par exemple), ils peuvent conduire à une mutation.

2.2.1.2 Mutations géniques

Il s'agit de mutations par substitution, insertion ou délétion de nucléotides.

Par exemple, les agents alkylants et intercalants, en introduisant dans la double hélice d'ADN un radical alkyl pour les premiers et un radical bifonctionnel pour les seconds, provoquent des mutations conduisant ainsi à des erreurs lors de la réplication de l'ADN.

2.2.1.3 Mutations chromosomiques

Elles sont provoquées par des agents clastogènes ou aneugènes. Actuellement, les preuves du potentiel cancérigène des substances aneugènes sont limitées. Cependant, de nombreuses substances aneugènes induisent une transformation maligne de cellules de mammifères *in vitro*. Aussi, certains comités ont décidé d'inclure les essais sur les propriétés aneugènes des

⁷ Reni : Registry Nomenclature Information System. www.item.fraunhofer.de

⁸ ICD : International classification of diseases. <http://www.who.int/classifications/icd/en/>

substances dans les stratégies de tests de génotoxicité (COM, 2000). Dans le *Technical Guidance Document* européen, les substances aneugènes n'agissant pas directement sur l'ADN mais sur le fuseau mitotique cellulaire sont considérées comme des substances à seuil (ECB, 2003). Bolt *et al.* (2004) précisent que des tests d'aberrations chromosomiques positifs, en l'absence de tests de mutagenicité positifs, peuvent soutenir (ou justifier) l'hypothèse de substances à seuil. Ils précisent également que les substances n'agissant pas directement sur l'ADN mais sur certaines topoisomérases, dont les effets se traduisent par une clastogénicité, peuvent être également considérées comme des substances à seuil.

2.2.1.4 Stress oxydatif et espèces réactives de l'oxygène

Certaines substances cancérogènes induisent la formation d'espèces réactives de l'oxygène et/ou de l'azote (stress oxydatif) dont les effets sont multiples : lésion de l'ADN (oxydations, cassures simple brin), mutagenicité, cytotoxicité et changement au niveau de l'expression des gènes. Il est à noter que ce mécanisme est également valable pour des composés génotoxiques (dérivés nitrés des HAP par exemple).

Un stress oxydatif peut être à l'origine de cancer *via* un mécanisme génotoxique (mutations) et non génotoxique (*via* la formation de peroxyde d'hydrogène et son impact sur la signalisation cellulaire).

2.2.2 Mécanismes non génotoxiques

2.2.2.1 Expression ou inactivation de gènes (mécanisme épigénétique⁹)

L'expression ou l'inactivation des gènes est un mécanisme naturel qui peut être perturbé par l'action de substances chimiques :

- méthylation de l'ADN : la méthylation par les méthyltransférases a lieu sur la cytosine au niveau de la région promotrice d'un gène et est associée généralement à une mise sous silence de l'expression du gène. Les gènes actifs ne sont généralement pas méthylés (Watson *et al.*, 2004) ;
- remodelage de la chromatine : la chromatine est une structure compacte d'ADN associée aux histones et enroulée en pelotes. Les modifications chimiques des histones (addition d'un groupement acétyl, méthyl, phosphate) peuvent altérer la structure de la chromatine et modeler ainsi l'expression des gènes. Ces modifications ainsi que le degré de compaction de l'ADN permettent de réguler l'accessibilité du génome à la machinerie responsable de la transcription. Par exemple, les gènes associés à des histones acétylés sont généralement activés. Cependant, les conséquences des multiples modifications des histones restent encore mal connues (Dennis, 2003).

2.2.2.2 Augmentation du taux de divisions cellulaires

A titre d'exemple :

- La cytotoxicité et l'inflammation chronique peuvent entraîner une régénération cellulaire compensatrice, responsable d'une augmentation du nombre de divisions cellulaires et donc de prolifération cellulaire. Celles-ci peuvent être accompagnées d'une dérégulation des processus de réparation du matériel génétique et d'apoptose ;

⁹ Sont concernées ici les modifications de la séquence ADN basées sur une modification de la méthylation de l'ADN et de l'acétylation des histones et de la chromatine.

- La prolifération ou « expansion » clonale de cellules déjà initiées, issue par exemple d'une hyperactivité métabolique, conduit dans ce cas à une hyperplasie ; les taux de transformation spontanée sont accrus par le biais de la prolifération cellulaire ;
- La liaison à des récepteurs entraînant la transduction de signaux responsables d'une augmentation du taux de division cellulaire. Par exemple, le 12-o-tétra-décanoyl-phorbol-13-acétate (TPA), ester de phorbol entrant dans la composition de l'huile de croton, est un promoteur de tumeur très étudié : sa liaison à des récepteurs membranaires induit la transduction d'un signal mitogène, notamment *via* les protéines kinase C ;
- Certains états physiologiques naturels tels que la croissance ou la gestation s'accompagnent naturellement d'un accroissement du taux de divisions cellulaires constituant un facteur de risque pour la fixation de mutations provoquées par des agents génotoxiques exogènes.

2.2.2.3 Inhibition de l'apoptose

La mort cellulaire induite par les agents cytotoxiques est le plus souvent de type apoptotique, dans les cellules tumorales comme dans les cellules normales.

L'apoptose est un processus physiologique, génétiquement programmé et déterminant dans la morphogénèse, le vieillissement et l'élimination des cellules porteuses de mutations de l'ADN. Certains stimuli pro-apoptotiques endogènes ou exogènes (stress oxydant, xénobiotiques, UV...) déclenchent différentes voies de signalisation aboutissant à l'activation de caspases (protéases exécutrices de l'apoptose) puis à la mort de la cellule.

La régulation de ce processus est sous contrôle de protéines pro- et anti-apoptotiques, les mieux caractérisées étant celles de la famille Bcl-2 dont le déséquilibre orientera la cellule vers la survie ou vers la mort. Il est bien établi que les dérèglements de l'apoptose sont au cœur de la formation des tumeurs, puisque les cellules cancéreuses ont perdu leur capacité à s'autodétruire. Ainsi, les cellules cancéreuses présentent fréquemment une altération des voies d'induction ou d'inhibition de l'apoptose et plusieurs formes de cancers et leur résistance aux chimiothérapies sont liées à une suppression atypique des protéines anti-apoptotiques telles que Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1 ou A1.

3 Evaluation du potentiel cancérogène et génotoxique

Ce chapitre a pour vocation de proposer les études et tests qu'il est utile d'analyser afin de décrire le plus précisément possible, qualitativement et quantitativement, le profil toxicologique de la substance étudiée. L'ensemble de ces connaissances doit permettre de définir le mode d'action cancérogène de la substance, étape préalable nécessaire au choix de l'hypothèse de construction de la VTR cancérogène (à seuil ou sans seuil de dose), ainsi que l'effet critique cancérogène à retenir.

3.1 Etudes épidémiologiques

3.1.1 Description

On distingue deux grandes catégories d'enquêtes épidémiologiques : les enquêtes expérimentales et les enquêtes d'observation. Les enquêtes d'observation sont :

- à visée descriptive : elles fournissent des fréquences de phénomènes de santé, des tendances temporelles ou géographiques. Elles peuvent être réalisées à l'échelle d'individus ou de populations (études écologiques) ;
- à visée étiologique : elles contribuent à mettre en lumière une relation causale entre un facteur de risque et une pathologie. Elles correspondent aux études de cohorte (prospectives et rétrospectives), aux études cas-témoins ou aux études transversales.

Le Tableau 2 présente les types d'études épidémiologiques et leurs applications (enHealth Council, 2002).

Tableau 2 : Applications des différents types d'études épidémiologiques

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

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

Les études écologiques, qui ne reposent pas sur des mesures individuelles et ne permettent pas la prise en compte de biais ou de facteurs de confusion à l'échelle individuelle, permettent rarement d'établir un lien de causalité entre exposition et risque.

Les études à visée étiologique sont celles qui apportent le plus d'informations utiles à la caractérisation de la relation dose-réponse, dans le contexte de construction de VTR.

3.1.2 Critères de qualité

Les Bonnes pratiques en épidémiologie (BPE) proposent des recommandations précises aux investigateurs qui préparent, mettent en œuvre et diffusent les résultats d'une étude épidémiologique ainsi qu'à ceux qui commandent ou financent de telles études. Ces BPE, actualisées en 2003 par l'Adelf¹⁰, sont en accord avec les principes édictés par la fédération européenne de l'*International Epidemiological Association*. Ces clés de décisions sont qualitatives : elles concernent notamment le contenu du protocole et de la publication. Elles ne peuvent en aucun cas remplacer l'expertise épidémiologique réalisée au cas par cas, notamment sur certains points critiques pour la construction de VTR cancérigènes.

3.1.2.1 Mesures des expositions

Une attention particulière devra être portée à la manière dont ont été mesurées les expositions (validité des outils de mesure et qualité de leur mise en œuvre), avec notamment des précisions sur :

- L'existence d'expositions multiples à des agents variés pouvant avoir chacun un rôle dans l'effet cancérigène étudié ;
- L'application d'outils ou de techniques classiques de l'épidémiologie environnementale (budgets espace-temps moyens, relations expositions - biomarqueurs) à des sous-groupes particuliers ;
- La part des sources extérieures, professionnelles, intérieures et alimentaires dans l'exposition et leur articulation dans le temps ;
- L'importance des biais dans les études utilisant un questionnaire pour évaluer les expositions ;
- Les biais de mémorisation différentiels entre les cas et les témoins liés à une réminiscence plus importante d'événements non souhaités ;
- Les biais d'information liés à une négation d'une conduite connue ou suspectée comme « à risque » telle que la consommation d'alcool par exemple ;
- La caractérisation des expositions : niveaux, classes d'exposition (stratifications).

3.1.2.2 Effets observés

Une attention particulière sera apportée à la méthode de collecte des données concernant l'effet cancérigène retenu. Les mêmes conditions standardisées devront avoir été appliquées aux cas, aux témoins, aux personnes exposées et non exposées. Dans ce contexte, les cas rapportés en dehors d'un suivi systématique et standardisé seront interprétés avec prudence, notamment en raison de la difficulté de précision relative à la population source dont ils sont issus.

¹⁰ Association des épidémiologistes de langue française : <http://adelf.isped.u-bordeaux2.fr/>

A ce stade, il est important de noter si l'effet observé correspond à une incidence de survenue de cancers dans la population étudiée, ou à sa mortalité.

3.1.2.3 Puissance

Comme pour toute étude épidémiologique, les résultats négatifs ne seront interprétés qu'en relation avec la puissance de l'étude, c'est-à-dire la probabilité d'obtenir de faibles excès de risque statistiquement significatifs.

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

En dehors de ceux cités précédemment, un autre type de biais est plus susceptible d'être rencontré fréquemment : les biais de sélection, liés à l'inclusion de cas et/ou témoins non représentatifs de la population générale ou non comparables.

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

- l'âge,
- la catégorie socio-professionnelle,
- l'exercice professionnel pendant l'exposition (modifications de poste, arrêt, co-expositions possibles...),
- les habitudes tabagiques,
- les habitudes alimentaires,
- la consommation d'alcool,
- les antécédents médicaux, la consommation médicamenteuse, les infections intercurrentes (ex : *Helicobacter pylori*),
- les sources éventuelles de contamination non prises en compte dans l'étude : eau du robinet, air extérieur, air intérieur, température/saison/jour, expositions proches de sites pollués (ou autres, à juger selon le contexte),
- les susceptibilités génétiques (si possible).

3.1.2.5 Lien causal entre exposition et effet

D'une manière générale, une relation causale ne peut être établie à partir d'une seule étude épidémiologique du type de celles pouvant être utilisées pour construire une VTR. Le choix d'une étude épidémiologique pour construire une VTR devra naturellement être en cohérence avec les connaissances issues de l'analyse des dangers. Les critères de causalité les plus reconnus (critères de B. Hill, 1965) sont :

- la force de l'association (i.e. l'importance de l'excès de risque relatif),
- l'existence d'une relation entre la dose d'exposition (prenant en compte la durée et l'intensité de l'exposition) et l'importance et/ou l'incidence de l'effet (relation dose-réponse),
- la description de l'exposition (la stratification rend difficile la construction de VTR),
- la temporalité (l'exposition précède l'effet),
- la spécificité de l'association entre l'exposition et l'effet,
- la reproductibilité des résultats d'une étude à l'autre,

- la plausibilité biologique de l'association entre la substance étudiée et la survenue d'un cancer,
- la cohérence avec les connaissances disponibles (toxicocinétiques...),
- l'existence de données expérimentales contrôlées lorsque cela est possible,
- l'analogie avec des connaissances disponibles sur d'autres agents.

Une aide à la lecture des études épidémiologiques disponibles pour une substance étudiée est proposée en Annexe 2, élaborée sur la base des éléments développés ci-dessus.

3.1.3 Cas particulier des études de cas chez l'homme

Seules les études épidémiologiques peuvent permettre d'établir un lien de causalité entre l'exposition à une substance toxique et un effet chez l'homme (en l'occurrence ici le cancer). Il faut cependant reconnaître que les niveaux d'exposition sont souvent indiqués sous une forme semi-quantitative ou qualitative. De plus, ils sont souvent déterminés *a posteriori* dans le cadre d'études rétrospectives ce qui nuit à la qualité de l'évaluation de l'exposition.

Lorsque le lien entre un type de tumeur et l'exposition à une substance a été établi, il est possible dans certains cas de disposer d'informations plus précises provenant d'études de cas isolés. Dans ces études, l'exposition fait souvent l'objet d'une description détaillée qui pourra fournir des éléments sur les niveaux de dose / concentration (quantité, durée) et les caractéristiques des tumeurs observées. Pour évaluer le niveau d'exposition, il sera important de disposer des résultats de mesures atmosphériques réalisées sur plusieurs années mais également des résultats de biométrie surtout si l'on connaît, pour le toxique évalué, la relation entre l'exposition et le devenir du composé dans l'organisme.

L'utilisation de ces données pour l'établissement d'une VTR devra tenir compte du fait qu'il s'agit de cas isolés qui ne permettent pas d'évaluer le niveau de réponse d'une population. Il sera naturellement important de s'assurer, dans l'analyse de ces publications, que les facteurs de confusion et les co-expositions ont été correctement pris en compte.

3.2 Etudes chez l'animal

3.2.1 Description

L'OCDE (Organisation de coopération et de développement économique) a développé, depuis 1981, des lignes directrices pour les essais des produits chimiques. La section 4 de ce programme concerne les effets sur la santé chez l'homme. Des protocoles expérimentaux standardisés sont proposés afin d'évaluer les effets et les relations dose-effet quand elles existent, de la façon la plus fiable et la plus pertinente possible. L'OCDE propose trois types d'études permettant d'évaluer le potentiel cancérigène d'une substance (Tableau 3).

Tableau 3 : Etudes toxicologiques pour l'évaluation du potentiel cancérogène d'une substance

Types d'études		Référence OCDE	Références réglementaires
<i>In vivo</i>	Etudes de cancérogénicité	451	Directive 67/548 (étude B32) Directive 91/414/CEE
	Etudes combinées toxicité chronique / cancérogénèse	453	Directive 67/548/CEE (B33) Directive 91/414/CEE
	Etudes de toxicité chronique	452	Directive 67/548/CEE (B30) Directive 91/414/CEE

Les lignes directrices de l'OCDE sont généralement recommandées par l'Union Européenne et les organismes internationaux concernés par l'évaluation de la qualité des études toxicologiques. Il est possible de les consulter directement sur le site internet de l'OCDE¹¹.

La directive européenne 67/548/CEE modifiée concernant le rapprochement des dispositions législatives réglementaires et administratives relatives à la classification, l'emballage et l'étiquetage des substances dangereuses, propose dans la partie B de l'annexe V, pour l'évaluation du potentiel cancérogène, de se référer à deux types d'études : études de cancérogénèse et études combinées toxicité chronique/cancérogénèse. Les études de toxicité chronique fournissent des informations complémentaires sur des modifications histopathologiques telles que des hyperplasies précoces observées au niveau du ou des tissus de l'organe tumoral.

La directive 91/414/CEE modifiée concernant la mise sur le marché des produits phytosanitaires propose en annexe II, partie A, les conditions à remplir pour inscrire une substance active à l'annexe I de la présente directive (« Substances actives dont l'incorporation dans les produits phytopharmaceutiques est autorisée »). Concernant les effets cancérogènes, la directive recommande une étude de toxicité chronique et une étude cancérogénèse par voie orale chez le rat et la souris. Il est possible de combiner l'étude de toxicité chronique et de cancérogénèse chez le rat.

3.2.1.1 Témoins historiques

Les données de témoins historiques correspondent à un recensement de données expérimentales (notamment les incidences tumorales), issues de lots d'animaux contrôles ou témoins, sur plusieurs études différentes, conduites sur plusieurs années. Elles proviennent de lots composés d'animaux de même âge, de même espèce et de même souche, maintenus dans des conditions similaires mais non exposés à une substance toxique.

Ces données peuvent s'avérer utiles pour l'interprétation de certaines études de cancérogénèse notamment dans l'évaluation des résultats (par exemple, faux positifs, morts des lots témoins, incidence tumorale anormalement élevée) ou dans le cas de tumeurs rares. Elles apportent des informations complémentaires aux données issues des lots témoins expérimentaux et permettent de valider les données des témoins actuels.

Les données historiques doivent être justifiées par des informations sur :

- l'identification de l'espèce et la souche, le nom du fournisseur et l'identification de la colonie spécifique si le fournisseur est implanté sur plusieurs sites géographiques,

¹¹ Lignes directrices de l'OCDE pour les essais pour les produits chimiques, Section 4 « Effets sur la santé » : <http://lysander.sourceoecd.org/vl=8471257/cl=15/nw=1/lg=fre/rpsv/home.htm>

- le nom du laboratoire et les dates de conduites des études,
- la description des conditions générales dans lesquelles les animaux ont été maintenus, y compris le type ou la marque de la ration alimentaire et, si possible, les quantités consommées,
- l'âge approximatif, exprimé en jours, des animaux témoins au début de l'étude et à la date de sacrifice ou de la mort,
- la description du schéma de mortalité du groupe historique constaté pendant ou la fin de l'étude et d'autres observations pertinentes (par exemple, maladies, infections),
- le nom du laboratoire et des experts scientifiques chargés de la réalisation de l'étude, de la collecte et de l'interprétation des données,
- la description de la nature des tumeurs qui peuvent avoir été combinées pour produire une augmentation d'incidence.

L'OCDE propose de nombreuses références permettant d'accéder aux données historiques chez l'animal de laboratoire (OCDE, 2002).

Le NTP propose sur son site internet les données historiques d'études de cancérogénèse, pour les animaux de laboratoire dont les animaux génétiquement modifiés en fonction de la voie d'exposition et du type de régime alimentaire utilisé¹².

Il est important de noter que les données historiques d'incidence tumorale spontanée évoluent avec le temps (Tennekes *et al.*, 2004a, 2004b).

3.2.1.2 Cumul des incidences tumorales

Selon la localisation, les études peuvent mettre en évidence plusieurs types de tumeurs (bénignes et/ou malignes). Dans le cas où le mode d'action cancérogène met en évidence ou suspecte l'évolution possible d'une tumeur bénigne (lésion précurseur) à une tumeur maligne, au sein d'un même organe et pour une localisation tissulaire identique, il est alors possible de cumuler les incidences de ces tumeurs.

Le recours aux nomenclatures de classification tumorale peut s'avérer utile dans ce cas (cf. chapitre 2.1.4). Il est donc important de vérifier que les tumeurs soient caractérisées précisément d'un point de vue anatomopathologique.

3.2.2 Critères de qualité

3.2.2.1 Lignes directrices de l'OCDE

La conformité d'une étude aux lignes directrices proposées par l'OCDE permet de s'assurer de sa qualité et de sa reproductibilité. Cependant, ces lignes directrices n'exigent pas de conditions précises pour la détermination de la relation dose-effet ou dose-réponse.

Pour une aide à l'interprétation des études, l'OCDE fournit un document guide sur l'analyse et l'évaluation des études de cancérogénèse et de toxicité chronique (OCDE, 2002).

¹² National Toxicology Program : <http://ntp-server.niehs.nih.gov/> (Study Results & Research Projects, Study Data searches)

3.2.2.2 Bonnes pratiques de laboratoire

Les bonnes pratiques de laboratoire (BPL) garantissent une qualité portant sur le mode d'organisation des études de sécurité non cliniques ayant trait à la santé et à l'environnement et sur les conditions dans lesquelles ces études sont planifiées, réalisées, contrôlées, enregistrées, archivées et diffusées. Elles ont pour objectif de promouvoir l'obtention de données d'essai de qualité et comparables entre elles afin de permettre l'acceptation mutuelle de ces données. Elles définissent notamment les principes à respecter concernant l'organisation des essais, les appareils et matériaux utilisés, les systèmes d'essai, les modes opératoires normalisés, le plan de l'étude et la rédaction du rapport d'évaluation.

Elles sont définies dans l'annexe I de la directive européenne 2004/10/CE concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives relatives à l'application des principes de bonnes pratiques de laboratoire et au contrôle de leur application pour les essais sur les substances chimiques.

L'OCDE a également mis à jour des principes de BPL en 1998, issus d'une synthèse des méthodes de gestion, des pratiques scientifiques et de l'expérience de divers organismes internationaux et nationaux (OCDE, 1998).

D'un point de vue réglementaire, les essais d'évaluation des matières actives des pesticides, des substances dangereuses, des cosmétiques, des additifs ainsi que des médicaments doivent être réalisés selon les principes des BPL.

3.2.2.3 Cotation de Klimisch

Dans de nombreux cas, les études toxicologiques publiées dans la littérature sont anciennes ou de qualité inégale ou ne respectant pas de protocole expérimental standardisé. Il convient alors d'évaluer la qualité de ces études à partir de critères spécifiques à la toxicologie expérimentale, peu différents des critères promus par les BPL et les méthodes standardisées.

L'évaluation de Klimisch publié en 1997 est une approche permettant d'évaluer la qualité des données toxicologiques expérimentales, y compris les études de cancérogenèse (Klimisch *et al.*, 1997). Elle est fondée sur une harmonisation des procédés d'évaluation de la qualité des études toxicologiques utilisés par différentes institutions (notamment l'ECB, l'IPCS, l'OCDE et le BUA¹³). Ce système repose sur une cotation des études expérimentales en tenant compte de la fiabilité des études (méthodes standardisées, BPL) et le détail de description de la publication (cf. tableau ci-dessous).

¹³ ECB : European Chemical Bureau. IPCS : International Programme on Chemical Safety. BUA : Beratergremium Für Umweltrelevante Altstoffe : www.gdch.be/

Tableau 4 : Critères pour la cotation de Klimisch

Cotation	Catégorie de validité
1	Valide sans restriction
-1a	– Etude BPL respectant les tests standardisés (OCDE, UE, US EPA, FDA*, etc.)
-1b	– Comparable à de tests standardisés (guidelines)
-1c	– Protocole en accord avec une méthode standardisée nationale (AFNOR*, etc.)
-1d	– Protocole en accord avec les méthodes standards scientifiquement acceptées et suffisamment détaillé
2	Valide avec restriction
-2a	– Etude standardisée sans documentation détaillée
-2b	– Etude standardisée avec restrictions acceptables
-2c	– Comparables à une étude standardisée nationale, avec restrictions acceptables
-2b	– Protocole en accord avec les méthodes standardisées nationales, avec restrictions acceptables
-2e	– Etude bien documentée et en accord avec les principes scientifiques, acceptables pour l'évaluation
-2f	– Méthode de calcul acceptée
-2g	– Données provenant d'ouvrages de références et de collecte de données
3	Non valide
-3a	– Document insuffisant pour l'évaluation
-3b	– Déficiences méthodologiques significatives
-3c	– Protocole inconcevable
4	Non évaluable
-4a	– Résumé
-4b	– Littérature secondaire
-4c	– Référence originale non disponible
-4d	– Référence originale dans un autre langage (difficulté de traduction)
-4e	– Documentation insuffisante pour l'évaluation

*UE : Union européenne. US EPA : United States Environmental protection agency. FDA : Food and drug administration. AFNOR : Agence française de normalisation.

Les études considérés comme valides (cotation 1 et 2) décrivent avec précision la méthodologie et les résultats observés, la nature de l'effet toxique, le nombre et le pourcentage d'animaux concernés par les effets observés ainsi que les conditions de l'exposition (durée – concentration). Les études considérées comme non valides ou non évaluables peuvent néanmoins être considérées comme sources d'informations complémentaires.

La cotation relève finalement du jugement d'expert ; en effet, une étude peut être à la frontière de deux critères de validité et jugée finalement plus ou moins pertinente au regard des autres données disponibles.

Cependant, les critères de cotation de Klimisch ne prennent pas en compte la détermination de la relation dose-effet ou dose- réponse dans les études toxicologiques analysées.

L'ECVAM¹⁴ a développé récemment un outil d'aide à la cotation de Klimisch, qui permet de coter de façon systématique les études *in vivo* et *in vitro*. Le ToxRTool (Toxicological data reliability assessment tool) permet également de proposer une cotation de Klimisch selon le jugement d'experts.

3.3 Tests de génotoxicité

Les tests de mutagenicité et génotoxicité *in vitro* et *in vivo* fournissent des éléments importants à prendre en compte dans la description globale du mode d'action cancérogène d'une substance. Les résultats de ces tests et leur évaluation constituent une étape décisive dans le choix de la méthode de construction de la VTR cancérogène (à seuil ou sans seuil de dose).

3.3.1 Description

L'évaluation du potentiel génotoxique d'une substance nécessite de disposer de données sur les différents types d'altérations de l'intégrité du patrimoine génétique (potentiel mutagène), les aberrations chromosomiques (potentiel clastogène) ou modifications du nombre de chromosomes (potentiel aneugène). La mise en évidence d'un tel éventail de lésions (ou altérations) potentielles repose aujourd'hui sur des batteries de tests menés *in vitro* et *in vivo* :

- o Tests de mutations géniques sur procaryotes telles que *Salmonella typhimurium* (test d'Ames) ou sur cellules de mammifères telles que les lignées de lymphomes de souris (mousse lymphoma TK assay) ;
- o Test d'aberrations chromosomiques et de numération des micronoyaux (chromosomes entiers ou fragmentés non incorporés dans le noyau pendant la mitose). Les modes d'apparition des micronoyaux peuvent être regroupés en effet clastogène (production de fragments acentriques) d'une part et effet aneugène d'autre part (perte de chromosomes). Les substances peuvent être testées *in vitro* sur des cellules de mammifère (lymphocytes circulants en métaphase, lignée CHO¹⁵) ou *in vivo* (érythrocytes de moelle osseuse, lymphocytes circulants) ;
- o Tests d'altérations de l'ADN (adduits) ;
- o Mise en évidence de la synthèse non programmée de l'ADN (UDS¹⁶, qui mesure la capacité de réparation de l'ADN après action d'une substance toxique) ;
- o Numérotation des échanges de chromatides sœurs (test SCE¹⁷ réalisé sur des lymphocytes de mammifères en métaphase).

¹⁴ ECVAM : European centre for the validation of alternative methods.
http://ecvam.jrc.it/page_pdf.cfm?voce=s&idvoce=110

¹⁵ CHO : cellules ovariennes de hamster chinois

¹⁶ Unscheduled DNA synthesis

¹⁷ Sister chromatide exchange

Parmi les tests faisant l'objet d'une augmentation significative du nombre de publications, figure le test des comètes, applicable à tout type cellulaire et qui permet, suivant les conditions expérimentales, d'évaluer les cassures simple et/ou double brin de l'ADN pouvant être dues à la réparation de ces lésions (Kumaravel, 2006 ; Mutation Research, 2009).

Le Tableau 5 reprend la liste des tests de génotoxicité, classés selon l'ordre proposé dans l'annexe V de la directive 67/548/CEE modifiée.

Tableau 5 : Tests pour l'évaluation du potentiel génotoxique d'une substance

Types d'effets		Intitulé du test	Référence OCDE	Références réglementaires
Mutations géniques	<i>In vitro</i>	Test de mutation génique inverse sur procaryotes (<i>Salmonella typhimurium</i> ou <i>Escherichia coli</i>)	471	Directive 67/548/CEE (test B13/14) Directive 91/414/CEE (test B13 <i>E.coli</i> - B14 <i>S.typhimurium</i>) ICH S2B 1997 TGD 2003
		Test de mutation génique sur cellules de mammifères (mouse lymphoma TK +/-)	476	Directive 67/548/CEE (test B17) Directive 91/414/CEE ICH S2B 1997 TGD 2003 (si résultats positifs sur bactéries)
		Test de mutation génique sur <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	480	Directive 67/548/CEE (test B15)
		Test de recombinaison mitotique sur <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	481	Directive 67/548/CEE (test B16)
	<i>In vivo</i>	Test de mutation létale récessive liée au sexe sur <i>Drosophila melanogaster</i>	477	Directive 67/548/CEE (test B20)
		Spot test chez la souris	484	Directive 67/548/CEE (classification M3-test B24) Directive 91/414/CEE
Mutations chromosomiques	<i>In vitro</i>	Test cytogénétique ou d'aberration chromosomique sur cellule de mammifères	473	Directive 67/548/CEE (classification M3-test B10) Directive 91/414/CEE (test B10) ICH S2B 1997
		Test du micronoyau sur culture cellulaire	Draft	

	<i>In vivo</i>	Test cytogénétique ou d'aberration chromosomique sur cellules de moelle osseuse de mammifères	475	Directive 67/548/CEE (classification M3-test B11) Directive 91/414/CEE (test B11) ICH S2B 1997 TGD 2003
		Test du micronoyau sur érythrocytes de mammifères	474	Directive 67/548/CEE (classification M3-test B12) Directive 91/414/CEE (test B12) ICH S2B 1997 (érythrocytes ou lymphocytes périphériques) TGD 2003
		Test de mutation dominante létale sur rongeurs	478	Directive 67/548/CEE (classification M2-test B22) Directive 91/414/CEE
		Test d'aberration chromosomique sur spermatogonies de mammifères	483	Directive 67/548/CEE (classification M2-test B23)
		Test de la translocation héréditaire chez la souris	485	Directive 67/548/CEE (test B25)
Altération primaire de l'ADN (lésions à l'ADN)	<i>In vitro</i>	SOS chromotest sur bactéries		
		Test de synthèse non programmée de l'ADN (UDS) sur cellules de mammifères	482	Directive 67/548/CEE (classification M2-test B18) TGD 2003
		Test d'échange de chromatides sœurs sur cellules de mammifères (SCE)	479	Directive 67/548/CEE (test B19)
		Test des comètes (cassure des brins d'ADN) sur culture cellulaire		
		Mesure des adduits de l'ADN		
	<i>In vivo</i>	Test de synthèse non programmée de l'ADN (UDS) sur hépatocytes de mammifères	486	Directive 67/548/CEE (classification M2-test B39) Directive 91/414/CEE
		Chez le rongeur : mesure des adduits de l'ADN		Directive 67/548/CEE (classification M3)

Autres méthodes	<i>In vitro</i>	Test de transformation de cellules de mammifères		Directive 67/548/CEE (test B21)
------------------------	-----------------	--	--	---------------------------------

Afin de détecter le potentiel génotoxique d'une substance *via* les métabolites formés, les tests de génotoxicité *in vitro* sont menés avec et sans activateur métabolique (c'est toujours le cas pour le test d'Ames). L'activation métabolique est généralement simulée par un extrait hépatique de rongeur préalablement traité par un inducteur enzymatique, l'arochlor (fraction S9) et additionné de co-facteurs (mélange final métabolisant S9 MIX).

D'après la directive 92/69/CEE résumant les essais de génotoxicité recommandés par la directive 91/414/CEE modifiée et d'après les guidelines de l'OCDE sur les tests de génotoxicité, la plus forte dose utilisée dans les tests *in vivo* est la Dose maximale tolérée (DMT)¹⁸ ou à défaut, la dose limite de 2000 mg.kg⁻¹.j⁻¹ pour une administration unique ou de 1000 mg.kg⁻¹.j⁻¹ dans le cas d'administrations répétées sur plus de 14 jours. Pour les tests *in vivo*, il est important de prouver que la substance ait atteint l'organe/tissu cible (exposition suffisante, mesure de biomarqueurs d'exposition).

D'après la directive 67/548/CEE modifiée, la classification du potentiel mutagène des substances repose sur le caractère héréditaire des mutations sur cellules germinales : catégorie 1 (effet héréditaire avéré chez l'homme) et 2 (effet héréditaire probable chez l'homme). La catégorie 3 définit des effets mutagènes avérés sur cellules somatiques (effet héréditaire possible chez l'homme).

Dans le domaine du médicament, les conférences internationales d'harmonisation (ICH) proposent de disposer d'une batterie de trois types de tests dont deux tests *in vitro* (mutations géniques sur bactéries et mutations géniques ou clastogénicité sur cellules de mammifères) et un test *in vivo*.

Le TGD propose une batterie de tests pour les substances chimiques nouvelles et existantes et les produits biocides. Dans un premier temps, les tests de mutations géniques (sur bactéries puis sur cellules de mammifères si les résultats sont positifs sur bactéries) sont complétés par des tests cytogénétiques sur cellules de mammifères. Des tests complémentaires sont conduits en fonction des résultats obtenus, la nécessité de conduire des essais *in vivo* devant être solidement justifiée (diminution du recours aux études expérimentales dans l'objectif de réduction, raffinement et remplacement des études animales).

3.3.2 Critères de qualité

L'évaluation de la qualité de conduite des essais de génotoxicité peut faire appel à la cotation de Klimisch, valable pour les études toxicologiques mais également pour les essais de génotoxicité *in vivo* et *in vitro* (cf. chapitre 3.2.2.3).

3.3.3 Interprétation des résultats

Pour apprécier le potentiel génotoxique, il est indispensable de disposer d'un nombre minimal de tests *in vitro* et *in vivo*, dans la mesure du possible (Tableau 6) :

- o Mutations géniques : il est recommandé d'évaluer les résultats des tests *in vitro* menés sur procaryotes et eucaryotes. Ces tests bénéficient d'une validation et d'une base scientifique satisfaisante ;

¹⁸ La Dose Maximale Tolérée ou DMT correspond à la dose maximale de substance administrée chez l'animal provoquant des manifestations toxiques sans conséquence néfaste sur la survie de l'animal.

- o Mutations chromosomiques : les tests préconisés pour évaluer ce type d'effet doivent être conduits *in vitro* et *in vivo* ;
- o Altérations primaires de l'ADN : les tests proposés fournissent des informations complémentaires et permettent potentiellement de corroborer les résultats obtenus précédemment. Certains de ces tests permettent de révéler des effets génotoxiques non détectés par les deux premières séries comme par exemple le test SCE qui détecte la formation d'adduits ADN-protéines ou le test UDS (synthèse non programmée d'ADN).

Tableau 6 : Préconisation de tests pour les trois types effets génotoxiques

Types d'effet	Intitulé	Référence OCDE	Référence Réglementaires
Mutations géniques	Test de mutation génique sur procaryotes <i>in vitro</i> : <i>Salmonella typhimurium</i> (TA98, TA 100, TA 1535 et TA 1537), <i>Escherichia coli</i> (WP2 et WP2uvrA) avec et sans activation métabolique	471	Directive 67/548/CEE Directive 91/414/CEE ICH S2B 1997 TGD 2003
	Test de mutation génique sur cellules de mammifères (<i>in vitro</i>)	476	Directive 67/548/CEE Directive 91/414/CEE ICH S2B 1997 TGD 2003
Mutations chromosomiques	Test cytogénétique ou d'aberration chromosomique sur cellules de mammifères (<i>in vitro</i>)	473	Directive 67/548/CEE Directive 91/414/CEE ICH S2B 1997 TGD 2003
	Test cytogénétique ou d'aberration chromosomique sur cellules de moelle osseuse de mammifères (<i>in vivo</i>)	475	Directive 67/548/CEE Directive 91/414/CEE ICH S2B 1997
	Test du micronoyau sur érythrocytes de mammifères (<i>in vivo</i>) ou sur cellules de moelle osseuse (<i>in vivo</i>)	474-475	Directive 67/548/CEE Directive 91/414/CEE ICH S2B 1997
Altération primaire de l'ADN (lésions à l'ADN)	Test de synthèse non programmée de l'ADN (UDS) sur hépatocytes de mammifères	486	Directive 67/548/CEE Directive 91/414/CEE
	Spot test	484	Directive 67/548/CEE Directive 91/414/CEE
	Test des comètes		
	Test d'échange des chromatides sœurs (SCE) sur cellules de mammifères (<i>in vitro</i>)	479	Directive 67/548/CEE

L'évaluation du potentiel génotoxique d'une substance devra être réalisée à la lumière de l'ensemble des résultats fournis par ces tests. Si d'autres types d'essais de génotoxicité existent également pour la substance étudiée, l'évaluation pourra être réalisée sur l'ensemble des données disponibles. **Si les résultats obtenus sont contradictoires ou si les tests disponibles sont de qualité discutable et ne permettent pas de conclure de façon certaine, il est préconisé de considérer la substance étudiée comme génotoxique par principe de précaution.**

Dans le cas d'une substance pour laquelle un grand nombre d'essais de génotoxicité est disponible, il sera possible de se référer dans un premier temps aux conclusions issues de monographies ou de synthèses publiées par des organismes internationaux reconnus (par exemple, l'US EPA ou le Circ). **Si les conclusions sont concordantes en faveur de l'existence d'un potentiel génotoxique, la consultation des études sources pour chacun des tests de génotoxicité n'est pas jugée nécessaire. Si les conclusions sont discordantes ou convergent vers l'absence d'un potentiel génotoxique, il est alors fortement recommandé de remonter aux articles sources pour les types de tests mentionnés au Tableau 6.**

Une aide à la lecture des tests de génotoxicité est fournie dans le présent document (Annexe 4).

3.4 Etudes toxicologiques à doses répétées

Les études toxicologiques à doses répétées peuvent être exploitées en support aux études épidémiologiques, aux études de cancérogenèse conduites chez l'animal et aux tests de génotoxicité. Elles renseignent sur les effets observés après administration répétée d'une substance sur une durée d'administration courte (en général, 28 à 90 jours). Elles fournissent des informations sur la relation dose-effet, les organes cibles, les effets toxiques observés (par exemple la mise en évidence d'hyperplasies ou de phénomènes inflammatoires précoces), la persistance et la réversibilité de certains effets toxiques (Cohen, 2009). Elles permettent notamment de déterminer la DMT.

Les études à doses répétées sont également régies par des documents guides permettant de s'assurer de la qualité des expérimentations (notamment les guidelines OCDE). Il conviendra de s'assurer de cette conformité en vue de retenir les études de meilleure qualité. Il est à noter que, comme pour les études de cancérogenèse, les documents guides de l'OCDE ne prennent pas en compte la possibilité de décrire les relations dose-effet et/ou dose-réponse.

Tableau 7 : Etudes toxicologiques à doses répétées

Types d'études <i>in vivo</i>		Référence OCDE	Référence réglementaires
Voie orale	Etude de 28 jours à doses répétées par voie orale chez le rongeur	407	Directive 67/548/CEE Directive 91/414/CEE
	Etude de 90 jours à doses répétées par voie orale chez le rongeur	408	Directive 67/548/CEE Directive 91/414/CEE
	Etude de 90 jours à doses répétées par voie orale chez le non-rongeur	409	Directive 67/548/CEE Directive 91/414/CEE
Voie dermique	Etude de 28 jours à doses répétées par voie dermique	-	Directive 67/548/CEE Directive 91/414/CEE
	Etude de 90 jours subchronique par voie dermique	411	Directive 67/548/CEE Directive 91/414/CEE
Voie respiratoire	Etude de 28 ou 14 jours à doses répétées par voie respiratoire	412	Directive 67/548/CEE Directive 91/414/CEE
	Etude de 90 jours subchronique par voie respiratoire	413	Directive 67/548/CEE Directive 91/414/CEE

Ces études ne suffisent pas en elles-mêmes à évaluer le potentiel cancérogène d'une substance mais sont complémentaires car elles peuvent apporter des éléments sur la survenue d'effets précurseurs du cancer.

3.5 Etudes de toxicocinétique

Les études de toxicocinétique apportent des informations sur le devenir des substances dans l'organisme (profil ADME¹⁹), préalable nécessaire chez l'animal à la réalisation et l'interprétation des études de toxicité proprement dites. Afin que les informations fournies par ces études soient les plus pertinentes possibles, il est nécessaire de disposer d'études spécifiques à la voie d'administration considérée (voie orale par exemple et voie intraveineuse dans la mesure du possible pour disposer des données de biodisponibilité absolue).

3.5.1 Chez l'animal

Les études toxicocinétiques chez l'animal sont réalisées soit en tant qu'études spécifiques, soit sur des lots d'animaux appelés « groupes satellites » lors des études de toxicité de doses répétées. Le protocole d'études de toxicocinétique peut suivre des recommandations réglementaires ou les guidelines de l'OCDE.

Tableau 8 : Etudes de toxicocinétique

Intitulé du test	Référence OCDE	Références réglementaires
Toxicocinétique (études des phases ADME)	417	Directive 67/548/CEE Directive 91/414/CEE (97/302/CEE)

L'analyse d'études toxicocinétiques conduites chez des espèces animales différentes et chez les deux sexes permet de comparer les paramètres et d'identifier des particularités d'espèce ou de sexe. Certaines études peuvent également être conduites chez des animaux juvéniles ou chez des femelles gestantes.

Lorsque de telles particularités sont documentées, il est possible de moduler les valeurs des facteurs d'incertitude inter-espèces dans le cas d'une VTR cancérogène à seuil. En l'absence de comparaison possible et par principe de précaution, le profil toxicocinétique d'une substance cancérogène sera considéré identique chez l'animal et chez l'homme.

3.5.2 Chez l'homme

Les données de toxicocinétiques humaine sont issues d'études menées chez des volontaires sains ou chez des travailleurs. Les dosages des substances et/ou des métabolites dans les urines, le plasma ou les fèces peuvent être utilisés pour identifier les voies métaboliques majeures.

Ce type d'étude a l'avantage de fournir des résultats directement observés chez l'homme qui, comparés aux données animales, permettent de confirmer ou non les hypothèses de transposition inter-espèces.

L'inconvénient majeur repose sur les limites de ces études, en particulier en matière de mesure des expositions. En outre, il est difficile de corréliser les niveaux d'élimination des métabolites aux niveaux d'exposition, en raison notamment des polymorphismes génétiques qui affectent les

¹⁹ Profils pharmaco-toxicocinétiques d'absorption, distribution, métabolisation, élimination

gènes codant pour les systèmes enzymatiques intervenant dans les bioactivations métaboliques (mono-oxygénases à CYP 450, glutathion S-transférases et N-acétyl-transférases par exemple).

3.5.3 Modèles PBPK

Les modèles toxicocinétiques physiologiques appelés PBPK (*Physiologically-Based Pharmacokinetic*) apportent également des informations complémentaires au corpus d'études mentionnées précédemment. L'organisme y est modélisé comme un ensemble de compartiments reliés entre eux, représentant les échanges entre les différents organes. Le transport des substances peut être modélisé par un système d'équations différentielles liant principalement la quantité ou la concentration de la substance dans les différents organes, le flux sanguin, le volume des organes, les coefficients de partage ou encore le taux de ventilation. La représentation des organes dépend de la substance étudiée et des organes cibles ou jouant un rôle dans le métabolisme ou le stockage de la substance.

Les modèles PBPK permettent de répondre à des problèmes d'extrapolation (inter-doses, inter-espèces, inter-individuelle) et de prendre en compte les spécificités liées à des organes précis. Ils permettent également de simuler la relation temps-concentration et de déterminer les concentrations dans l'organe cible.

Les inconvénients majeurs reposent sur le faible nombre de modèles développés à l'heure actuelle et, lorsqu'un modèle est disponible, sur la difficulté à y accéder.

3.6 Propriétés physicochimiques

Les propriétés physico-chimiques d'une substance peuvent contribuer à prédire son comportement dans l'organisme ou influencer les paramètres toxicocinétiques d'absorption. Ainsi, il est important de connaître ces propriétés et de vérifier leur conformité dans les études toxicologiques et les tests étudiés.

3.7 Relations (quantitatives) structure-activité

Les données de (Q)SAR (*quantitative structure-activity-relationship*) apportent des informations sur le potentiel cancérogène et/ou génotoxique d'une substance lorsque celle-ci est structurellement proche d'une substance cancérogène et/ou génotoxique de référence, par association statistique (classe chimique, structure d'alerte...).

Cependant cette approche ne peut être appliquée systématiquement pour toutes les substances. De plus, elle ne tient pas compte de la possibilité de formation de métabolites génotoxiques ou cancérogènes de structure chimique différente de la substance étudiée.

3.8 Effets de synergie

Des interactions entre plusieurs produits chimiques cancérogènes peuvent être à l'origine d'effets de combinaison et de synergies. De telles interactions peuvent exister dans les cas suivants :

- co-activation métabolique par des inducteurs d'enzymes,
- inhibition d'enzymes du métabolisme,
- diminution de la réaction immunitaire,
- inhibition des enzymes intervenant dans la réparation de l'ADN,
- réactions inflammations et cytotoxicité,

- fréquences rapides de division cellulaire (enfance),
- contexte alimentaire particulier (carence en aliments antioxydants, exposition à des xénobiotiques etc.)

3.8.1 Mécanismes principaux

o Co-activation métabolique

Dans les étapes de cancérogénèse, la métabolisation par biotransformation enzymatique est fondamentale (au niveau hépatique, rénal, pulmonaire, cutané). Des xénobiotiques non cancérogènes agissant comme inducteurs enzymatiques peuvent renforcer le potentiel cancérogène d'un composé. Ce type de synergie est appelée co-activation métabolique.

Un co-activateur bien connu est l'éthanol. Le renforcement de la métabolisation par l'alcool éthylique de certains produits cancérogènes comme par exemple le N-nitrosodiméthylamine et le N-nitrosomorpholine a été déjà prouvé au début des années 1980 (Schwarz et *al.*, 1983 ; Eisenbrand et *al.*, 1986 ; Garro et *al.*, 1981).

o Inhibition enzymatique

Contrairement à la co-activation métabolique, une exposition à un co-contaminant peut résulter en une inhibition partielle ou complète des effets cancérogènes du fait du blocage de la métabolisation. De tels inhibiteurs sont classables selon leur mécanisme d'action comme par exemple :

- les inhibiteurs compétitifs qui forment un complexe « enzyme-inhibiteur »,
- les inhibiteurs non compétitifs qui forment des liaisons avec d'autres régions que le site actif de l'enzyme,

Une inhibition est irréversible si l'enzyme est structurellement modifiée par une liaison covalente par l'inhibiteur ou un de ses métabolites.

o Interaction par liaison chimique

Deux substances ou plus peuvent réagir entre elles et former une nouvelle molécule. Si cette nouvelle substance est plus réactive que les produits initiaux, un effet de synergie peut être observé (Pool, 1986).

Un exemple est l'exposition simultanée aux amines et aux nitrites qui conduit à la formation de nitrosamines dans l'appareil digestif (Shepard et *al.*, 1987), dont certaines formes peuvent avoir un potentiel cancérogène.

o Synergies entre des produits chimiques et des radiations

Un rapport de l'UNSCEAR²⁰ a mis en évidence les interactions entre certaines radiations et des produits cancérogènes (UNSCEAR, 1982).

Par exemple, le renforcement des effets cancérogènes de l'arsenic par contact cutané simultané à l'exposition aux UV a été démontré.

3.8.2 Quantification des effets de synergie cancérogène

Plusieurs approches ont été décrites concernant la quantification des effets de synergie de substances cancérogènes (Künstler & Klein, 1986 ; Hunkelbach & Wolf, 1985 ; UNSCEAR, 1982).

²⁰ UNSCEAR : United Nations scientific committee on the effects of atomic radiations

Hunkelbach & Wolf en 1985 ont proposé les définitions suivantes concernant les effets de combinaison :

- effet synergique : une deuxième ou ($n^{\text{ième}}$) substance à une dose « d_2 » (ou « d_n ») provoque un effet « E » supérieur à celui d'une première substance seule à une dose « d_1 » ;
- effet indifférent : aucune différence n'existe entre les effets « E » d'une dose d'une première substance « d_1 » et d'une dose « $d_1 + d_2$ » (ou « $d_1 + d_n$ ») ;
- effet antagoniste : l'effet « E » d'une dose « d_1 » est supérieur à celui d'une dose combinée « $d_1 + d_2$ » (ou « $d_1 + d_n$ »).

Des définitions complémentaires ont été données par le comité scientifique des Nations Unies (UNSCEAR, 1982). Si quatre groupes d'une population sont exposés à deux produits cancérogènes « a » et « b », les effets biologiques (par exemple l'incidence des tumeurs) peuvent être représentés comme suit :

$$\text{Effets (n) dans un contexte de synergie} = n_{ab} > n_a + n_b - n_o$$

Les effets d'un groupe exposé à « a » (n_a) additionnés à ceux d'un groupe exposé à « b » (n_b) diminués des effets d'un groupe de population témoin (n_o) devraient être inférieurs aux effets d'une population exposée simultanément à « a+b » (n_{a+b}).

$$\text{Effets (n) dans un contexte d'antagonisme} = n_{ab} < n_a + n_b - n_o$$

Les effets de l'exposition combinée sont inférieurs aux effets de chaque substance pris individuellement.

3.9 Omics

Grâce à la conjonction de plusieurs avancées technologiques, il est à présent possible d'étudier de manière quasi-exhaustive les régulations transcriptionnelles, traductionnelles et éventuellement post-transcriptionnelles en réponse aux toxiques chez plusieurs espèces animales, et chez l'homme (génomique, transcriptomique, protéomique, métabolomique). Ces nouvelles technologies appelées « omics » sont en particulier applicables pour :

- définir des empreintes spécifiques de familles de polluants chimiques, pouvant servir de bioindicateurs d'exposition ;
- évaluer la variabilité de réponse inter-espèces et entre les tissus cibles ;
- analyser la susceptibilité interindividuelle de réaction aux toxiques.

Ces nouvelles technologies pourraient permettre d'étudier les effets, leur réversibilité, leur pertinence en toxicologie et estimer les incidences de mélanges de contaminants chimiques (Bhagal *et al.*, 2005 ; Ellinger-Ziegelbauer *et al.*, 2009 ; McHale *et al.*, 2010 ; Van Landingham *et al.*, 2001 ; Zhou *et al.*, 2009).

L'utilisation de ces nouvelles méthodologies est très prometteuse mais reste encore limitée du fait de leur sophistication, de leur coût et de surtout de l'absence de validation dans le domaine de la santé environnementale.

4 Hypothèses de validité et de construction d'une VTR cancérogène chez l'homme

La première étape de collecte des données ayant permis de caractériser le potentiel cancérogène et génotoxique d'une substance chez l'animal et/ou chez l'homme, il est alors important de pouvoir décrire précisément, si les données le permettent, le mode d'action cancérogène de la substance et s'interroger sur sa pertinence chez l'homme.

Dans la situation la plus favorable, les données observées chez l'homme suffisent à identifier un mode d'action cancérogène. Mais en pratique, les données proviennent le plus souvent d'études menées chez l'animal. Dans ce cas, la discussion sur la pertinence de transposer le mode d'action postulé chez l'animal à l'homme prend tout son sens, afin notamment de valider la possibilité ou non d'utiliser tout ou une partie des données animales dans un contexte d'exposition humaine. Cette démarche d'évaluation de la transposition du mode d'action cancérogène de l'animal à l'homme a été décrite par de nombreux organismes reconnus tel que l'US EPA et IPCS (IPCS, 1999 ; US EPA, 2005a).

La démarche consiste donc à poser les hypothèses de validité du mode d'action, de sa transposition chez l'homme et de la possibilité *in fine* de construire une VTR cancérogène.

Intervient dans un dernier temps le choix des hypothèses de construction de la VTR : mode de construction de la VTR (à seuil ou sans seuil), choix de l'effet critique et de l'étude clé.

4.1 Mode d'action : description et validité chez l'homme

Pour des raisons physiologiques ou biochimiques, l'homme peut présenter une sensibilité différente de celle de l'animal (métabolisme différent, populations sensibles...). Il est alors indispensable de disposer d'une méthodologie permettant d'évaluer la plausibilité du mode d'action décrit à partir de données animales et d'évaluer la transposition à une situation d'exposition humaine.

L'IPCS²¹ a proposé dès 1999 une approche proposant l'évaluation du mode d'action cancérogène comme une étape majeure dans l'évaluation du potentiel cancérogène d'une substance (IPCS, 1999 ; Sonich-Mullin, 2001). Plusieurs étapes sont décrites dans ce processus.

4.1.1 Plausibilité du mode d'action chez l'animal

La première étape de ce travail consiste à établir la plausibilité du mode d'action cancérogène et des événements-clés (c'est-à-dire les événements critiques mesurables se produisant au cours du développement du cancer) chez l'animal. Une série de critères, proposée par l'IPCS, permet d'évaluer la plausibilité/vraisemblance du mode d'action postulé chez l'animal, préalable indispensable dans la démarche à suivre pour juger de sa transposition chez l'homme. Ces critères sont repris dans l'encadré ci-dessous.

²¹ International Programme on Chemical Safety

La plausibilité du mode d'action peut-elle être établie chez l'animal ?

- ⇒ Mode d'action postulé : brève description de l'enchaînement des effets observés, de l'administration de la substance chimique à la cancérogénicité, pour un site tissulaire donné ;
- ⇒ Identification des événements-clés : description claire de chaque événement-clé (paramètre mesurable) supposé décrire le mode d'action ;
- ⇒ Relation temporelle : enchaînement dans le temps des événements-clés et de la réponse tumorale. Cette relation permet d'identifier les événements-clés précurseurs et de confirmer ou non le mode d'action initialement postulé ;
- ⇒ Force, cohérence et spécificité de l'association entre les événements-clés et la réponse tumorale : présentation et évaluation complète de l'association entre les événements-clés, les événements/lésions précurseurs et les tumeurs. Utilisation des études montrant l'absence ou la diminution d'apparition d'une tumeur lorsqu'un événement-clé est bloqué ou inhibé (dans la mesure du possible) ;
- ⇒ Relation dose-réponse : identification voire quantification des relations dose-réponse pour chaque événement-clé, comparaison du profil des relations avec celui de la relation dose-réponse tumorale ;
- ⇒ Plausibilité biologique et cohérence : adéquation entre les événements-clés, leur enchaînement et les connaissances actuelles sur la cancérogénèse (plausibilité biologique) sur la substance chimique étudiée et sur une substance chimique analogue (cohérence) ;
- ⇒ Autres modes d'action : si des modes d'action alternatifs peuvent être proposés pour la substance considérée, comparer leur vraisemblance avec celle du mode postulé ;
- ⇒ Conclusion sur le mode d'action : indication globale du niveau de confiance dans le mode d'action postulé ;
- ⇒ Incertitudes, incohérences et données manquantes : identification et discussion sur ces points, événements-clés ou étapes non étudiées, proposition de recherches susceptibles de fournir des réponses aux questions posées dans ce contexte.

Dans le cas où le mode d'action ne peut pas être décrit chez l'animal, l'effet cancérogène observé sera transposé dans sa globalité à l'homme. En effet, la mise en évidence de tumeurs chez l'animal constitue un indicateur du potentiel cancérogène d'une substance qu'il convient donc de prendre en compte, malgré l'impossibilité de décrire un mode d'action. Ce choix sera revu à la lumière des données scientifiques récentes, pouvant confirmer ou non la plausibilité de transposer les tumeurs observées de l'animal à l'homme.

4.1.2 Plausibilité chez l'homme

Pour chaque événement-clé identifié chez l'animal, une discussion doit porter sur l'existence d'information comparables chez l'homme afin d'apporter une réponse qualitative. Certaines informations sont utiles à intégrer à cette réflexion parmi lesquelles :

- o L'incidence des cancers pour le site anatomique d'intérêt, en considérant l'âge, les différents ethniques, les facteurs de risque (agents chimiques et environnementaux) ;

- o Les connaissances sur la nature et la fonction du site anatomique d'intérêt tel que son développement, sa structure (anatomique et histologique) et ses mécanismes de contrôle physiologique, cellulaire et biochimique ;
- o L'existence de maladies humaines et animales donnant des indices sur la régulation de l'organe cible ;
- o Les réponses de l'homme et de l'animal suite à l'administration de la substance chimique étudiée ou d'une substance analogue pour des expositions courtes, intermédiaires et longues, en considérant les effets sur les organes cibles ;
- o La connaissance d'un mode d'action spécifique à une espèce animale en raison par exemple d'un système enzymatique particulier, d'une spécificité histologique.

Plus le nombre et le degré de concordances animal-homme entre tous ces facteurs et événements-clés sont élevés, plus la transposition du mode d'action de l'animal à l'homme sera pertinente.

Si le mode d'action postulé chez l'animal est considéré, d'un point de vue qualitatif, transposable à l'homme, il convient ensuite de prendre en compte les facteurs toxicocinétique et toxicodynamique de manière à confirmer la pertinence d'une transposition. En effet, des différences significatives pour ces paramètres peuvent modifier la sensibilité de l'homme à une substance par rapport à l'animal. La réflexion à ce stade devient alors quantitative.

D'une manière générale, il existe une présomption de probabilité de transposition, qui ne peut être remise en cause que si les données sont suffisamment étayées. A titre d'exemple, le tableau ci-dessous, inspiré du rapport de l'OCDE (2002), présente les types de tumeurs pour lesquelles le mode d'action et les événements-clés identifiés sont spécifiques à l'animal et ne peuvent généralement pas être transposables à l'homme.

Tableau 9 : Exemples de tumeurs dues à des modes d'action *a priori* spécifiques à l'animal

Organe cible / espèce animale	Mode d'action et événements clés
Rein / rat	Prolifération cellulaire prolongée par la promotion de cellules initiées chez le rat mâle (cytotoxicité liée à l'accumulation de gouttelettes hyalines contenant l'alpha-2-globuline)
Vessie / souris, rat	Hyperplasie régénérative liée à une altération de l'épithélium (formation de calculs dans les voies urinaires) Effets mitogènes observé chez les rats sans formation de calculs
Thyroïde / rat	Génotoxicité Perturbation de l'axe hypothalamo-hypophysaire : • Toxicité sur les follicules thyroïdiens • Activation du métabolisme hépatique et de l'excrétion biliaire des hormones thyroïdiennes • Inhibition des enzymes thyroïdiennes
Foie / souris, rat	Prolifération des peroxysomes par activation de certains PPAR (<i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i>) : • Cytotoxicité et nécrose suivies d'une hyperplasie régénérative • Effets mitogènes • Induction enzymatique
Testicules (cellules de Leydig) / souris, rat	• Action agoniste des œstrogènes, de la GnRH (<i>Gonadotropine releasing hormone</i>) • Action agoniste sur les récepteurs dopaminergiques • Antagonisme des récepteurs aux androgènes • Inhibition de la 5-alpha-réductase • Inhibition de la synthèse de la testostérone

4.1.3 Aide à la décision pour la transposition du mode d'action à l'homme

L'ensemble de la démarche peut être représenté par un arbre décisionnel, inspiré d'un schéma proposé par Meek *et al.* (2003) (Figure 1).

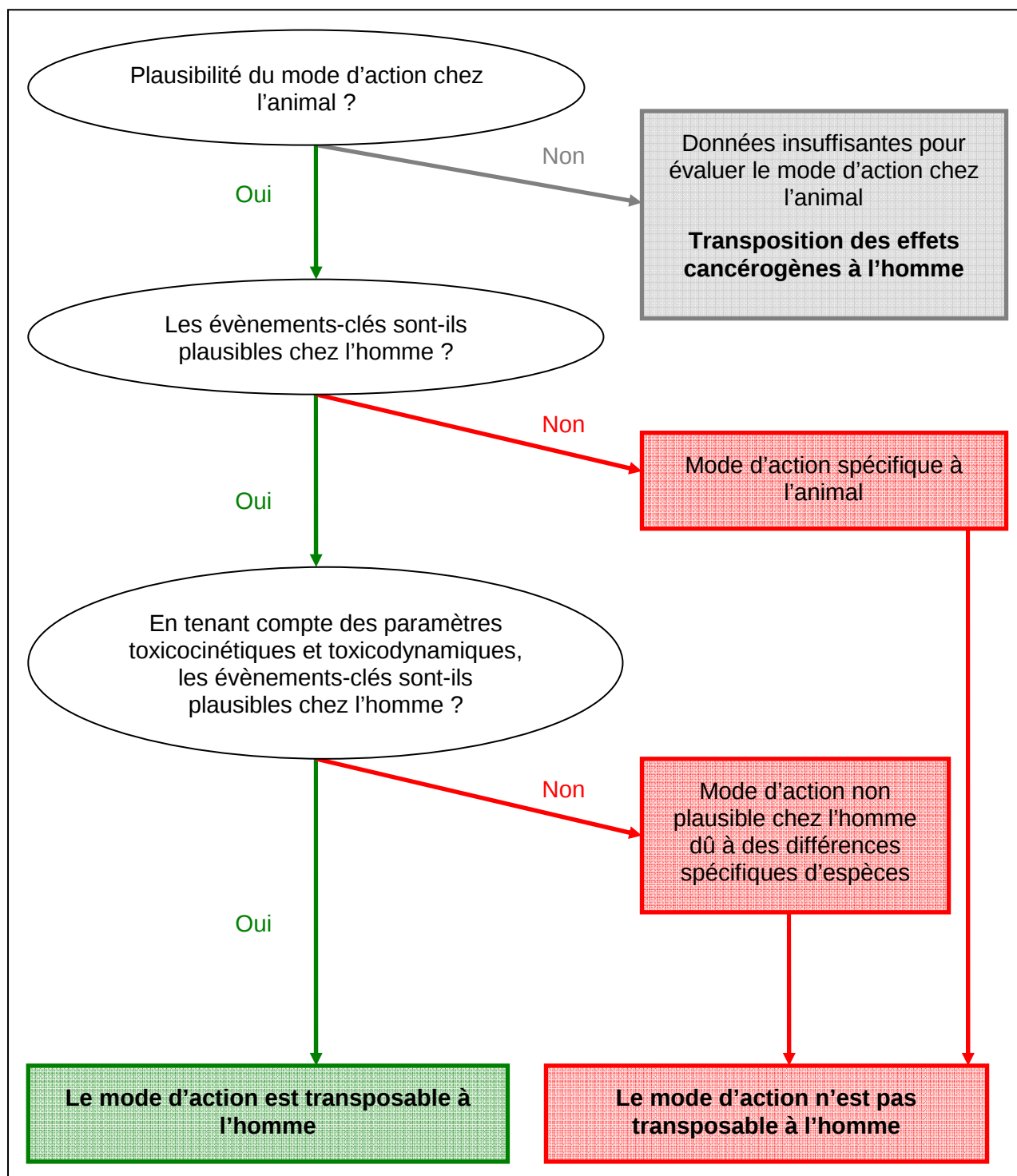


Figure 1 : Schéma d'aide à la décision sur la transposition du mode d'action de l'animal à l'homme

La transposition d'un mode d'action cancérogène de l'animal à l'homme est un exercice faisant appel à une diversité d'outils et de connaissances disponibles à un moment donné. Les hypothèses de validité et de transposition du mode d'action considéré peuvent donc évoluer en fonction des dernières données scientifiques publiées.

4.2 Hypothèse de construction de la VTR cancérogène

A la lumière des données disponibles et de la description du mode d'action cancérogène de la substance chimique étudiée, il est alors possible de formuler l'hypothèse de construction d'une VTR cancérogène.

Pour cela, il est proposé de suivre un schéma décisionnel reprenant chacune des étapes de la réflexion, permettant d'aboutir à l'hypothèse de construction des VTR cancérogènes. La Figure 2 est inspirée d'un schéma proposé par Bolt *et al.* (2004) et s'applique pour les substances dont l'effet cancérogène chez l'homme est suspecté voire prouvé.

Cinq catégories de substances peuvent être identifiées :

- o Substances cancérogènes génotoxiques (altération directe de l'ADN), pour lesquelles l'hypothèse d'absence de seuil est proposée ;
- o Substances cancérogènes génotoxiques pour lesquelles une action sur l'ADN ne peut pas être clairement écartée. Dans ce cas, par principe de précaution, l'hypothèse d'absence de seuil est conservée ;
- o Substances cancérogènes génotoxiques à des doses d'essais supérieures aux doses maximales tolérables (DMT) ou pour lesquelles une action indirecte sur le génome est avancée. Ce cas impose le jugement d'experts afin de proposer l'hypothèse de construction la plus pertinente ;
- o Substances cancérogènes génotoxiques dont l'action sur l'ADN repose sur un mécanisme aneugène ou clastogène. Dans certains cas, il est possible de retenir une hypothèse de construction à seuil ;
- o Substances cancérogènes non génotoxiques. Dans ce cas, l'hypothèse de construction à seuil est proposée.

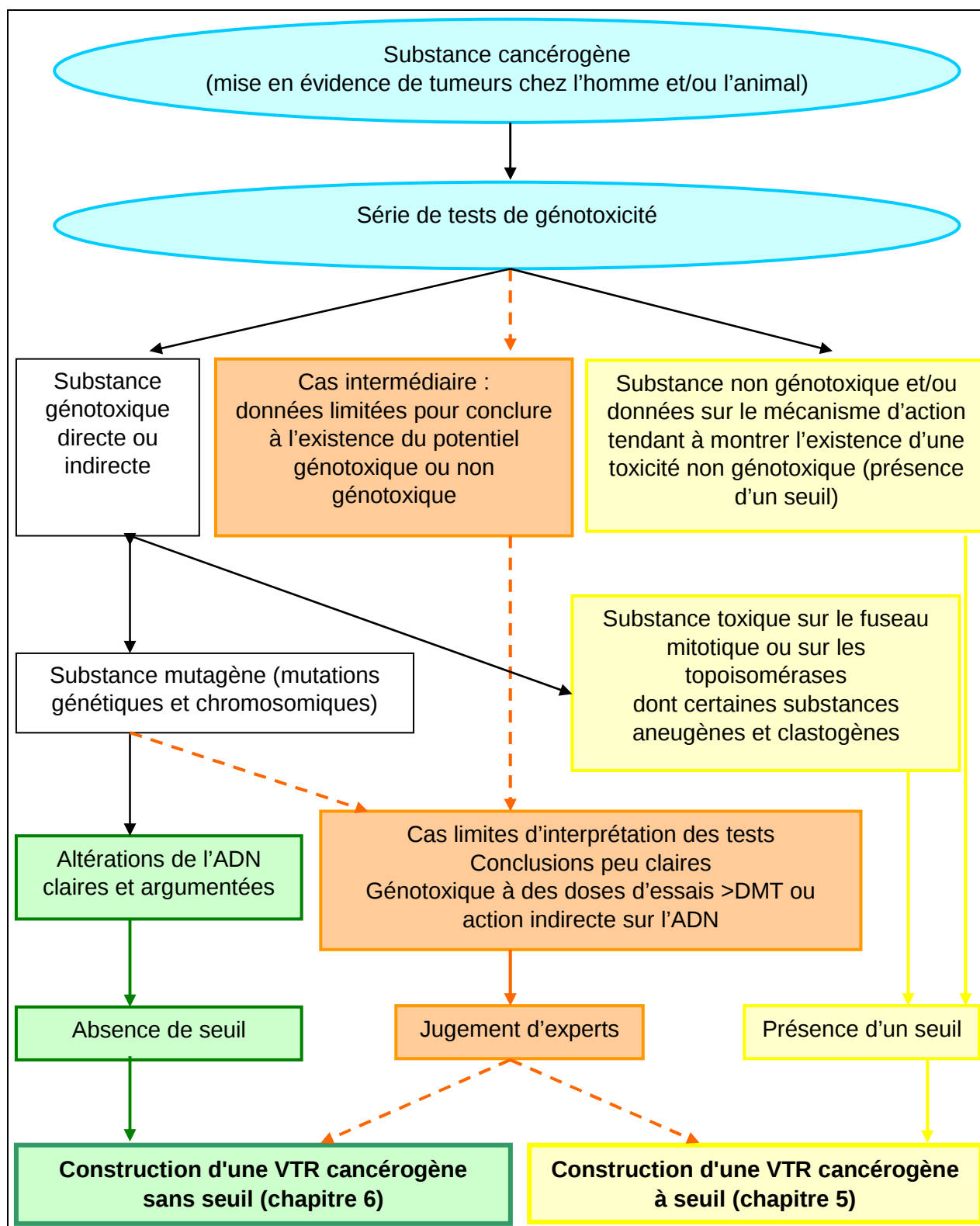


Figure 2 : Schéma d'aide à la décision sur l'hypothèse de construction des VTR cancérogènes

4.3 Sélection de l'effet critique cancérogène

Par définition, une VTR est construite sur la base d'un effet critique c'est-à-dire un effet néfaste, spécifique de la substance survenant aux faibles doses. Dans le cas d'une substance cancérogène, l'effet critique retenu est l'effet cancérogène proprement dit. Si la description du mode d'action le permet, il est possible de retenir comme effet critique un événement non cancérogène, considéré comme précurseur de la formation de tumeurs pour une même localisation (par exemple, inflammation, prolifération cellulaire).

Si l'effet critique retenu est l'effet cancérogène, il est important de caractériser précisément le type de tumeurs (cf. chapitre 2.1.4) et de vérifier que l'apparition des tumeurs est bien corrélée à l'exposition à la substance chimique étudiée. Il convient donc d'évaluer la part des tumeurs dites « spontanées » chez l'animal de celles réellement induites par la substance chimique (cf. chapitre 3.2.1.1). Il n'est pas préconisé de cumuler les incidences tumorales sauf lorsque cela est justifié, par exemple pour différents types de tumeurs localisées au niveau d'un même organe et d'un même tissu, pour des tumeurs bénignes précurseurs de tumeurs malignes.

Si la description du mode d'action cancérogène d'une substance le permet, il est possible de retenir un événement précurseur de l'apparition de tumeurs. L'effet critique dans ce cas n'est pas cancérogène et est observé à des doses/concentrations plus faibles ou des délais d'exposition plus courts. Dans ce cas, il est important de s'assurer que cet effet précurseur est bien relié au mode d'action cancérogène de la substance chimique étudiée et qu'il correspond bien à un événement clé de ce mécanisme (cf. chapitre 4.1).

Dans le cas d'une substance pour laquelle les relations dose-effet/dose-réponse ne permettent pas de choisir un seul effet critique, il peut être envisagé par précaution de construire plusieurs VTR pour chacun des effets différents, et retenir *in fine* la VTR la plus faible.

4.4 Sélection de l'étude clé pour la construction de la VTR

Il s'agit à ce stade de choisir l'étude toxicologique ou épidémiologique la plus pertinente, c'est-à-dire offrant une relation dose-effet ou dose-réponse exploitable et de bonne qualité, en vue de construire la VTR cancérogène. Cette étude appelée « étude clé » doit contenir des éléments quantitatifs caractérisant la relation dose-effet ou dose-réponse. Si les informations complémentaires ne sont pas utilisées directement pour une VTR, elles peuvent néanmoins servir à argumenter et à renforcer le choix de cette étude.

Pour faciliter ce choix et le rendre transparent, il est proposé de se référer aux grilles de lecture pour les études présentées en Annexe 2 et Annexe 3 de ce document.

Il convient, dans un premier temps, de privilégier les études épidémiologiques si elles sont de qualité suffisante, si les expositions sont suffisamment bien caractérisées et si une relation dose-réponse est exploitable. A qualité équivalente, il est préférable de privilégier dans l'ordre :

- Les études de cohortes prospectives,
- Les études de cohorte rétrospectives/prospectives,
- Les études cas-témoins.

Dans ces études, il convient également de privilégier les études fournissant des données d'incidence de survenue d'un cancer plutôt que de mortalité.

En l'absence d'études épidémiologiques pouvant être retenues comme étude clé, peuvent être retenues en deuxième intention les études expérimentales de cancérogenèse (étude sur 104 semaines chez le rat et/ou la souris) ou de toxicité chronique (étude sur 52 semaines et plus) proposant des relations dose-effet/dose-réponse exploitables et de qualité jugée satisfaisante (cotation de Klimisch 1 ou 2 de préférence).

Si le mode d'action cancérogène est suffisamment détaillé et que l'effet critique retenu est un effet précurseur du cancer, il est alors possible de retenir une étude épidémiologique décrivant ce type d'effets précurseurs ou une étude toxicologique à doses répétées (28 ou 90 jours), sous réserve que ces études fournissent des relations dose-effet/dose-réponse exploitables et qu'elles soient de bonne qualité.

5 Construction d'une VTR cancérogène à seuil de dose

La réflexion proposée ci-dessous est issue du « Document de référence pour la construction d'une valeur toxicologique de référence fondée sur des effets reprotoxiques » (Afsset, 2007).

Ne sont développés ci-dessous que les éléments de compréhension ainsi que les recommandations (choix de la dose critique et application de facteurs d'incertitudes) en vue de construire une VTR cancérogène à seuil. Pour plus de précisions, il est conseillé de se reporter au document de référence susmentionné.

5.1 Choix de la dose critique

5.1.1 Identification et construction des doses repères

5.1.1.1 NOAEL/LOAEL

Le NOAEL et le LOAEL²² sont déterminés à partir d'une expérimentation animale grâce à un test statistique qui permet de détecter une différence significative dans les effets induits par une dose testée par rapport au témoin (Figure 3) :

- o Le LOAEL est identifié à partir du test statistique parmi les doses testées. C'est la première dose testée, dans l'ordre croissant, qui produit un effet – considéré comme néfaste – d'une intensité ou d'une fréquence présentant une différence statistiquement significative avec le témoin (dose nulle) ;
- o Le NOAEL est défini comme la dose testée ne produisant pas d'effet statistiquement significativement différent du témoin, et immédiatement inférieur au LOAEL. Lorsque la première dose testée (D1) conduit déjà à un effet significativement différent du témoin, il n'est pas possible de définir un NOAEL. Ce type d'expérimentation ne devrait pas *a priori* être retenu pour la construction d'une VTR car rien ne dit qu'une dose inférieure au LOAEL (D1) ne produit pas déjà un effet significatif.

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

²² NOAEL : No Observed adverse effect level. LOAEL : Lowest observed adverse effect level

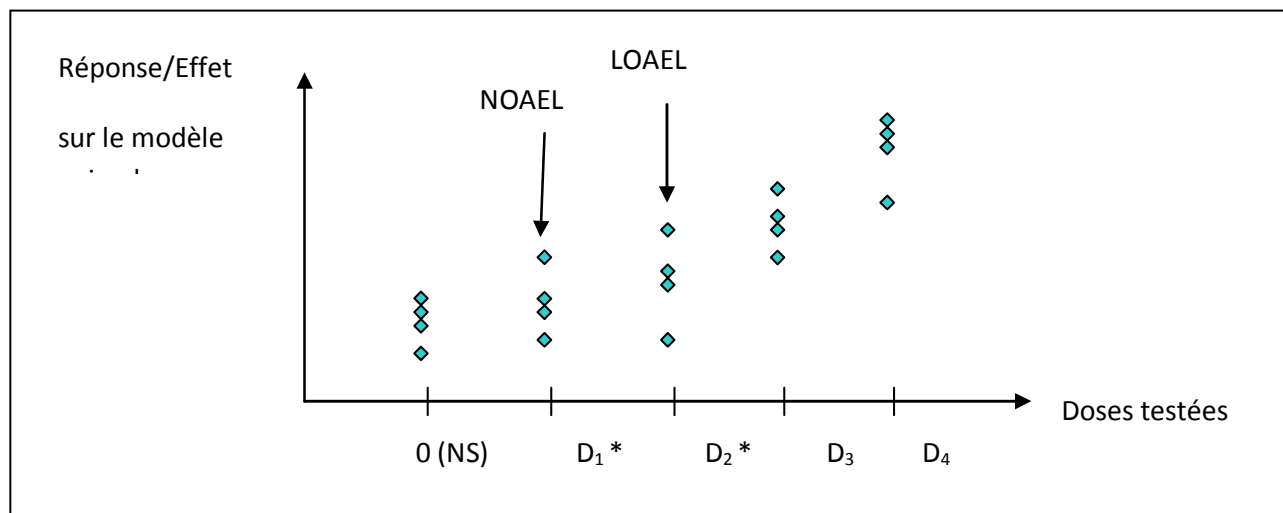


Figure 3 : Relation dose-réponse et recherche du LOAEL

NS : non statistiquement significatif. * : statistiquement significatif

Les approches de détermination d'une dose critique basées sur les LOAEL et NOAEL ont été remises en cause ces dernières années par la communauté toxicologique (AESA, 2009). Plusieurs raisons sont invoquées notamment les suivantes :

- o Les LOAEL et NOAEL sont des concentrations testées et leurs valeurs numériques sont très dépendantes du protocole expérimental ;
- o Leurs valeurs dépendent aussi directement de la taille des échantillons. La capacité d'une expérimentation à distinguer un effet entre une dose et le témoin augmente avec la taille des échantillons. Si les échantillons utilisés sont de faible taille, le risque est alors plus élevé que le NOAEL produise un effet (risque de deuxième espèce) ;
- o Plus l'expérience est de faible qualité, plus le NOAEL est élevé, ce qui n'est pas protecteur pour la santé publique ;
- o Ces valeurs ne disposent pas d'intervalle de confiance ni d'un niveau de précision ou d'un ordre de grandeur sur leurs incertitudes ;
- o Les niveaux d'effet du LOAEL et du NOAEL, par définition non existant donc non détecté, ne sont pas connus.

Pour ces raisons, malgré la large et quasi unanime utilisation de cette approche NOAEL/LOAEL, d'autres approches développées dans ce contexte méritent d'être présentées et utilisées.

5.1.1.2 BMD (benchmark dose)

L'objectif de la démarche d'une benchmark dose (BMD) est d'estimer la dose correspondant à un niveau de réponse ou à un pourcentage de réponse supplémentaire par rapport au témoin. Ce niveau ou pourcentage appelé *benchmark response level* (BMR) est fixé au préalable. C'est majoritairement la BMDL, autrement dit la limite inférieure de l'intervalle de confiance à 90% ou 95% de la BMD, qui est considérée comme dose critique (Figure 4).

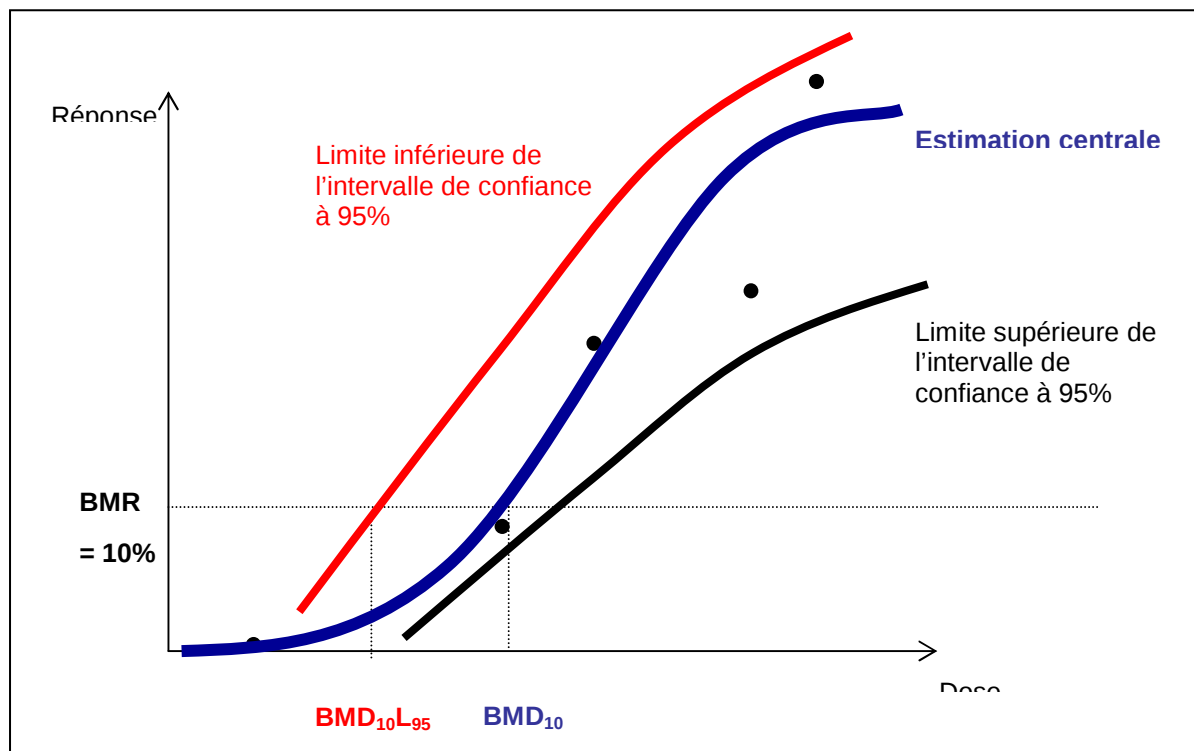


Figure 4 : Relation dose-réponse et définition de la BMDL

Cette approche peut être employée sur des données de type quantale ou dichotomique (la réponse du test s'exprime sous la forme d'un nombre ou d'un pourcentage d'animaux affectés pour chaque dose) ou continue (la réponse du test est un paramètre continu mesuré sur les individus).

Une BMD peut être déterminée à partir des mêmes résultats expérimentaux que les NOAEL/LOAEL, sous certaines conditions : disposer au minimum de 3 groupes de doses testées et fournir les données expérimentales suivantes : nombre d'animaux, moyenne et écart type pour les données dichotomiques.

Bien que développée depuis les années 1980, l'approche BMD est encore peu utilisée car elle apparaît plus complexe. Néanmoins, elle permet entre autre :

- o d'élaborer une relation dose-réponse en prenant en compte l'ensemble des résultats de l'expérimentation animale ;
- o de rendre explicite les choix ou hypothèses retenues (niveau d'effet jugé comme néfaste par exemple) bien souvent implicites dans l'approche NOAEL/LOAEL ;
- o de quantifier le niveau d'effet de la dose retenue et de lui associer un intervalle de confiance, rendant ainsi explicites les incertitudes de l'approche utilisée.

La plupart des institutions construisant des VTR dont l'US EPA proposent l'utilisation de la BMD/BMDL car l'un des apports de la démarche est justement le calcul d'un intervalle de confiance, non disponible dans l'approche NOAEL/LOAEL, prenant en compte l'incertitude liée au protocole expérimental.

La construction de la BMD/BMDL conduit systématiquement et explicitement à se poser des questions sur le protocole expérimental, l'effet critique analysé et les incertitudes/variabilités liées à l'estimation de la dose critique ainsi que sur son interprétation. Elle apparaît donc comme

particulièrement pertinente lorsque les données le permettent, et doit déboucher sur une discussion entre toxicologues et statisticiens.

5.1.2 Recommandations pour le choix de la dose critique

Sont privilégiés, *a priori*, pour l'effet critique retenu et pour la voie d'exposition d'intérêt, dans cet ordre :

- o L'approche BMD/BMDL : fournir une ou plusieurs BMD/BMDL correspondant à une BMR de 1 - 5 ou 10% si cela est possible, en justifiant ce choix. La valeur de 10% correspond généralement au seuil de sensibilité des effets observés dans les études de cancérogenèse, selon l'US EPA (US EPA, 2005a). Il existe d'autres préconisations tel que d'utiliser un BMR de 10% pour les données continues et 5% pour les données dichotomiques (AESAs, 2009) ;
- o Le couple NOAEL/LOAEL, le nom du ou des tests statistiques qui ont servi à déterminer ce couple NOAEL/LOAEL ainsi que la valeur du risque de première espèce α considérée ;
- o Enfin, en dernière intention, un LOAEL seul ou un NOAEL seul.

Concernant l'élaboration d'une BMDL, toutes les hypothèses ou les choix de calcul effectués au cours de la démarche seront explicités et justifiés, en particulier :

- (1) le logiciel utilisé ;
- (2) les modèles de relation dose-réponse testés ;
- (3) le mode de calcul de la BMD et le ou les pourcentages d'effet retenus ;
- (4) la méthode de calcul et le niveau de confiance de la BMDL.

Afin qu'une discussion collective puisse s'engager sur le choix de la dose critique à utiliser, le maximum d'informations sera présenté. Tous les résultats intermédiaires seront présentés, en particulier :

- ⇒ les résultats d'ajustement (valeurs et écart type des valeurs des paramètres, p-value du test du Chi2 de Pearson par exemple) ;
- ⇒ les résultats des comparaisons inter-modèles ;
- ⇒ les valeurs de BMD et des BMDL conjointes (ratios BMD/BMDL).

In fine, le choix de la BMDL sera effectué en fonction de la valeur du critère de maximum de vraisemblance (variable selon le logiciel utilisé), correspondant à l'utilisation du modèle le plus approprié aux données expérimentales. Pour ce modèle, le ratio BMD/BMDL devra être inférieur à 3 (US EPA, 2005a).

5.2 Ajustements temporel et allométrique

Les ajustements temporel et allométrique seront à appliquer quelle que soit l'hypothèse choisie pour la construction de la VTR (à seuil/sans seuil).

5.2.1 Ajustement temporel

Dans de nombreuses études expérimentales conduites chez l'animal, le mode d'administration de la substance étudiée est discontinu, c'est-à-dire que les animaux sont exposés pendant un nombre d'heures et de jours limité.

Afin de prendre en compte l'intermittence de cette exposition, un ajustement temporel peut être appliqué à la dose critique déterminée. Il consiste à déterminer un équivalent d'exposition continue en appliquant un coefficient d'ajustement de la dose critique expérimentale :

$$\text{Dose critique}_{\text{ajustée}} = \text{Dose critique expérimentale} \times N_1 \text{ heures}/24 \text{ heures} \times N_2 \text{ jours}/7 \text{ jours}$$

N_1 heures = nombre d'heures d'exposition des animaux à la substance

N_2 jours = nombre de jours d'exposition des animaux à la substance

Toutefois, cet ajustement ne doit pas être appliqué de façon systématique, notamment lorsque la toxicité observée, pour une substance donnée, est plus dépendante de la concentration d'exposition que de la durée d'exposition (Afsset, 2008). C'est le cas du formaldéhyde dont l'effet cancérigène repose sur un mode d'action concentration dépendant (cytotoxicité et génotoxicité).

5.2.2 Ajustement allométrique

Si la dose critique est déterminée à partir d'études animales, l'application d'un ajustement allométrique permet de réduire la valeur de l'incertitude sur la variabilité inter-espèces. La dose critique expérimentale est ainsi pondérée afin de déterminer une dose/concentration équivalente humaine (ou HED/HEC²³), prenant en compte les différences de toxicocinétique qui existent entre l'animal et l'homme. Les formules d'ajustement allométrique proposées diffèrent selon la voie d'exposition (voie orale ou inhalation).

- Pour la voie orale, la formule recommandée est celle proposée par l'US EPA :

$$\text{Dose critique}_{\text{ajustée}} = \text{Dose critique expérimentale} \times (\text{poids corporel homme/poids corporel animal})^{3/4}$$

Cette équation repose sur l'hypothèse selon laquelle l'homme et l'espèce animale manifestent les mêmes effets toxiques s'ils absorbent la même dose par unité de surface corporelle. Les surfaces corporelles sont approximativement proportionnelles dans un rapport $3/4$ des poids corporels.

- Pour la voie respiratoire, l'US EPA a développé une méthodologie d'application de différents ajustements allométriques qui sont réalisés en fonction des propriétés physico-chimiques de la substance inhalée (particules ou gaz, coefficients de partage, flux sanguins) et du site anatomique où sont observés les effets critiques (respiratoires ou extra-respiratoires) (Figure 5). En fonction des données disponibles, un arbre décisionnel permet de choisir le type d'ajustement allométrique à appliquer (US EPA, 1994).

²³ HED/HEC : Human equivalent dose/concentration

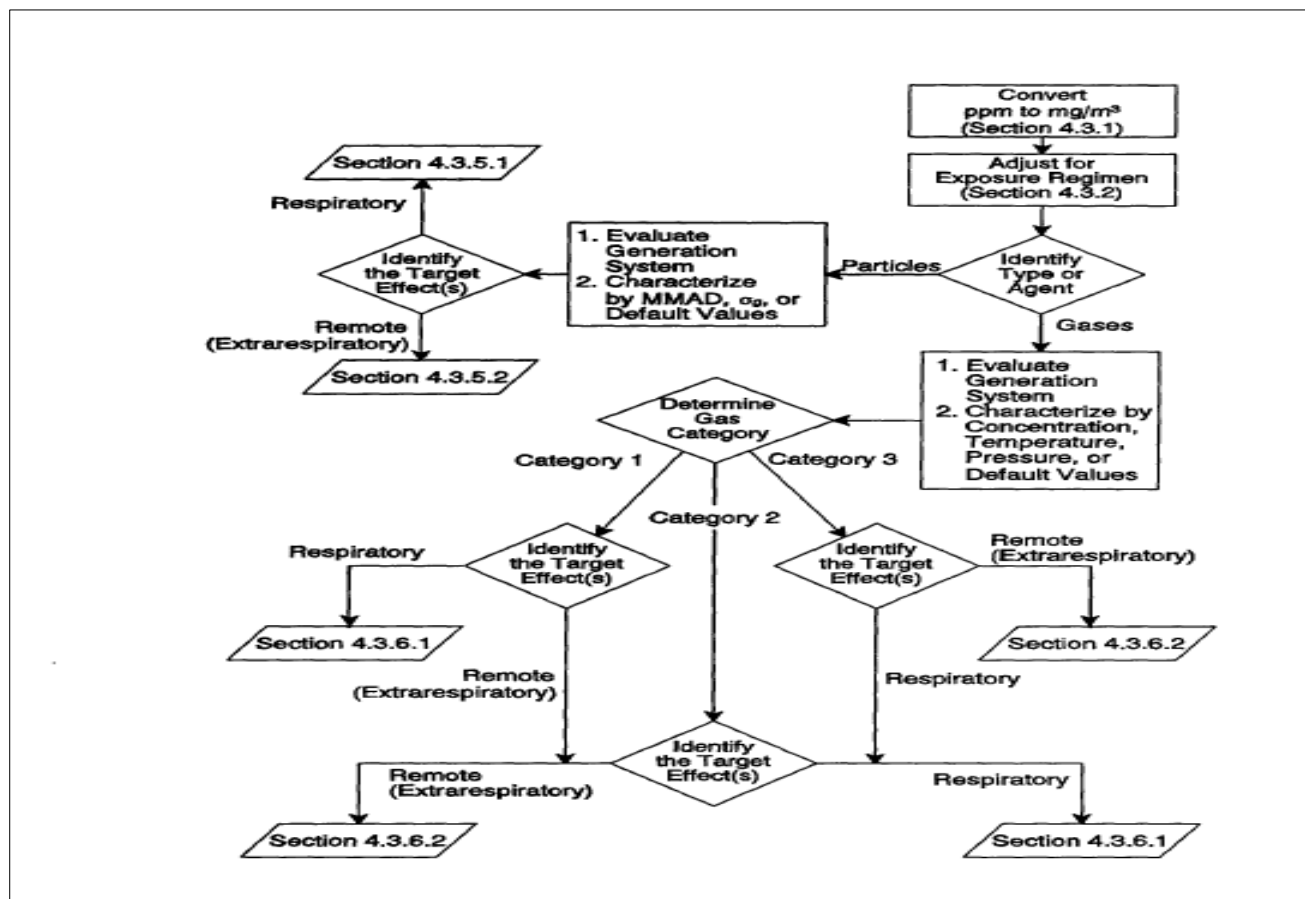


Figure 5 : Arbre décisionnel pour l'application des facteurs allométriques par inhalation (US EPA, 1994)

Ces ajustements allométriques, quelle que soit la voie concernée, permettent de réduire la valeur des facteurs d'incertitude inter-espèces qui seront ensuite appliqués.

5.3 Choix des facteurs d'incertitude

Les facteurs d'incertitude (UF²⁴) reflètent l'incertitude scientifique existante liée à la transposition inter-espèces et interindividuelle ou à la transposition d'une situation d'exposition à une autre. Ils reflètent également l'état des connaissances scientifiques au moment de la construction de la VTR. Leur application suit certaines règles qui ne sont pas immuables, permettant d'apporter des modifications au cas par cas. La discussion entre experts lors du choix de ces facteurs est donc nécessaire.

Les différents facteurs d'incertitude proposés dans la littérature sont présentés dans le Tableau 10. Ces facteurs d'incertitude ne sont pas spécifiques aux VTR cancérogènes (IPCS, 1994 ; ECETOC, 1995-2003 ; European Commission, 2001 ; Commonwealth of Australia, 2002 ; US EPA, 2002 ; US EPA, 2005a ; IEH, 2003 ; OEHHA, 2003).

²⁴ UF : Uncertainty factor

Tableau 10 : Facteurs d'incertitudes proposés dans la littérature

Facteur d'incertitude	Interprétation des UF	Valeurs numérique
UF _A	Variabilité inter-espèces (toxicocinétique/toxicodynamie)	1 ou 4/2,5 ou 3,16/3,16 ou 10
UF _H	Variabilité inter-individuelle (toxicocinétique/toxicodynamie)	1 ou 3,16 ou 10
UF _{L/B}	LOAEL à NOAEL / Utilisation d'une BMD	1 ou 3 ou 10
UF _S	Subchronique à chronique	1 ou 3 ou 10
UF _D	Suffisance des données (en qualité et en quantité)	1 ou 3 ou 10
	Sévérité de l'effet	1 ou 3 ou 10

Par défaut, pour tout facteur d'incertitude, les valeurs de 10 sont utilisées lorsqu'aucune connaissance ne permet de les réduire. L'application d'une valeur plus faible doit être argumentée par des éléments scientifiques pertinents.

La valeur numérique finale du facteur d'incertitude global est un indicateur de la confiance de la VTR ainsi construite.

5.3.1 Détails des facteurs d'incertitude

5.3.1.1 Facteur d'incertitude inter-espèces (UF_A)

En théorie :

Le facteur d'incertitude inter-espèces, nommé UF_A, est appliqué lorsqu'une étude animale est utilisée comme étude clé pour construire la VTR. Il est le reflet des différences de toxicocinétique et de toxicodynamie entre l'espèce testée et l'homme. Cette distinction toxicocinétique/toxicodynamique permet d'étudier séparément ces composantes lorsque des données sont disponibles pour l'une ou l'autre (IPCS, 1994).

Pour la voie orale, la transposition inter-espèces serait proportionnelle à la surface corporelle, elle-même corrélée au poids corporel (rapport des poids moyens à la puissance $\frac{3}{4}$). Lorsqu'un ajustement allométrique est réalisé, l'OMS et l'US EPA considèrent que la valeur du facteur d'incertitude UF_A peut être réduite à 3.

Pour la voie respiratoire, un ajustement allométrique fondé sur des paramètres physico-chimiques et biologiques peut être réalisé si les connaissances sont suffisantes, permettant également de réduire au maximum la part toxicocinétique de l'UF_A. En pratique, l'US EPA propose un UF_A de 3 lorsqu'un ajustement allométrique est réalisé.

Si l'ensemble de la communauté scientifique ne retient pas les mêmes hypothèses lors de l'application de l'UFA, il semble qu'elle s'accorde sur la valeur de 10 utilisée par défaut et sur les deux composantes toxicocinétique et dynamique. Théoriquement, les valeurs possibles de l'UF_A sont étayées par les éléments du Tableau 11.

Tableau 11 : Valeurs de UF_A proposés en théorie dans les documents guides

UF_A		Valeur numérique
Composante toxicocinétique	Absence de données	3 ou 4
	Une partie des données identique (absorption, distribution, élimination, etc.)	1 ou 3 ou 4
	Ensemble des données sensiblement identique chez l'animal et l'homme ou application d'un ajustement allométrique	1
	Concentrations à la cible inférieures chez l'homme	<1
	Modèle PBPK renseigné	Pas d'application de UF_A
	Utilisation d'une étude humaine	Pas d'application de UF_A
Composante toxicodynamique	Absence de données	2,5 ou 3
	Ensemble des données sensiblement identique chez l'animal et l'homme	1
	Homme moins sensible	<1
	Utilisation d'une étude humaine	Pas d'application de UF_A

En pratique :

Pour les VTR construites avant les années 1990, la valeur de UF_A était souvent égale à 10. L'US EPA tend actuellement à réduire la valeur lorsque des informations toxicocinétiques et/ou toxicodynamiques sont prises en compte ou en appliquant par exemple, un ajustement allométrique.

Lorsqu'un modèle PBPK est disponible, ce qui reste rare, le facteur est égal à 1 ou 3 en fonction des données de toxicodynamie disponibles : pour le chlorure de vinyle, l'US EPA a appliqué un UF_A de 3 car les données de toxicodynamie ne sont pas suffisamment renseignées.

Les valeurs utilisées en pratique sont résumées dans le Tableau 12.

Tableau 12 : Valeurs de UF_A utilisées en pratique

UF_A		Valeur numérique
Composante toxicocinétique	Absence de données	3
	Une partie des données identique (absorption, distribution, élimination, etc.)	1 à 3
	Ensemble des données sensiblement identique chez l'animal et l'homme ou application d'un ajustement allométrique	1
	Modèle PBPK renseigné	1
	Utilisation d'une étude humaine	Pas d'application de UF_A
Composante toxicodynamique	Absence de données	3
	Ensemble des données identique chez l'animal et l'homme	1
	Homme moins sensible	1
	Utilisation d'une étude humaine	Pas d'application de UF_A

5.3.1.2 Facteur d'incertitude interindividuel (UF_H)

En théorie :

Le facteur d'incertitude interindividuel est appliqué pour transposer les données à l'ensemble de la population humaine lorsque l'étude a été réalisée sur un groupe restreint (exemple d'une étude réalisée en milieu professionnel), ou chez l'animal (dont la variabilité interindividuelle est réduite). Ce facteur permet de tenir compte des populations sensibles (enfants, personnes âgées, femmes enceintes, etc.) et des différences de réponse toxicocinétique (polymorphisme enzymatique par exemple) ou toxicodynamiques (différence de nombre de récepteurs à la cible par exemple). Il faut noter que l'application de ce facteur ne vise pas les sujets dits « hypersensibles ».

Renwick a démontré que des facteurs de 4 et de 3 couvraient respectivement les différences de toxicocinétique et de toxicodynamie dans la population adulte saine (Renwick, 1991). L'OMS a proposé un facteur 3,16 pour la composante toxicocinétique et un facteur 3,16 pour la composante toxicodynamique en précisant que les données n'étaient pas suffisantes pour identifier deux sous-facteurs différents (IPCS, 1994).

Des études ont estimé la validité du facteur de 3,16 pour les différences toxicocinétiques, en utilisant des données humaines sur la cinétique de certains médicaments métabolisés par le cytochrome P450 1A2 (Renwick *et al.*, 2000a, 2000b ; Dorne *et al.*, 2001, 2002 ; Walton *et al.*, 2001). 99 % de la population adulte saine serait couverte par ce facteur mais il ne s'appliquerait pas aux femmes enceintes, aux personnes âgées, aux enfants ou encore aux patients atteints de maladies hépatiques.

En 2003, le Kemi²⁵ a proposé une série de facteurs reflétant les différences de sensibilité d'un individu à l'autre. Ainsi, il est déterminé que l'âge, le polymorphisme génétique, le genre, les pathologies et le mode de vie influent de manière significative sur la variabilité d'un individu à l'autre. Le KEMI propose qu'un facteur UF_H de 3 à 5 pour la toxicocinétique soit utilisé pour tenir compte de la variabilité de sensibilité dans la population adulte saine, et que le facteur UF_H de 3,2 (3,16) pour la toxicodynamie soit conservé en l'absence de connaissances suffisantes à ce sujet. Le KEMI propose ainsi l'application d'un facteur UF_H global de 10 à 16 ne couvrant pas l'ensemble des sous populations identifiées comme à risque (KEMI, 2003).

Selon l'UBA²⁶ et l'US EPA, l'application d'un facteur d'incertitude supplémentaire pour les enfants est préconisée pour les effets cancérogènes et mutagènes combinés (UBA, 2001 ; US EPA, 2005b). Ce facteur, d'une valeur de 10, peut être directement appliqué sur la VTR et permet de prendre en compte l'existence d'une susceptibilité accrue des enfants exposés à des substances cancérogènes et mutagènes, dès le plus jeune âge.

En pratique :

L' UF_H est égal à 10 dans le cas de VTR construites à partir d'études animales. Lorsque des données utilisées sont humaines, elles sont fréquemment d'origine professionnelle et le facteur 10 est, dans ce cas, le plus souvent respecté pour prendre en compte les populations sensibles.

Pour quelques substances, les données proviennent d'études conduites chez des groupes d'individus sensibles et dans ce cas, le facteur est réduit à 3 voire 1 s'il s'agit de populations hypersensibles spécifiquement à la substance étudiée.

Concernant l'application du facteur d'incertitude spécifique aux enfants, il n'est quasiment jamais utilisé en pratique. L'US EPA l'a utilisé lors de la construction d'une VTR pour le chlorure de vinyle, substance pour laquelle les enfants constituent une population sensible. Néanmoins, son application semble relever d'un processus décisionnel de gestion et n'entre pas dans le cadre du processus de construction de VTR cancérogènes.

5.3.1.3 Facteur d'incertitude pour l'application d'un LOAEL ou d'une BMD/BMC (UF_L)

En théorie :

Ce facteur d'incertitude est appliqué lorsque l'étude n'a pas mis en évidence de NOAEL et qu'un LOAEL a été appliqué. Il peut également être utilisé lorsqu'une BMD est appliquée. Dans le cas de VTR cancérogènes, ce facteur est appliqué pour la construction d'une VTR à seuil établie pour un effet précurseur non cancérogène.

En pratique :

La valeur du facteur UF_L (pour l'utilisation d'un LOAEL ou d'une BMD) est le plus souvent de 3 ou 10 mais il existe peu de justification quant au choix de ces valeurs. Elle est laissée au jugement d'experts en fonction du type d'effet et de la relation dose-réponse. L'analyse des VTR existantes élaborées par l'US EPA démontre une hétérogénéité d'application de la valeur numérique (UF_L allant de 1 à 10).

²⁵ KEMI : *Kemikalieinspektionen* (Inspection des substances chimiques)

²⁶ UBA : *Umwelt Bundesamt* (Bureau fédéral de l'environnement allemand)

5.3.1.4 Facteur d'incertitude subchronique à chronique (UF_S)

En théorie :

Ce facteur d'incertitude est appliqué lorsque la dose critique a été déterminée à partir d'études subchroniques et que la VTR s'applique pour des expositions chroniques. L'application de ce facteur suppose que l'effet observé lors d'expositions subchroniques l'est également pour des expositions chroniques, à plus faible dose et que l'incidence ou la sévérité de l'effet augmente avec la durée de l'exposition (Malkiewicz *et al.*, 2009). Dans le cas de VTR cancérogènes, ce facteur peut être appliqué pour la construction d'une VTR à seuil établie pour un effet précurseur non cancérogène, défini à partir d'études subchroniques.

En pratique :

Les valeurs numériques du facteur UF_S prend généralement les valeurs de 3 ou de 10, sans justification concrète. Cette application est donc laissée au jugement d'experts au cas par cas. Dans le cas du choix d'un effet précurseur du cancer, de par la relation dose-réponse de cet effet, il n'apparaît pas forcément pertinent de l'appliquer.

5.3.1.5 Facteur d'incertitude pour l'insuffisance de données (UF_D)

En théorie :

Ce facteur n'est pas systématiquement utilisé. Il tient compte de l'exhaustivité des données collectées pour la substance étudiée et reflète un manque de connaissances, à un moment donné, pour un type d'effet par exemple. La relation dose-effet qu'il est possible de décrire pour la substance d'intérêt apparaît alors incomplète.

En pratique :

Le facteur UF_D est généralement compris entre 3 et 10, mais aucune règle ne fixe la valeur à appliquer en fonction des données. Cette application est donc laissée au jugement d'experts.

5.3.2 Recommandations pour les facteurs d'incertitude à appliquer

Suite à la présentation des différentes pratiques exercées par les organismes internationaux en matière d'application de facteurs d'incertitude, l'Afsset propose les recommandations suivantes (Tableau 13).

Tableau 13 : Facteurs d'incertitude proposés par l'Afsset

Facteur d'incertitude	Interprétation des UF	Valeur numérique
UF_A	Variabilité inter-espèces (toxicocinétique/toxicodynamique)	1 ou 4/2,5 ou 3,16/3,16 (10)
UF_H	Variabilité interindividuelle (toxicocinétique/toxicodynamique)	1 ou 3,16/3,16 (10)
UF_L	LOAEL à NOAEL, utilisation d'une BMD/BMC	1 ou 3 ou 10
UF_S	Subchronique à chronique (pertinence à discuter dans le cas d'effets précurseurs du cancer)	1 ou 3 ou 10
UF_D	Suffisance des données (en qualité et en quantité)	1 ou 3 ou 10

5.4 Expression finale de la VTR

La VTR cancérogène à seuil est souvent déterminée sur la base d'un effet précurseur du cancer, non tumorigène. L'expression de la VTR ainsi construite est la suivante :

$$\text{VTR} = \text{Dose critique} / \text{UF global}$$

$$= (\text{BMDL ou NOAEL ou LOAEL}) / (\text{UF}_A \times \text{UF}_H \times \text{UF}_L \times \text{UF}_S \times \text{UF}_D)$$

Elle s'exprime en $\text{mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ ou en $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ pour une exposition par voie orale, et en mg.m^{-3} ou en $\mu\text{g.m}^{-3}$ pour une exposition par inhalation.

6 Construction d'une VTR cancérogène sans seuil de dose

Il existe différentes méthodes de construction de VTR cancérogènes sans seuil de dose, proposées par les organismes compétents dans ce domaine. Sur certains points méthodologiques, il n'existe à l'heure actuelle ni consensus scientifique, ni décision harmonisée. Aussi, afin d'aider à l'élaboration d'une approche méthodologique par l'Afsset, une revue des méthodes pratiquées par les organismes compétents, la plus exhaustive possible, a été réalisée.

6.1 Méthodes de construction des VTR cancérogènes sans seuil

Le Tableau 14 illustre les différences méthodologiques de construction de VTR cancérogènes sans seuil pour 5 organismes de référence nationaux et européens. Pour disposer d'un état des lieux plus complet, il est possible de se référer à l'article de Mullot *et al.* (2006).

Deux exemples seront détaillés ci-dessous afin de présenter les notions et définitions des différents critères appliqués lors de la construction d'une VTR cancérogène, et d'illustrer plus précisément les différences méthodologiques entre un organisme de référence dans la production de VTR cancérogènes, l'US EPA, et un organisme d'autorité européenne ayant publié récemment une prise de position sur ce sujet, l'AESA²⁷.

²⁷ AESA: Autorité européenne de sécurité des aliments

Tableau 14 : Méthodes de construction des VTR cancérogènes sans seuil

	US EPA (2005a)		Santé Canada (2004)	RIVM ²⁸ (2001)	AESA (2005)	NHMRC ²⁹ (1999)
Expression de la VTR	Excès de risque unitaire (ERU)		Marge d'exposition (MOE : <i>Margin of exposure</i>)	Excess lifetime cancer risk (CR)	Marge d'exposition (MOE : <i>Margin of exposure</i>)	Marge d'exposition (MOE : <i>Margin of exposure</i>)
Modélisation des données	Modèle linéaire multi-étapes (LMS)	Modèles mathématiques → BMD _{10L}	Modèles mathématiques → DT ₀₅ (Dose tumorigène 5%) = BMD ₀₅	Non précisé → NOAEL / LOAEL	Modèles mathématiques → BMD _{10L} ou T25	Modèles mathématiques → BMD ₀₅
Extrapolation vers les faibles doses		Extrapolation linéaire à l'origine		Modèles mathématiques ou extrapolation linéaire à l'origine	Facteurs d'incertitude	Facteurs d'incertitude

6.1.1 US EPA

L'agence américaine pour la protection de l'environnement (US EPA) possède une solide expérience en matière d'élaboration de VTR pour les substances cancérogènes puisque le premier document méthodologique relatif à ce sujet date de 1986 et que plusieurs centaines de VTR pour des substances cancérogènes ont été construites et sont accessibles sur la base de donnée IRIS (US EPA, 1986). Ce cadre méthodologique a été révisé en 1999 et plus récemment en 2003 dans un souci d'intégration des avancées scientifiques relatives à la compréhension des mécanismes de cancérogénèse et de commentaires issus de l'expérience (US EPA, 1996 ; US EPA, 1999 ; US EPA, 2003a ; US EPA, 2003b).

La méthode adoptée en 1986 proposait de retenir des études épidémiologiques ou animales comme étude clé pour dériver la VTR. Le cancer était reconnu comme un effet sans seuil. Il était demandé d'employer le modèle LMS³⁰ ou un modèle *time-to-tumor* si les informations sur la durée d'apparition des tumeurs étaient disponibles. Par défaut, ce même modèle était ensuite appliqué pour extrapoler la relation dose-effet vers les très faibles doses jusqu'au niveau de risque de cancer considéré comme acceptable (10^{-6} pour l'US EPA).

La méthode adoptée en 1999 est considérablement plus détaillée (Science advisory board, 1997 ; US EPA, 1996 ; US EPA, 1999). Une place centrale est accordée au mode d'action cancérogène.

²⁸ RIVM : *Rijksinstituut voor volksgezondheid en milieu* (Institut national hollandais pour la santé publique et l'environnement)

²⁹ NHMRC : *National health and medical research council* (Australie)

³⁰ Linearised MultiStage : modèle multi-étapes linéarisé

De nombreux choix méthodologiques dans l'élaboration de la relation dose-réponse sont conditionnés par ce mode d'action et des critères pour apprécier sa qualité sont proposés.

Dans cette méthode, à l'inverse de la précédente, **l'étape d'interpolation³¹ des données expérimentales et celle d'extrapolation vers les faibles doses sont clairement séparées** et utilisent des modèles différents. Pour l'interpolation des données expérimentales de la courbe dose-réponse, tous les modèles existants sont utilisables (ex : modèle multi-étapes linéarisé, modèle Weibull etc.). Le choix est davantage fondé sur la qualité de l'ajustement aux données expérimentales que sur la plausibilité biologique du mode d'action. Ce modèle, retenu pour l'interpolation, permet de choisir le **point de départ (POD³²)** de l'extrapolation aux faibles doses, c'est-à-dire un point de la courbe dose-réponse modélisée, peu éloigné des données expérimentales pour conserver une certaine confiance dans sa validité. Les POD utilisables par défaut sont respectivement, la limite inférieure de l'intervalle de confiance de la dose produisant 10 % d'augmentation de l'incidence tumorale estimée par le modèle (BMD_{10L}) et le niveau de risque correspondant au LOAEL ou au NOAEL.

L'étape d'extrapolation aux faibles doses repose sur l'extrapolation linéaire à l'origine à partir du POD, réputée plus protectrice pour la santé publique (US EPA, 2003a ; US EPA, 2003b). Cette extrapolation linéaire est utilisée par défaut.

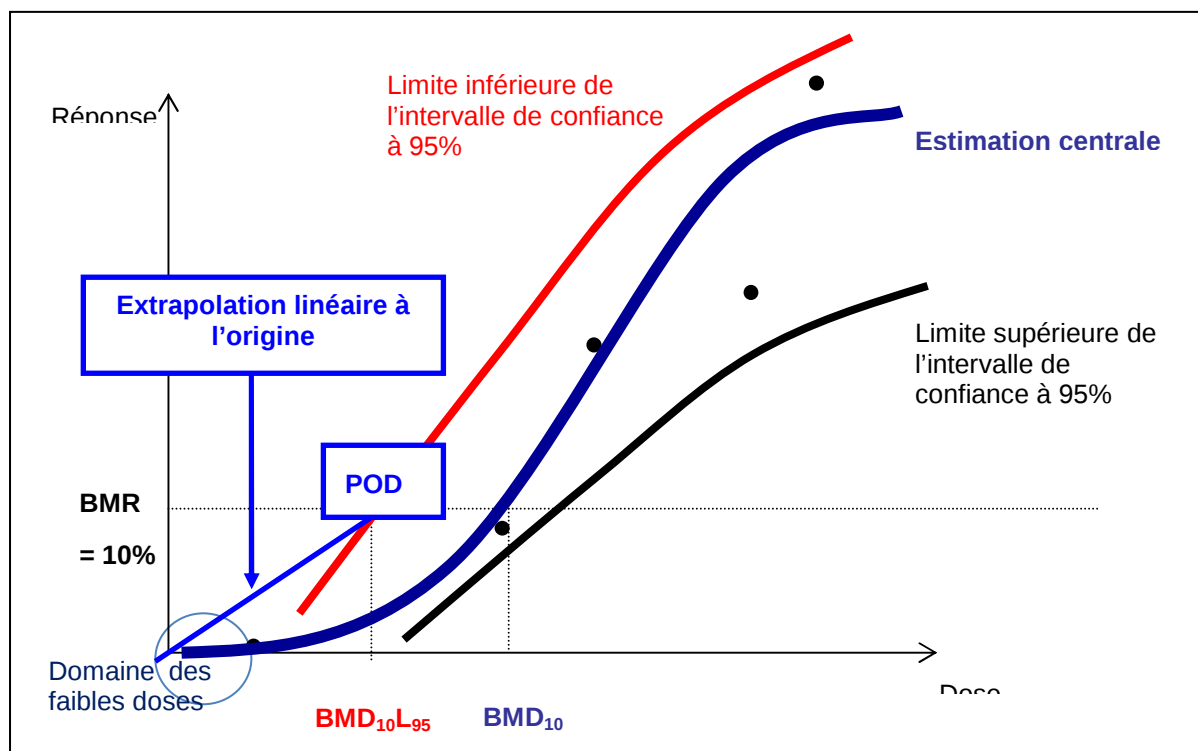


Figure 6 : Détermination du POD et extrapolation linéaire aux faibles doses

En 2005, l'US EPA a proposé une nouvelle méthode de construction de VTR pour les substances cancérogènes (US EPA, 2005a), accompagnée d'un document traitant de la prise en compte d'une éventuelle hypersensibilité aux substances cancérogènes si l'exposition se produit pendant les premières années de la vie (US EPA, 2005b). Les principales différences avec la méthode précédente sont :

³¹ Détermination approchée d'une donnée manquante à partir d'informations disponibles encadrant cette donnée

³² POD: Point of departure

- le renforcement de l'utilisation des données sur le mode d'action pour réduire les incertitudes de la démarche ;
- la clarification des conditions permettant le recours aux hypothèses par défaut, cohérentes avec d'autres méthodes et concepts comme par exemple le principe de précaution ;
- la prise en compte des susceptibilités individuelles qu'elles soient liées à l'âge, au mode de vie ou génétiques avec une préoccupation particulière pour les enfants.

6.1.2 AESA

En 2005, l'autorité européenne de sécurité des aliments (AESA) a publié un rapport sur l'évaluation des risques associés à l'exposition alimentaire à des substances cancérogènes génotoxiques (AESA, 2005). Jusqu'alors, le seul éclairage scientifique donné sur cette question au gestionnaire des risques était de réduire l'exposition à des niveaux aussi faibles que possible (principe ALARA³³).

Dans ce rapport, faute de données scientifiques suffisantes, il est admis par défaut l'hypothèse d'absence de seuil pour les substances cancérogènes génotoxiques. Les modèles permettant habituellement le calcul de cet excès de risque sont jugés trop éloignés de toute réalité biologique, et il est proposé d'appliquer une méthode par calcul d'une marge d'exposition (MOE). Le point de départ de cette méthode, dérivé des observations expérimentales, peut être : soit la limite inférieure de l'intervalle de confiance à 95 % de la BMD associée à 10 % d'effet, soit la T25 si le calcul de cette BMD n'est pas possible. La T25 est déterminée sans prendre en compte l'ensemble de la relation dose-réponse et correspond à la dose/concentration pour laquelle une augmentation de l'incidence tumorale par rapport au groupe témoin est de 25%.

Le calcul de la marge d'exposition à partir de ce point est présenté comme une méthode permettant ainsi de hiérarchiser les risques et il est rappelé que seul le gestionnaire peut décider de l'acceptabilité de tel ou tel risque pris individuellement. Toutefois, le comité scientifique propose une marge d'exposition de référence intégrant des facteurs prenant en compte les différences inter-espèces (10), interindividuelle (10), la nature de l'effet cancérogène (10) et le fait que la BMD ne soit pas une dose sans effet (10). Au final, une marge d'exposition de référence de 10 000 (25 000 si la T25 est utilisée) est proposée comme seuil pour considérer qu'une priorité d'action est « faible » (et non qu'un risque est négligeable).

Cette prise de position constitue une approche intéressante, proche des méthodes de Santé Canada, du NHMRC et de la prise de position de l'ECETOC³⁴. Toutefois, elle est surtout présentée par ses auteurs comme une méthode pour définir des priorités de gestion, hiérarchiser des risques, et non pour construire une VTR cancérogène.

6.2 Recommandations pour la méthode de construction à appliquer

A la suite de l'évaluation des différentes méthodologies proposées, il est proposé de suivre la démarche de l'US EPA pour l'élaboration d'une VTR cancérogène. Celle-ci est fondée sur la séparation entre l'interpolation dans le domaine de l'observable et l'extrapolation aux faibles doses et bénéficie d'un important recul en matière d'utilisation.

³³ ALARA : *As low as reasonably achievable*

³⁴ ECETOC : *European centre for ecotoxicology and toxicology of chemicals*

6.2.1 Choix des doses repères à considérer comme POD

La méthode de l'US EPA (2005a) est fondée sur le concept de POD (*Point of departure*) qui est une dose estimée, proche des faibles valeurs du domaine observé. Ce POD est, en première intention, un BMD_{10L95} autrement dit, la borne inférieure de l'intervalle de confiance à 95 % d'une dose produisant 10 % d'effet excédentaire par rapport au témoin, mais d'autres choix sont possibles en fonction du contexte.

La BMDL est retenue plutôt que la BMD (tendance centrale), car elle permet de prendre en compte l'incertitude liée au protocole expérimental. Néanmoins ce choix peut différer en fonction du contexte. Les estimations des deux valeurs (BMDL et BMD) doivent systématiquement être effectuées et discutées, le ratio BMD/BMDL étant considéré comme pertinent pour évaluer la capacité de prédiction du protocole expérimental et du modèle au niveau d'effet choisi.

Les NOAEL et LOAEL sont à utiliser dans un second et dernier temps car ils produisent potentiellement déjà un niveau d'effet. Il convient toutefois de remarquer que les études réalisées selon les lignes directrices de l'OCDE visent à déterminer le couple NOAEL/LOAEL et il est malgré tout possible de déterminer une VTR sur ces paramètres.

La T25 est à éviter car, outre le fait que son estimation est grossière, elle se situe à un niveau d'effet (25%) où la relation ne peut pas être considérée comme linéaire (même approximativement). Van Landingham *et al.* en 2001 ont simulé les valeurs de T25 et de BMD à partir de l'analyse d'études de cancérogenèse conduites chez l'animal pour plusieurs substances différentes. Les résultats montrent que, dans la majorité des cas, les T25 surestiment le potentiel cancérogène en sous-estimant la valeur réellement associée à une augmentation de 25% de l'incidence tumorale, si l'ensemble de la relation dose-réponse était prise en compte. Les BMD permettent une estimation moins biaisée et souffrent d'une moins grande variabilité dans leur détermination. ECETOC rappelle dans sa méthodologie que la T25 doit uniquement être utilisée dans les calculs de potentiel cancérogène ou les méthodes de priorisation/ hiérarchisation des substances.

Les tests conventionnels de cancérogenèse, comportant approximativement 50 animaux par groupe de doses, permettent en général une modélisation correcte dans les niveaux d'effet excédentaire par rapport au témoin compris entre 1 et 10 % (US EPA, 2005a). Les études épidémiologiques permettent dans certains cas de diminuer ce seuil.

Il est donc recommandé d'estimer, de comparer et de discuter les ratios BMD/BMDL correspondant aux niveaux d'effet de 1,5 et 10 % et de retenir comme POD, la BMDL la plus pertinente selon les critères de choix des modèles testés (dépendant du logiciel de modélisation BMD utilisé).

Le POD ainsi déterminé doit être accompagné de toutes les informations associées à son choix, entre autres :

- o La nature et le niveau de confiance de la dose critique choisie ;
- o La nature de la réponse observée ;
- o Le niveau de dose correspondant ;
- o La nature de la population d'étude ;
- o La pente de la relation dose-effet au niveau du POD.

6.2.2 Ajustement temporel et allométrie

Comme signalé dans le chapitre 5.2, l'objectif est de réduire la valeur de l'incertitude sur la variabilité inter-espèce afin de déterminer une dose/concentration équivalente humaine.

Pour ces deux ajustements, les équations sont dépendantes de la voie d'exposition et non de l'hypothèse de construction à seuil vs. sans seuil aussi, les équations seront identiques à celles proposées au chapitre 5.2.

6.2.3 Choix du modèle d'extrapolation aux faibles doses

Le POD est le point de départ pour le calcul du facteur de pente (*slope factor*), c'est-à-dire la pente de la droite reliant le POD à l'origine. Cette pente est également appelée ERU ou excès de risque unitaire lorsque le risque est ramené à une unité de dose/concentration de la substance étudiée.

L'analyse des méthodologies existantes a montré qu'il était possible de faire appel à de nombreux modèles différents (biologiques, mécanistiques, mathématiques) pour réaliser cette extrapolation aux faibles doses. Le consensus actuel converge vers une utilisation de l'extrapolation linéaire à l'origine qui semble être plus précautionneux pour la santé publique, et apporterait des résultats très similaires à ceux obtenus avec le modèle LMS par exemple.

Pour ces raisons, **il est conseillé d'appliquer une extrapolation linéaire à l'origine à partir du POD**. Celle-ci est réalisée en tirant une droite à partir du POD jusqu'à l'origine en tenant compte naturellement de l'effet à l'origine. Si le POD correspond à un niveau d'effet excédentaire de x%, le facteur de pente correspond à $x\% / \text{POD}$; c'est donc un risque par unité de dose. Il peut être utilisé pour évaluer les risques sanitaires correspondant à différents niveaux de dose.

6.2.4 Construction d'une VTR sans seuil à partir de données épidémiologiques

La construction d'une VTR cancérogène sans seuil à partir de données épidémiologiques suppose de connaître certaines informations de manière quantitative. Il s'agit de la valeur de l'excès de risque qui peut être sous la forme de différents indicateurs épidémiologiques (Risque relatif - RR, Odds ratio – OR etc.) et de la concentration d'exposition associée (moyenne ou cumulée sur la durée d'exposition). La force de l'association entre un agent et un cancer est estimée par divers paramètres épidémiologiques (Inserm, 2008) (Annexe 5).

La VTR correspond à un excès de risque unitaire, c'est-à-dire **l'excès de risque (RR-1) rapporté à une unité de dose**. Seules les relations dose réponse publiées par les auteurs peuvent être utilisées car leurs calculs nécessitent l'accès aux données individuelles.

En pratique, la construction d'une VTR cancérogène sans seuil à partir de données épidémiologiques s'avère complexe et dépendante de l'accès aux données individuelles de l'étude. Un rapport récent de l'agence européenne des produits chimiques (ECHA³⁵) propose une méthodologie de construction de valeurs repères à partir de données épidémiologiques (ECHA, 2010).

6.2.5 Cas particulier des enfants

L'approche allemande proposée par l'UBA concernant la sensibilité renforcée des enfants se base sur le fait qu'en cas de mutagénicité et cancérogénicité prouvées, l'impact d'une exposition est supérieur chez les enfants par rapport aux adultes, du fait de la division cellulaire plus rapide pendant la croissance (Schneider, 1999 ; UBA, 2001).

Ainsi l'UBA recommande, en cas d'expositions des enfants aux substances chimiques cancérogènes et mutagènes, de multiplier l'ERU par un facteur de 10 pour les enfants âgés de 0 à 5 ans, ou d'un facteur de 2 en cas d'exposition en âge de 5 ans et plus jusqu'à l'âge adulte.

³⁵ ECHA : European chemicals agency

L'US EPA préconise une approche similaire à l'UBA, c'est-à-dire une application d'un facteur majorant les VTR cancérogènes de 15 pour les enfants de 0 à 2 ans et d'un facteur de 3 pour les enfants de 3 à 15 ans (US EPA, 2005b).

En pratique, ces facteurs sont le plus souvent appliqués dans le cadre de réflexions de gestion du risque et non pas de construction de VTR. **L'utilisation de ces facteurs devra donc reposer sur une discussion d'experts éclairée et justifiée.**

6.3 Expression finale de la VTR

L'excès de risque unitaire (ou *slope factor*) correspond à la VTR sans seuil calculée à partir du POD suivi d'une étape d'extrapolation linéaire à l'origine. Il s'agit d'un inverse de dose ou de concentration. La VTR sera donc exprimée en $(\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{j}^{-1})^{-1}$ ou en $(\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{j}^{-1})^{-1}$ pour une exposition par voie orale, et en $(\text{mg} \cdot \text{m}^{-3})^{-1}$ ou en $(\mu\text{g} \cdot \text{m}^{-3})^{-1}$ pour une exposition par inhalation.

Seront également présentées les doses / concentrations associées à différents niveaux de risque : 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} .

Dans le cas d'une VTR sans seuil déterminée à partir d'une étude épidémiologique, il conviendra de préciser si les données exploitées correspondent à des données de mortalité ou d'incidence.

7 Organisation et présentation des connaissances

La construction d'une VTR cancérogène suit une démarche structurée aussi, il convient d'organiser clairement la présentation des données qui ont permis cette construction. Dans le cadre de ces travaux, les données présentées se concentreront principalement sur les effets cancérogènes.

A partir de l'ensemble des informations disponibles, la méthodologie de construction d'une VTR cancérogène doit permettre de déterminer si les données humaines et/ou animales présentées peuvent raisonnablement être utilisées, de sélectionner l'étude clé pour chaque type d'exposition considérée, d'identifier le (ou les) effet(s) critique(s) pertinent(s) et de retenir *in fine* l'hypothèse de construction de la VTR cancérogène.

Ce chapitre indique l'ensemble des informations nécessaires à fournir dans la démarche de construction d'une VTR cancérogène. Il est proposé de présenter ces données de façon synthétique sous la forme de tableaux, en citant l'ensemble des sources bibliographiques consultées.

7.1 Synthèse des données toxicologiques

Les informations générales doivent permettre l'identification de la substance par son nom, sa formule, ses propriétés physico-chimiques, les voies d'exposition plausibles chez l'homme et sa toxicité générale.

7.1.1 Identification et propriétés physico-chimiques

L'appartenance à des listes de substances classées pour leur potentiel cancérogène sera à fournir. Plusieurs sources peuvent être consultées :

- Europe : liste des substances chimiques classées Cancérogènes, mutagènes et reprotoxiques (CMR) selon la directive 67/548/CEE ;
- Circ (Centre international de recherche sur le cancer) : classification d'agents cancérogènes faisant l'objet de monographies spécifiques ;
- US EPA : classification des substances chimiques cancérogènes disponibles sur la base de données IRIS ;
- Santé Canada : classification des substances chimiques listées comme substances d'intérêt prioritaires (LSIP) ;
- NTP (*National toxicology program*) : classification de substances chimiques selon leur potentiel cancérogène chez l'homme, dans le cadre des *Report on carcinogens*.

Pour les données de physico-chimie, les informations seront issues principalement d'ouvrages et de bases de référence : l'Index Merck³⁶, le *Handbook of chemistry and physics* ou la base HSDB (Chemfinder)³⁷. Il est important d'indiquer précisément les unités.

³⁶ Index MERCK : The Merck index, an encyclopaedia of chemicals, drugs and biologicals. Thirteenth edition. Published by Merck Research Laboratories Division of Merck & Co., Inc. Whitehouse Station, NJ. 2001.

Numéro CAS, EINECS, etc....	
Nom	
Synonymes	
Formule brute	
Formule développée	
Appartenance à une liste de substances classées pour leur potentiel cancérigène (Europe, Circ, US EPA, Santé Canada, NTP)	

Forme physique	
Poids moléculaire	
Point d'ébullition	
Point de fusion	
Pression de vapeur	
Densité	
Facteurs de conversion	
Solubilité	
LogKow ³⁸ , Koc ³⁹	
BCF ⁴⁰ , BAF ⁴¹	
Produits de dégradation environnementale	

³⁷ HSBD et ChemFinder : <http://toxnet.nlm.nih.gov/>

³⁸ Log Kow : logarithme du coefficient de partage octanol-eau. Il correspond au ratio entre la concentration de substance dans l'octanol et celle dans l'eau à l'équilibre. Il est corrélé à la solubilité dans l'eau et reflète indirectement les potentiels de bioaccumulation et de bioconcentration d'une substance.

³⁹ Koc : coefficient d'absorption sur la matière organique. C'est le ratio entre la quantité de substance adsorbée par le sol par unité de poids de carbone organique et la concentration de la substance en solution, à l'équilibre. Il reflète donc la mobilité de la substance dans les sols.

⁴⁰ *Bioconcentration factor* : facteur de bioconcentration : c'est le rapport entre la concentration de la substance dans un organisme aquatique et sa concentration dans l'eau. Il exprime donc l'accumulation de la substance dans un organisme aquatique c'est-à-dire sa capacité à extraire et concentrer les substances de l'environnement qui l'entoure (eau).

⁴¹ *Bioaccumulation factor* : facteur de bioaccumulation : la bioaccumulation est la capacité d'un organisme (généralement aquatique) à extraire et concentrer les substances, à la fois directement à partir de l'environnement qui l'entoure (bioconcentration) mais aussi directement à partir de la nourriture.

7.1.2 Plausibilité d'exposition humaine

Les données permettant de définir le contexte d'exposition chez l'homme seront issues de rapports ou synthèses publiées par les organismes compétents dans le domaine de l'évaluation des risques sanitaires.

Types d'utilisation	
Restrictions d'usage	
Tonnages (Europe, France)	
Milieux de rejet dans l'environnement	
Vecteurs potentiels d'exposition humaine	
Populations concernées	

7.1.3 Toxicocinétique

Les données comparées de toxicocinétique chez l'homme et l'animal (le plus souvent, le rongeur) seront présentées en précisant les unités. Des schémas sur le métabolisme peuvent être insérés.

	Données chez l'animal	Données chez l'homme
Substance mère		
Absorption (% par voie)		
Passage percutané		
Volume de distribution		
C _{max} (concentration maximale atteinte)		
T _{max} (temps auquel la C _{max} est atteinte)		
Stockage (% et organe/tissu cible)		
Accumulation (% et organe/tissu cible)		
Bioactivation		
Passage de la barrière hémato-encéphalique		
Passage transplacentaire		
Passage dans le lait		
Cycle entéro-hépatique (CEH)		
Sites de métabolisation et effets de premier passage		
Voies de métabolisation possibles		
Métabolites principaux		
Élimination (voie et % par voie, t _{1/2} plasmatique ⁴²)		
Clairance		
Biodisponibilité (f)		

⁴² t_{1/2} : demi-vie : temps nécessaire pour que la concentration C passe à C/2 dans la phase d'élimination

7.1.4 Toxicité générale

Ce chapitre a pour objectif de présenter tous les éléments permettant de décrire, dans son ensemble, le mode d'action cancérogène de la substance par l'apparition d'évènements précurseurs de tumeurs. Il conviendra à l'évaluateur de sélectionner les informations pertinentes à reporter dans ce paragraphe, dans le cadre de la construction d'une VTR cancérogène. Des informations sur le potentiel irritant pulmonaire d'une substance cancérogène peuvent apporter des éléments de compréhension sur un mode d'action cytotoxique par exemple.

Chez l'animal, les données de toxicité générale proviennent des études de toxicité répétée sur 28 jours et 90 jours. Les informations issues de ces expérimentations apportent des éléments importants pour la compréhension du mode d'action notamment par la mise en évidence de signes de toxicité précurseurs de tumeurs.

Chez l'homme, il est possible de prendre en compte des informations issues de cas d'intoxications ou de cas cliniques ainsi que d'études épidémiologiques.

Les données seront extraites de documents de synthèse déjà existants, publiés par les organismes nationaux ou internationaux reconnus tels que : l'ATSDR⁴³ (« *Toxicological profiles* »), l'IPCS (« *environmental health criteria* »), Santé Canada (« *rapports d'évaluation des substances d'intérêt prioritaire* »), US EPA (IRIS « *Toxicological review* »), l'ECB (« *risk assessment reports* »), l'OCDE (« *chemicals screening information data set* »), le Circ (« *monographs* ») ou le NCEA (« *risk assessment* »)⁴⁴. Une recherche complémentaire de publications scientifiques pourra également s'avérer utile.

7.1.5 Cancérogénicité

Ce chapitre doit permettre d'identifier les effets cancérogènes observés après exposition à la substance étudiée selon les études épidémiologiques ou les études expérimentales de cancérogenèse sélectionnées.

Pour chacune des études décrites, il conviendra d'apporter le maximum d'informations sur le type d'étude, le protocole expérimental, l'espèce animale testée le cas échéant, le type de tumeurs observée et si possible, sa caractérisation anatomo-pathologique (cf. chapitre 2.1.4) ainsi que les résultats quantitatifs les plus précis possibles. Une appréciation de la qualité des études doit être apportée. La présentation des résultats peut suivre les grilles de lecture proposées en Annexe 2 et Annexe 3.

7.1.6 Génotoxicité

Ce chapitre doit présenter les résultats des tests de génotoxicité de façon détaillée et précise selon les essais conduits *in vivo* et *in vitro*.

Un maximum d'informations devra être fourni concernant notamment le protocole d'essai, la pureté de la substance administrée et le type de cellules ou de systèmes biologiques utilisé. La présentation de ces données peut suivre la grille de lecture des tests de génotoxicité proposée en Annexe 4.

⁴³ ATSDR : Agency for toxic substances and disease registry. <http://www.atsdr.cdc.gov/>

⁴⁴ IPCS/OCDE/Circ : www.inchem.org/; Santé Canada : <http://www.hc-sc.gc.ca/>; ECB : <http://ecb.jrc.it/>; NCEA : National centre for environmental assessment : <http://cfpub.epa.gov/ncea/>

7.1.7 VTR existantes

Le recensement des VTR existantes pour la substance chimique étudiée permet d'apprécier les connaissances sur la relation dose-effet / dose-réponse et d'identifier les choix méthodologiques réalisés par les organismes proposant des VTR.

Les VTR peuvent rapidement être recensées par le biais du moteur de recherche Furetox⁴⁵. L'OEHHA⁴⁶ propose également des *Child-specific reference doses*. L'IPCS recense sur son portail des valeurs guides sanitaires. Enfin, des VTR peuvent être proposées dans les rapports d'évaluation des risques de l'ECB.

Les VTR cancérogènes et non cancérogènes seront listées et détaillées sous la forme d'un tableau. Il conviendra de se limiter aux VTR existantes pertinentes dans le contexte étudié (par exemple, sélection selon une voie d'exposition si la transposition de voie à voie n'est pas possible ; sélection d'une espèce animale si l'effet critique retenu est spécifique d'espèce etc.).

Organisme (année)	
VTR (unité)	
Voie d'exposition	
Durée d'exposition	
Etude clé (référence)	
Homme / espèce animale	
Protocole expérimental / doses testées	
Effet critique	
Dose critique / POD / Ajustements temporel et/ou allométriques	
UF (si VTR à seuil)	
Modèles utilisés (si VTR sans seuil)	

7.2 Elaboration de la VTR cancérogène pour la substance étudiée

7.2.1 Mode d'action proposé et cohérence des données animales et humaines

Ce chapitre doit préciser les hypothèses proposées pour la description du ou des mode(s) d'action cancérogène proposé(s). Dans la situation la plus favorable, les données observées chez l'homme suffisent à justifier un mode d'action cancérogène. En pratique, les données sont le plus souvent issues d'expérimentations chez l'animal de laboratoire. Dans ce cas, la discussion sur la pertinence de transposer le mode d'action postulé prend tout son sens. A cette étape, la démarche proposée au chapitre 4.1 pourra être utilisée.

7.2.2 Hypothèse de construction de la VTR cancérogène

Au regard du mode d'action cancérogène postulé pour la substance chimique étudiée et des données de cancérogénicité et génotoxicité, il est possible d'effectuer un choix quant à la

⁴⁵ Furetox : <http://www.furetox.fr/home.html>

⁴⁶ OEHHA : *Office of environmental health hazard assessment*

méthodologie de construction de la VTR cancérogène. Le schéma d'aide à la décision proposé au chapitre 4.2 peut alors être consulté.

7.2.3 Choix de l'étude clé et de l'effet critique

A l'issue de l'analyse des études toxicologiques et épidémiologiques disponibles, de la description du mode d'action cancérogène et de l'hypothèse de construction avancée, l'étude clé et l'effet critique sont choisis afin de permettre la construction de la VTR cancérogène (cf. chapitres 4.3 et 4.4).

Une discussion globale à ce niveau doit permettre de conclure sur :

- o l'identification des différents effets cancérogènes ;
- o l'identification d'un ou plusieurs effets critiques ou bien d'un évènement précurseur pertinent pour la proposition d'une VTR cancérogène ;
- o l'identification et la synthèse des études de bonne qualité ;
- o l'identification des manques de connaissances.

7.2.4 Construction de la VTR cancérogène

Sur la base des conclusions prises lors des étapes précédentes, la construction de la VTR cancérogène suivra les méthodologies proposées aux chapitres 5 ou 6.

Selon l'approche retenue (à seuil ou sans seuil de dose), le calcul de la dose critique ou du POD, ainsi que la justification des facteurs d'incertitude ou du modèle d'extrapolation aux faibles doses seront mentionnés.

7.2.5 Expression finale de la VTR

La VTR cancérogène peut être synthétisée sous la forme d'un tableau récapitulatif, intégrant le choix de l'étude clé et de l'effet critique, les détails du calcul de la VTR et enfin le résultat final.

Effet critique	Dose critique	UF (à seuil)	VTR
Effet critique Etude clé et description du protocole expérimental Référence bibliographique	Ratios BMD / BMDL LOAEL / NOAEL Sans seuil : choix du POD Ajustement temporel Ajustement allométrique	UF global Détail des valeurs numériques de chacun des UF	Sans seuil : détail du modèle d'extrapolation aux faibles doses retenu Résultat numérique et unité Sans seuil : correspondance des doses associés aux niveaux de risque 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}

8 Conclusions et recommandations

Ce document a pour objectif l'établissement d'un guide méthodologique de construction de VTR spécifiques aux effets cancérogènes et détaille les étapes nécessaires à cette construction. Une première mise à l'épreuve de cette méthode a été réalisée lors d'une phase de faisabilité sur une sélection de substances chimiques cancérogènes représentant plusieurs cas-types (peu ou grand nombre de données, potentiel cancérogène démontré ou suspecté, mélange de substances etc.).

Dans une première partie, sont posés les définitions ainsi que des rappels liés aux principaux mécanismes de la cancérogenèse repris dans l'ensemble du document. Il a été choisi de ne pas présenter la cancérogenèse comme une succession d'étapes (à savoir l'initiation, la promotion et la progression), mais de considérer le développement de tumeurs comme la résultante d'évènements génotoxiques et/ou non génotoxiques.

L'existence d'un seuil de dose pour des effets cancérogènes est admise dans le cas des **cancérogènes non génotoxiques** (incluant les substances cancérogènes épigénétiques). Dans ce document, une substance cancérogène non génotoxique est définie comme une substance capable de modifier l'expression de l'information génétique (au niveau de la transcription ou de la traduction), sans altération du matériel génétique.

Pour la plupart des substances **cancérogènes génotoxiques**, il est admis qu'il n'existe pas de seuil de dose. Dans ce document, une distinction a été faite entre génotoxicité directe et indirecte.

On parle de **génotoxicité directe** pour décrire les réactions chimiques possibles entre une substance et l'ADN, comme des liaisons covalentes (adduits) ou des cassures double brin (attaque électrophile).

On parle de **génotoxicité indirecte** pour décrire les autres mécanismes conduisant à des modifications du matériel génétique (stress oxydatif par exemple). Cependant, dans ce cas précis, il est nécessaire qu'une discussion collégiale ait lieu entre experts, afin de déterminer s'il peut exister un seuil de dose (exemple de substances pro-mutagènes formées après métabolisme).

La seconde partie du document est consacrée à l'évaluation du potentiel cancérogène et génotoxique et permet de définir le mode d'action cancérogène, dont l'hypothèse est fondamentale pour la construction de la VTR cancérogène.

La troisième partie détaille précisément la méthode de construction des VTR cancérogènes à seuil et sans seuil. Sont décrites les étapes de construction des doses critiques ainsi que l'application de facteurs d'incertitude adéquats en fonction des données disponibles pour les VTR à seuil de dose. Pour les VTR sans seuil de dose, le choix du modèle d'extrapolation aux faibles doses à partir de la dose critique est proposé.

Enfin, le dernier chapitre propose un mode d'organisation des connaissances nécessaires à la présentation de la VTR cancérogène construite selon la méthodologie précédemment détaillée.

Ce document méthodologique devra néanmoins faire l'objet d'une actualisation régulière, en fonction des dernières données scientifiques qui seraient publiées dans le domaine et de l'expérience acquise lors de la construction de VTR cancérogènes. Pour cela, les experts souhaitent émettre un certain nombre de recommandations, en vue de l'amélioration continue de cette méthodologie de construction de VTR cancérogènes.

- Pour la construction de la VTR

Dans le cadre d'une VTR construite à partir de données épidémiologiques, de nombreuses questions se posent : transposition des données observées en milieu professionnel à la population générale, données d'incidence tumorale (ou de mortalité) différentes d'une localisation géographique à une autre, prise en compte du polymorphisme génétique etc. Une réflexion plus globale sur la faisabilité de construction d'une VTR cancérogène à partir d'une étude épidémiologique devrait être engagée.

Les méthodes de calcul des ajustements allométriques pour les voies orale et respiratoire proposées dans le rapport n'ont pas été discutées. Il serait pertinent d'engager une réflexion afin de recommander des approches validées dans ce domaine.

- Pour l'application de la VTR

La durée d'application et les conditions d'utilisation des VTR cancérogènes devraient être précisées de façon systématique. Ces modalités incluent notamment les limites des VTR produites et le niveau de confiance accordée à chacun des choix effectués. De plus, une procédure de révision régulière des VTR produites devrait être mise en place.

Lors d'une exposition à un mélange de substances, une réflexion devrait être engagée afin de préconiser une approche adaptée aux substances et à leurs toxicités. Plusieurs approches sont possibles et des pistes sont déjà abordées dans ce rapport : considérer la toxicité du mélange équivalente à celle de la substance chimique prépondérante (exemple des toxines de *Fusarium moniliforme* et de la fumonisine B1), considérer les toxicités de chacun des composés par rapport à la toxicité d'une substance de référence (exemple de l'approche par facteur équivalent toxique pour les dioxines ou les HAP), considérer la toxicité du mélange selon les modes d'action des substances (exemple des phtalates).

- Perspectives

Il serait intéressant de développer l'approche probabiliste pour la construction de VTR en fournissant non plus une valeur unique, mais une distribution, une médiane et des percentiles qui reflètent les choix méthodologiques pris lors de la construction de la VTR et la confiance globale accordée à la VTR.

Une réflexion globale devrait être engagée sur la proposition d'une approche harmonisée entre les effets à seuil et les effets sans seuil de dose.

9 Bibliographie

9.1 Références réglementaires

Directive 67/548/CEE du 27 juin 1967 concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives relatives à la classification, l'emballage et l'étiquetage des substances dangereuses.

Directive du Conseil du 15 juillet 1991 concernant la mise sur le marché des produits phytopharmaceutiques.

Directive 92/69/CEE de la Commission du 31 juillet 1992, portant dix-septième adaptation au progrès technique de la directive 67/548/CEE du Conseil concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives relatives à la classification, l'emballage et l'étiquetage des substances dangereuses.

Directive du Parlement européen et du Conseil du 11 février 2004 concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives relatives à l'application des principes de bonnes pratiques de laboratoire et au contrôle de leur application pour les essais sur les substances chimiques.

9.2 Documents guides

Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail (Afsset). Valeurs toxicologiques de référence (VTR) pour les substances reprotoxiques. Méthode de construction de VTR fondées sur des effets toxiques pour la reproduction et le développement. Avril 2007.

Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail (Afsset). Problématique de la prise en compte systématique des ajustements temporels dans la construction des valeurs toxicologiques de référence (VTR). Mémoire d'E. Belkebir. Master « Médicaments et autres produits de santé ». 2008

Autorité européenne de sécurité des aliments (AESA). Draft opinion on a harmonised approach for risk assessment of compounds which are both genotoxic and carcinogenic. Bruxelles: European food safety authority (EFSA) Scientific Committee GENTOX; 2005.

Autorité européenne de sécurité des aliments (AESA). Scientific opinion. Use of the benchmark dose approach in risk assessment. Guidance of the Scientific Committee. (Question No EFSA-Q-2005-232) Adopted on 26 May 2009. The European food safety authority (EFSA) Journal (2009) 1150, 1-72.

Bonvallot N, Dor F. Valeurs toxicologiques de référence : Méthodes d'élaboration. Institut de veille sanitaire. Département Santé Environnement. Unité Evaluation des risques sanitaires. 2002.

Centre international de recherche sur le cancer (Circ). International Classification of Rodent Tumours, Part I: the Rat. IARC Scientific Publications No.122 Vol.1 – 10. 1992-1997.

Centre international de recherche sur le cancer (Circ). International Classification of Rodent Tumours, Part II: the Mouse. IARC Scientific Publications. 2001.

Commission européenne (CE). DG SANCO. Draft guidance document. Guidance for the setting of acceptable operator exposure levels (AOELs). Septembre 2001.

Committee on mutagenicity of chemicals in food, consumer products and TGE environment (COM). Guidance on a strategy for testing of chemicals for mutagenicity. Department of Health (Royaume-Uni), 2000.

Commonwealth of Australia. Department of health and ageing and enHealth Council. Environmental health risk assessment, Guidelines for assessing human health risks from environmental hazards. Juin 2002.

Conseil supérieur d'hygiène publique de France (CSHPPF). Les éthers de glycols dans les produits de consommation et la santé. Groupe d'experts du CSHPPF, section des milieux de vie. Rapport d'avancement au Directeur Général de la Santé. Juin 2002.

enHealth Council. Environmental health risk assessment. Guidelines for assessing human health risks from environmental hazards. Department of health and ageing and enHealth Council. Commonwealth of Australia. Juin 2002.

European centre for ecotoxicology and toxicology of chemicals (ECETOC). Derivation of assessment factors for human health risk assessment. Technical Report n°86, Bruxelles, Février 2003.

European centre for ecotoxicology and toxicology of chemicals (ECETOC). Reproductive and general toxicology of some inorganic borates and risk assessment for human beings. Technical Report N°63, Bruxelles, Février 1995.

European chemicals agency (ECHA). DNEL/DMEL derivation from human data. Draft Rev.:0. Février 2010.

European chemicals bureau (ECB). Technical guidance document in Support of Commission Directive 93/67/EEC on Risk assessment for new notified substances. Commission Regulation (EC) No 1488/94 on Risk assessment for existing substances. Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council concerning the placing of biocidal products on the market. Part I. European Commission; 2003.

Institut national de la santé et de la recherche médicale (Inserm). Cancer et environnement. Expertise collective. Afsset. 2008.

Institute for environment and health (IEH). Uncertainty factors: Their use in human health risk assessment by UK Government. The Interdepartmental group on health risks from chemicals (IGHRC). Leicester. Royaume-Uni. 2003.

International programme on chemical safety (IPCS). Assessing human health risks of chemicals: derivation of guidance values for health-based exposure limits. Environmental Health Criteria N°170. World Health Organization, Genève. 1994.

International programme on chemical safety (IPCS). IPCS Harmonization Workshop—Conceptual framework for cancer risk assessment. Circ, Lyon, France. February 16–18, 1999. IPCS/99.6. 1999.

KEMI, The Swedish National Chemicals Inspectorate. Human health risk assessment: Proposals for the use of assessment (Uncertainty factors). Application to risk assessment for plant protection products, industrial chemicals and biocidal products within the European Union. Report n°1/03. Janvier 2003. Stockholm.

Office of environmental health and hazard assessment (OEHHA). Air toxics hot spots program risk assessment guidelines. The air toxics hot spots program guidance manual for preparation of health risk assessments. Oakland, Californie. Août 2003.

Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE). Guidance notes for analysis and evaluation of chronic toxicity and carcinogenicity studies. OECD Environment, health and safety publications. Series on testing and assessment n°35 and pesticides n°14. ENV/JM/MONO(2002)19. Septembre 2002.

Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE). Series on principles of Good laboratory practice and compliance monitoring. OECD principles on good laboratory practice (as revised in 1997). Number 1. 1998.

Science advisory board. Review of the Office of research and development's draft guidelines for cancer risk assessment by the Environmental health committee. EPA-SAB-EHC-97-010. Washington (DC): U.S. Environmental Protection Agency, Science Advisory Board; 1997.

United Nations Scientific committee on the effects of atomic radiation (UNSCEAR). Ionizing radiation : sources and biological effects. United Nations New-York. 1982 :727-773

United States Environment protection agency (US EPA). A review of the reference dose and reference concentration processes. Prepared for the risk assessment Forum. U.S. Environmental protection agency. Washington, DC. Décembre, 2002. Final Report EPA/630/P-02/002F.

United States Environment protection agency (US EPA). Draft final guidelines for carcinogen risk assessment. EPA/630/P-03/001A. Washington (DC): U.S. Environmental Protection Agency, Risk Assessment Forum; 2003a.

United States Environment protection agency (US EPA). Guidelines for carcinogen risk assessment. EPA/630/R-00/004. Washington (DC): U.S. Environmental Protection Agency, Risk Assessment Forum; 1986.

United States Environment protection agency (US EPA). Guidelines for carcinogen risk assessment. NCEA-F-0644. Washington (DC): U.S. Environmental Protection Agency, Risk Assessment Forum; 1999.

United States Environment protection agency (US EPA). Guidelines for carcinogenic risk assessment. Risk assessment forum. US EPA. Washington DC. EPA/630/P-03/001B. 2005a.

United States Environment protection agency (US EPA). Methods for derivation of inhalation reference concentrations and application of inhalation dosimetry. Office of research and environmental protection development. Washington DC 20460. EPA/600/8-90/066F. Octobre 1994.

United States Environment protection agency (US EPA). Proposed guidelines for carcinogen risk assessment. EPA/600/P-92/003C. Washington (DC): U.S. Environmental Protection Agency, Office of Research and Development; 1996.

United States Environment protection agency (US EPA). Supplemental guidance for assessing cancer susceptibility from early-life exposure to carcinogens. EPA/630/R-03/003. Washington (DC): U.S. Environmental Protection Agency, Risk Assessment Forum Technical Panel; 2003b.

United States Environment protection agency (US EPA). Supplemental guidance for assessing susceptibility from early-life exposure to carcinogens. Risk assessment forum. US EPA. Washington DC. EPA/630/R-03/003F. 2005b.

Umwelt Bundesamt (UBA) Schneider K. Zur Frage von Unterschieden der Empfindlichkeit von Kindern gegenüber krebserzeugenden Stoffen im Vergleich zu Erwachsenen. Dans : Eikmann T., Heinrich K., Heinzow B., Konietzka K. : Gefährdungsabschätzung von Umweltschadstoffen.

Ergänzbare Handbuch: Toxikologische Basiswerte und ihre Bewertung, Erich Schmidt Verlag Berlin, Bielefeld, München : Kennzahl B100.Vorhaben 295 74 124. 2001.

9.3 Publications scientifiques

Bhogal N, Grindon C, Combes R and Balls M. Toxicity testing: creating a revolution based on new technologies. *Trends in biotechnology*. 2005 Jun;23(6):299-307.

Bolt H.M, Foth H., Hengstler J.G, Degen G.H. Carcinogenicity categorization of chemicals. New aspects to be considered in a European perspective. *Toxicol Lett* 2004; 151:29-41.

Cohen SM. An enhanced 13-week bioassay: an alternative to the 2-year bioassay to screen for human carcinogenesis. *Exp Toxicol Pathol*; 2009.

Dennis C. Epigenetics and disease: altered states. *Nature* 2003 Feb; 421 (6924):686-688.

Dorne JL, Walton K, Renwick AG. Uncertainty factors for chemical risk assessment. Human variability in the pharmacokinetics of CYP1A2 probe substrates. *Food Chemical Toxicol*. 2001;39(7):681-696.

Dorne JL, Walton K, Slob W, Renwick AJ. Human variability in polymorphic CYP2D6 metabolism: is the kinetic default uncertainty factor adequate? *Food Chemical Toxicol*. 2002;40(11):1633-1656.

Eisenbrand G., Schlemmer K., Junzowski C. Combination effects influencing the host situation : Tools of elucidation of metabolic pathways. In : Combination effects in chemical carcinogenesis, Schmähl D. (1986). VCH Weinheim.

Ellinger-Ziegelbauer H, Aubrecht J, Kleinjans JC, Ahr HJ. Application of toxicogenomics to study mechanisms of genotoxicity and carcinogenicity. *Toxicol Lett*. 2009 Apr 10;186(1):36-44.

Garro A., Seitz H., Lieber C. Enhancement of dimethylnitrosamine metabolism and activation to a mutagen following chronic ethanol consumption. *Cancer research* 1981;41:120-124.

Hill B. The environment of disease: association or causation? *Proc R Soc Med* 1965; 58:295-300.

Hunkelbach H.D. & Wolf T. Quantitative Dosiswirkungs-Analysen, Einzelsubstanzen und Kombinationen. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart – New-York. 1985.

Imbernon E. Estimation du nombre de cas de certains cancers attribuables à des facteurs professionnels en France. Institut de veille sanitaire. Département Santé Travail. 2003.

Keenan C. *et al*. The North American control animal database: a resource based on standardized nomenclature and diagnostic criteria. *Toxicol Pathol* 2002; 30 (1):75-79.

Kittel B *et al*. Revised guides for organ sampling and trimming in rats and mice – Part 2. A joint publication of the RITA and NACAD groups. *Exp Toxic Pathol* 2004; 55: 413–431.

Klimisch H.-J., Andreae M., Tillmann U. A systematic approach for evaluating the quality of experimental toxicological and ecotoxicological data. *Regul Toxicol Pharmacol* 1997; 25:1-5.

Kumaravela TS, Jha AN. Reliable Comet assay measurements for detecting DNA damage induced by ionising radiation and chemicals. *Mutat Res/Genetic Toxicol Env Mutagenesis*. Volume 605, Issues 1-2, 16 Juin 2006, Pages 7-16.

Künstler K., Klein G. Mathematical approaches in combination effects. Dans : Schmähl D.: Combination effects in chemical carcinogenesis. VCH, Weinheim, 1986:31-43.

- Lewandowski TA, Rhomberg LR. A proposed methodology for selecting a trichloroethylene inhalation unit risk value for use in risk assessment. *Reg Toxicol and Pharmacol* 41 (2005):39–54.
- Malkiewicz K, Hansson SO, Rudén C. Assessment factors for extrapolation from short-time to chronic exposure—Are the REACH guidelines adequate? *Toxicol Letters*, Volume 190, Issue 1, 8 Octobre 2009, Pages 16-22.
- McHale CM, Zhang L, Hubbard AE, Smith MT. Toxicogenomic profiling of chemically exposed humans in risk assessment. *Mutat Res*. 2010 Apr 9. (En cours d'impression).
- Meek ME, Bucher JR, Cohen SM, Dellarco V, Hill RN, Lehman-McKeeman LD, Longfellow DG, Pastoor T, Seed J, Patton DE. A framework for human relevance analysis of information on carcinogenic modes of action. *Crit Rev Toxicol*. 2003;33(6):591-653.
- Morawietz G *et al.* Revised guides for organ sampling and trimming in rats and mice – Part 3. A joint publication of the RITA and NACAD groups. *Exp Toxic Pathol* 2004; 55: 433–449.
- Mullot JU, Solal C, Bonvallot N, Zmirou D. Méthodes de construction de valeurs toxicologiques de référence (VTR) pour les substances chimiques cancérogènes. *Environnement Risques et Santé*. 2006; 5(3):181-189.
- Mutation Research/Reviews in mutation research. Volume 681. Issue 1. Janvier-Février 2009:1-109.
- Pool B.L. Short term tests as tool in the identification of combinations and of combination effects in carcinogenesis. Dans Schmähl D.: Combination effects in chemicals carcinogenesis. VCH Weinheim, 1986:45-64.
- Renwick AG. Symposium paper: Safety factors and establishment of acceptable daily intakes. *Food Additives and Contaminants*. 8(2), 1991: 135-150.
- Renwick AG. The use of safety or uncertainty factors in the setting of acute reference doses. *Food Additives and Contaminants*. 2000a; 17(7):627-635.
- Renwick AG, Dorne JL, Walton K. An analysis of the need for additional uncertainty factor for infants and children. *Reg Toxicol Pharmacol*. 2000b; 31(3):286-296.
- Ruehl-Fehlert C *et al.* Revised guides for organ sampling and trimming in rats and mice – Part 1. A joint publication of the RITA and NACAD groups. *Exp Toxic Pathol* 2003; 55: 91–106.
- Schneider K. Unterschiede in der Empfindlichkeit von Kindern gegenüber krebserzeugenden Stoffen im Vergleich zu Erwachsenen. UFP Umweltmedizinische Forschungspraxis, 1999; Nr. 3: 155-162.
- Schwarz M., Buchmann A., Wiesbeck G., Kunz W. Effect of ethanol on early stages in nitrosamine carcinogenesis in rat liver. *Cancer lett*. 1983;20:305-312.
- Sonich-Mullin C., Fielder R., Wiltse J., Baetcke K., Dempsey J., Fenner-Crisp P., Grant D., Hartley M., Knaap A., Kroese D., Mangelsdorf I., Meek E., Rice J. M. and Younes M. IPCS Conceptual Framework for Evaluating a Mode of Action for Chemical Carcinogenesis. *Regul Toxicol Pharmacol* 34, 146–152 (2001).
- Tennekes H., Gembardt C., Dammann M., Van Ravenzwaay B. The stability of historical control data for common neoplasms in laboratory rats: adrenal gland (medulla), mammary gland, liver, endocrine pancreas and pituitary gland. *Regul Toxicol Pharmacol* 2004a; 40:18-27.

Tennekes H., Kaufmann W., Dammann M., Van Ravenzwaay B. The stability of historical control data for common neoplasms in laboratory rats and the implications for carcinogenic risk assessment. *Regul Toxicol Pharmacol* 2004b; 40:293-304.

Thuret A. Evaluation des risques sanitaires et environnementaux : évaluation des incertitudes associées à la détermination des valeurs toxicologiques de référence. Thèse présentée à la faculté de pharmacie de Dijon pour l'obtention du diplôme d'état de docteur en pharmacie. 25 juin 2004. Université de Bourgogne. Faculté de Pharmacie.

Van Landingham CB, Allen BC, Shipp AM, Crump KS. Comparison of the EU T25 single point estimate method with benchmark dose response modeling for estimating potency of carcinogens. *Risk Anal.* 2001 Aug;21(4):641-56.

Walton K, Dorne JL, Renwick AG. Uncertainty factors for chemical risk assessment: interspecies differences in the *in vivo* pharmacokinetics and metabolism of human CYP1A2 substrates. *Food Chemical Toxicol.* 2001;39(7):667-680.

Watson R.E., McKim J.M., Cockerell G.L., Goodman J.I. The value of DNA methylation analysis in basic, initial toxicity assessments. *Toxicol Sci* 2004 May; 79(1):178-88.

Zhou T, Chou J, Watkins PB, Kaufmann WK. Toxicogenomics: transcription profiling for toxicology assessment. *EXS.* 2009;99:325-66.

ANNEXES

Annexe 1 : Synthèse des déclarations publiques d'intérêts des experts par rapport au champ de l'auto-saisine

RAPPEL DES RUBRIQUES DE LA DECLARATION PUBLIQUE D'INTERETS

IP-A	Interventions ponctuelles : autres
IP-AC	Interventions ponctuelles : activités de conseil
IP-CC	Interventions ponctuelles : conférences, colloques, actions de formation
IP-RE	Interventions ponctuelles : rapports d'expertise
IP-SC	Interventions ponctuelles : travaux scientifiques, essais, etc.
LD	Liens durables ou permanents (Contrat de travail, rémunération régulière ...)
PF	Participation financière dans le capital d'une entreprise
SR	Autres liens sans rémunération ponctuelle (Parents salariés dans des entreprises visées précédemment)
SR-A	Autres liens sans rémunération ponctuelle (Participation à conseils d'administration, scientifiques d'une firme, société ou organisme professionnel)
VB	Activités donnant lieu à un versement au budget d'un organisme

SYNTHESE DES DECLARATIONS PUBLIQUES D'INTERETS DES MEMBRES DU CES PAR RAPPORT AU CHAMP DE L'AUTO-SAISINE

BADOT Pierre-Marie	30 octobre 2009
Aucun lien déclaré	
Analyse Afsset : /	
BEAUSOLEIL Claire	Démission en juillet 2009
Analyse Afsset : N'a pas participé aux travaux	
BELZUNCES Luc	29 octobre 2009
VB	
Étude du mode d'action de l'acétamipride financée par Aventis donnant lieu à versement à l'organisme d'appartenance (INRA) (10 % du budget du laboratoire) (2001-2003)	
Analyse Afsset : Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la thématique de l'auto-saisine	
CÉZARD Christine	19 décembre 2006
N'a pas participé aux travaux	
Analyse Afsset : /	
DESLAURIERS Michel	29 octobre 2009
LD	

	Médecin du travail au sein d'EDF-GDF.	
Analyse Afsset :	Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la thématique de l'auto-saisine	
EMPEREUR-BISSONNET	Pascal	30 novembre 2009
	Aucun lien déclaré	
Analyse Afsset :	/	
ENRIQUEZ	Brigitte	25 juin 2009
	Aucun lien déclaré	
Analyse Afsset :	/	
FARDEL	Olivier	26 juin 2007
	VB	
	Collaboration scientifique avec EDF-SEM (Service des études médicales) donnant lieu à versement à l'organisme d'appartenance (Université de Rennes I) (6 % du budget du laboratoire) (2007-2009)	
Analyse Afsset :	Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la thématique de l'auto-saisine	
FÉNET	Hélène	20 septembre 2007
	N'a pas participé aux travaux	
Analyse Afsset :	/	
FERRARI	Luc	11 octobre 2007
Analyse Afsset :	Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la thématique de l'auto-saisine	
FONTANA	Luc	26 octobre 2009
Analyse Afsset :	Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la thématique de l'auto-saisine	
FOUILHÉ SAM-LAÏ	Nathalie	20 septembre 2007
Analyse Afsset :	Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la thématique de l'auto-saisine	
GOUGET	Barbara	08 février 2008
Analyse Afsset :	Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la thématique de l'auto-saisine	
GUENOT	Dominique	26 octobre 2009
	Aucun lien déclaré	
Analyse Afsset :	/	
GUERBET	Michel	29 octobre 2009
	Aucun lien déclaré	
Analyse Afsset :	/	
HUYNH	Cong Khanh	26 octobre 2009
	Aucun lien déclaré	

Analyse Afsset : /		
LAFON	Dominique LD Médecin du travail (coordinateur médical) groupe Dassault Falcon Services Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la thématique de l'auto-saisine	12 novembre 2009
Analyse Afsset : /		
LALÈRE	Béatrice Aucun lien déclaré	24 octobre 2009
Analyse Afsset : /		
LAUDET	Annie Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la thématique de l'auto-saisine	20 septembre 2007
Analyse Afsset : /		
LEPOITTEVIN	Jean-Pierre IP-SC Financement de thèses par L'Oréal jusqu'en 2006, par le COLIPA (The European Cosmetic Toiletry and Perfumery Association) jusqu'en 2007 et par Firmenich jusqu'en 2009 au bénéfice de l'organisme d'appartenance (Université de Strasbourg I) Contrat en préparation avec le COLIPA au bénéfice de l'organisme d'appartenance (Université de Strasbourg I) IP-AC Conseil Sécurité produits chez L'Oréal donnant lieu à versement à l'organisme d'appartenance (Université de Strasbourg I) Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la thématique de l'auto-saisine	20 novembre 2009
Analyse Afsset : /		
MACHEREY	Anne-Christine Aucun lien déclaré	26 juin 2007
Analyse Afsset : /		
MÉNÉTRIER	Florence Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la thématique de l'auto-saisine	18 novembre 2009
Analyse Afsset : /		
PFOHL-LESZKOWICZ	Annie Aucun lien déclaré	10 novembre 2009
Analyse Afsset : /		
PICART	Daniel Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la thématique de l'auto-saisine	23 octobre 2009
Analyse Afsset : /		
ROUDOT	Alain-Claude Aucun lien déclaré	27 octobre 2009

Analyse Afsset : /		
SECRETAN	Béatrice	27 octobre 2009
Analyse Afsset : Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la thématique de l'auto-saisine		
STEENHOUT	Anne	20 novembre 2009
IP-CC		
Évaluation de projets pour Ecetoc (2002) donnant lieu à versement à l'organisme d'appartenance (Université Libre de Bruxelles - ULB)		
VB		
Participation à un programme de recherche « Méthodologie générale » financé par le CEFIC (European Chemical Industry Council) sur l'exposition des consommateurs, donnant lieu à versement à l'organisme d'appartenance (Université Libre de Bruxelles - ULB)		
Analyse Afsset : Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la thématique de l'auto-saisine		
TARDIF	Robert	20 novembre 2009
VB		
HTH, ARJOWIGGINS, SOFILETA, ALCEN, TRONICO, FAUR INGÉNIERIE, EDF, ANDRA, AREVA, DEBIOPHARM, PHILIPS [Principaux contrats de collaboration scientifique] [Laboratoire CEA] [< 50 % du budget du laboratoire]		
Analyse Afsset : Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la thématique de l'auto-saisine		
THYBAUD	Éric	7 novembre 2008
N'a pas participé aux travaux		
Analyse Afsset : /		

SYNTHESE DES DECLARATIONS PUBLIQUES D'INTERETS DES RAPPORTEURS DU CES (FIN DE MANDAT EN 2006) PAR RAPPORT AU CHAMP DE L'AUTO-SAISINE

KARG	Frank	11 octobre 2005
PF		
HPC A.G. ; HPC Envirotec S.A. (Actions)		
LD		
HPC Envirotec SA (Employeur) ; IHIE (Contrat de vacation)		
Analyse Afsset : Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la thématique de l'auto-saisine		

SYNTHESE DES DECLARATIONS PUBLIQUES D'INTERETS DES MEMBRES DU GT PAR RAPPORT AU CHAMP DE L'AUTO-SAISINE**MULLOT Jean-Ulrich**

24 octobre 2009

Analyse Afsset : Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la thématique de l'auto-saisine.**ORGANISME-EXPERT PARTICIPANT**

L'Afssa a été représentée par Mme Marie-Odile RAMBOURG et M. Sébastien GARRY, qui a démissionné en juillet 2009.

Les centres antipoison ont été représentés par MM Alain BAERT (CAPTV Rennes) et Philippe SAVIUC (CTV Grenoble). Ils n'ont pas participé aux travaux.

Le Centre international de recherche sur le cancer (Circ) a été représenté par Mme Fatiha EL GHISSASSI.

Le Commissariat à l'énergie atomique (CEA) a été représenté par M. Rémy Maximilien.

L'Ineris a été représenté par Mme Blandine DOORNAERT, qui a démissionné en juillet 2007 et n'a pas été remplacée.

L'Inra a été représenté par M. Roger RAHMANI.

L'INRS a été représenté par M. Michel FALCY.

L'Inserm a été représentée par Mme Marie-Agnès PELISSIER.

L'InVS a été représenté par M. Pascal EMPEREUR-BISSONNET.

L'IRSN a été représenté par Mme Cécile CHALLETON DE VATHAIRE.

L'UIC a été représentée par M. Patrick Lévy, qui a démissionné en janvier 2008 et n'a pas été remplacé.

Annexe 2 : Grille de lecture des études épidémiologiques

Afin d'évaluer la qualité des études épidémiologiques disponibles et de sélectionner le cas échéant l'étude clé pour la construction d'une VTR cancérigène, il est proposé d'utiliser une grille de lecture des études épidémiologiques permettant d'identifier leurs faiblesses et limites, faisant appel au jugement d'experts à chacune des étapes décisionnelles.

- Construction de l'étude, objectifs et hypothèses

Le contexte, les objectifs de l'étude et/ou les hypothèses testées sont-ils clairement indiqués dès l'introduction ?

Sont-ils suffisamment étayés par une revue bibliographique ?

Le choix du type d'étude (cohorte, cas-témoins, expérimental...) est-il clairement indiqué, discuté et pertinent dans ce contexte ?

Les contraintes particulières à ce type d'études sont-elles identifiées dès l'introduction (choix du groupe témoin dans les études cas-témoins : description précise, taille du groupe témoin, origine des témoins...) ?

Est-il fait mention du respect de toutes les bonnes pratiques applicables (épidémiologiques, cliniques, informatiques...) ?

- Sélection, caractérisation et représentativité de la population étudiée

Les critères de sélection de la population étudiée sont-ils indiqués ? Sont-ils adéquats vis-à-vis des objectifs ?

Comment a été effectué l'éventuel échantillonnage ?

La population source échantillonnée est-elle vraiment celle visée dans les objectifs ? Notamment, dans le cas d'une population de travailleurs, quel est le sex-ratio et est-il représentatif de la population générale ?

D'éventuels biais de sélection sont-ils discutés ?

Les groupes « témoins » et « cas » ou « exposés » et « non exposés » ne diffèrent-ils réellement que par les facteurs étudiés ?

Les deux groupes sont-ils suivis exactement avec les mêmes moyens (biais de classement) ?

Les facteurs de confusion/ biais habituels ont-ils été contrôlés lors de la sélection : santé moyenne de la population, régime alimentaire, style de vie, lieu de vie, biais de mémorisation éventuel... ?

- Mesure des expositions

Comment sont documentées le niveau, la fréquence, la date par rapport à l'étude/aux effets, la durée et la voie d'exposition au(x) substance(s) ?

Les moyens utilisés ont-ils été validés (détails fournis ou bibliographie) ? Dans le cas de données analytiques, correspondent-elles à des mesurages moyens, réglementaires ou en situation accidentelle (surestimation de la dose moyenne) ?

Les incertitudes liées aux mesures d'expositions sont-elles discutées et quelle peut-être leur influence sur les résultats finaux ? (surestimation, sous-estimation, confusion...) ?

La variable d'exposition retenue est-elle pertinente vis-à-vis de l'objectif de l'étude (dose moyenne, aiguë, cumulée...) ?

Les éventuelles expositions professionnelles sont-elles prises en compte dans les études non professionnelles et les expositions environnementales/alimentaires dans le cas contraire ? Idem pour l'air intérieur et l'air extérieur ?

Est-ce la dose efficace qui est mesurée (biomarqueurs), un intermédiaire (cas des métabolites toxiques), un traceur ou une variable de confusion (sous-produit, Co-émission) ? Dans le cas d'une mesure de la dose efficace, la relation avec l'exposition est-elle clairement établie ?

L'éventail des expositions est-il suffisamment large, notamment au vu des variations intra-individuelles pour construire une relation dose-réponse représentative des situations réelles ?

- Mesure de l'effet sanitaire

La définition de l'effet sanitaire est-elle claire, explicitée, consensuelle, discutée ? Ecarte-t-elle tout risque de biais de classification ?

Cet effet correspond-il réellement à un effet néfaste ? Si oui, correspond-il à un effet critique ? Cet effet est-il spécifique de l'exposition et dans le cas contraire, les autres facteurs de risque ont-ils été pris en compte comme facteurs de confusion ?

Cet effet est-il cohérent avec les objectifs de l'étude ?

La mesure de l'effet sanitaire est-elle décrite ? Quel est le degré de complétude et de certitude de cette mesure ?

La variable de quantification du risque est-elle pertinente (Risque Relatif, Odds Ratio...) ?

- Durée de l'étude

La durée de l'étude permet-elle un suivi suffisant des personnes pour mettre en évidence la/les maladie(s) ?

Comment est appréhendé l'éventuel problème du temps de latence ?

Les biais potentiellement introduits par les perdus de vue sont-ils pris en compte ?

Considérations statistiques ?

Les facteurs de confusion et biais particuliers au contexte sont-ils identifiés *a priori* (de par la bibliographie) ou *a posteriori* ?

Sont-ils contrôlés par des moyens statistiques ou une stratification ? Sont-ils discutés ?

La taille des groupes est-elle suffisante pour détecter une différence (sensibilité/puissance) ? A-t-elle été calculée avant ou après l'étude ?

Les méthodes de recueil des données ont-elles été appliquées pour retrouver les données manquantes et pour contrôler la qualité des données ?

Les outils statistiques sont-ils présentés ? Sont-ils appropriés (type de test, mono ou bilatéral selon l'objectif) ?

Les hypothèses sous-jacentes aux tests statistiques sont-elles globalement respectées ? Discutées ? Y a-t-il indépendance des cas (sinon outils statistiques différents) ?

Les tests statistiques ne sont-ils réellement utilisés que pour tester les hypothèses présentées dans l'introduction ? Dans le cas contraire, la multiplication des tests entraîne un risque d'observer une relation statistiquement significative par le simple fait du hasard (ex : si $\alpha = 0,05$ et si 20 tests indépendants sont réalisés à la suite, 1 des tests sera forcément significatif).

Les estimations synthétiques choisis sont-ils cohérents avec la distribution des variables (moyenne géométrique et distribution log-normale, moyenne arithmétique, rangs...) ?

Les mesures elles-mêmes ne modifient-elles pas la nature des cas/ effets (influence de l'observation sur la maladie ou sur l'exposition pour les cohortes) ?

- Présentation des résultats

Chaque résultat important est-il assorti d'une estimation des erreurs de première et de deuxième espèce ?

Les résultats sont-ils présentés clairement ? Complètement (statistiques descriptives générales notamment pour juger la population source ainsi que les résultats) ?

Les résultats répondent-ils aux objectifs présentés en introduction ?

Peut-on vérifier tous les calculs importants avec les données fournies ?

- Causalité

Les arguments habituels en faveur de la causalité sont-ils discutés ?

- Cohérence avec d'autres études, reproductibilité des résultats
- Force de l'association
- Temporalité, latence
- Relation dose-réponse (non exclusif par défaut probable de puissance)
- Plausibilité biologie
- Cohérence avec des données différentes (cinétique, données animales...)

- Mise en évidence dans des conditions expérimentales contrôlées (ou proches), unidirectionnalité
- Analogie (relation structure activité)
- Cas particulier des méta-analyses

Les données utilisées sont plutôt des données brutes ou des données agrégées ?

Quels sont les critères d'inclusion ?

Les études ont-elles été pondérées en fonction de la précision des évaluations ?

Le biais de publication est-il discuté ? Les moyens mis en œuvre pour le contourner sont-ils présentés ?

L'hétérogénéité des résultats des études individuelles (variabilité « naturelle » du phénomène observé ou effet d'un sous-groupe en particulier, d'une méthodologie...) est-elle discutée ? Dans ce dernier cas, quelle est la pertinence de grouper les données ?

Etude de sensibilité : varier les paramètres extraits des études sources, exclusion/ inclusion d'autres études et vérifier la stabilité des résultats.

Des méthodes statistiques particulières et adaptées ont-elles été utilisées (évaluation moyenne/synthétique) ?

Annexe 3 : Grille de lecture des études toxicologiques

La description des études toxicologiques et l'évaluation de leur validité et de leur pertinence permettent de choisir la ou les études clés pour la construction d'une VTR cancérogène. Dans cet objectif, il est proposé de se référer à une grille de lecture des études toxicologiques inspirée de la démarche proposée par Lewandowski *et al.* (2005).

- Conception de l'étude

Conception de l'étude toxicologique : répond-elle à un cadre méthodologique reconnu ou à une méthode standardisée (guidelines de l'OCDE, protocole réglementaire...) ?

L'étude a été réglementée selon les recommandations émises par les BPL ?

Des informations précises sont-elles données concernant l'espèce, la race, la souche, le sexe et l'âge des animaux utilisés ?

Quel est le nombre d'animaux testés ?

Quelles sont les gammes et le nombre de doses répétées ? Ces choix sont-ils justifiés ? Quelle est la durée et la fréquence d'administration ?

La DMT est-elle dépassée dans la cadre cette étude ?

Quelle est la pureté de la substance testée ? son caractère volatil ? Sa stabilité dans le milieu d'exposition choisi ? Sa composition et son origine ?

La voie d'administration est-elle définie ? Le véhicule utilisé est-il précisé ? Dans le cas d'une exposition par voie orale, s'agit-il d'une administration *via* la nourriture ou d'un gavage ? Quelle est la composition du régime alimentaire des animaux ?

Quelles sont les maladies ou infections recensées dans la population animale soumise à une expérimentation ?

Le schéma de conduite de l'étude est-il défini et décrit ?

L'exposition à la substance testée est-elle mesurée (précision de la dose administrée) ?

- Données collectées chez l'animal : mesure des effets toxicologiques

Quelles sont les données collectées (analyses hématologiques, biochimiques, poids des organes, observations et caractérisation anatomopathologique...) ?

Le domaine d'observation est-il défini *a priori* Quel est le degré de précision et de définition des effets mesurés ?

L'adéquation des moyens mis en œuvre pour les mesures sont-ils précisés (détection certaine, incertitudes assorties...) ? Les méthodes d'analyse sont-elles décrites ?

Quel est le degré de précision dans l'enregistrement des effets toxicologiques et des observations cliniques observés ? Quel est le degré de description des effets observés ?

Durée de l'étude ?

Dans le cas d'une étude de cancérogenèse, quelles est la durée exacte de l'expérimentation ?

Des informations sont-elles données sur des événements imprévus intercurrents chez l'animal (épidémie, mort prématurée...) ? Si oui, comment ces données influencent-elles l'évaluation globale des résultats obtenus ?

Des informations sont-elles données sur des événements imprévus intercurrents relatifs à la conduite de l'étude (manquement dans l'administration régulière de la substance, contrôle de la température non maintenu...) ? Si oui, comment ces données influencent-elles l'évaluation globale des résultats obtenus ?

- Interprétation des résultats

Les résultats observés correspondent-ils à tous les domaines d'observation initialement définis ? Sinon, quelles en sont les raisons ?

Des données témoins concurrentes de l'étude sont-elles disponibles ?

Les données historiques du laboratoire sont-elles disponibles ?

Des informations sont-elles disponibles sur les doses administrées (avec si possible les résultats du contrôle d'analyse chimique) ?

Existe-t-il une relation dose-effet ou dose-réponse ?

- Pertinence de l'étude pour la construction de VTR cancérogènes pour des voies d'exposition différentes

Quelle est la pertinence des données disponibles pour évaluer quantitativement la relation dose-réponse au regard du choix des niveaux de doses testés, du nombre et de l'espacement de ces doses et de l'utilisation d'effets observés bien définis ? Si une relation dose-réponse peut-être définie, quelle est son allure (pente, forme...) ?

La voie d'administration est-elle cohérente avec la voie d'exposition chez l'homme ?

Le schéma d'administration (fréquence, durée, dose) est-il cohérent avec la situation d'exposition chez l'homme ?

Quelles sont les différences ou les similitudes connues entre l'espèce expérimentale retenue et l'homme ?

Quelle es la cohérence globale entre le protocole expérimental et les conditions réelles d'exposition environnementales (telles que les co-expositions) ?

Annexe 4 : Grille de lecture des tests de génotoxicité

Afin d'évaluer la qualité et la pertinence des tests de génotoxicité, des informations et des données sont nécessaires dans le cadre des études menées *in vitro* (hors méthodes standard de reconnaissance nationale ou internationale). Ces critères sont proposés notamment par le système de cotation de Klimisch, le TGD et par d'autres organismes internationaux.

Quel est le degré de pureté de la substance testée ? Sa composition et son origine ?

Les propriétés physico-chimiques de la substance sont-elles précisées (pH, solubilité de la substance, stabilité, volatilité...) ? Sont-elles identiques aux conditions d'exposition humaine ? L'effet écotoxique observé est-il lié à l'effet physico-chimique propre (pH, osmolarité par exemple) ?

Les propriétés physico-chimiques, l'osmolarité du mélange ou de l'excipient utilisé sont-ils précisés ?

Le choix de l'espèce animale ou de la souche cellulaire testée est-il précisé et justifié ? Les conditions de bioactivation sont-elles précisées ? Si un OGM est utilisé, des informations qualitatives ou mécanistique sont-elles disponibles pour interpréter un autre test ?

Le choix du matériel et de la méthode est-il défini précisément ?

Doses testées : les mécanismes sont-ils identiques à toutes les doses (présence d'une cytotoxicité à des doses trop élevées non spécifique à la génotoxicité de la substance) ? Quel est le positionnement des doses testées par rapport à la DMT ?

Y a-t-il des données sur le rapport dose-concentration dans le système test ?

Quelle est la cohérence des résultats ?

- Répétitivité et reproductibilité
- Cohérence entre des tests différents
- In vitro* et *in vivo*
- Avec la structure de la molécule (QSAR)
- Avec d'autres données mécanistes

Dans le cas de la mise en évidence d'effets prolifératifs, s'agit-il d'une action sur la régulation de la mitose (effets mitogènes) ou d'une régénération suite à une cytotoxicité ?

Des données sur les effets indésirables pouvant avoir un effet sur les résultats de l'étude (solubilité, impuretés, variation de pH, impact sur l'osmolarité...) sont-elles disponibles ?

Quel est le taux de validation de la méthode du test ? Respecte-t-il les BPL, les guidelines validés par la communauté scientifique internationale ?

Des références prouvant l'adéquation de la méthode employée sont-elles disponibles ?

Des contrôles positifs et négatifs sont-ils utilisés ? Quel est le degré de description de ces contrôles ?

Existe-t-il un effet sexe dépendant (qualitativement) ?

Peut-on définir une relation dose-réponse ? Quelle est la force des associations ?

En cas de résultat négatif, s'agit-il d'un résultat isolé ? S'agit-il d'un résultat issu d'une méthode validée ? Les concentrations ont-elles été maintenues pendant le test (forte volatilité de la substance par exemple) ? La substance a-t-elle atteint sa cible lors des tests *in vivo* ?

Annexe 5 : Paramètres épidémiologiques

La force d'association entre l'exposition à une substance chimique et la survenue de cancer est estimée par divers paramètres épidémiologiques. Les définitions présentées ci-dessous proviennent de l'annexe 3 du rapport d'expertise collective de l'Inserm « Cancer et environnement » (2008).

Le **risque relatif (RR)** est le rapport des taux de survenue de la maladie étudiée chez les individus exposés et non exposés (ou encore chez des individus de niveaux d'exposition différents). Il est estimable à partir des études de cohorte dans lesquelles la survenue de nouveaux cas au cours du temps est observée en fonction de l'exposition relevée au préalable. Le RR n'est pas directement estimable à partir des études cas-témoins dans lesquelles on observe la prévalence de l'exposition en fonction du statut cas ou témoin.

L'**Odds ratio (OR)** représente la probabilité d'être malade sur la probabilité de ne pas l'être chez les individus exposés et non exposés (ou encore chez des individus de niveaux d'exposition différents). Il ne peut être estimé qu'à partir des études cas-témoins. Dans les situations où la maladie est peu fréquente ou dans les situations où la population peut être considérée comme homogène en termes d'exposition, l'Odds ratio représente une très bonne approximation du risque relatif, ce qui confère tout son intérêt.

L'**excès de risque relatif (ERR)** est une mesure du changement du risque relatif de maladie ou de décès (le plus souvent, par unité de dose reçue) pour un groupe d'individus exposés à un niveau connu, par rapport à ceux qui ne sont pas exposés ($ERR = RR - 1$) ou encore pour deux groupes d'individus de niveaux d'exposition différents ($ERR = RR_2 - RR_1$ pour des niveaux d'exposition 1 et 2).

Le **ratio standardisé de mortalité (ou *standardized mortality ratio*, SMR)** est le rapport du nombre de décès observés dans une cohorte d'individus au nombre de décès attendus si le taux de mortalité de la population générale s'appliquait aux individus de cette étude. Un SMR supérieur à 1 implique que le taux de mortalité est plus élevé dans le groupe d'individus étudié par rapport à la population générale. Cette augmentation peut être interprétée comme liée à l'exposition plus élevée à un (ou des) facteur(s) de risque que dans la population générale. Le taux de mortalité de la population générale est calculé en fonction de l'âge et du sexe (standardisation sur l'âge et le sexe) et pour les années concernées. Ainsi, l'augmentation éventuelle du SMR peut s'interpréter comme étant indépendante de la composition en âge et en sexe de la cohorte.

Le **risque attribuable (RA) ou fraction de risque attribuable (FRA)** est une mesure d'impact qui rend compte de la survenue de nouveaux cas de la maladie au niveau de la population. Il n'a de sens que si l'exposition est un agent causal de la maladie étudiée. Il mesure la proportion de cas de la maladie que l'on peut attribuer au facteur de risque dans l'ensemble de la population. Il est fonction à la fois de la prévalence de l'exposition et du risque relatif (RR). Ainsi, si le risque relatif est faible ou modéré mais associé à une forte proportion de sujets exposés dans la population (forte prévalence de l'exposition), le risque attribuable peut être non négligeable.

Notes



agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail

253, avenue du Général Leclerc
94701 Maisons-Alfort Cedex
Tél. +33 1 56 29 19 30
afsset@afsset.fr
www.afsset.fr

ISBN 978-2-11-098866-9

