

# Valeurs toxicologiques de **référence** : méthodes d'**élaboration**



**Nathalie Bonvallot, Frédéric Dor**

*Institut de Veille Sanitaire*

*Département Santé Environnement*

*Unité Evaluation des Risques Sanitaires*

*Les auteurs remercient très chaleureusement Mesdames Claire Gourier-Fréry, Martine Ledrans, Marie-Odile Rambourg, Coralie Ravault (Département Santé Environnement, InVS) et Messieurs Frédéric-Yves Bois (Unité de Toxicologie Expérimentale, INERIS), Pascal Empereur-Bissonnet (Service d'Etudes Médicales, EDF-GDF), Philippe Quénel (Département Santé Environnement, InVS) pour leur relecture critique très constructive et leurs conseils précieux pour la rédaction de ce rapport.*





# Résumé

Les professionnels de santé publique utilisent des valeurs toxicologiques de référence (VTR) afin de caractériser certains risques sanitaires encourus par les populations. Ces VTR sont des indices qui établissent la relation entre une dose externe d'exposition à une substance toxique et la survenue d'un effet nocif. Avant de choisir et d'utiliser une VTR, il est nécessaire de s'assurer de sa pertinence pour le contexte étudié.

Le choix de la VTR est, à l'heure actuelle, guidé par le respect de certains critères de sélection conventionnels. Les principaux sont la mise à jour récente de la VTR, la notoriété de l'organisme producteur, la transparence des résultats, l'adéquation entre les durées et les voies d'exposition des protocoles expérimentaux et celles de la population, la préférence des données humaines sur les données animales. A qualité scientifique égale, la valeur la plus conservatrice pour la santé humaine est retenue. Cette analyse simplifiée conduit les évaluateurs à faire des choix parfois pénalisants ou mal adaptés à la situation étudiée.

Ces premiers critères s'appuient peu sur les méthodes de construction des VTR. L'objectif de ce document est de décortiquer ces méthodes, d'analyser la qualité des données nécessaires et d'appréhender les modèles mathématiques utilisés afin d'apprécier s'il est possible d'intégrer cette dimension lors de l'étape de sélection.

Les VTR sont généralement établies par des instances internationales ou nationales, et sont spécifiques d'un effet, d'une voie et d'une durée d'exposition. Les études animales sont la source principale de données toxicologiques du fait de la difficulté d'obtenir des résultats solides chez l'homme. Les méthodes d'élaboration ont à l'origine été dictées par les hypothèses admises sur les mécanismes d'action de la toxicité.

Pour les effets à seuil de dose, principalement les effets non cancérogènes, le schéma de construction se décompose systématiquement en trois étapes : (i) la détermination de l'effet critique, (ii) la détermination de la dose critique et (iii) l'application de facteurs d'incertitude qui tient compte notamment des différences entre espèces et individus et des variations entre les conditions expérimentales et les conditions réelles d'exposition de la population. Les indices déterminés (par exemple une dose journalière admissible) représentent un niveau d'exposition en deçà duquel il n'y aura pas de manifestations d'effets nocifs pour l'homme.

Pour les effets sans seuil de dose, principalement les effets cancérogènes génotoxiques, le schéma de construction se décompose en trois points sans ordre prédéfini : (i) la détermination d'un équivalent de dose pour l'homme, (ii) la modélisation des données expérimentales et (iii) l'extrapolation vers le domaine des faibles doses en passant généralement par l'origine. Les indices élaborés (par exemple un excès de risque unitaire) représentent la probabilité supplémentaire, par rapport à un sujet non exposé, qu'un individu contracte un cancer s'il est exposé pendant sa vie entière à une unité de dose de la substance incriminée.

L'analyse des méthodes de construction montre les évolutions actuelles :

- 1) *la remise en cause de la séparation dogmatique des méthodes de construction entre effets cancérogènes et non cancérogènes* en raison d'une meilleure connaissance des mécanismes d'action de la substance qui permet de préciser la présence ou l'absence de seuil.

2) *l'utilisation de l'ensemble des données observées au niveau expérimental pour établir une dose critique.* Ainsi, il est établi une « benchmark dose » qui correspond, dans la relation dose-réponse, à un niveau de réponse fixé a priori.

3) *la réduction des incertitudes,*

- *concernant l'extrapolation de l'animal à l'homme.* Une meilleure connaissance de la toxicocinétique et de la toxicodynamie permet, d'une part, de construire des modèles physiologiques pharmacocinétiques qui affinent la détermination de la dose critique et, d'autre part, d'abaisser les valeurs affectées aux facteurs d'incertitude. Ces données sont principalement obtenues chez l'animal et peuvent ainsi contribuer à remettre en cause l'utilisation préférentielle des données humaines (le cas de l'EGBE est démonstratif).
- *concernant la transposition d'une voie d'exposition à une autre.* La détermination de la dose interne permet d'établir le lien entre les doses externes administrées par les différentes voies d'exposition. La transposition s'avèrera envisageable notamment si la biodisponibilité de la substance est connue et l'effet indésirable identique quelle que soit la voie de pénétration.

Le renforcement de la précision des VTR passe par le soutien à des efforts de recherche tant sur les connaissances à acquérir chez l'animal et chez l'homme en matière de toxicocinétique et de susceptibilités individuelles, que sur les méthodes d'extrapolation vers les faibles doses où l'observation est problématique. La réduction des incertitudes à tous les niveaux doit être une priorité.

L'évaluateur doit s'assurer que la VTR s'appuie sur des données solides et que les méthodes de construction sont adaptées pour qu'au final, l'évaluation du risque soit menée dans les meilleures conditions possibles, dans un objectif de santé publique.



# Tables des matières

<b>1. Introduction</b> .....	<b>11</b>
<b>1.1. Contexte</b> .....	<b>11</b>
<b>1.2. Objectif du document</b> .....	<b>12</b>
<b>1.3. Les valeurs toxicologiques de référence</b> .....	<b>12</b>
<b>1.4. Effets à seuil – Effets sans seuil</b> .....	<b>13</b>
1.4.1. Relations dose-effet, relations dose-réponse .....	13
1.4.2. Effet critique .....	13
1.4.3. VTR des effets à seuil .....	14
1.4.4. VTR des effets sans seuil .....	15
<b>2. Méthodes de construction</b> .....	<b>17</b>
<b>2.1. Historique</b> .....	<b>17</b>
<b>2.2. Effets toxiques à seuil</b> .....	<b>18</b>
2.2.1. Schéma général de construction .....	18
2.2.2. Détermination de l'effet critique .....	19
2.2.3. Détermination de la dose critique .....	19
2.2.3.1. DMSENO ou NOAEL .....	19
2.2.3.2. DMENO ou LOAEL .....	20
2.2.3.3. BMD .....	20
2.2.4. Ajustements allométriques .....	21
2.2.5. Facteurs d'incertitude .....	22
2.2.6. Conditions d'utilisation des méthodes .....	25
2.2.6.1. NOAEL ou LOAEL .....	25
2.2.6.2. BMD .....	25
2.2.7. Avantages / limites .....	25
2.2.7.1. NOAEL ou LOAEL .....	25
2.2.7.2. BMD .....	26
2.2.8. Comparaison des deux approches .....	26
2.2.9. Exemples .....	27
2.2.9.1. Méthode traditionnelle : l'acétonitrile .....	27

2.2.9.2. Benchmark Dose : le 1,3-dichloropropène.....	28
2.2.10. Cas particulier des effets sur le développement embryofœtal et la reproduction.....	29
2.2.10.1. Généralités.....	29
2.2.10.2. Exemple : l'éthylène glycol monobutyléther.....	30
2.2.11. Conclusion.....	31
<b>2.3. Effets toxiques sans seuil.....</b>	<b>32</b>
2.3.1. Schéma général de construction.....	32
2.3.2. Détermination d'un équivalent de dose pour l'homme.....	32
2.3.3. Modélisation des données expérimentales.....	33
2.3.3.1. Les modèles statistiques.....	33
2.3.3.2. Les modèles mécanistes.....	34
2.3.3.2.1. Les modèles à coups.....	34
2.3.3.2.2. Les modèles à étapes.....	35
2.3.4. Extrapolation dans le domaine des faibles doses.....	37
2.3.4.1. A partir des modélisations mathématiques.....	37
2.3.4.2. Extrapolation linéaire jusqu'à l'origine.....	37
2.3.5. Conditions d'utilisation des modèles.....	38
2.3.5.1. Modèles statistiques.....	38
2.3.5.2. Modèles mécanistes.....	38
2.3.6. Avantages / limites.....	39
2.3.6.1. Modèles statistiques.....	39
2.3.6.2. Modèles mécanistes.....	39
2.3.7. Exemples.....	40
2.3.7.1. Modèles statistiques : la N-Nitrosodiméthylamine.....	40
2.3.7.2. Modèles mécanistes : l'acrylonitrile.....	40
2.3.8. Conclusion.....	41
<b>2.4. Discussion.....</b>	<b>41</b>
<b>3. Les méthodes employées par différents organismes.....</b>	<b>43</b>
<b>3.1. Effets à seuil.....</b>	<b>43</b>
3.1.1. Détermination de l'effet et de la dose critiques.....	43
3.1.2. Les facteurs d'incertitude.....	44
3.1.3. Comparaison des résultats.....	44
3.1.4. Récapitulatif.....	44
<b>3.2. Effets sans seuil.....</b>	<b>45</b>
3.2.1. Nature des effets sans seuil.....	45
3.2.2. Extrapolation aux faibles doses.....	45

3.2.3. Expression de la VTR .....	45
3.2.4. Récapitulatif .....	46
<b>3.3. Evolution .....</b>	<b>46</b>
<b>3.4. Conclusion .....</b>	<b>47</b>
<b>4. Tendances actuelles .....</b>	<b>49</b>
<b>4.1. Des méthodes partagées .....</b>	<b>49</b>
<b>4.2. Une nouvelle dose critique .....</b>	<b>50</b>
<b>4.3. Facteurs d'incertitude et approche probabiliste .....</b>	<b>50</b>
<b>4.4. Prise en compte des données biologiques .....</b>	<b>51</b>
4.4.1. Diminution des incertitudes lors de l'extrapolation animal – homme .....	51
4.4.2. Remise en cause de certains critères conventionnels .....	52
4.4.2.1. Les données disponibles .....	52
4.4.2.2. Analyse de l'effet critique .....	53
4.4.2.3. Analyse de l'établissement de la dose critique .....	53
4.4.2.4. Analyse des facteurs d'incertitude appliqués .....	54
4.4.2.5. Discussion .....	54
4.4.3. Meilleure compréhension des techniques de transposition de voies .....	55
4.4.3.1. Voie respiratoire .....	55
4.4.3.2. Voie cutanée .....	57
4.4.3.3. Evolution .....	61
<b>5. Conclusion générale .....</b>	<b>63</b>
<b>6. Références bibliographiques .....</b>	<b>65</b>
<b>7. Annexes .....</b>	<b>71</b>

# Table des illustrations

Figure 1 : Effets à seuil, détermination de la dose critique par la méthode traditionnelle .....	20
Figure 2 : Effets à seuil : détermination de la benchmark dose .....	21
Figure 3 : Illustration du modèle MVK .....	36
Figure 4 : Comparaison d'ERU : doses d'exposition ou doses internes .....	59
Figure 5 : De l'exposition à l'effet observé : mise en jeu des phénomènes biologiques.....	59
Figure 6 : Relation entre doses externes et doses internes .....	60
Tableau 1 : Part de la toxicocinétique et de la toxicodynamie dans les facteurs d'incertitude .....	24
Tableau 2 : Résumé de l'élaboration de la VTR de l'acétonitrile pour la voie respiratoire.....	28
Tableau 3 : 1,3-dichloropropène, résumé de la construction de la VTR.....	29
Tableau 4 : EGBE, résumé de la construction de la RfC .....	30
Tableau 5 : EGBE, résumé de la construction de la RfC <sub>dt</sub> .....	31
Tableau 6 : Facteurs affectant la précision de la VTR pour les effets à seuil .....	31
Tableau 7 : Effets à seuil, comparaison des pratiques de quelques organismes reconnus .....	44
Tableau 8 : Effets sans seuil, comparaison des pratiques de quelques organismes reconnus.....	46
Tableau 9 : VTR de l'EGBE pour les effets sur le sang après inhalation .....	52

# Table des annexes

Annexe 1 : Bases de données toxicologiques utilisées.....	73
Annexe 2 : Classification des substances cancérogènes .....	75
Annexe 3 : Description détaillée des modèles mathématiques.....	77
Annexe 4 : Les modèles physiologiques pharmacocinétiques .....	79



# Liste des abréviations

ADI : Acceptable Daily Intake	IUR : Inhalation Unit Risk
AUC : Area Under the Curve	JECFA : Joint Expert Committee on Food Additive
ATSDR : Agency for Toxic Substance and Disease Registry	LED : Limit Estimated Dose
BAA : Butoxy Acetic Acid	LMS : Linearized Multi Stage
BMD : Benchmark Dose	LOAEL : Lowest Observed Adverse Effect Level
BMR : Benchmark Response	MF : Modifying Factor
CAA : Concentration Admissible dans l'Air	MRL : Minimal Risk Level
CR : excess lifetime Cancer Risk	MVK : Moolgavkar-Venzon-Knudson
DJA : Dose Journalière Admissible	NCI : National Cancer Institute
DMENO : Dose Minimale entraînant un Effet Nocif Observable	NOAEL : No Observed Adverse Effect Level
DMSENO : Dose Minimale Sans Effet Nocif Observable	NOEL : No Observed Effect Level
ED : Estimated Dose	NTP : National Toxicology Program
EGBE : Ethylene Glycol Butyl Ether	OMS : Organisation Mondiale de la Santé
ERU : Excès de Risque Unitaire	PBPK : Physiological Based Pharmacokinetic
FAC : Fraction d'Absorption Cutanée	RfC : Reference Concentration
FAD : Fraction d'Absorption Digestive	RfD : Reference Dose
FAO : Food and Agriculture Organization of the United Nations	RIVM : Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu
HAP : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques	SF : Slope Factor
HEAST : Health Effect Assessment Summary Table	TC : Tumorigenic Concentration
HEC : Human Equivalent Concentration	TD : Tumorigenic Dose
IEP : Indice Exposition/Potentiel	TDI : Tolerable Daily Intake
ILSI : International Life Science Institute	TCDD : Tetrachlorodibenzo-p-dioxine
IPCS : International Program of Chemical Safety	UF : Uncertainty Factor
IRIS : Integrated Risk Information System	US EPA : United States Environmental Protection Agency
	VTR : Valeur Toxicologique de Référence
	WHO : World Health Organization





# 1. Introduction

## 1.1. Contexte

L'évaluation de risque sanitaire est une démarche visant à structurer et analyser les éléments de connaissances scientifiques disponibles pour guider les décisions en matière de protection de la santé publique. Elle consiste, selon la définition donnée par le National Research Council des Etats-Unis en 1983 en une « ...utilisation de faits scientifiques pour définir les effets sur la santé d'une exposition d'individus ou de populations à des matériaux ou à des situations dangereuses ». Cette démarche a pour but de présenter de manière explicite aux différentes parties concernées les éléments d'analyse sur lesquels la prise de décision pourra s'appuyer.

Ce cadre méthodologique est le plus approprié pour qualifier les risques sanitaires à venir et compléter l'approche épidémiologique pour caractériser les risques faibles. Il s'articule en quatre étapes : *l'identification des dangers* qui vise à répertorier puis sélectionner les substances ou agents rejetés dans l'environnement, notamment en s'appuyant sur leurs dangers (effets sanitaires indésirables) ; *la sélection des valeurs toxicologiques de référence*, lien entre la dose administrée de la substance et l'occurrence de l'effet étudié, qui seront mises en regard des niveaux d'exposition de la population concernée pour les substances sélectionnées précédemment ; *l'estimation de l'exposition des populations* qui conduit à déterminer la dose de produit qui arrive au contact ou pénètre dans l'organisme ; *la caractérisation du risque* qui combine les informations issues des trois précédentes étapes. Lorsque la quantification est possible, le résultat est exprimé sous forme d'un quotient de danger (rapport entre l'exposition de la population et la VTR) ou d'un excès de risque individuel. Le jugement sur la qualité des données disponibles est à prendre en compte à chacune des étapes.

La connaissance de l'exposition est souvent considérée comme une étape importante voire souvent cruciale. Il est vrai que sans cette connaissance, il ne peut être calculé ou caractérisé un quelconque risque encouru par les populations. De même, l'absence d'une VTR limite, voire empêche cette caractérisation. Cependant, l'existence d'une VTR ne résout pas tout. Il est nécessaire de s'assurer de sa pertinence pour le contexte étudié. Le choix de la valeur la plus appropriée, parmi celles disponibles, prend alors toute son importance.

La pratique actuelle en évaluation des risques consiste à rassembler les données disponibles dans la littérature puis, à l'aide de quelques critères, d'opérer la sélection de la VTR adéquate. Ces critères sont, notamment, la notoriété de l'organisme qui a élaboré la VTR, la date de son élaboration, l'origine des données (animales ou humaines) qui ont permis de la construire et la cohérence entre la voie d'exposition et la durée de l'étude par rapport à la situation étudiée. Toutes choses égales par ailleurs, la plus sévère des VTR pertinentes est le plus souvent retenue.

L'étape de sélection des VTR accorde donc une grande confiance aux organismes les proposant car il n'y a pas de regard critique porté sur les méthodes concourant à leur production. Or, les premières VTR ont été construites il y a plus d'un demi-siècle, et celles classiquement utilisées aujourd'hui datent déjà du milieu des années 80 pour les plus anciennes. Se pose ainsi la question de la prise en compte de l'avènement de nouvelles méthodes et de l'amélioration des connaissances notamment sur la compréhension des processus biologiques.

## 1.2. Objectif du document

Le présent document a pour objet de décrire et expliquer les bases théoriques et méthodologiques de la construction des VTR afin d'intégrer cette dimension dans le choix des VTR au cours d'une évaluation des risques.

Après une présentation générale sur les VTR, ce qui permettra également de fixer le vocabulaire employé dans ce document, une première partie détaillera les différentes méthodes utilisées pour construire les VTR. Ensuite, seront décrites les pratiques des instances nationales et internationales. Enfin, les tendances actuelles et les axes de recherche en cours seront détaillés. Au cours du document, des exemples illustreront l'intérêt de connaître ces procédures pour effectuer la sélection des VTR.

## 1.3. Les valeurs toxicologiques de référence

Les VTR sont des indices toxicologiques établis par des instances internationales (OMS) ou des structures nationales (ATSDR, US EPA, Health Canada, RIVM...) ; elles sont généralement spécifiques d'un effet donné, d'une voie et d'une durée d'exposition. Elles sont principalement élaborées pour des expositions sur la totalité de la durée de vie de l'individu. L'ATSDR et l'US EPA proposent également des VTR pour des périodes plus courtes, puisque les VTR de l'ATSDR sont également définies pour des expositions aiguës (inférieures ou égales à 14 jours) et subchroniques (de 14 jours à 1 an) et que l'US EPA propose dans la table HEAST des VTR pour des expositions subchroniques [67].

Dans le cadre de l'évaluation de risques sanitaires, nous ne décrivons dans ce document que les VTR définies pour des expositions chroniques, voire subchroniques, de la population générale à des toxiques. Nous ne nous attarderons donc pas sur les indices utilisés en toxicologie expérimentale (DL50, CL50), ni sur les valeurs de référence utilisées en milieu professionnel.

Pour les VTR des substances non cancérogènes, construites pour des expositions chroniques, la validité d'application commence à partir de 1 an d'exposition pour l'ATSDR [12] et de 7 ans pour l'US EPA [67].

A côté du respect des conditions d'application d'une VTR, sa validité intrinsèque est une nécessité. Elle repose avant tout sur la qualité des études disponibles et retenues pour sa construction. Qu'elles proviennent d'études en population humaine ou d'expérimentations animales, l'analyse de ces études doit être rigoureuse, et notamment le respect de la conformité des études avec les bonnes pratiques épidémiologiques ou toxicologiques édictées. Pour les études expérimentales, il convient également, outre un protocole solide basé sur les bonnes pratiques de laboratoire, que les espèces animales présentent un profil biologique et un métabolisme le plus en rapport possible avec celui connu chez l'homme ou, si le métabolisme n'est pas déterminé, il convient d'utiliser des animaux dont l'espèce, la souche et le sexe sont les plus sensibles possibles.

En règle générale, il est convenu que les effets toxiques d'une molécule chez les animaux de laboratoire sont supposés se produire aussi chez l'homme dans des conditions appropriées. En conséquence et du fait de la difficulté de disposer d'études épidémiologiques pertinentes, les études animales sont la source principale de données toxicologiques. Au cours de ces expérimentations, le recours à des doses élevées permet d'observer des signes manifestes de toxicité, assurant une meilleure appréciation de l'organe cible et d'un effet spécifique.

L'élaboration des VTR diffère en fonction des hypothèses formulées sur les mécanismes d'action considérés dans la survenue des effets toxiques. On distingue les effets à seuil (déterministes) et les effets sans seuil (stochastiques). Ils sont tous déterminés sur la base de l'ensemble des connaissances disponibles au moment présent et sont donc sujets à modification avec les avancées des recherches.

## 1.4. Effets à seuil - Effets sans seuil

### 1.4.1. Relations dose-effet, relations dose-réponse

L'exposition à une substance toxique peut produire des effets biochimique, histologique ou morphologique, se traduisant par des altérations spécifiques d'un organe, d'un système ou d'une fonction (système hématopoïétique, fonctions de reproduction par exemple), ou d'un processus biochimique ou biologique (cancer et mutagenicité). Ces effets varient selon l'intensité, la voie, la fréquence et la durée de l'exposition mais aussi en fonction de l'espèce, du sexe, de l'âge et de l'état de santé des populations exposées. Ils peuvent être réversibles ou irréversibles, immédiats ou différés.

La variété et la sévérité des effets toxiques observés dans les populations augmentent généralement avec le niveau d'exposition : c'est la relation dose-effet. Elle est clairement à distinguer de la relation dose-réponse définie comme décrivant la relation entre la fréquence de survenue d'une pathologie dans une population et le niveau d'exposition à un toxique.

En règle générale, les VTR pour les effets cancérigènes traduisent la relation dose-réponse, alors que les VTR pour les effets non cancérigènes traduisent la relation dose-réponse ou la relation dose-effet en fonction de la mesure effectuée (proportion d'individus ou sévérité d'un effet). On comprend également que pour une substance engendrant des effets multiples, des relations dose-réponse puissent être établies pour chacun de ces effets et qu'une VTR puisse être construite pour chacun d'entre eux.

### 1.4.2. Effet critique

Les VTR doivent être considérées différemment en fonction des effets pris en compte pour la construction de la relation dose-réponse. Les effets considérés lors d'une évaluation de risque sont les effets nocifs ou adverses. Il s'agit de tous les changements dans la morphologie, la physiologie, la croissance, le développement ou la durée de vie d'un organisme, *résultant d'une détérioration de la capacité fonctionnelle ou de la capacité de compenser un stress additionnel ou une augmentation de sensibilité*. Ces effets contribuent à la dangerosité de la substance. Mais certains de ces effets sont considérés comme physiologiques ou adaptatifs et sont donc exclus pour la construction de la relation dose-réponse. Par exemple, une hépatomégalie peut résulter de la stimulation des fonctions oxydases hépatiques ou d'une synthèse protéique par le réticulum endoplasmique. Une diminution du poids corporel peut provenir d'une diminution de la consommation alimentaire induite par un comportement de stress remarqué chez les animaux de laboratoire. Une déplétion du glycogène hépatique ou une diminution du nombre de leucocytes peut également être le reflet d'un état de stress. Toutefois, avant de rejeter ces effets lors de l'évaluation de la toxicité, il convient de s'assurer qu'ils ne sont pas la manifestation d'une toxicité [48].

*L'effet critique est le premier effet adverse qui survient lorsqu'on accroît la dose, et jugé pertinent chez l'homme pour l'élaboration de la VTR. Après la mise en évidence dans les études*

toxicologiques d'une batterie d'effets adverses, la VTR est généralement construite à partir de l'effet critique.

Notons que la distinction entre les effets à seuil et les effets sans seuil revient généralement à considérer pour les premiers l'effet critique de la substance et pour les seconds d'étudier spécifiquement les cancers.

Il existe cependant un cas particulier. Il s'agit des effets sur la reproduction et le développement embryofœtal. Même s'ils ne correspondent pas forcément à un effet critique, on s'intéresse à la quantification des risques spécifiques à ces effets, qui sont considérés comme sévères dès lors qu'ils touchent la progéniture. La construction d'une VTR spécifique est donc requise. La raison principale est que la période de l'embryogenèse est critique pour le développement du fœtus et qu'une seule exposition, même très courte, est susceptible d'entraîner des conséquences irréversibles.

### 1.4.3. VTR des effets à seuil

Un effet à seuil est un effet qui survient au delà d'une certaine dose administrée de produit. En deçà de cette dose, le risque est considéré comme nul. Ce sont principalement les effets non cancérogènes qui sont classés dans cette famille. Au delà du seuil, l'intensité de l'effet croît avec l'augmentation de la dose administrée. Dans ce cas, les VTR sont généralement construites sur la base de l'effet critique. Il peut être différent selon la voie d'exposition de l'organisme.

Pour une exposition par voie orale, les valeurs toxicologiques de référence sont exprimées en masse de substance par kilogramme de poids corporel et par jour (mg/kg pc/j). Ces valeurs sont définies comme étant l'estimation de la quantité de produit à laquelle un individu peut théoriquement être exposé (par ingestion) sans constat d'effet nuisible, sur une durée déterminée et sur la base de toutes les informations actuelles. On recense :

- les « Reference doses (RfD) » élaborées par l'US EPA,
- les « Minimal risk levels (MRL) » élaborés par l'ATSDR,
- les « Acceptable daily intake (ADI) » ou « Dose Journalière Admissible (DJA) », encore appelées « Tolerable Daily Intake (TDI) » ou « Dose Journalière Tolérable (DJT) », élaborées par l'OMS, le RIVM ou Health Canada.

Notons que les ADI et les TDI n'ont pas la même origine mais sont aujourd'hui confondues. Les ADI ont été établies à l'origine pour les additifs alimentaires et les résidus de pesticides dans les aliments, ce qui justifie le terme « admissible ». Les TDI ont été établies pour ces mêmes substances chimiques, pour les compartiments de l'environnement où leur présence est indésirable (l'eau potable par exemple) et pour les autres substances chimiques, n'ayant pas de fonction de protection des aliments et des cultures.

Pour une exposition par voie respiratoire, la VTR s'exprime en masse de substance par mètre cube d'air ambiant (ex : mg/m<sup>3</sup>) et correspond à la teneur de produit dans l'air ambiant à laquelle un individu peut être exposé sans constat d'effet nuisible. On recense :

- les « Reference Concentration (RfC) » élaborées par l'US EPA,
- les « Minimal risk levels (MRL) » élaborés par l'ATSDR,
- les « Concentrations Admissibles dans l'Air (CAA) » élaborées par l'OMS.

Le traitement des données est différent pour l'une ou l'autre voie d'exposition. Pour une ingestion, il s'agit d'une dose rapportée au kilogramme de poids corporel, donc d'une dose rapportée à l'organisme alors que pour une inhalation, il s'agit d'une concentration dans l'air ambiant, donc d'une concentration dans un milieu de l'environnement. Cependant, elles correspondent toutes à un niveau d'exposition externe, avant le passage des barrières biologiques de l'organisme.

#### 1.4.4. VTR des effets sans seuil

Un effet sans seuil se définit comme un effet qui apparaît quelle que soit la dose reçue. La probabilité de survenue croît avec la dose, mais l'intensité de l'effet n'en dépend pas. L'hypothèse classiquement retenue est qu'une seule molécule de la substance toxique peut provoquer des changements dans une cellule et être à l'origine de l'effet observé. A l'origine, la notion d'absence de seuil était associée aux effets cancérogènes uniquement.

Les différentes VTR rencontrées sont :

- pour la voie orale : l'Excès de Risque Unitaire (ERU) ou Sfo (oral slope factor) et le Drinking Water Unit Risk élaborés par l'US EPA,
- pour la voie respiratoire : l'Inhalation Unit Risk (IUR) élaboré par l'US EPA,
- quelle que soit la voie d'exposition : l'excess lifetime Cancer Risk ou CR élaboré par le RIVM et la dose ou concentration tumorigène (TD<sub>05</sub> ou TC<sub>05</sub>) élaboré par Health Canada.

L'ERU et le CR correspondent à la probabilité supplémentaire, par rapport à un sujet non exposé, qu'un individu contracte un cancer s'il est exposé pendant sa vie entière à une unité de dose de la substance cancérogène. Il s'agit généralement de la limite supérieure de l'intervalle de confiance à 95 % de la pente de la droite (« slope factor ») qui relie la probabilité de réponse à la dose toxique et dont la plage de validité correspond généralement à un risque compris entre 0 et 1 % [67].

Cet indice est l'inverse d'une dose et s'exprime en (mg/kg/j)<sup>-1</sup> ou (µg/kg/j)<sup>-1</sup>.

L'ERU appliqué à l'ingestion d'eau est un Drinking Water Unit Risk, exprimé comme une concentration dans un milieu, en (µg/L)<sup>-1</sup> par exemple. Pour la voie respiratoire, l'expression de l'indice IUR est l'inverse d'une concentration dans un milieu, en (µg/m<sup>3</sup>)<sup>-1</sup> par exemple.

La TD<sub>05</sub> (ou TC<sub>05</sub>) est la dose totale (ou la concentration) qui induit une augmentation de 5% de l'incidence des tumeurs attribuables à l'exposition, ou des décès dus à ces tumeurs.





## 2. Méthodes de construction

Les relations dose-réponse ou dose-effet sont construites à partir des observations obtenues pour des niveaux ou doses d'exposition élevés. Appréhender ces relations pour des populations exposées à de faibles niveaux a nécessité de développer des procédures permettant l'extrapolation des fortes doses utilisées dans les expérimentations vers les faibles doses, où les effets n'ont pu être observés. Notons que le terme « faibles doses » employé dans ce document ne porte pas sur la quantité de substance à laquelle les individus sont exposés, mais correspond aux niveaux de doses pour lesquels on n'a pas mis en œuvre les conditions d'observation adaptées.

Encore aujourd'hui, les méthodes diffèrent selon que l'on considère les effets à seuil de toxicité et ceux sans seuil de toxicité.

### 2.1. Historique

En 1954, après avoir montré que « toute substance pouvait devenir dangereuse au delà d'une certaine dose » et qu'il n'y avait « pas de risque tant que cette condition d'exposition était évitée », Lehman et Fitzhugh introduisent la notion de facteurs de sécurité pour déterminer, à partir d'un niveau de dose sans effet observé (NOEL), une dose journalière acceptable, précurseur des valeurs toxicologiques de référence [38].

La première description mécaniste des cancers date de 1924, avec l'étude des radiations ionisantes. Puis l'analyse de nouvelles données a conduit à déterminer une relation dépendante entre le taux d'apparition des tumeurs et l'âge, faisant du cancer le résultat final de plusieurs mutations successives [76]. En 1954, Armitage et Doll définissent ainsi la théorie multi-étapes, à l'origine des théories actuelles [5]. Elle suppose que plusieurs transformations peuvent avoir lieu dans une même cellule et que les taux de transition d'une étape à l'autre peuvent être différents.

En 1961, Mantel et Bryan introduisent la notion de doses virtuelles de sécurité établies après une modélisation statistique des données observées aux fortes doses et l'extrapolation vers les faibles doses. Jusque là, on considérait que tout produit toxique possédait un seuil d'exposition en dessous duquel les effets nocifs n'apparaissaient pas. Mais certaines substances cancérigènes ont provoqué des cancers dans la population humaine à des doses bien plus faibles que le seuil présumé (amiante, chlorure de vinyle). La notion de seuil fut alors abandonnée pour les substances engendrant ces effets. Il semblait raisonnable d'admettre que la probabilité qu'une transformation mutagène ait lieu soit proportionnelle à la quantité de produit atteignant sa cible. Ces raisonnements sont fondés sur des supports expérimentaux (linéarité apparente des relations dose-réponse pour les produits mutagènes) et épidémiologiques (linéarité montrée sur l'incidence des leucémies au Japon pour les survivants de la bombe atomique) et ils ont conduit à considérer une hypothèse de linéarité pour les toxiques ayant un effet sans seuil. Cependant, le débat se poursuit toujours sur la réalité

biologique d'un tel processus, mais depuis 1969, les méthodes de construction distinguent les effets sans seuil des effets à seuil.

La validation des modèles mécanistes d'extrapolation pour les cancers doit passer par une meilleure compréhension des mécanismes de la cancérogenèse. Aussi, la recherche fait valoir la nécessité d'utiliser des données biologiques. Moolgavkar et ses équipiers développent entre 1979 et 1981 le modèle « Moolgavkar-Venzon-Knudson » (MVK), théorie d'expansion clonale à deux étapes intégrant des données biologiques.

La décennie 1980-1990 marque le développement de la démarche d'évaluation du risque. La prise en compte des outils statistiques pour les effets à seuil est jugée nécessaire afin de réduire la part d'arbitraire dans l'établissement des seuils de toxicité [15].

Entre 1990 et 2000, les modèles physiologiques pharmacocinétiques font leur apparition. Cette connaissance permet d'améliorer la pertinence, voire la précision, des VTR construites chez l'homme à partir de modèles animaux que l'on maîtrise mieux.

Le XXIème siècle ouvre des perspectives nouvelles de recherche fondée sur l'utilisation de toutes les informations disponibles. Le terme d'acceptabilité fait toujours l'objet de débat au sein des différents organismes, et l'approche permettant de contourner cette notion est d'utiliser en première intention les données d'observation.

## 2.2. Effets toxiques à seuil

### 2.2.1. Schéma général de construction

Quand on suppose l'existence d'un seuil, quels que soient les effets mis en évidence, la démarche de construction de la VTR suit un schéma unique :

- 1 - Détermination de l'effet critique ;
- 2 - Détermination d'une dose critique (NOAEL, LOAEL, BMD, ED) à *partir des données observées* (études épidémiologiques chez l'homme ou études toxicologiques chez l'animal) ;
- 3 - Détermination, si nécessaire, d'une dose critique applicable à l'homme à l'aide d'un ajustement allométrique. Cet ajustement n'est clairement appliqué que pour la voie respiratoire ;
- 4 - Utilisation de facteurs d'incertitude (UF et MF) pour obtenir un niveau d'exposition de sécurité acceptable pour l'homme.

En résumé **VTR = Dose critique / [(UF) × (MF)]**

On propose également de déterminer le rapport entre le niveau d'exposition estimé de la population et la dose critique. Le résultat est appelé « margin of exposure » (marge de sécurité) en fonction des diverses sources d'incertitude. Proposée et utilisée par l'US EPA, cette méthode n'est pas encore retenue ni validée par tous les organismes construisant des VTR. Une autre démarche commence également à voir le jour : la « régression catégorique », fondée sur le regroupement des données de toxicité en catégories (pas d'effet / pas d'effet adverse / effets adverses / effets sévères...), régressées sur la dose [24,34]. Le résultat donne une probabilité d'avoir un type d'effet en fonction de la dose. Peu étudiée à l'heure actuelle, elle ne peut encore constituer une méthode alternative.

## 2.2.2. Détermination de l'effet critique

Lorsqu'on considère les effets à seuil, le choix de l'effet critique est déterminant dans la construction d'une VTR car il permet de fixer l'indicateur de toxicité retenu pour l'étude et influence donc le niveau de la dose critique testée. Sa détermination requiert un jugement toxicologique approfondi, afin de différencier les effets considérés comme nocifs et ceux considérés comme adaptatifs (cf paragraphe 1.4.2).

## 2.2.3. Détermination de la dose critique

Globalement, quelle que soit l'approche, l'objectif est de déterminer la dose critique (NOAEL, LOAEL, BMD) qui servira de point de départ à l'extrapolation de la VTR dans le domaine des faibles doses.

### 2.2.3.1. DMSENO ou NOAEL

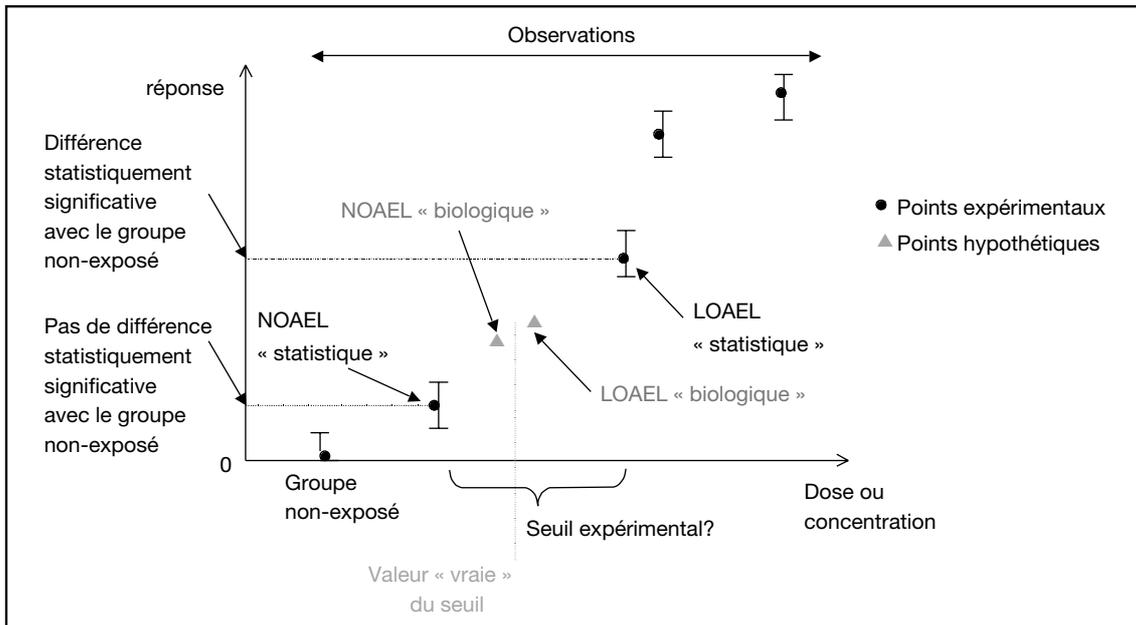
Pour presque tous les types d'effets toxiques (organospécifiques, neuro-comportementaux, immunologiques, cancérigènes épigénétiques...), on estime généralement qu'il existe une dose ou une concentration en dessous de laquelle aucun effet indésirable ne se produit : il existe un seuil de toxicité. L'objectif est alors de déterminer la dose ou la concentration en dessous de laquelle la probabilité de survenue de l'effet critique sera en théorie nulle : *la dose maximale sans effet nocif observable* (DMSENO ou NOAEL en anglais pour No Observed Adverse Effect Level). Plus précisément, elle correspond à *la dose la plus élevée pour laquelle on n'observe pas d'augmentation statistiquement (ou biologiquement) significative en fréquence ou en sévérité d'un effet nocif, dans un groupe exposé à la substance par rapport à un groupe non exposé.*

En pratique, il s'agit de la dose maximale n'induisant aucun signe de toxicité dans l'espèce animale la plus sensible et la plus appropriée et en utilisant l'indicateur de toxicité le plus sensible par rapport à un groupe d'animaux non exposés. Mais en réalité, cette dose n'est pas nécessairement une dose sans aucun effet. L'objectif est de déterminer la plus haute dose qui peut être administrée expérimentalement aux animaux sans observer l'effet critique choisi, car l'emploi d'un nouvel indicateur de toxicité ou l'utilisation d'un protocole expérimental plus sensible (espèce animale différente, plus grand nombre d'animaux...) pourrait révéler un seuil de toxicité encore plus faible.

En pratique encore, la DMSENO ou NOAEL devrait être une dose de substance administrée inférieure au seuil biologique (dose sans aucun effet nocif). Mais cette définition est rarement atteinte car les moyens mis en œuvre dans les études permettent difficilement d'atteindre un tel niveau de détection (nombre de groupes de doses peu important et/ou espacés, effectifs réduits, pertinence de l'indicateur de toxicité ou du modèle animal limitée...). On utilise plus fréquemment une détermination statistique de cette dose, qui dépend entièrement du protocole et de la puissance statistique des études (figure 1).

Les tests statistiques (écart-réduit, test de Fischer, test du Chi-2) ont pour but de comparer les groupes non exposés aux groupes exposés pour déterminer si les réponses observées dans les groupes non exposés sont significativement différentes de celles observées dans les groupes exposés (hypothèse nulle  $H_0$  : « les réponses observées dans les groupes non exposés et exposés sont semblables »).

FIGURE 1 : Effets à seuil, détermination de la dose critique par la méthode traditionnelle



### 2.2.3.2. DMENO ou LOAEL

L'étude expérimentale ne permet pas toujours d'avoir accès à ce NOAEL. Il est alors proposé de déterminer la dose ou la concentration théoriquement la plus faible pour laquelle un effet indésirable est observé. C'est la dose minimale pour un effet nocif observable (DMENO ou LOAEL en anglais pour Lowest Observed Adverse Effect Level). Plus précisément, elle correspond à *la plus faible dose de substance pour laquelle on constate une augmentation statistiquement (ou biologiquement) significative en fréquence ou en sévérité d'un effet nocif observé dans le groupe exposé par rapport au groupe non exposé.*

Les mêmes remarques théoriques que celles formulées pour la DMSENO ou NOAEL sur la définition statistique peuvent être faites (figure 1).

### 2.2.3.3. BMD

Une méthode alternative est de plus en plus préconisée car elle permet de s'affranchir de la variabilité inhérente aux expérimentations animales lors de l'utilisation d'un NOAEL comme dose critique : c'est *la « benchmark dose »* (ou BMD). L'objectif est de déterminer la dose (ou la limite inférieure de l'intervalle de confiance correspondant) produisant un effet critique avec une augmentation de la fréquence ou de la sévérité particulière, conventionnellement fixée à 1, 5 ou 10 % (figure 2). Le principe de cette méthode décrite par Crump en 1984 repose sur un ajustement statistique de la totalité des données d'observation [15]. Ce n'est pas une méthode permettant l'extrapolation aux faibles doses mais seulement une méthode d'estimation de la dose critique.

Par définition, la réponse fixée pour déterminer une BMD est la réponse la plus basse pouvant être détectée expérimentalement, mais suffisante pour que la BMD soit relativement insensible au choix du modèle statistique [50]. Ce compromis permet d'utiliser les observations pour les niveaux de doses les plus faibles possibles.

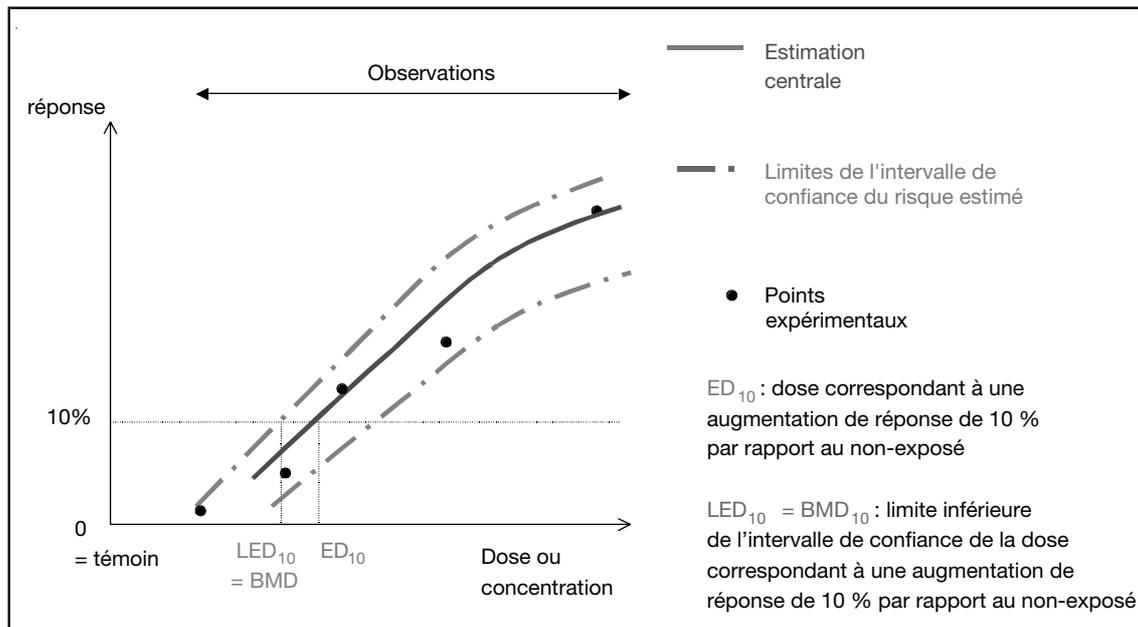
Les données pouvant être modélisées sont de deux types : on parle de données quantales ou continues.

Une réponse quantale n'est pas mesurée, il s'agit simplement d'une réponse dichotomique, de type présence / absence d'effet ou d'une réponse qualitative ordonnée, c'est-à-dire correspondant à un dénombrement en classes de type sévérité faible, modérée ou forte. Ce type de réponse est utilisé lorsque l'effet sanitaire considéré n'est pas observé dans des conditions de non exposition. Elle est décrite par une variable discrète. Dans ce cas, une réponse de référence notée BMR (pour « benchmark response ») de 1, 5 ou 10 % est conventionnellement utilisée si la limite de détection de l'étude le permet.

Une réponse continue est une mesure quantitative exprimée par un nombre réel qui peut prendre toutes les valeurs possibles. C'est souvent une mesure d'un indicateur biologique ou d'une variation morphologique d'un organe. Elle est décrite par une variable continue et est représentée par la moyenne et la déviation standard. Il est plus difficile de rendre compte d'effets adverses car la réponse est positive même en l'absence d'exposition. Dans ce cas, la réponse déterminée doit correspondre à un changement biologique significatif (jugement scientifique) de la mesure par rapport aux individus non exposés.

Les modèles permettant d'ajuster les données sont nombreux et sont représentés par des équations de régression (linéaires ou non, quadratiques, polynomiales) ou de distribution de probabilités (modèle de Weibull [27], probit, logistique ou gamma). Lorsque les données le permettent, on peut parfois appliquer des modèles mécanistes (modèle multi-étapes linéarisé, modèle de Moolgavkar-Venzon-Knudson décrits au paragraphe 2.3.3.2).

**FIGURE 2 : Effets à seuil : détermination de la benchmark dose**



## 2.2.4. Ajustements allométriques

Les ajustements allométriques conduisent à déterminer une « concentration équivalente humaine ». Ils permettent de réduire la valeur des facteurs d'incertitude relatifs aux différences entre deux espèces qui seront ensuite appliqués.

Ils interviennent en amont de l'utilisation des facteurs d'incertitude, uniquement lorsqu'on détermine une VTR pour une exposition par inhalation [20]. Ils ont été développés pour tenir compte des variations observées entre différentes espèces de la dose réellement inhalée, car les caractéristiques d'entrée d'un produit dans le système respiratoire sont fonction de

paramètres physiques, anatomiques et physiologiques qui varient considérablement d'une espèce à l'autre.

Ils correspondent à des modèles physiologiques traduisant les interactions qui existent entre le système respiratoire et les particules ou gaz inhalés, induites par le caractère dynamique du système. Il s'agit de pondérer la dose critique par des paramètres biologiques (liés à l'animal et à l'homme) et physicochimiques (liés à la substance) applicables à l'animal et à l'homme pour prédire les différences de comportement entre les deux espèces.

Ainsi, il est fréquent de retrouver comme point de départ des NOAEL ou BMD équivalents chez l'homme notés  $\text{NOAEL}_{\text{HEC}}$  ou  $\text{BMD}_{\text{HEC}}$ . Théoriquement, cette concentration équivalente humaine devrait être à la base de l'identification de l'espèce réellement la plus sensible.

Différents ajustements allométriques sont effectués en fonction de la nature de l'agent inhalé (particules ou gaz) et du site où sont observés les effets critiques (respiratoires ou extra-respiratoires) conduisant à quatre scénarios distincts [40]. Par exemple, pour un gaz de faible solubilité dans l'eau, de faible réactivité au contact des tissus pulmonaires, et entraînant un effet extraréspiratoire, le transfert entre l'air et le sang dépend principalement du coefficient de partage air : sang ( $\lambda$ ). L'ajustement allométrique qui s'ensuit correspond à l'équation suivante [41] :

$$\text{NOAEL}_{\text{HEC}} = \text{NOAEL} \times \lambda_A / \lambda_H \quad (\text{A : animal, H : homme})$$

L'US EPA, qui semble utiliser systématiquement ces ajustements, a choisi d'appliquer pour cette catégorie de gaz et en l'absence de donnée, une valeur par défaut de 1 pour le ratio des coefficients de partage air : sang entre l'animal et l'homme ( $\lambda_A / \lambda_H$ ). Il considère donc que le comportement de la molécule toxique est identique chez l'homme et chez l'animal. L'utilisation de cette valeur par défaut ne devrait pourtant pas permettre de réduire le facteur d'incertitude interespèces puisque aucune donnée pertinente ne vient conforter l'hypothèse de comportement similaire.

Les recherches dans ce domaine tendent à définir un modèle physiologique qui pourrait servir à remplacer la composante toxicocinétique du facteur d'incertitude interespèces traditionnellement utilisé (cf paragraphe 2.2.5). Ainsi, dans le cas de l'élaboration d'une valeur toxicologique de référence pour une exposition chronique par inhalation, lorsqu'on dispose de données qui permettent d'ajuster la dose expérimentale pour estimer une concentration équivalente humaine, ce facteur est réduit à 3 au lieu de 10.

## 2.2.5. Facteurs d'incertitude

Des facteurs d'incertitude sont appliqués pour tenir compte des différences lors de l'extrapolation de données provenant d'une étude expérimentale, le plus souvent conduite chez l'animal, à une situation d'exposition environnementale réelle chez l'homme [73]. En règle générale, ces facteurs tiennent compte des variabilités entre les espèces, entre les individus, et des incertitudes liées aux protocoles expérimentaux [23,29]. On en distingue six :

$$\text{UF} = \text{UF}_H \times \text{UF}_A \times \text{UF}_S \times (\text{UF}_L \text{ ou } \text{UF}_B) \times \text{UF}_D$$

1 -  $\text{UF}_H$  prend en compte l'incertitude sur la variabilité interindividuelle, ce qui permet d'estimer le NOAEL dans une population sensible lorsque seul le NOAEL de la population générale est défini. Il suppose qu'il existe des sous-groupes de populations humaines qui sont plus sensibles à la toxicité d'une substance que la population moyenne et que cette variabilité n'a pas été détectée dans les études en raison des échantillons de petite taille.

En absence de donnée sur cette variabilité, on applique un facteur 10, valeur par défaut conservatrice [10,11,21]. Si le NOAEL est disponible dans une population sensible connue ou si les données toxicocinétiques ou toxicodynamiques sont connues, le facteur 10 peut être ajusté (la toxicocinétique définit l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'excrétion de la substance en fonction du temps, et tient compte des différences de quantité de composé parent ou de métabolites actifs arrivant à la cible, et la toxicodynamie définit le comportement de la molécule au niveau de la cible qui induit l'effet toxique).

- 2 - **UF<sub>A</sub>** prend en compte l'extrapolation interespèces, ce qui permet d'estimer le NOAEL dans la population humaine générale, à partir de données toxicologiques animales lorsque les études épidémiologiques chez l'homme sont insuffisantes. Le facteur appliqué par défaut est 10. Il est fondé sur plusieurs hypothèses : les résultats obtenus dans les expérimentations animales sont en rapport avec ceux qui pourraient être obtenus chez l'homme, il existe des différences toxicocinétiques et toxicodynamiques entre l'animal et l'homme, les hommes sont plus sensibles à la toxicité d'une substance que les animaux pour une dose donnée en mg/kg pc/jour.
- 3 - **UF<sub>S</sub>** prend en compte l'incertitude liée à l'utilisation d'un NOAEL déterminé à partir d'études à moyen terme (environ 3 mois au lieu de la vie entière de l'animal) dans la construction de la VTR s'appliquant à la vie entière. Il suppose qu'un effet observé lors d'expositions subchroniques sera également observé pour des expositions chroniques à plus faible dose. On utilise un facteur 10 fondé sur des études qui ont comparé des NOAEL provenant d'études subchroniques à des NOAEL provenant d'études chroniques [52], pour le même modèle animal et le même effet. Ce n'est pas une valeur utilisée par défaut. Le jugement toxicologique sur la molécule étudiée et sur les effets pris en compte a une importance cruciale dans le choix de cette valeur. Cette transposition doit être validée par le toxicologue qui s'appuie sur les propriétés connues de la substance chimique (potentiel d'accumulation, potentiel tératogène...).
- 4 - **UF<sub>L</sub>** est utilisé lorsque seul le LOAEL a été déterminé comme dose critique. Il prend en compte l'incertitude liée au fait que le LOAEL observé correspond à une dose plus élevée que la dose sans effet qu'on veut estimer. On utilise généralement un facteur de 10 choisi arbitrairement, ou parfois moins lorsque les données le permettent. Faustman et al. [26] ont montré que ce facteur était souvent surestimé et préconisent l'application d'un facteur égal à 3.
- 5 - **UF<sub>B</sub>** correspond à UF<sub>L</sub> quand on utilise l'approche par la BMD. Lorsque l'espacement des doses est grand ou lorsqu'on a choisi une BMR plus élevée, ce facteur est utilisé pour se rapprocher le plus possible d'une dose sans effet. Il n'est pas systématiquement utilisé.
- 6 - **UF<sub>D</sub>** regroupe d'autres facteurs qui ne sont pas systématiquement utilisés et qui tiennent compte de la confiance que l'on peut accorder aux études toxicologiques ou aux effets considérés. Par exemple, on peut utiliser un facteur allant de 3 à 10 lorsque les études toxicologiques sont peu nombreuses, pour tenir compte de la variabilité que l'on aurait pu observer sur différents résultats [22]. Il peut également s'agir d'une précaution prise par rapport à la nature de la toxicité [58]. Certains organismes comme l'OMS, l'ATSDR, le FAO ou le JECFA incorporent un facteur de sécurité supplémentaire de 10 dans le cas où le NOAEL est déterminé pour un effet critique associé à un phénomène sévère et irréversible. C'est le cas des substances tératogènes [75].

**MF** est le « modifying factor » ou facteur modificatif. C'est un facteur non nul inférieur ou égal à 10, utilisé par des experts qui jugent de la qualité des données et du niveau de confiance qu'ils peuvent attribuer à la construction de la VTR. Le facteur utilisé par défaut, ou lorsque les données sont suffisantes et de bonne qualité est égal à 1.

La recherche sur la pertinence de l'utilisation des facteurs d'incertitude a progressé de façon rapide pendant cette dernière décennie. L'augmentation des connaissances sur les variations des sensibilités inter et intra-espèces a entraîné des améliorations permettant

d'incorporer des données plus scientifiques, évitant une utilisation trop empirique des facteurs.

En 1990, Lewis et al. ont développé un paradigme mettant l'accent sur la séparation des jugements scientifiques et de gestion [46]. Ainsi, ils distinguent les facteurs toxicologiques ( $UF_H$ ,  $UF_A$ , pertinence de l'effet critique,  $UF_S$  et  $UF_L$ ) et un facteur de gestion tenant compte des incertitudes résiduelles dans l'application de  $UF_A$ ,  $UF_H$  et dans l'estimation des différences entre les conditions expérimentales et le scénario d'exposition humain. Cette approche se caractérise par la distinction minutieuse des différents ajustements, difficilement réalisable.

En 1991, Renwick propose de subdiviser chaque facteur d'incertitude relatif aux différences entre deux individus ou deux espèces en plusieurs sous facteurs pour permettre de séparer les considérations toxicocinétiques et toxicodynamiques [56]. L'avantage est que les composantes de ces facteurs peuvent être étudiées séparément si les données sont disponibles (par exemple, un facteur d'extrapolation interspèces ne tiendra compte que des différences toxicodynamiques si les données toxicocinétiques existent).

En 1994, l'OMS propose de considérer que la toxicodynamie et la toxicocinétique aient une part égale dans les variabilités interindividuelles, équivalant chacune à  $\sqrt{10}$  (tableau 1) [75]. Ces conclusions ont été tirées à partir d'une analyse complète de molécules médicamenteuses pour lesquelles les données chez l'homme et chez l'animal étaient disponibles [57]. Récemment, Renwick et al. ont montré que les différences toxicocinétiques d'une espèce à l'autre étaient généralement plus grandes que les différences toxicodynamiques : le facteur 10 se divise alors en un facteur 4 pour la toxicocinétique et 2,5 pour la toxicodynamie. Ils ont décrit les variabilités interindividuelles de la même manière [59,60].

En l'absence de données pertinentes relatives à la substance étudiée, la multiplication de chaque facteur entre eux aboutit à la valeur de 100 ( $10 \times 10$ ) utilisée par défaut.

Les facteurs retenus pour tenir compte des différences de toxicocinétique ont été déterminés à partir de la comparaison de paramètres cinétiques comme l'aire sous la courbe des concentrations plasmatiques en fonction du temps, chez l'homme et chez l'animal. Les facteurs retenus pour les différences toxicodynamiques sont principalement fondés sur des études *in vitro* (mesures de la sensibilité des tissus humains et animaux) [60].

Cette approche fut critiquée en raison de sa simplicité et du fait que l'incertitude totale est grande : chaque facteur est estimé de façon plus ou moins empirique, laissant une part d'incertitude non négligeable. L'incertitude augmente lorsque l'on multiplie tous les facteurs entre eux. Des méthodes alternatives probabilistes sont proposées depuis quelques années, mais elles sont, à l'heure actuelle, encore très peu utilisées (cf paragraphe 4.3.).

**TABLEAU 1 : Part de la toxicocinétique et de la toxicodynamie dans les facteurs d'incertitude [59,75]**

	Toxicocinétique	Toxicodynamie
<b>Facteur</b>	1- valeur spécifique du produit	1- valeur spécifique du produit
<b>Inter</b>	2- espèce + voie spécifique	2- classe chimique / effet spécifique
<b>espèces</b>	3- valeur défaut spécifique d'une espèce	3- valeur défaut : <b>2.5</b>
	4- valeur défaut : <b>4.0</b>	
<b>Facteur</b>	1- valeur spécifique du produit	1- valeur spécifique du produit
<b>Inter</b>	2- taux de métabolisation défaut (polymorphisme ?)	2- classe chimique / effet spécifique
<b>individus</b>	3- valeur défaut : <b>3.16</b>	3- valeur défaut : <b>3.16</b>

## 2.2.6. Conditions d'utilisation des méthodes

### 2.2.6.1. NOAEL ou LOAEL

Cette méthode est largement utilisée pour les substances ayant un effet non cancérigène, mais elle peut également être appliquée dans le cas de produits cancérigènes lorsqu'on a montré l'existence d'un seuil biologique de toxicité. L'absence de NOAEL ou de LOAEL est le seul facteur limitant l'utilisation de cette méthode. Elle est donc très répandue.

### 2.2.6.2. BMD

A l'origine, cette approche a été largement étudiée pour proposer une relation entre la dose et la réponse probabiliste concernant les effets sur le développement. La BMD devait satisfaire l'équation suivante, où BMR est le niveau de réponse associé à BMD :

$$\text{BMR} = [\text{P}(\text{BMD}) - \text{P}(0)] / [1 - \text{P}(0)],$$

Le nombre de doses testées doit être suffisant pour avoir une estimation correcte. Il faut au moins 2 groupes de dose en plus du groupe non exposé pour effectuer une modélisation. Il est préférable d'avoir une ou plusieurs doses proches de la BMR pour avoir une meilleure estimation de la BMD et un intervalle de confiance plus étroit.

Les paramètres nécessaires à la modélisation des données expérimentales, et donc à la détermination de la BMD, sont différents en fonction du type de réponse, quantale ou continue. Pour les données quantales, ce sont le nombre d'animaux montrant une réponse positive pour l'effet recherché et le nombre total d'animaux pour chaque groupe de dose ; pour les données continues, ce sont le nombre d'individus, la moyenne de la variable réponse et la mesure de la variabilité (déviations standard ou variance) pour chaque groupe de dose.

## 2.2.7. Avantages / limites

### 2.2.7.1. NOAEL ou LOAEL

Il est nécessaire, dans un premier temps, de déterminer l'effet critique. Celui-ci définit les niveaux de doses sur lesquels on se base pour obtenir la dose critique. Son interprétation est à l'origine des variations importantes que l'on peut rencontrer sur le choix de la dose critique.

La détermination d'un NOAEL ou d'un LOAEL comme dose critique est simple à appliquer et facile à comprendre. Elle s'applique à tous les types d'effets à seuil. Cependant, c'est une méthode qui comporte un très grand nombre d'inconvénients.

Toute l'information donnée par les études toxicologiques n'est pas retenue : le NOAEL, par définition, est une seule des doses expérimentales testées. Le reste de la relation dose-réponse est donc totalement ignoré.

Les schémas expérimentaux priment sur la pertinence biologique : le niveau de réponse n'est pas toujours cohérent. Il existe des variations en fonction de l'espèce, du sexe, de la souche et de l'âge des animaux utilisés, de la taille des lots, de la sensibilité des méthodes utilisées pour mesurer la réponse, de la durée de l'exposition et de la sélection des niveaux de doses (les doses utilisées sont souvent espacées, la valeur observée du NOAEL est donc souvent

inférieure à la vraie valeur). De même, déterminé à partir d'études chez l'homme, le NOAEL est souvent mal évalué en raison de schémas d'exposition très variables et d'une difficulté à caractériser ces expositions. Par exemple, pour les effets neurologiques du styrène (altération de la capacité d'apprentissage), alors que Rabovsky et al. ont évalué à partir d'une étude en milieu professionnel le LOAEL à 15 ppm pour une exposition par inhalation [54], l'US EPA (IRIS, 1993) a établi un NOAEL à 22 ppm à partir de la même étude épidémiologique, et l'ATSDR a établi un LOAEL à 25 ppm. Cet exemple montre bien les limites de cette approche et l'importance de définir précisément la notion de nocivité.

De plus, le NOAEL dépend entièrement de la taille des populations d'individus utilisés dans les études : celles réalisées avec un petit nombre d'animaux auront moins de chance de détecter statistiquement une réponse à faible dose que celles s'appuyant sur un nombre d'animaux élevé. Ainsi, le NOAEL sera d'autant plus fort, et donc la VTR d'autant plus élevée, que les études auront une faible puissance statistique. Il est également possible que, si les intervalles entre chaque groupe de dose sont larges, le NOAEL déterminé expérimentalement soit plus faible que celui qui aurait été observé avec des groupes de dose à intervalles plus rapprochés. Il est donc impossible de prévoir si on se trouve au-dessus ou en dessous du seuil biologique ; il en résulte une incertitude difficile à quantifier. De ce fait, le jugement sur le choix des facteurs d'incertitude devient très important et ceux-ci se doivent d'être majorés en fonction de la qualité des données.

### 2.2.7.2. BMD

Cette méthode a été développée pour s'affranchir de certains inconvénients liés à la méthode traditionnelle. Ce n'est pas une méthode d'extrapolation vers les faibles doses, seulement une façon différente de déterminer une dose critique. Le changement positif est que l'on considère l'ensemble de la relation dose-réponse. Il n'y a donc pas de perte d'information. De plus, la valeur de la dose retenue a l'avantage d'être moins dictée par les conditions protocolaires puisqu'elle correspond à un niveau de réponse fixé a priori. Par le calcul d'un intervalle de confiance, cette méthode prend en compte la variabilité liée aux données toxicologiques. Dans ce cas, plus l'intervalle de confiance sera étroit (ou plus la puissance statistique de l'étude sera bonne), plus la BMD sera forte, donc plus la VTR sera élevée.

Cependant, un grand nombre d'inconvénients persiste encore. La précision de la BMD dépend également, mais de façon moins importante que le NOAEL, des protocoles expérimentaux. Son application est plus difficile car en plus du choix de l'effet critique, le choix du niveau de réponse (BMR) que l'on veut fixer est aussi sujet à discussion. De plus, il faut pouvoir modéliser les données (cf paragraphe 2.2.5.2).

Cette méthode se développe néanmoins de façon importante car elle permet d'harmoniser les différentes méthodes utilisées par les agences pour construire les VTR, par l'utilisation d'une dose dont on connaît le niveau de réponse [19].

## 2.2.8. Comparaison des deux approches

De nombreuses études ont comparé les résultats obtenus par l'approche traditionnelle et la BMD, notamment pour les effets sur le développement embryofœtal [2,27,43]. Ces évaluations ont montré que la méthode benchmark offrait une réelle alternative à l'utilisation du NOAEL ou du LOAEL et qu'elle n'était en général pas plus conservatrice. Les auteurs ont montré que les valeurs de BMD<sub>05</sub> pour des données continues et de BMD<sub>10</sub> pour des données quantales étaient généralement similaires aux valeurs de NOAEL.

Le NOAEL ne correspondrait donc pas à une absence d'effet mais plutôt à un niveau de réponse pouvant aller jusqu'à 20%, en fonction des études toxicologiques ; il s'apparenterait plus à un LOAEL. Par exemple, Leisenring et Ryan ont montré que la réponse associée aux valeurs de NOAEL variait entre 3 et 21% [45] ; d'autres auteurs ont montré que le NOAEL correspondait à une réponse variant de 1 à 4,5% [30]. Il existe donc une grande variabilité sur la détermination des NOAEL selon les études utilisées, à l'origine de l'incertitude finale. L'utilisation d'une BMD associée à un niveau de réponse connue permet de s'affranchir de cette variabilité.

De plus, la BMD augmente avec la puissance statistique de l'étude. Aussi, si l'étude est bien menée, la valeur de la VTR sera moins conservatrice. Par opposition, le NOAEL sera plus faible si l'étude est bien menée, ce qui est en contradiction avec le conservatisme que l'on veut donner à la VTR dans le cas d'études de faible puissance statistique.

## 2.2.9. Exemples

### 2.2.9.1. Méthode traditionnelle : l'acétonitrile

L'objectif de l'US EPA a été de déterminer une valeur toxicologique de référence pour une exposition journalière par inhalation de la population humaine générale.

#### Détermination de la dose et de l'effet critiques

Les études toxicologiques utilisées proviennent du National Toxicology Program (NTP). L'une est subchronique et l'autre est chronique. Elles ont été réalisées chez des souris, par inhalation discontinue d'acétonitrile (6h/j, 5j/sem) pendant 13 et 111 semaines. Les études ont nécessité chacune 10 animaux par sexe pour chacun des 6 groupes de dose (0, 100, 200, 400, 800, 1600 ppm). Des observations cliniques et des examens histopathologiques des organes ont été réalisés. Les mesures d'acétonitrile dans le sang n'ont pas été effectuées, ce qui peut être une source d'incertitudes quant à la distribution du toxique dans l'organisme. L'effet retenu a été la mort, à partir de 400 ppm pour les femelles. Une hyperplasie du tissu épithélial de l'estomac a été observée pour des doses supérieures ou égales à 200 ppm. Cette hyperplasie est un effet adverse car elle était accompagnée d'une infiltration de cellules inflammatoires et d'un ulcère pour les plus fortes doses. Mais le rôle qu'a joué l'inhalation de l'acétonitrile dans le développement de cette hyperplasie est fortement incertain. Dans ce contexte, l'effet critique considéré a été la mort, fixant le NOAEL à 200 ppm.

#### Ajustement allométrique et facteurs d'incertitude

L'US EPA a calculé un NOAEL applicable à l'homme (NOAEL<sub>HEC</sub>) en utilisant un ajustement allométrique. Du fait des données physicochimiques connues relatives à l'acétonitrile, l'US EPA a estimé que le transfert de l'acétonitrile entre l'air et le sang dépendait principalement du coefficient de partage air : sang ( $\lambda$ ). Les coefficients de partage n'étant pas connus, une valeur par défaut de 1 pour le ratio  $\lambda_A/\lambda_H$  a été retenue, ce qui suppose que le comportement de la substance est identique chez l'homme et chez l'animal.

La concentration critique a également été ajustée pour une exposition continue chez l'homme à partir d'une exposition de l'animal de 6 h par jour, 5 jours par semaine.

L'US EPA a appliqué un facteur d'incertitude ( $UF_H$ ) de 10 pour tenir compte des populations sensibles. Un facteur 3 est utilisé pour l'extrapolation interspèce ( $UF_A = \sqrt{10}$ ). Ce facteur est réduit car l'US EPA a calculé une dose équivalente pour l'homme à partir des données animales. Cependant, cette réduction est fondée sur une hypothèse fragile puisque les données de l'acétonitrile ne sont pas toutes disponibles.

Un second facteur 3 a été appliqué pour tenir compte du manque de données sur d'autres effets (reproduction) et pour tenir compte de l'absence de mesures hématologiques dans l'étude utilisée (**UF<sub>D</sub>**). Le facteur 10 conventionnellement appliqué n'a pas été utilisé car on n'a pas mis en évidence d'accumulation d'acétonitrile dans l'organisme, et les effets sur le développement semblaient être très marginaux, car se produisant pour des concentrations létales chez la mère. Un facteur de modification (**MF**) de 10 a été appliqué pour tenir compte du rôle incertain que l'inhalation peut avoir joué dans l'augmentation de l'incidence de certaines lésions (au niveau de l'estomac) chez les souris des deux sexes [1] et pour tenir compte de l'incertitude globale (tableau 2).

**TABLEAU 2 : Résumé de l'élaboration de la VTR de l'acétonitrile pour la voie respiratoire**

type d'étude	effet critique observé	doses expérimentales	facteurs d'incertitude		VTR RfC
			UF	MF	
subchronique et chronique, souris, inhalation	mortalité	NOAEL : 336mg/m <sup>3</sup> (200ppm) NOAEL(ADJ) : 60mg/m <sup>3</sup> NOAEL(HEC) : 60mg/m <sup>3</sup>	100	10	0,06 mg/m <sup>3</sup>

NOAEL(ADJ) : concentration rapportée à 24h - NOAEL(HEC) : concentration équivalente humaine.

La confiance attribuée à cette évaluation est moyenne en raison d'un manque flagrant d'information : l'effet pris en compte (la mort) est très sévère, le rôle de la voie d'exposition dans le développement de l'hyperplasie est incertain, et on ne connaît pas la toxicité de l'acétonitrile sur les fonctions de reproduction (absence d'étude sur deux générations).

### 2.2.9.2. Benchmark Dose : le 1,3-dichloropropène

L'objectif est de déterminer une valeur de référence applicable à la population humaine générale pour une exposition journalière par ingestion (IRIS, 2000).

#### Détermination de l'effet et de la dose critiques

L'étude toxicologique utilisée date de 1995 et a été réalisée chez le rat Fischer 344 [64]. Les travaux de Stebbins et al. sont venus conforter ces résultats [63]. L'expérimentation a consisté à exposer au 1,3-dichloropropène 50 animaux par sexe et par dose pendant deux ans par l'alimentation (ingestion chronique) à 0-2,5-12,5 et 25 mg/kg/j. Les effets nocifs observés ont été des lésions de l'estomac traduisant une irritation chronique démontrée dans d'autres études, et une perte de poids. La perte de poids n'a pas été associée à une nocivité car elle est parfois due à un état de stress. L'effet critique retenu correspond aux lésions de l'estomac car elles mettent en évidence l'irritation chronique due au 1,3-dichloropropène.

La réponse est donnée par la proportion d'animaux présentant des lésions de l'estomac mises en évidence par un examen histopathologique pour chaque groupe. Ces données expérimentales ont été ajustées par 7 modèles statistiques différents utilisés pour des données quantales (gamma, logistique, multi-étapes, probit, linéaire, quadratique et weibull). Le choix s'est ensuite porté sur ceux qui ajustaient le mieux les données par la méthode du maximum de vraisemblance ( $p > 0,05$ ) : le modèle gamma ( $p = 0,2435$ ) a été retenu pour l'estimation de la limite inférieure de l'intervalle de confiance d'une dose correspondant à une augmentation de la réponse par rapport au groupe non exposé de 10% (BMD<sub>10</sub>). La dose critique, BMD<sub>10</sub>, a été fixée à 3,4 mg/kg/j.

#### Ajustement allométrique et facteurs d'incertitude

Dans le cas d'une évaluation de la toxicité par voie orale, on n'applique pas d'ajustement allométrique sur la dose critique. C'est pourquoi dans le cas du 1,3-dichloropropène, les

facteurs d'incertitude sont appliqués directement à partir de la dose critique déterminée chez l'animal.

Les facteurs d'incertitude appliqués tiennent compte de la variabilité interindividuelle et des différences entre les espèces (tableau 3). La valeur de chacun a été fixée à 10 en raison d'une méconnaissance importante des variations de la toxicité du 1,3-dichloropropène entre espèces et individus.

**TABLEAU 3 : 1,3-dichloropropène, résumé de la construction de la VTR**

type d'étude	effet critique observé	doses expérimentales	facteurs d'incertitude		VTR RfD
			UF	MF	
chronique, rat ingestion (alimentation normale)	irritation chronique : lésions de l'estomac	BMD <sub>10</sub> = 5,1 mg/kg/j BMDL <sub>10</sub> = 3,4 mg/kg/j	100	1	3.10 <sup>-2</sup> mg/kg/j

Il n'y a pas d'autre facteur d'incertitude car la base de données toxicologiques relative au 1,3-dichloropropène est très bien documentée. Elle inclut des données de génotoxicité, de toxicité sur les fonctions de reproduction et sur le développement, des données de toxicocinétique et de cancérogenèse. De plus, l'étude retenue pour la détermination de la VTR est réalisée sur toute la vie des animaux. Pour ces raisons, le niveau de confiance est fort, conduisant les experts à affecter la valeur 1 au facteur modificatif (MF).

## 2.2.10. Cas particulier des effets sur le développement embryofœtal et la reproduction

### 2.2.10.1. Généralités

Il est classiquement considéré que les effets sur la reproduction et le développement embryofœtal surviennent au-delà d'une dose seuil de la substance incriminée. La construction des VTR repose donc sur les méthodes développées précédemment. Ces effets sont rarement retenus comme effet critique. Cependant, la quantification de leur probabilité de survenue est souvent demandée par les différentes parties prenantes, la protection des femmes enceintes ou en âge de procréer étant une priorité de santé publique. Cette demande est d'autant plus forte lorsque les substances toxiques sont reconnues comme ayant des effets sur les enfants.

Cependant, les données disponibles chez l'homme sont très éparses et ne concernent qu'une minorité de molécules. L'observation sur des animaux se heurte à la difficulté de transposer les résultats à l'homme. Il est généralement impossible de prévoir l'espèce qui sera la plus proche de l'homme, ce qui rend fragile la validation d'un modèle animal (les souris et les lapins par exemple présentent une fréquence élevée de malformations spontanées). On suppose alors que les effets observés dans les études animales ne sont pas forcément les mêmes que ceux que l'on pourrait observer chez l'homme car le développement embryofœtal ne suit pas le même schéma d'une espèce à l'autre (différences dans la période critique). De plus, on est amené à prendre en compte les tests de toxicité à moyen terme (subchroniques) et à court terme (aigus) car une seule dose, à un moment critique du développement, peut se révéler toxique.

Par ailleurs, chez l'homme, il est rarement possible de faire la distinction entre les deux étiologies possibles qui conduisent à un effet nocif observé chez l'enfant : la première étiologie

considère une exposition directe in utero pendant la grossesse de la mère. Dans ce cas, l'exposition peut être répétée et de courte durée, voire unique. La seconde considère une exposition indirecte où les fonctions reproductives des parents sont altérées lors d'une exposition antérieure à la conception de l'enfant. Dans ce cas, on imagine aisément des expositions plus fréquentes sur des durées plus importantes.

La pratique actuelle d'élaboration d'une VTR, lorsque l'évaluateur doit estimer le risque de survenue d'effets sanitaires sur la reproduction et le développement embryofœtal, est d'appliquer un facteur d'incertitude supplémentaire fixé à 10 soit sur la dose critique concernant spécifiquement cet effet, soit en appliquant ce facteur d'incertitude supplémentaire à la VTR calculée pour un autre effet de la substance [75].

Si cet effet délétère prend plus d'importance, cela va conduire à élaborer des VTR inférieures d'un facteur 10 à celles déjà existantes. Pourtant les conditions d'utilisation des VTR dans le cas d'une exposition in utero ne sont pas remplies, la durée ne pouvant excéder 9 mois (la durée minimum requise est d'un an pour l'ATSDR et de 7 ans pour l'US EPA). Le débat est d'importance.

Aussi, l'US EPA établit aujourd'hui de façon ponctuelle des VTR spécifiques au développement embryofœtal ( $RfC_{dt}$  et  $RfD_{dt}$ ) issues d'études expérimentales sur le développement de l'animal. De la même manière que pour les effets cancérogènes, il existe un classement relatif à la toxicité du développement (toxicité évidente, potentielle, pas apparente ou données inadéquates pour évaluer cette toxicité) et les VTR ne seront déterminées que pour les toxiques dont on a prouvé la toxicité in utero (par exemple pour l'éthylène glycol monométhyléther) et pour lesquels on dispose d'études sur le développement. Elles sont applicables à partir d'une seule exposition en raison de la période critique considérée. La chronicité n'est pas un pré-requis pour ce type de VTR, elles ne sont donc pas ajustées sur la durée d'exposition.

### 2.2.10.2. Exemple : l'éthylène glycol monobutyléther

L'exemple de l'éthylène glycol monobutyléther (EGBE) illustre bien la difficulté de développer une VTR associée aux effets sur le développement in utero lorsque ceux-ci n'interviennent pas pour les plus faibles doses, donc lorsqu'ils ne sont pas considérés comme effets critiques. L'US EPA a construit une  $RfC$  pour les effets sur le sang, qui sont observés aux plus faibles doses (voir le détail au paragraphe 4.4.2.) par détermination d'une BMD à l'aide d'un modèle physiologique pharmacocinétique (IRIS, 1999). Le facteur d'incertitude retenu est de 30. Il tient compte de la variabilité interindividuelle et de l'utilisation d'un LOAEL plutôt que d'un NOAEL dans la construction de la VTR (tableau 4).

Il n'y a pas de facteurs d'ajustement interspèces. Les études in vivo et in vitro ont montré que l'homme était moins sensible que l'animal sur le plan pharmacodynamique. Le modèle PBPK permet de s'affranchir du facteur d'ajustement toxicocinétique.

**TABLEAU 4 : EGBE, résumé de la construction de la  $RfC$  (IRIS, 1999).**

type d'étude	effet critique observé	concentrations expérimentales et déduites	facteurs d'incertitude UF	MF	VTR $RfC$
chronique, rat femelle, inhalation	hémolyse	$BMC_{max05}(HEC)=78$ ppm =380 mg/m <sup>3</sup> PBPK et $BMC_{05}$	30	1	13 mg/m <sup>3</sup>

$BMC_{max05}$  (HEC) : concentration équivalente humaine - « human equivalent concentration ».

En France, des valeurs de référence pour l'EGBE ont été déterminées sur la base des principes retenus par l'US EPA, mais l'étude d'origine a été choisie pour tenir compte des effets sur le développement in utero [13]. Dans ce cas, d'après l'étude de Tyl et al. [66] et en retenant les facteurs d'incertitude adéquats (selon l'OMS), on obtient à partir d'un NOAEL de 50 ppm pour deux types d'effets chez le rat (altération du squelette et diminution du nombre de progénitures viables), une RfC de 0,06 mg/m<sup>3</sup>. Cette valeur est obtenue en utilisant la méthode traditionnelle (détermination du NOAEL). Le facteur d'incertitude appliqué (1 000) tient compte de la variabilité interspèce et interindividuelle ainsi que de la nature et de la sévérité de l'effet considéré (tableau 5).

**TABLEAU 5 : EGBE, résumé de la construction de la RfC<sub>DT</sub> (1999).**

type d'étude	effet critique observé	doses expérimentales	facteurs d'incertitude		VTR RfC
			UF	MF	
6 <sup>ème</sup> au 15 <sup>ème</sup> jour de gestation, rat, inhalation	variations du squelette diminution du nombre de progéniture viable	NOAEL : 50 ppm 241,5 mg/m <sup>3</sup> NOAEL(ADJ) : 60 mg/m <sup>3</sup>	1 000	1	0,06 mg/m <sup>3</sup>

NOAEL(ADJ) : ajustement de la concentration inhalée pour une exposition continue sur 24 heures.

Cet exemple montre qu'à partir d'un NOAEL pour un effet sur le développement plus élevé qu'un LOAEL pour un effet critique (observé avant), il est possible de déterminer une valeur toxicologique de référence beaucoup plus faible (de l'ordre de 200 fois plus faible) lorsqu'on tient compte de la sévérité de l'effet considéré et que les méthodes de construction diffèrent par rapport aux données disponibles (application d'un facteur d'incertitude supplémentaire de 10, sauf si les données permettent d'écarter un risque éventuel sur le développement embryofœtal).

Cet exemple milite pour que, à l'instar des effets cancérigènes, ces effets soient considérés à part en évaluation du risque et justifient la construction d'une VTR spécifique, sous peine d'avoir toujours des VTR très pénalisantes. En outre, la VTR ne serait pas élaborée pour une durée vie entière mais plutôt pour une exposition de quelques jours à quelques mois (pendant l'organogenèse ou pendant toute la durée de la grossesse), étant donné qu'une exposition maternelle même de courte durée peut être nuisible pour le fœtus et que la durée de gestation chez l'homme est inférieure à la définition de la durée d'une exposition chronique.

## 2.2.11. Conclusion

La précision de la VTR va dépendre d'un certain nombre de facteurs associés à chacune des étapes de sa construction [28] (tableau 6).

**TABLEAU 6 : Facteurs affectant la précision de la VTR pour les effets à seuil.**

Espacement des doses	Effet critique			Taille du facteur d'incertitude	Niveau de confiance	Précision de la VTR
	Sévérité de l'effet	Pente de la droite	Correspondance espèce / souche			
Petit	Mineur	Forte	Bon	Petit	Fort	Fine
↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
Large	Sévère	Faible	Mauvais	Grand	Faible	Mauvaise

On peut moduler les facteurs relatifs à la qualité des données en étant plus sévère dans la définition de l'effet toxique (par exemple en considérant un effet toxique mineur) ou en améliorant les schémas expérimentaux (par exemple en utilisant plus de groupes de doses). Le

niveau de confiance dépend essentiellement des données disponibles sur la toxicologie de la substance étudiée. Le facteur d'incertitude reflète par définition les incertitudes associées à la VTR, donc plus il sera petit, plus la précision sera bonne.

## 2.3. Effets toxiques sans seuil

Actuellement, les effets mutagènes et cancérigènes génotoxiques composent cette catégorie. L'hypothèse majeure est qu'il n'y a pas de seuil de toxicité ; autrement dit, quelle que soit l'intensité de l'exposition, une probabilité de survenue de la pathologie y est toujours associée.

Cette hypothèse repose sur le postulat suivant : la cancérogenèse est un processus à plusieurs étapes (initiation, promotion, progression...) et les agents cancérigènes peuvent agir à une, plusieurs ou toutes ces étapes. Dans le cas des cancérigènes initiateurs (agents mutagènes), il est convenu qu'un petit nombre d'événements moléculaires peut provoquer des changements dans une seule cellule et déclencher une prolifération incontrôlée.

Des modèles mathématiques, prenant en compte l'ensemble des données sur la relation dose-réponse, ont été conçus pour reproduire ce phénomène biologique. Le choix des modèles d'extrapolation dépendra des informations chimiques et biologiques que l'on a sur le mécanisme du processus en cause. Ces modèles interprètent l'extrapolation des fortes doses vers les faibles doses, mais ils ne tiennent pas compte de l'extrapolation des données animales à des données humaines, aussi le schéma général de construction comprend plusieurs étapes.

### 2.3.1. Schéma général de construction

Classiquement, on distingue trois étapes pour construire une VTR [72]. Les deux premières n'ont pas d'ordre prédéfini. Ce sont :

1. la détermination d'un équivalent de dose pour l'homme ;
2. la modélisation des données expérimentales ;
3. l'extrapolation vers le domaine des faibles doses, associé au domaine des faibles risques. Celle-ci est soit directement réalisée à partir de la courbe résultant de la modélisation ci-dessus, soit réalisée graphiquement par extrapolation linéaire jusqu'à l'origine.

Notons que certaines agences ou organismes qualifiés n'effectuent pas systématiquement toutes ces étapes (cf chapitre 3).

### 2.3.2. Détermination d'un équivalent de dose pour l'homme

L'objectif est de tenir compte des différences de toxicocinétique qui existent entre l'animal et l'homme lorsque la VTR est construite à partir d'études chez l'animal, *quelle que soit la voie d'exposition prise en compte*. Par exemple, la dose équivalente humaine repose sur un ajustement dosimétrique qui, à partir des données animales et pour une exposition par voie orale, suit l'hypothèse que les espèces ont la même sensibilité et déclenchent le même effet toxique si elles absorbent la même dose par unité de surface corporelle. Les surfaces corporelles sont approximativement proportionnelles dans un rapport 3/4 des poids corporels et les doses équivalentes sont exprimées en  $\text{mg}/(\text{poids du corps})^{3/4}/\text{jour}$  [69].

L'expression mathématique du calcul de l'équivalent de dose pour l'homme est la suivante :

$$DEqH = d_A \times \frac{P_A}{70} \times \left[ \frac{70}{P_A} \right]^{3/4} = d_A \times \left[ \frac{P_A}{70} \right]^{1-3/4},$$

Avec DEqH = dose équivalente humaine,  $d_A$  : dose administrée à l'animal,  $P_A$  : poids de l'animal (on utilise souvent un poids standard : 0,034kg pour la souris, 0,34kg pour le rat), et 70 : poids standard humain (en kg).

Cet ajustement dosimétrique est parfois réalisé après application du modèle mathématique. L'équation obtenue doit alors être transformée en terme d'ERU en  $(\text{mg/kg/j})^{-1}$ . Il s'agit de l'inverse

d'une dose. La relation devient :  $DEqH = d_A \times \left[ \frac{70}{P_A} \right]^{1-3/4}$  [32].

### 2.3.3. Modélisation des données expérimentales

Deux types de modèles permettent de décrire les données expérimentales : les modèles statistiques et les modèles mécanistes.

#### 2.3.3.1. Les modèles statistiques

##### *Définition-principe*

Les modèles statistiques sont nombreux. Les plus couramment rencontrés sont les modèles probit, Weibull et logit. Les modèles probit et Weibull sont des modèles de distributions de tolérances, fondés sur deux hypothèses : (i) la formation de tumeurs fait partie des réponses toxicologiques de type « tout-ou-rien » ; (ii) chaque individu a son propre niveau de tolérance au composé testé et ne développera de maladie que si ce niveau de tolérance est dépassé. C'est une tolérance individuelle [8].

Ainsi, lorsqu'une population est exposée à une certaine dose, les individus dont le niveau de tolérance sera dépassé vont développer un effet nocif alors que les autres seront sains. Lorsque la dose reçue augmente, la proportion de la population dont le niveau de tolérance est dépassé croît, donnant une courbe dose-réponse additive montrant le cumul des distributions de tolérances [National Commission on Risk Assessment and Risk Management, site internet]. Ces équations sont représentatives d'une courbe sigmoïdale. Elles ajustent toutes bien les données observables.

Le modèle logit correspond simplement à une modélisation empirique d'une probabilité de réponse. Une description des différents modèles est donnée en annexe 3.

##### *Les modèles*

Ils ont été utilisés dans le passé lorsque les mécanismes mis en jeu dans la cancérogenèse n'étaient pas connus. La modélisation de toutes les données expérimentales observées permettait d'obtenir une courbe servant à estimer la relation dose-réponse aux faibles doses non observées en réalité. Les modèles Weibull, Probit et Logit en sont les principaux types. L'utilisation de ces modèles en évaluation quantitative du risque relève plutôt de l'histoire (certains ont été développés et utilisés pour les études de toxicité aiguë dans le but de calculer des paramètres comme la  $DL_{50}$ ).

### 2.3.3.2. Les modèles mécanistes

#### Définition-principe

Ces modèles reposent sur trois concepts fondamentaux : (i) la relation entre la dose et l'altération des cellules est linéaire, (ii) tous les individus sont considérés comme identiques et (iii) la réponse de chaque individu face à l'altération cellulaire est déterminée par le hasard. Ainsi, tous les individus exposés à la même dose de produit devraient avoir le même risque de développer un cancer.

#### Les modèles

Ils sont fondés sur des principes moins empiriques puisqu'ils ont été développés à partir d'hypothèses sur le mécanisme d'action de la cancérogenèse : une simple cellule suffit à déclencher le mécanisme de cancérisation et une réponse positive au niveau cellulaire est le résultat de la survenue aléatoire d'un ou plusieurs événements biologiques irréversibles. Ces événements peuvent intervenir dans un ordre quelconque et on parle des modèles « à coups » ou bien ils surviennent dans un ordre précis et on parle des modèles « à étapes ». Ils peuvent également prendre en compte le délai d'apparition de la pathologie étudiée (en général, les tumeurs) et on parle de modèles « time-to-tumor ».

#### 2.3.3.2.1. Les modèles à coups

##### Le modèle « one hit »

C'est la plus simple description d'une relation dose-réponse. Il a été formulé en 1924 par Crowther pour étudier les relations dose/cancers provoqués par les rayons X. L'idée biologique suppose que les tumeurs sont initiées par un seul événement rare se produisant au hasard, et que la probabilité que cet événement se produise pour un individu donné (causant le développement d'une tumeur) augmente proportionnellement avec la dose reçue. La forme du modèle est un cas particulier des modèles multi-coups, multi-étapes et Weibull. Il s'agit d'une équation exponentielle linéaire, ou linéaire dans le cas particulier des faibles doses.

L'approfondissement des connaissances a montré que le développement d'un cancer semblait être un processus à plusieurs étapes. Ce modèle serait en quelque sorte une trop grande simplification du processus puisqu'il donne une relation nécessairement linéaire. Il ne serait donc une description adéquate seulement dans certains cas particuliers.

##### Le modèle « multi hit »

Il doit être compris comme une généralisation du modèle « un coup ». Il suppose que plusieurs transformations cellulaires sont nécessaires avant que la cellule devienne cancéreuse. Ces atteintes sont traduites par un nombre critique d'événements « k ». Rai et Van Rysin en déduisent alors une équation supposant que la probabilité que chaque événement se produise est proportionnelle à la dose et la distribution d'un nombre donné de coups suit une loi de Poisson [55]. Il en résulte l'expression de la probabilité qu'un individu réponde à une exposition continue pendant la vie entière. Il possède deux paramètres intéressants : le nombre de coups k et le coefficient ajusté  $\lambda$ . k est inconnu ; il peut être estimé à partir des données ou bien fixé arbitrairement. Tous les coups agissent sur une seule cible.  $\lambda$  correspond à la cote de proportionnalité entre la probabilité d'un coup et la dose.

Ce modèle s'est montré mathématiquement attractif car il possède deux paramètres variables permettant d'ajuster au mieux les données [76]. Cependant la cohérence avec les processus

biologiques est mise à mal car les ajustements convaincants au niveau mathématique peuvent conduire à des nombres d'événements « k » irréalisables (par exemple 0,5 !).

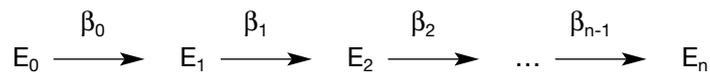
Les modèles à coups ne sont pas utilisés et rarement étudiés dans la littérature actuelle. C'est pourquoi par la suite, nous nous focaliserons sur l'étude des modèles à étapes.

### 2.3.3.2.2. Les modèles à étapes

#### Le Modèle multi-étapes linéarisé (LMS : linearized multistage)

Il est venu remplacer le modèle « un coup » utilisé auparavant. Il est plus flexible et ajuste mieux les données disponibles. Il est construit sur la base de deux hypothèses fortes : l'induction de la réponse cancérogène suit le hasard des événements biologiques, et la fréquence de chaque événement est en relation linéaire avec la valeur de la dose [3].

Le modèle LMS tire son origine de la théorie multi-étapes de Armitage et Doll de 1954 qui mentionne qu'une cellule doit passer séquentiellement par X étapes avant de devenir cancéreuse. Les temps mis par la cellule pour franchir chaque étape sont indépendants et distribués de façon exponentielle. De même, différentes cellules peuvent progresser vers un cancer indépendamment les unes des autres. Le schéma suivant en est une illustration simplifiée :



$E_0$  représente la cellule normale et  $E_n$  la cellule maligne.  $\beta_j$  est le taux de transition entre les états  $E_j$  et  $E_{j+1}$ , sachant que  $j$  varie de 0 à  $n-1$ .

Le modèle LMS est représenté de la même façon, mais il n'y a pas de facteur « temps ». Il ajuste les données concernant les doses utilisées, le nombre d'animaux utilisés pour chaque expérience et le nombre d'animaux développant la tumeur considérée dans chaque groupe de dose expérimentale. Il est décrit par la fonction mathématique suivante :

$$P(d) = 1 - e^{-(q_0 + q_1 d + q_2 d^2 + \dots + q_k d^k)}$$

où  $P(d)$  est la probabilité de développer un cancer sachant qu'on est exposé continuellement pendant toute la vie à une dose  $d$ , c'est-à-dire la probabilité de réponse à la dose  $d$  ;  $q_i$  sont les coefficients de dose ajustés au modèle avec  $i = 0, 1, \dots, k$  ( $q_i \geq 0$  paramètres non négatifs, déterminés par la méthode du maximum de vraisemblance, [17]) ;  $k$  est le nombre d'étapes sélectionné par le meilleur ajustement au modèle tenant compte du nombre de groupes de doses disponibles.

Chaque étape peut être assimilée à une fonction linéaire de la dose, chacune étant indépendante de l'autre, mais nécessaire pour l'expression de la tumeur. La fonction est de type polynomiale. Mais les paramètres de chaque étape ne peuvent pas être réellement décrits car ils ne sont pas identifiés par des processus biologiques. Ils sont estimés empiriquement par ajustement des données observées. Il y a donc perte de l'interprétation biologique de départ.

L'équation décrit une courbe de forme sigmoïde. Le degré du polynôme est restreint à un nombre fini. Quand le polynôme n'a qu'un seul degré, le modèle est équivalent au modèle « un coup » fondé sur une approximation linéaire de la relation dose-risque de cancer aux faibles doses. Pour des expositions suffisamment faibles, les grands termes du polynôme sont considérés négligeables et la limite supérieure de l'intervalle de confiance du risque apparaît

comme une ligne droite (dont la pente est utilisée comme ERU par l'US EPA) [18]. Cette assertion est valable pour des excès de risque compris entre 0 et 1 % [67]. L'utilisation d'une limite supérieure de l'intervalle de confiance du risque plutôt que l'estimation centrale permet d'avoir une valeur d'excès de risque maximisée, afin de se situer dans une approche conservatrice pour la santé humaine.

L'US EPA [67] décrit une autre équation applicable à des risques supérieurs à 1 %. Dénommée « one hit equation for high carcinogenic risk levels », elle est décrite par :

$$P(d) = 1 - e^{(-CDI \times Sfo)} \quad \text{avec } P(d), \text{ la probabilité de réponse à la dose } d ; \text{ CDI,}$$

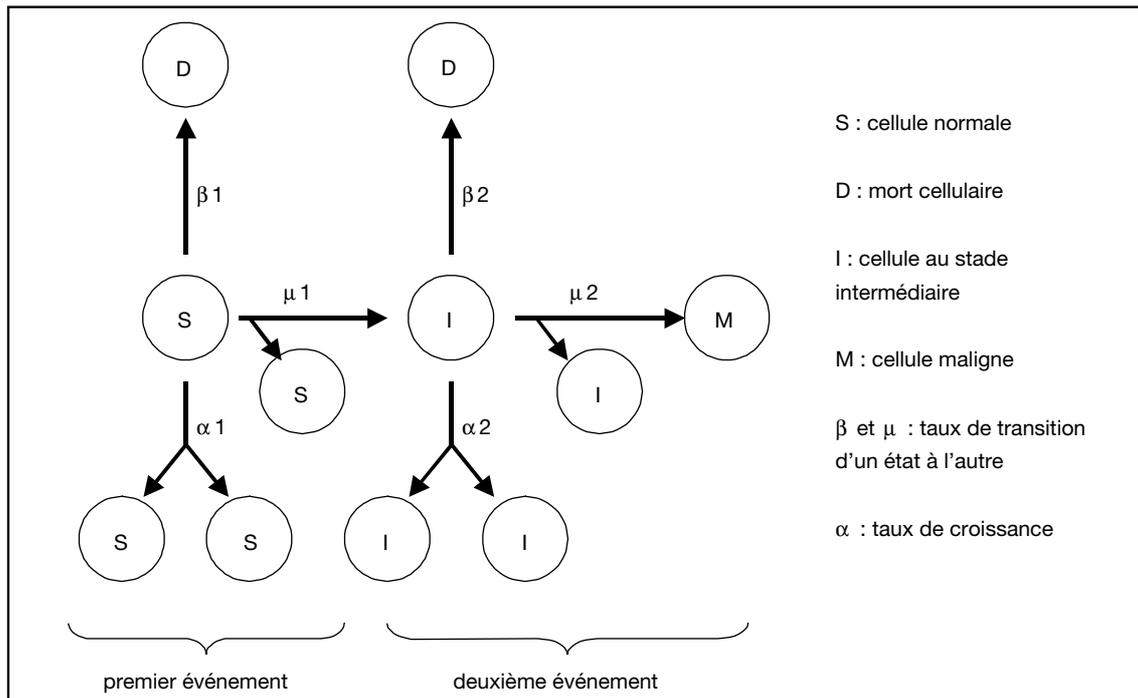
l'exposition journalière (Chronic Daily Intake) et Sfo, le « slope factor ».

### Le modèle de Moolgavkar-Venzon-Knudson (MVK)

Egalement dénommé modèle d'expansion clonale à deux étapes, le modèle MVK est une adaptation biologique du modèle LMS. Il est fondé sur l'hypothèse que l'activation d'oncogènes est le processus général de la transformation maligne qui s'effectue en deux étapes : initiation et promotion (figure 3). Seules deux transitions sont alors nécessaires pour aboutir à une cellule maligne, alors que le modèle LMS considère 1 à n transitions possibles. Le modèle a aussi pour avantage d'intégrer des données en fonction du temps (modèle « time-to-tumor »).

La construction de ce modèle est associée à quatre hypothèses : (1) dans chaque tissu, il existe un pool de cellules susceptibles de devenir malignes (identifié pour les cellules souches, le pool peut changer de taille pendant la vie), (2) les tumeurs malignes sont formées par un processus clonal : elles proviennent d'une seule cellule génitrice transformée, (3) la transformation maligne d'une cellule est le résultat de deux événements spécifiques, rares, héréditaires et irréversibles, (4) ces événements ont lieu pendant la division cellulaire (supposition partiellement ignorée dans le développement mathématique) [49].

FIGURE 3 : Illustration du modèle MVK



Il s'intéresse seulement aux probabilités de transition d'une cellule normale à une cellule intermédiaire puis à une cellule maligne. Il suppose donc l'occurrence de deux événements distincts, rares et irréversibles pour voir apparaître un cancer. Le premier événement conduit à la formation d'un clone de cellules initiées ; le deuxième événement conduit à la perte de contrôle de la croissance cellulaire. L'incidence de cancer au temps  $t$  est représentée par l'équation suivante :

$$I(t) = \frac{\mu_1 \mu_2 N}{\alpha_2 - \beta_2} \left[ e^{(\alpha_2 - \beta_2)t} - 1 \right],$$

où  $N$  est une constante et correspond au nombre de cellules normales dans un tissu, et où le nombre de cellules intermédiaires au temps  $t$  est considéré comme un processus poissonnien d'intensité  $(\mu_1 \cdot N)$ .

Certains auteurs ont développé des modèles intégrant le paramètre de temps d'apparition de la tumeur. Ce sont les modèles « time-to-tumor ». Leur distribution est approximativement lognormale. La plupart des modèles mécanistes peuvent être transformés pour tenir compte du paramètre « temps » (pour les modèles statistiques, seul le modèle Weibull peut intégrer ce paramètre). On parle le plus souvent de délai nécessaire à l'apparition d'une tumeur, d'où le nom « time-to-tumor ». La modélisation du risque se fait en fonction de la dose et du temps, ce qui donne des fonctions de type  $P(d,t)$ . L'avantage est la possibilité de comparaison en termes de survie. Cependant, les données expérimentales sur les paramètres de temps ne sont pas assez précises et sont souvent responsables d'une variation importante de l'allure de la pente au niveau des faibles doses. Ces modèles comportent aujourd'hui encore trop d'inconvénients et de difficultés d'application pour être utilisés comme méthode de choix [42].

### 2.3.4. Extrapolation dans le domaine des faibles doses

L'objectif est de construire une droite représentant le risque de développer un cancer en fonction de la dose. Cette droite peut être obtenue soit à l'aide d'une équation mathématique déterminée au préalable à partir des données expérimentales, soit par une extrapolation linéaire graphique jusqu'à l'origine à partir d'un point de départ défini comme la dose critique. C'est la pente de cette droite qui constitue la base du calcul de la VTR.

#### 2.3.4.1. A partir des modélisations mathématiques

Les modèles mathématiques définis précédemment ont tous la caractéristique de fournir des courbes dose-réponse linéaires dans la région des faibles doses. Ainsi, à partir des équations obtenues et en respectant la méthode de construction des VTR pour les effets sans seuil, il est possible d'utiliser directement ces courbes. La VTR correspond à la relation quantitative existant entre la dose et la réponse observée, il s'agit donc de la pente de la droite préalablement construite.

#### 2.3.4.2. Extrapolation linéaire jusqu'à l'origine

Egalement dénommée méthode de Gaylor et Kodell, elle a été développée lorsque la modélisation des données expérimentales a eu pour objet de déterminer une dose critique, généralement une BMD.

Si les données quantitatives sont suffisantes et les processus carcinogènes compris, on peut développer un modèle fondé sur des données scientifiques bien établies. Dans le cas contraire, qui est encore fréquent, on identifie une dose appelée  $LED_{10}$  [72]. Elle correspond à la limite inférieure de l'intervalle de confiance à 95 % de la dose et traduit une augmentation de 10 %

de l'incidence tumorale. Il s'agit donc d'une appellation différente de la  $BMD_{10}$ . Elle devient le point de départ pour l'extrapolation graphique jusqu'à l'origine du repère. L'excès de risque unitaire est calculé de la manière suivante :

$$ERU = \frac{0,10}{LED_{10}}$$

Cette benchmark dose est déterminée à l'aide de modèles statistiques de distribution de probabilités ou de régression linéaire ou non linéaire, ou par le modèle LMS. Le modèle MVK est également utilisé lorsque des données biologiques sont disponibles.

## 2.3.5. Conditions d'utilisation des modèles

### 2.3.5.1. Modèles statistiques

Utilisés dans les années 1960-70 pour l'extrapolation vers les faibles doses des relations dose-réponse lors de la construction de valeurs de référence pour les toxiques cancérigènes, les modèles statistiques ont été largement mis de côté au profit des modèles à étapes qui s'accordaient mieux avec les suppositions théoriques de linéarité.

Actuellement, ils restent principalement appréciés pour l'ajustement des données expérimentales (calcul d'une benchmark dose par exemple), pour la modélisation des données épidémiologiques, ou pour l'extrapolation de données en écotoxicologie dans le cadre de la détermination des critères de qualité environnementale.

Le modèle de Weibull est encore utilisé pour la construction des excès de risque unitaire (ERU) de la N-nitrosodiméthylamine, de la N-nitrosodiéthylamine et du benzo(a)pyrène (base de données IRIS). Pour le benzo(a)pyrène, l'ERU correspond à une moyenne géométrique de différents ERU obtenus par différents modèles statistiques et mécanistes utilisés en parallèle dont celui de Weibull.

### 2.3.5.2. Modèles mécanistes

#### LMS

Le modèle multi-étapes linéarisé est le principal modèle utilisé pour la construction des VTR des toxiques sans seuil. Il est très apprécié et constitue la méthode utilisée par défaut par l'US EPA pour le calcul des ERU, car ses paramètres sont estimés par ajustement des données observées et les suppositions théoriques à partir desquelles il découle sont en accord avec la cancérogénèse.

L'US EPA applique ce modèle pour la plupart des produits cancérigènes, lorsqu'il n'y a pas d'information suffisante sur le mode d'action du processus tumoral et qu'on ne peut donc pas appliquer de modèle plus sophistiqué. Mais on peut l'utiliser plus largement, tant que les données ne rejettent pas l'hypothèse d'absence de seuil, ou lorsqu'on a mis en évidence une activité mutagène directe ou d'autres effets sur l'ADN cohérents avec l'hypothèse de linéarité, ou bien lorsqu'on suspecte une relation dose-réponse linéaire, même sans effet direct sur l'ADN.

#### MVK

Bien qu'il soit rarement appliqué, le modèle MVK est utilisable pour les substances pour lesquelles on montre un mécanisme de formation des tumeurs en deux étapes avec initiation et

prolifération cellulaire. Quelques études y font référence, par exemple pour les particules diesel [71] ou pour le formaldéhyde [14]. Mais ce modèle n'est pratiquement jamais utilisé car les paramètres nécessaires à sa construction sont rarement identifiables. Cependant, on s'y intéresse toujours car il ouvre des perspectives de recherche intéressantes.

### **2.3.6. Avantages / limites**

En général, les modèles mathématiques, qu'ils soient statistiques ou mécanistes, sont limités par le manque de données expérimentales permettant de conduire à des relations fiables.

Les modèles complexes qui sont capables d'incorporer des données biologiquement fondées devraient être capables de fournir à l'avenir de meilleures estimations du risque.

#### **2.3.6.1. Modèles statistiques**

Ces modèles ajustent statistiquement bien les données expérimentales mais ils ne considèrent pas les hypothèses admises sur la cancérogenèse. Aussi, ils ont été progressivement abandonnés au profit des modèles mécanistes.

#### **2.3.6.2. Modèles mécanistes**

##### **LMS**

C'est l'un des modèles les plus répandus dans la construction d'une relation dose-réponse. Il est conservateur. Contrairement aux modèles statistiques, les modèles mécanistes ont l'avantage de pouvoir intégrer des données de toxicocinétique plus ou moins complexes comme les modèles physiologiques pharmacocinétiques, évitant d'utiliser les équations empiriques pour passer de l'animal à l'homme.

Par contre, même si les suppositions théoriques de départ interprètent les mécanismes de la cancérogenèse, les paramètres ne sont plus interprétables en termes biologiques du fait de leur simplification. Ils sont simplement ajustés par rapport aux données expérimentales fournies par les études de toxicologie. Aussi, leur interprétation est conditionnée par le protocole expérimental [47].

##### **MVK**

Ce modèle est attractif car ses paramètres sont directement interprétables en termes biologiques. Cependant, l'ensemble des données nécessaires à sa mise en œuvre est rarement disponible : pour une approche rationnelle de l'évaluation de risque, il faut disposer de certaines informations concernant des questions biologiques fondamentales du type : comment le nombre de cellules souches (ou de cellules initiées, ce qui est encore plus difficile) dans un tissu évolue-t-il avec l'âge ? Quels sont les taux de division et de différenciation de ces cellules ? Comment ces taux changent-ils après administration d'un toxique ? [16,37].

##### **Méthode de Gaylor et Kodell**

C'est une méthode simple et conservatrice. Elle permet une harmonisation avec les méthodes utilisées pour les effets à seuil, puisque la détermination d'une dose critique correspondant à une augmentation particulière de la fréquence d'un effet caractérise également la BMD des effets à seuil [31]. Ainsi, un point de départ identique est déterminé pour les effets à seuil et sans seuil.

Elle permet également une harmonisation entre différentes agences, puisque Health Canada utilise une dose critique comme VTR pour les toxiques cancérigènes.

L'utilisation de la limite inférieure de l'intervalle de confiance, plutôt qu'une estimation centrale, tient compte de la variabilité des données expérimentales, mais n'est pas utilisée par tous les organismes.

## 2.3.7. Exemples

### 2.3.7.1. Modèles statistiques : la N-Nitrosodiméthylamine

L'objectif de l'US EPA a été de déterminer un excès de risque unitaire pour une exposition journalière par ingestion d'eau (IRIS, 1993).

La N-Nitrosodiméthylamine est une substance probablement cancérigène chez l'homme (B2). Elle induit des tumeurs sur des sites multiples (poumons, foie, reins) chez les mammifères, qu'ils soient rongeurs ou non, pour plusieurs voies d'exposition.

L'exposition humaine à des nitrosamines existe mais résulte du contact de mélanges de produits. Les facteurs confondants limitent donc l'utilisation de données humaines pour la construction d'une VTR.

Les études toxicologiques utilisées ont été celles de Peto et al. [51] qui ont exposé des groupes de rats Colworth (36 par sexe et par dose) à 15 concentrations de N-Nitrosodiméthylamine dans leur eau de boisson, comprises entre 0,033 et 16,896 ppm. Les tumeurs hépatiques ont été la cause de la mortalité liée à l'intoxication.

Pour cet exemple, la détermination d'un équivalent de dose pour l'homme a été effectuée en second, par application des ajustements nécessaires directement sur la pente de la relation dose-réponse caractérisée chez l'animal.

#### Modélisation

Les données expérimentales ont été modélisées à l'aide du modèle de Weibull, en considérant l'excès de risque en fonction de la dose. Les tumeurs du foie ont été retenues comme effet critique. La pente de la relation dose-réponse a été calculée à  $7,8 \text{ (mg/kg/j)}^{-1}$ .

#### Détermination d'un équivalent de dose pour l'homme

En tenant compte des différences de surfaces corporelles entre le rat et l'homme, la pente équivalente chez l'homme a été calculée à  $51 \text{ (mg/kg/j)}^{-1}$ .

Ainsi, pour un homme pesant 70 kg et buvant 2L d'eau par jour, l'US EPA a calculé un « drinking water unit risk » (ERU pour l'ingestion d'eau de boisson) à  $1,4 \cdot 10^{-3} \text{ (}\mu\text{g/L)}^{-1}$ .

Comme on considère l'hypothèse de linéarité aux faibles doses valable uniquement dans une gamme de réponse allant de 0 à 1 %, cet ERU ne sera valable que pour des concentrations dans l'eau inférieures à  $7 \mu\text{g/L}$ , concentration correspondant à un excès de risque de 0,01.

### 2.3.7.2. Modèles mécanistes : l'acrylonitrile

Le modèle LMS est le plus utilisé dans la construction des VTR. On trouve dans la littérature quelques articles relatifs à la mise en place du modèle MVK, ses limites et ses avantages, mais

les VTR ne sont pas construites sur la base de ce modèle. Nous avons donc choisi d'illustrer les exemples de modèles mécanistes par l'utilisation du modèle LMS.

L'objectif est de déterminer un excès de risque unitaire pour une exposition journalière par ingestion d'eau (IRIS, 1997).

L'acrylonitrile est une substance probablement cancérigène pour l'homme (B2). Les tumeurs considérées sont nombreuses : tumeurs du cerveau, de la moelle épinière, carcinomes de l'estomac et des glandes cérumineuses.

Il n'y a pas d'étude épidémiologique permettant d'estimer de manière valide le risque associé à une exposition de la population humaine à l'acrylonitrile par voie orale. Les études toxicologiques utilisées sont celles de Biodynamics et Quast et al. qui ont exposé des groupes de rats (Fischer, Sprague-Dawley) à l'acrylonitrile par l'eau de boisson [53].

La détermination d'un équivalent de dose pour l'homme est la première étape. Chaque point de la relation dose-réponse a été ajusté selon le principe décrit précédemment en tenant compte des différences de surfaces corporelles entre le rat et l'homme.

Les données expérimentales transformées pour correspondre à des données équivalentes humaines ont ensuite été modélisées à l'aide du modèle multi-étapes linéarisé. La pente a été calculée par la moyenne géométrique des trois pentes des relations dose-réponse provenant des études citées précédemment, fournissant la valeur de  $5,4 \cdot 10^{-1} \text{ (mg/kg/j)}^{-1}$ .

Ainsi, si un homme de 70 kg boit 2L d'eau contaminée par  $1 \mu\text{g/L}$  d'acrylonitrile par jour, le risque de développer un cancer est de  $1,5 \cdot 10^{-5}$ .

### 2.3.8. Conclusion

De nombreux modèles sont proposés pour élaborer une relation dose-réponse et le choix est souvent difficile. La capacité d'ajustement au niveau des observations diverge peu selon les modèles. Cependant, aux niveaux des faibles doses, donc dans le cas de l'estimation d'un risque environnemental, les différences d'un modèle à l'autre s'intensifient.

Certains de ces modèles paraissent plus acceptables car ils sont défendus par des arguments biologiques, cependant ils ne sont pas plus utilisés car leur application demande des données souvent indisponibles.

Il est donc souvent impossible de vérifier quel sera le modèle fournissant aux faibles doses les estimations les plus correctes puisqu'on ne connaît pas le vrai niveau de risque. Face à ces incertitudes et par précaution, les outils les plus utilisés sont le modèle LMS et la méthode d'extrapolation linéaire à l'origine mis en place par l'US EPA. Le modèle LMS est le plus conservateur, c'est-à-dire qu'il fournit la plus forte probabilité de cancer par unité de dose de la substance toxique.

## 2.4. Discussion

Il n'est pas de notre propos de conclure qu'une méthode est meilleure qu'une autre, d'autant que chacune doit être replacée dans le contexte scientifique qui prévalait au moment où elle a été proposée. Mais une bonne compréhension de leurs avantages et de leurs limites est

nécessaire pour porter un jugement qualifié. On ne peut garantir que les méthodes les plus récentes soient plus solides que leurs prédécesseurs ; un temps de validation est indispensable. La date d'élaboration de la VTR ne peut donc suffire à s'affranchir du regard critique à porter sur les méthodes employées. Enfin, il est important de comprendre l'optique dans laquelle chaque instance a construit les VTR qu'elle propose. Il apparaît donc utile de se pencher sur les procédures qui ont conduit à l'établissement des VTR afin de permettre à ces règles de devenir un déterminant du choix final de la VTR la plus pertinente pour la situation analysée.



## 3. Les méthodes employées par différents organismes

Ce chapitre est consacré à la description et l'analyse des approches retenues par les différentes instances nationales et internationales pour élaborer les VTR. Ce n'est pas tant la prépondérance d'une méthode de construction sur une autre qui doit servir de base au raisonnement mais plutôt la mise en évidence des confiances respectives allouées par les instances vis-à-vis de ces méthodes.

### 3.1. Effets à seuil

Pour tous les organismes, l'étape initiale consiste à recueillir puis sélectionner les informations relatives aux effets toxicologiques engendrés par la substance, issues d'expérimentations animales ou d'études en population humaine. Chaque organisme évalue également de façon critique les renseignements portant sur les concentrations de cette substance dans l'environnement à laquelle est exposée la population.

#### 3.1.1. Détermination de l'effet et de la dose critiques

Pour les substances qui ont un effet à seuil, même si toutes les agences s'accordent à dire que les éléments d'incertitude sont trop importants et que la détermination de la dose critique dépend plus des conditions expérimentales que de la substance toxique, la méthode traditionnelle qui détermine le NOAEL est largement utilisée car elle est simple à appliquer, facile à comprendre, et n'a pas montré d'importante défaillance depuis son développement dans les années 1950.

L'US EPA utilise cette méthode pour les substances non cancérogènes en général, sauf dans le cas où certaines données sont en faveur d'une absence de seuil (effet sanitaire même pour des doses très faibles). Health Canada propose cette approche pour les substances classées dans les groupes IV, V et VI de sa classification (les classifications des molécules cancérogènes de chaque organisme sont répertoriées en annexe 2). Cependant, l'approche adoptée pour les substances du groupe VI (inclassable) repose davantage sur le manque de données relatives à la cancérogénicité que sur la connaissance des effets critiques. Les substances du groupe III (susceptibles d'être cancérogènes pour l'homme) sont généralement évaluées par cette approche bien que retenir l'hypothèse d'un seuil pour ces substances ne soit pas toujours fondé sur des connaissances scientifiques.

L'US EPA a développé le concept de BMD à la fin des années 80. Quelques substances ont des VTR élaborées à l'aide de cette méthode. Malgré un intérêt croissant porté par l'ensemble des agences (ATSDR, Health Canada, ILSI), des questions restent en suspens et limitent une utilisation plus large, notamment le choix de la valeur de BMR et l'utilisation ou non d'une limite inférieure d'un intervalle de confiance qui pénalise encore la VTR.

### 3.1.2. Les facteurs d'incertitude

Les facteurs d'incertitude qui sont appliqués à la dose critique sont proches d'une agence à l'autre. Les variations intra et interespèces sont aujourd'hui invariablement représentées par un facteur 1 si les données toxicocinétiques et toxicodynamiques existent, par un facteur compris entre 2,5 et 4 si seules les données toxicocinétiques ou toxicodynamiques existent, et par un facteur 10 si ces données ne sont pas disponibles.

Les autres facteurs d'incertitude sont appliqués en fonction de la qualité de la base de données. Leur terminologie varie d'une agence à l'autre mais ils sont en général appliqués pour les mêmes raisons. Un facteur d'incertitude supplémentaire est parfois proposé par Health Canada et l'OMS pour le cas où l'on disposerait de renseignements suffisants sur un éventuel potentiel d'interaction entre la substance étudiée et d'autres substances chimiques ordinairement présentes dans l'environnement [75]. Parfois, un autre facteur d'incertitude compris entre 1 et 10 peut être appliqué par Health Canada, pour rendre compte du manque de preuves concernant la cancérogénicité des substances du groupe III [75].

### 3.1.3. Comparaison des résultats

Les principales différences entre les VTR relatives aux effets à seuil établies par différents organismes sont essentiellement liées aux choix des durées d'exposition. Ainsi, l'interprétation que chaque organisme donne au terme de chronicité peut sensiblement varier.

Les RfD chroniques sont applicables à partir de 7 ans d'exposition (1/10 de la vie correspond à la définition de la subchronicité en toxicologie animale) et jusqu'à une exposition vie entière [67]. Les RfD<sub>dt</sub>, concernant les seuls effets sur le développement embryofœtal, sont applicables à partir d'une seule exposition même de courte durée du fait de la période critique que constitue l'organogenèse. Les MRL chroniques, développés par l'ATSDR, sont applicables à partir d'une année d'exposition [12].

L'US EPA construit également des RfD applicables pour des durées d'exposition plus courtes mais celles-ci n'ont pas de caractère officiel.

Les MRL de l'ATSDR existent aussi pour des expositions aiguës (jusqu'à 14 jours) et subchroniques (de 15 jours à un an).

### 3.1.4. Récapitulatif

Le tableau récapitulatif suivant permet de visualiser les pratiques courantes utilisées par les différentes instances compétentes et reconnues dans l'élaboration des VTR.

**TABLEAU 7 : Effets à seuil, comparaison des pratiques de quelques organismes reconnus.**

		US EPA Etats Unis	ATSDR Etats Unis	Health Canada Canada	RIVM Pays-Bas	OMS International	
Effets à seuil	Dose critique	NOAEL/LOAEL ou Benchmark dose	NOAEL/ LOAEL	NOAEL/ LOAEL	NOAEL/ LOAEL	NOAEL/ LOAEL	
	Facteurs d'incertitude	UFH	1/3/10	1/3/10	1/3.16 × 1/3.16	≤10	1/3.16 × 1/3.16
		UFA	1/3/10	1/3/10	1/2.5 × 1/4	≤10	1/2.5 × 1/4
		UFS	≤10	≤10	≤100	≤100	≤100
		UFL	1/3/10	1/3/10			
		UFD	≤10				
	MF	≤10	≤10	≤10		≤10	
VTR	RfD / RfC	MRL	DJA/DJT/CAA	TDI / TCA	ADI/TDI/CAA		
Sources		Federal Register, 1998, 2000 US EPA, 1992	Chou et al., 1998	Health Canada, 1994, 1996	RIVM, 1997, 2001	WHO, 1994	

## 3.2. Effets sans seuil

Pour les effets sans seuil, ce n'est pas tant les modèles retenus pour la construction d'une VTR qui changent d'un organisme à l'autre, mais plutôt l'expression même de la VTR. Cette diversité d'expression peut parfois engendrer des difficultés de compréhension.

### 3.2.1. Nature des effets sans seuil

A l'heure actuelle, Health Canada considère l'hypothèse d'absence de seuil comme étant admissible uniquement pour la mutagenèse et la cancérogenèse génotoxique. Il se fonde sur la classification des substances chimiques pour poser l'hypothèse d'absence de seuil : les substances classées dans les groupes I et II (cancérogènes et probablement cancérogènes pour l'homme) sont systématiquement considérées comme ayant des effets toxiques sans seuil.

Les autres agences (US EPA, RIVM) se fondent plus sur une approche considérant les molécules au cas par cas. Dans le cas où aucun seuil n'a pu être mis en évidence, ils considèrent l'absence de seuil comme hypothèse par défaut. De ce fait, elle s'applique encore essentiellement aux molécules cancérogènes, génotoxiques ou non, en fonction des données rassemblées.

### 3.2.2. Extrapolation aux faibles doses

Health Canada considère que le recours aux modèles mathématiques pour l'extrapolation aux faibles doses comporte trop d'éléments d'incertitude pour être utilisé en vue de la caractérisation d'un risque. En effet, l'extrapolation linéaire de plusieurs ordres de grandeur, parfois en l'absence de donnée pertinente sur les mécanismes d'induction des tumeurs ou sur les différences de toxicocinétique et de toxicodynamique existant entre l'animal et l'homme ne permet pas de caractériser un risque précis.

La particularité du RIVM est d'utiliser la dose correspondant à la plus faible incidence tumorale observée dans l'étude source comme point de départ de l'extrapolation aux faibles doses [39]. L'extrapolation est ensuite conduite selon la formule générale :

$$D_h^x = \frac{I_{human}}{I_{exp}} \times \frac{t_{exp}}{t_{life}} \times \frac{t_{exposure}}{t_{life}} \times d_{exp}$$

avec  $D_h^x$  : dose pour l'homme correspondant à un risque acceptable de cancer ;  $I_{human}$  : risque acceptable ( $10^{-4}$ ) ;  $I_{exp}$  : incidence tumorale la plus faible observée dans l'étude source ;  $t_{exp}$  : durée de l'étude expérimentale en jours ;  $t_{life}$  : durée de vie des animaux en jours (1 000 pour le rat, 750 pour la souris) ;  $t_{exposure}$  : durée de l'exposition chez l'homme en jour ;  $d_{exp}$  : dose associée à la plus faible incidence tumorale observée dans l'expérimentation.

### 3.2.3. Expression de la VTR

Alors que l'US EPA et le RIVM définissent des excès de risque unitaire, Health Canada détermine un niveau de référence dans le domaine des observations. La valeur toxicologique de référence est le potentiel cancérogène ( $TD_{05}$  ou  $TC_{05}$ ), dose ou concentration de substance correspondant à une augmentation de réponse de 5% chez les groupes exposés par rapport aux groupes non exposés, calculé à partir de l'estimation centrale de la courbe dose-réponse plutôt que de la limite d'un intervalle de confiance. Le choix du modèle d'ajustement n'est pas critiquable puisque chaque modèle a l'avantage de bien ajuster les données expérimentales.

La comparaison de chaque potentiel cancérigène avec les expositions journalières environnementales estimées ou observées de la population permet de prendre les mesures nécessaires à la protection de la santé humaine en termes de réduction des expositions. Le ratio entre l'exposition et la VTR est appelé Indice Exposition / Potentiel (IEP). Les mesures à prendre seront fortement prioritaires si l'IEP est supérieur ou égal à  $2.10^{-4}$ , elles sont de priorité moyenne pour les IEP compris entre  $2.10^{-4}$  et  $2.10^{-6}$  et sont de faible priorité pour les IEP inférieurs à  $2.10^{-6}$ , sachant que la prise de mesures se fait au cas par cas en fonction de la toxicité des produits. Ces niveaux de valeurs correspondent à la notion d'acceptabilité utilisée par Health Canada [36].

Cette approche permet d'éviter la quantification d'un risque qui comporterait beaucoup d'éléments d'incertitude (chiffre absolu basé sur des extrapolations incertaines, rendant des valeurs souvent trop conservatrices) en définissant plutôt des priorités d'action pour les substances toxiques dont l'IEP est important. Cependant, les TD/TC<sub>05</sub> peuvent être ajustées à l'aide d'une marge de sécurité appropriée, pour fournir des indicateurs permettant de juger de l'acceptabilité de l'exposition humaine, par comparaison à des quantités ingérées ou inhalées par la population humaine.

### 3.2.4. Récapitulatif

Le tableau récapitulatif suivant permet de visualiser les pratiques courantes utilisées par les différentes instances compétentes et reconnues dans l'élaboration des VTR.

Notons que l'ATSDR ne produit pas de VTR pour les effets sans seuil, donc pour les effets cancérigènes. L'OMS ne construit pas de VTR mais propose des valeurs guides dans les milieux qui s'appuient sur les VTR proposées par les autres agences.

**TABLEAU 8 : Effets sans seuil, comparaison des pratiques de quelques organismes reconnus**

		US EPA Etats-Unis	Health Canada Canada	RIVM Pays-Bas
Effets Sans seuil	Ajustement aux données observées	LMS privilegié	Tous modèles mathématiques → dose critique LED10	Tous modèles mathématiques → dose critique
	Extrapolation vers les faibles doses		Extrapolation graphique à l'origine	NA*
	VTR	ERU	TD05 / TC05	CR
Sources		Federal Register, 1998, 2000 US EPA, 1999	Health Canada, 1994, 1996	RIVM, 1997, 2001

\*NA : non appliqué

## 3.3. Evolution

Chacune des agences élaborant des VTR tente de développer une approche systématique permettant de résumer les évaluations, les conclusions sur les VTR et les réserves quant à leur utilisation. Les experts dégagent ainsi un niveau de confiance permettant à l'évaluateur de risque de situer l'état des connaissances sur la molécule étudiée.

Un haut niveau de confiance indique que la VTR est calculée sur la base de connaissances validées et qu'elle ne devrait probablement plus changer (compréhension des mécanismes d'action, mise en évidence de groupes sensibles, effets pertinents, étude chez l'homme...). Il est rare d'avoir tous ces renseignements.

Une confiance faible indique que la qualité de l'évaluation est mauvaise ou inadéquate et que des informations supplémentaires entraîneront une réévaluation pour réduire les incertitudes. L'analyse et l'interprétation des données observées prennent une place de plus en plus prépondérante en évaluation du risque sanitaire.

## 3.4. Conclusion

Les différentes méthodes existantes et les différents jugements scientifiques qui interviennent dans la construction d'une VTR rendent la plupart du temps des résultats variables, et donc plusieurs VTR pour le même produit. La diversité des méthodes peut être une source de confusions pour la caractérisation du risque ou pour la prise de décision.

Il n'y a pas de « bonnes » ou de « mauvaises » valeurs de référence. Il convient de mettre en place des méthodes fondées sur des mécanismes scientifiques cohérents, et de travailler au cas par cas en fonction du produit plutôt que d'avoir des approches systématiques. Ainsi, les différentes valeurs proviendront essentiellement de différents jugements scientifiques.

Puisque l'extrapolation est source d'incertitude, l'harmonisation doit passer par l'analyse de l'ensemble des données observées, pour fournir un point de départ cohérent avant toute extrapolation vers les faibles niveaux d'exposition.





## 4. Tendances actuelles

La qualité de la démarche d'évaluation des risques repose notamment sur l'analyse de la qualité des données inhérentes à chacune de ses étapes. La sélection des valeurs toxicologiques de référence n'échappe pas à la nécessité de cette rigueur. Aujourd'hui, cette analyse s'appuie sur tout ou partie des critères suivants :

- La notoriété de l'organisme qui produit la VTR ;
- La mise à jour récente de la VTR ;
- La transparence de l'explication de l'élaboration de la VTR ;
- L'adéquation des durées et des voies d'exposition ;
- La préférence des données humaines sur les données animales ;
- Si tous les critères précédents sont égaux, la valeur numérique la plus conservatrice pour la santé humaine est retenue [25].

Ces critères ne se déclinent pas dans un ordre particulier car pour sélectionner la VTR appropriée à l'étude réalisée, l'analyse doit être fine et globale à la fois. Il semble notamment hasardeux de faire reposer son analyse sur la méthode de construction employée. En effet, quelle que soit sa solidité, lorsque les données d'entrée ne sont pas appropriées, le résultat ne peut être satisfaisant. La compréhension des méthodes d'élaboration des VTR exposées précédemment montre l'importance de la qualité et de la sélection des connaissances acquises notamment sur la nature des effets engendrés par la substance et la toxicocinétique chez l'animal et/ou chez l'homme.

L'analyse des travaux conduits actuellement sur les méthodes d'élaboration des VTR indique que ce sont plutôt les données alimentant les méthodes qui font l'objet de nouveaux développements plus que les méthodes elles-mêmes. Ainsi, les évolutions actuelles tournent autour de quatre orientations :

- la remise en cause de la séparation dogmatique dans les méthodes d'élaboration des VTR entre les effets cancérogènes et les effets non cancérogènes ;
- l'utilisation de l'ensemble des données observées au cours des expérimentations animales notamment pour déterminer la dose critique ;
- la caractérisation des incertitudes par l'utilisation d'une approche probabiliste ;
- la réduction des incertitudes inhérentes aux extrapolations interspèces ou entre deux voies d'exposition par l'utilisation des données toxicocinétiques.

### 4.1. Des méthodes partagées

Jusqu'à maintenant, pour de multiples raisons scientifiques ou non, il était acquis d'élaborer de manière différente les VTR des effets cancérogènes et des effets non cancérogènes. Cette différence reposait sur deux hypothèses. La première stipule qu'il n'est pas possible de mettre en évidence une dose seuil en deçà de laquelle il peut être affirmé l'absence de survenue d'un cancer. La deuxième rapporte que les effets non cancérogènes ne se manifestent qu'au delà d'une dose seuil.

Certains exemples, pour les effets non cancérigènes, commencent à remettre en cause ce dogme. Une augmentation des troubles neurologiques, conséquence d'une exposition chronique au plomb, s'observe même pour les valeurs d'exposition les plus faibles actuellement enregistrées [44]. De même, il n'est pas possible pour le moment de mettre en évidence un seuil d'effet des polluants atmosphériques ; toute augmentation, même minime, de la concentration d'un polluant dans l'air ambiant, s'accompagne d'une augmentation des risques sanitaires associés [61].

En revanche, pour les effets cancérigènes, si l'existence de seuils de tolérance est admise, il n'en est pas de même pour les seuils de toxicité. Les études *in vitro*, animales ou humaines, ont montré que les cancers résultaient d'une cascade d'événements, tous modulés en fonction des conditions somatiques et environnementales. Aussi, pour un même niveau d'exposition, les sensibilités multiples au sein d'une population vont conduire à des probabilités de survenue diverses des cancers, en fonction des tolérances individuelles.

Au niveau de la toxicité intrinsèque des substances cancérigènes, il est difficile de conclure sur l'absence ou la présence d'un seuil au vu des observations.

Certains auteurs préconisent l'utilisation d'un précurseur de la tumorigénicité (nécrose, toxicité cellulaire, hyperplasie...) ou d'un changement dans le taux de synthèse de l'ADN pour fournir un marqueur prédisant un seuil de toxicité en dessous duquel le risque de développer la pathologie est considéré comme négligeable [33]. Là encore, la prudence est de rigueur car les tests eux-mêmes ont des seuils de sensibilité n'impliquant pas forcément de seuils de toxicité pour les produits cancérigènes.

C'est pourquoi la construction d'une VTR par une méthode plutôt qu'une autre pour certaines molécules cancérigènes est parfois controversée. Par exemple, l'action cancérigène de la 2,3,7,8-TCCD, liée à l'induction des récepteurs cellulaires *arylhydrocarbon* (Ah), est considérée comme ayant un seuil de dose par l'OMS alors que l'US EPA considère l'absence de seuil puisque les observations ne montrent pas de seuil même aux très faibles doses.

## 4.2. Une nouvelle dose critique

Jusqu'à maintenant les doses critiques déterminées définissent un seuil de toxicité : en deçà de la valeur retenue, on n'observe pas, dans les conditions expérimentales décrites, de manifestation de l'effet délétère. Cependant, la détermination de la dose critique repose sur l'utilisation d'une unique valeur expérimentale (NOAEL ou LOAEL) dont on ne connaît pas la précision.

La tendance actuelle est d'utiliser une valeur de dose correspondant à un niveau de réponse connu, autrement dit la benchmark dose (BMD) ou « estimated dose » (ED ou LED). Celle-ci est obtenue par modélisation de l'ensemble des données expérimentales. Cette dose ne représente plus un seuil de toxicité mais devient un repère dans la relation dose-réponse.

## 4.3. Facteurs d'incertitude et approche probabiliste

Baird et al. [4] et Slob et Pieters [62] se sont intéressés à la nature probabiliste des facteurs d'incertitude. Les auteurs ont proposé d'utiliser, à la place de valeurs uniques (par exemple 10), des distributions lognormales de valeurs dans la population. Ce point de vue paraît plus crédible dans la mesure où on tient compte de la variabilité de chaque facteur. Swartout et al. [65] ont montré que les distributions étaient telles que UF = 10 représente le 95<sup>ème</sup> percentile et UF = 3 représente le 50<sup>ème</sup> percentile. Par la technique de Monte Carlo, on obtient la distribution de l'incertitude globale relative à la VTR [6].

Ce concept se développe essentiellement aux Pays-Bas (RIVM) depuis quelques années. D'après Vermeire et al., les recherches sur la nature de la distribution des facteurs d'incertitude  $UF_A$ ,  $UF_H$  et  $UF_S$  apparaissent suffisamment solides pour être appliquées en évaluation de risque [74].

## 4.4. Prise en compte des données biologiques

La toxicocinétique étudie l'effet de l'organisme sur la substance toxique, à l'inverse de la toxicodynamie qui décrit l'effet de la substance sur l'organisme. L'amélioration de ces connaissances permet de s'interroger sur la validité de certaines hypothèses couramment formulées telle que la biodisponibilité totale du produit. La prise en compte de ce type de données a pour objectif d'une part d'améliorer la détermination de la dose critique et de la dose équivalente humaine, de réduire les valeurs affectées aux facteurs d'incertitude interspèces, et d'autre part, de mieux utiliser les techniques d'extrapolation d'une VTR d'une voie d'exposition à l'autre.

L'utilisation de ces données pour affiner la détermination de la dose critique nécessite de comprendre dans quelle mesure il est possible d'établir une analogie entre le devenir du produit dans l'organisme de l'animal de laboratoire et celui dans l'organisme humain. Seule l'existence de cette analogie conduira à affiner la dose équivalente humaine et la dose critique qui servira de base à l'établissement de la VTR, diminuant l'incertitude globale et, de ce fait, les valeurs appliquées aux facteurs d'incertitude. Le calcul de ces nouvelles doses s'appuie sur l'utilisation de modèles physiologiques pharmacocinétiques (une description de ces modèles est proposée en annexe 4).

Par exemple, la dose critique utilisée pour établir la VTR de l'EGBE a été déterminée en s'appuyant sur les données toxicocinétiques et physiologiques acquises chez l'animal et chez l'homme. Dans une première étape, la dose d'exposition chez l'animal a été transformée en dose interne (correspondant à la quantité de métabolites dans le sang). Ensuite, la comparaison des cinétiques et des paramètres physiologiques animaux et humains a permis de calculer la dose équivalente humaine à partir de la dose interne chez l'animal. Cet ajustement a conduit à augmenter la dose critique d'un facteur 2,5.

En revanche, d'autres exemples ont montré que la dose critique calculée à partir d'une méthode traditionnelle ou d'un modèle PBPK était sensiblement la même. La dose critique du chlorure de vinyle calculée pour les effets sur le foie après une exposition orale passe de 0,13 mg/kg/j à 0,09 mg/kg/j. Ce contre-exemple prouve le besoin d'adopter une démarche non systématisée, différente en fonction des données connues sur chaque substance toxique. Pour le chlorure de vinyle, la différence se verra dans l'expression de la VTR finale qui est augmentée d'un facteur 3 puisque le facteur  $UF_A$  toxicocinétique n'est pas appliqué.

### 4.4.1. Diminution des incertitudes lors de l'extrapolation animal – homme

La construction des VTR est fortement handicapée par l'extrapolation à des populations humaines des données obtenues lors d'expérimentations animales. En absence de connaissances précises, les valeurs affectées aux facteurs d'incertitudes sont maximales.

Depuis quelques années, il y a une forte amélioration des connaissances sur la compréhension des phénomènes biologiques et cinétiques qui entrent en jeu dans l'organisme. Les renseignements recueillis sur les voies métaboliques des substances étudiées et les

mécanismes moléculaires, biochimiques et cellulaires de la toxicité peuvent être déterminants pour évaluer si les effets observés lors des études chez l'animal sont pertinents pour l'homme. L'analyse de l'analogie entre l'animal et l'homme de la toxicocinétique et de la toxicodynamie peut permettre de réviser la valeur affectée au facteur d'incertitude  $UF_A$ .

#### 4.4.2. Remise en cause de certains critères conventionnels

La préférence des données humaines sur animales lors du choix d'une VTR peut ne plus être une nécessité dès lors qu'on utilise des modèles physiologiques pharmacocinétiques. Cette interrogation devient de plus en plus pertinente car dans de très nombreux cas, les connaissances acquises chez l'homme sont limitées en raison de la difficulté de conduire des études en population humaine. Trop souvent la taille des populations à partir desquelles les connaissances ont été acquises est petite, laissant des pans entiers d'incertitudes dans les conclusions tirées. En revanche, de plus en plus, des études menées chez l'animal au niveau cellulaire ou organique permettent d'acquérir une meilleure compréhension des mécanismes d'action des substances ainsi que de leur devenir dans l'organisme. Il en résulte une connaissance approfondie de la toxicocinétique de la substance qui est partie prenante de l'élaboration d'une VTR. Par exemple, cette connaissance peut permettre de réduire les valeurs affectées aux facteurs d'incertitude concernés et ainsi conduire, le cas échéant, à des VTR moins pénalisantes, ce qui remet en cause un deuxième critère de sélection. A ce titre le cas de l'éthylène-glycol-monobutylether (EGBE) est intéressant.

##### 4.4.2.1. Les données disponibles

L'EGBE est un éther de glycol possédant plusieurs VTR élaborées par deux agences, l'US EPA et l'ATSDR. Ces VTR ont été construites sur la base de la survenue d'une hémolyse comme effet critique après une exposition par voie respiratoire. Notons que le même effet critique est retenu par les deux agences. Toutes les données de construction sont rassemblées dans le tableau 9.

TABLEAU 9 : VTR de l'EGBE pour les effets sur le sang après inhalation.

	US EPA (études du NTP)				ATSDR étude épidémiologique [35]
	Méthode traditionnelle	Benchmark dose	Modèle PBPK		Méthode traditionnelle
			méthode traditionnelle	benchmark dose	
<b>dose critique</b>	LOAEL = 31 ppm = 150 mg/m <sup>3</sup>	Dose interne BMC <sub>05</sub> = 27 ppm = 130 mg/m <sup>3</sup>	Dose interne C <sub>max</sub> BAA (sang) = 285 µM	BMC <sub>05max</sub> (sang) = 225 µM	NOAEL = 0,6 ppm = 3 mg/m <sup>3</sup>
<b>Ajustement allométriques</b>	LOAEL <sub>HEC</sub> = 150 mg/m <sup>3</sup>	BMC <sub>05HEC</sub> = 130 mg/m <sup>3</sup>	non	non	non
<b>Modèle PBPK</b>	non	non	LOAEL <sub>HEC</sub> = 98 ppm = 474 mg/m <sup>3</sup>	BMC <sub>HEC</sub> = 78 ppm = 380 mg/m <sup>3</sup>	non
<b>Facteurs d'incertitude</b>	UF = 30 10 (UF <sub>H</sub> ) et 3 (UF <sub>L</sub> )	UF = 30 10 (UF <sub>H</sub> ) et 3 (UF <sub>L</sub> )	UF = 30 10 (UF <sub>H</sub> ) et 3 (UF <sub>L</sub> )	UF = 30 10 (UF <sub>H</sub> ) et 3 (UF <sub>L</sub> )	UF <sub>H</sub> = 3
<b>VTR</b>	RfC = 5 mg/m <sup>3</sup>	RfC = 4 mg/m <sup>3</sup>	RfC = 16 mg/m <sup>3</sup>	*RfC = 13 mg/m <sup>3</sup> 1999	*MRL = 1 mg/m <sup>3</sup> 1998

\* valeurs actuellement référencées dans les bases de données internationales

L'analyse du tableau permet de tirer les conclusions suivantes :

- les deux agences considèrent que l'effet critique survient au delà d'un seuil ;
- l'US EPA s'appuie sur une étude expérimentale animale ; l'ATSDR s'appuie sur une étude épidémiologique en population humaine ;

L'US EPA considère que les études chez l'homme, bien qu'elles existent, ne sont pas appropriées à la construction d'une valeur toxicologique de référence pour l'EGBE. Les seules études qu'il considère pertinentes concernent la toxicité à court terme et ne sont donc pas applicables à la construction d'une VTR chronique.

- l'US EPA tient compte de données toxicocinétiques acquises chez l'animal ;
- l'US EPA s'est appuyé sur la méthode traditionnelle et sur la benchmark dose ; l'ATSDR a appliqué la méthode traditionnelle ;
- finalement, l'US EPA a retenu la RfC égale à 13 mg/m<sup>3</sup> ; l'ATSDR a retenu un MRL égal à 1 mg/m<sup>3</sup> ;

L'US EPA a proposé plusieurs RfC pour l'EGBE mais une seule est proposée dans les bases de données toxicologiques. Un choix a été effectué au sein de l'agence par un groupe d'expert qui valide une des VTR proposées, toutes fondées sur des données animales, mais utilisant soit l'approche traditionnelle (détermination du NOAEL) soit la benchmark dose, et incorporant ou non un modèle physiologique pharmacocinétique ; le groupe d'expert a jugé plus juste d'utiliser les connaissances actuelles de cinétique (le modèle PBPK de l'EGBE a été validé par la communauté scientifique) couplées à la méthode benchmark dose qu'il promeut comme méthode d'harmonisation. Ainsi, ils ont retenu la valeur de 13mg/m<sup>3</sup> comme RfC applicable aux effets de l'EGBE sur le sang après une exposition chronique par inhalation. C'est cette valeur qui est présentée dans la base IRIS (1999).

Face à ces données, le premier réflexe serait de sélectionner la VTR de l'ATSDR qui, non seulement provient d'une étude en population humaine mais qui est également la plus pénalisante. Pourtant une analyse plus fine des données qui ont concouru à la proposition de la valeur conduit à un autre choix.

#### **4.4.2.2. Analyse de l'effet critique**

Pour l'US EPA, les études animales du NTP réalisées chez le rongeur ont permis de dégager l'hémolyse comme effet critique. Elle est observée en premier dans toutes les études chroniques, pour toutes les espèces et dans les 2 sexes. Le LOAEL a été observé à 31 ppm, soit 150 mg/m<sup>3</sup>. Ce même effet ayant été rapporté en population humaine dans le cas d'expositions aiguës, il est considéré comme pertinent pour la construction de la VTR.

Pour l'ATSDR, le premier choix a porté sur la sélection d'une étude épidémiologique. Dans la mesure où ces données existent, l'ATSDR s'est basé sur ce critère. L'étude de Haufroid et al. [35] a été retenue pour dériver un MRL chronique. Réalisée en milieu professionnel, les résultats de l'étude n'ont pas attesté de changement de la numération des globules rouges chez les travailleurs exposés ; une diminution de l'hématocrite et une augmentation de la concentration moyenne corpusculaire en hémoglobine ont été observées, ces valeurs restant cependant dans les limites physiologiques normales. L'ATSDR considère que ces valeurs sont cohérentes avec l'hémolyse observée dans les études animales et qu'elles peuvent donc être considérées comme un indicateur précoce d'éventuels effets adverses chez l'homme. Le NOAEL a été fixé à 0,6 ppm, soit 3 mg/m<sup>3</sup>, concentration d'exposition moyenne des travailleurs de l'étude.

#### **4.4.2.3. Analyse de l'établissement de la dose critique**

Les deux agences supposent l'existence d'un seuil pour cet effet. Quelle que soit la méthode utilisée, traditionnelle ou benchmark dose, l'US EPA utilise la valeur défaut de 1 pour l'ajustement allométrique du LOAEL (se référer au paragraphe 2.2.3).

La deuxième proposition de l'US EPA consiste à appliquer un modèle physiologique pharmacocinétique pour déterminer la dose critique. Le modèle décrit la concentration sanguine maximale du métabolite principal de l'EGBE (l'acide 2-butoxy acétique ou BAA, responsable de la toxicité sanguine de l'EGBE) chez l'homme pour s'affranchir du facteur toxicocinétique d'extrapolation interspèces. La différence entre les deux doses critiques calculées à partir des deux approches est d'un facteur proche de 3.

L'ATSDR ne procède à aucun ajustement allométrique, ni utilisation d'un modèle pharmacocinétique, les données initiales étant d'origine humaine.

#### **4.4.2.4. Analyse des facteurs d'incertitude appliqués**

L'effet critique étant supposé survenir au delà d'un seuil, la méthode de construction consiste à appliquer des facteurs d'incertitude aux doses critiques précédemment établies.

L'US EPA considère deux facteurs d'incertitude : la sensibilité au sein d'une même espèce et l'utilisation de la BMD plutôt que du LOAEL. Pour prévenir toute fragilité particulière, la valeur du premier facteur est fixée à 10 tandis que la valeur du deuxième est statuée à 3 en raison de l'utilisation de l'ensemble des observations expérimentales. Cette agence ne retient pas de facteur d'ajustement interspèces toxicodynamique, les études in vivo et in vitro ayant montré que l'homme était moins sensible à l'EGBE que l'animal sur le plan pharmacodynamique. Le modèle PBPK permet de s'affranchir du facteur d'ajustement toxicocinétique. Les études utilisées sont complètes, les modèles animaux sont pertinents et validés, ce qui a conduit les experts à considérer un MF égal à 1.

Utilisant des données humaines, l'ATSDR ne tient pas compte du facteur d'incertitude interspèce. Le facteur tenant compte des différences de susceptibilité humaine a été fixé à 3 car les études in vitro n'ont pas montré de différences de sensibilité à l'EGBE significatives entre des hématies saines ou fragilisées.

Finalement, la valeur obtenue à partir des expérimentations animales est supérieure de plus d'un ordre de grandeur à celle élaborée à partir d'une étude en population humaine.

#### **4.4.2.5. Discussion**

Cette analyse montre que la première réaction qui orientait le choix vers la VTR issue des données épidémiologiques (1 mg/m<sup>3</sup>) peut être remise en cause.

En effet, au final, l'analyse critique de la VTR élaborée à partir des données en population humaine indique que le NOAEL n'est pas établi sur un effet adverse avéré, la variation sanguine observée restant dans les limites physiologiques et l'étude ne permettant pas de déterminer une dose pour laquelle un effet hémolytique serait observé. De plus, l'étude a pris en compte comme dose d'exposition la moyenne des concentrations rencontrées dans l'atmosphère de travail. Il n'est donc pas possible de construire de relation dose-réponse. La concentration d'exposition est considérée comme un NOAEL dans la mesure où il n'y a pas d'effet adverse, mais aucun repère ne justifie la validité de cette affirmation ; l'incertitude liée à ce NOAEL ne peut être caractérisée. Pour toutes ces raisons, la confiance accordée à la VTR ne paraît pas élevée.

En revanche, la VTR produite par l'US EPA tient compte des données toxicocinétiques et toxicodynamiques connues chez l'animal et chez l'homme. A effet équivalent en nature et en gravité, la dose critique humaine est presque 3 fois plus importante que celle de l'animal (78 ppm contre 27 ppm, tableau 9). L'analyse de ces données indique une sensibilité de l'homme

pour l'EGBE moindre que celle de l'animal, ce qui semble contradictoire avec les résultats de l'étude en population humaine. Cela renforce l'idée que le NOAEL de l'étude humaine est pénalisant.

Ainsi, l'application des critères classiques de sélection conduirait à retenir la valeur pénalisante de 1 mg/m<sup>3</sup> produite par l'ATSDR. Ce choix s'infirme par l'étude des méthodes de construction. On peut envisager de retenir la valeur de 13 mg/m<sup>3</sup>, compte tenu des connaissances utilisées pour la construire.

Nous voyons que les applications de cette démarche dans des situations réelles font apparaître de larges zones de lacunes de connaissances qui conduisent les évaluateurs de risque à faire des choix qui se veulent protecteurs pour les populations aux différentes étapes de l'évaluation des risques sanitaires. C'est le cas lors de la sélection de la VTR : l'évaluateur de risque, par précaution, retient généralement la valeur la plus pénalisante parmi celles à sa disposition. Au final, les incertitudes notamment dans la connaissance des processus biologiques, des sensibilités ou susceptibilités intra-individuelles, conduisent les instances compétentes à construire des VTR pour lesquelles les marges de sécurité sont grandes. Cependant, l'utilisation de valeurs très pénalisantes est parfois remise en cause lorsque la VTR conduit à la mise en œuvre de normes environnementales irréalistes car trop conservatrices. Par exemple, la VTR du benzo(a)pyrène correspond à une moyenne géométrique de plusieurs excès de risque unitaire.

Cette analyse montre que les critères classiques ne suffisent pas forcément à effectuer le choix le plus juste. La compréhension des méthodes de construction, le jugement sur la nature et la qualité des données nécessaires à l'élaboration des VTR sont sans conteste dans ce cas une avancée. Des travaux complémentaires sur d'autres exemples devraient enrichir la réflexion et permettre de formuler des critères explicites.

### **4.4.3. Meilleure compréhension des techniques de transposition de voies**

Afin d'estimer un risque qui soit le plus proche de la réalité, la similarité des scénarios d'exposition entre l'étude sélectionnée et le contexte réel étudié doit être respectée. Cependant, les expositions environnementales très variées contrastent fortement avec les protocoles expérimentaux restrictifs utilisés en toxicologie animale et il arrive que ce critère ne puisse pas être respecté.

Aussi, pour permettre l'utilisation de VTR dans des conditions d'expositions différentes, des méthodes de transposition d'une voie d'exposition à une autre ont été admises dans la communauté scientifique. Ces méthodes demandent une analyse approfondie afin de mieux rendre compte des limites voire des impossibilités à les mettre en œuvre. La compréhension de la toxicocinétique permet de faire cette analyse.

#### **4.4.3.1. Voie respiratoire**

La construction d'une VTR pour la voie respiratoire à partir d'une VTR de la voie orale vient de la nécessité d'avoir des VTR applicables à l'inhalation car l'homme est exposé, à travers l'air, à une multitude de substances toxiques, et les études toxicologiques ne prennent pas toujours en compte cette voie d'exposition. Depuis une dizaine d'années, l'US EPA développe des techniques simplifiées pour construire ce type de VTR.

### Méthode utilisée par l'US EPA

Afin d'être en mesure de transposer à la voie respiratoire un indice de la voie orale, l'US EPA définit à priori certains critères qui doivent nécessairement être respectés :

- l'effet adverse considéré pour le calcul de la VTR doit être identique à celui observé par voie orale. Ce critère indique que les effets de la substance après une inhalation doivent être connus, même s'ils ne sont pas quantifiés ;
- la transposition de voie impose de ne considérer que les produits générant des effets toxiques à distance du point de contact. Ce sont les effets systémiques. Ainsi, pour transposer à la voie respiratoire une VTR orale, on ne peut tenir compte que des substances générant un effet adverse extra-digestif après une exposition orale, et extrarespiratoire après une exposition par inhalation ;
- la VTR utilisée doit répondre aux trois premiers critères de sélection habituellement admis, donnés au paragraphe 4.

Lorsque ces critères sont respectés, une proposition simple est de poser l'hypothèse que la voie d'exposition n'influence pas le comportement de la substance dans l'organisme vis-à-vis des effets systémiques et que les taux d'absorption par voie digestive et par inhalation sont de 100 %. Bien que cette hypothèse ne soit pas réaliste, nous verrons que la méthode peut être employée dans certains cas.

Ainsi, la dose en mg/kg/j devient une concentration en mg/m<sup>3</sup> par conversion des unités pour un adulte dont les paramètres physiologiques sont P = 70kg et V<sub>air</sub> = 20m<sup>3</sup>/j.

Pour un effet non cancérogène :

$$RfC_{\text{extrapolé}} \text{ (mg/m}^3\text{)} = RfD \text{ (mg/kg/j)} \cdot (70\text{kg} / 20\text{m}^3\text{/j)}$$

Pour un effet cancérogène :

$$IUR_{\text{extrapolé}} \text{ ((}\mu\text{g/m}^3\text{)}^{-1}\text{)} = (\text{ERU ((}\mu\text{g/kg/j)}^{-1}\text{)} / 70\text{kg}) \cdot 20\text{m}^3\text{/j} \cdot 10^{-3}\text{mg}/\mu\text{g}$$

Ces conversions d'unité utilisent deux paramètres correspondant aux valeurs standards physiologiques humaines recensées dans la littérature pour un adulte [70]. Aussi, elles ne peuvent être appliquées pour caractériser un risque dans une population particulière.

La méthode est contestable car elle ne tient pas compte de la déposition et de la distribution du toxique au niveau du tractus respiratoire, ni des facteurs physiques, biologiques, chimiques et d'autres aspects de l'exposition qui pourraient affecter l'absorption et l'élimination du produit.

Pour consolider ces hypothèses, l'US EPA a comparé, pour un certain nombre de produits, des VTR existantes avec les VTR extrapolées correspondantes afin de déterminer si ces dernières étaient pertinentes par rapport à des VTR calculées à partir de la bonne voie d'exposition.

Pour les effets non cancérogènes, ces études ont montré que pour les molécules les plus volatiles, les RfC extrapolées sont relativement proches des RfC calculées, alors que pour les molécules les moins volatiles, les RfC extrapolées ont tendance à être plus élevées, ce qui conduit à une sous-estimation du risque. Cette constatation est vérifiée par le fait que la tension de vapeur influence l'absorption du produit au niveau du tractus respiratoire.

Pour les effets cancérigènes, elles ont montré que les risques estimés étaient très proches de ceux extrapolés avec les données orales. La méthode semble donc cohérente si l'on quantifie un risque lié à un effet cancérigène.

Dans la base toxicologique IRIS, on remarque que certains IUR ont été calculés à partir de données provenant d'études animales par voie orale, comme pour le chloroforme. Ces pratiques ne doivent pas être systématisées pour tous les produits, l'évaluateur doit connaître la provenance de la VTR et s'assurer que la transposition de voie est réalisable. L'US EPA a montré à la suite de ces études qu'il n'était pas pertinent de transposer une VTR orale à une VTR par voie respiratoire lorsque les propriétés physicochimiques du produit montraient un caractère lipophile marqué et/ou fortement irritant [70].

Aussi, l'application de ces formules de transposition est très dépendante des propriétés physicochimiques et de l'effet de la substance considérée. Il est important que l'évaluateur fournisse les éléments justifiant la transposition de voie, que les résultats soient cohérents avec les données disponibles sur la substance (toxicocinétique, physicochimie), transparents, et que toutes les incertitudes liées à l'extrapolation soient caractérisées et discutées. L'évaluateur doit avoir un jugement critique et montrer une certaine prudence quant à l'utilisation de ces méthodes.

### Cas du chloroforme

Le chloroforme a été évalué par l'US EPA en 1991. L'augmentation de l'incidence de tumeurs chez le rat et chez plusieurs souches de souris l'a fait classer comme probablement cancérigène pour l'homme (B2).

Il n'existe pas de données humaines relatives à la cancérigénicité du chloroforme seul (les études disponibles considèrent les produits chlorés issus des interactions entre la matière organique et les produits chlorés dans l'eau). Des situations d'intoxication ont toutefois montré des effets non cancérigènes sur le foie (ictère, hépatomégalie).

Les données animales sont nombreuses mais il n'existe pas d'étude de cancérogenèse pour une exposition chronique par inhalation.

Les effets du chloroforme sont considérés comme n'ayant pas de seuil car il semble que l'activité cancérigène dépende d'un métabolite toxique formé dans le foie, le phosgène, connu pour sa toxicité directe sur l'ADN. Ainsi, la VTR publiée par l'US EPA est un IUR extrapolé à partir d'un ERU calculé pour les carcinomes hépatocellulaires chez des souris gavées au chloroforme. L'ERU a été obtenu par modélisation mathématique des données expérimentales (modèle LMS). L'analogie faite entre les effets cancérigènes sur le foie chez l'animal et les effets non cancérigènes sur le foie chez l'homme est critiquable, mais les propriétés physicochimiques et cinétiques du chloroforme (substance volatile (Constante de Henry = 287 à 326 Pa.m<sup>3</sup>/mol) et soluble dans l'eau (8,2 g/L), transformation en métabolite toxique dans le foie, absorption orale presque totale), les conditions expérimentales de l'étude (confiance bonne) et les résultats observés (toxicité systémique) ont conduit les experts à accepter cette VTR.

#### 4.4.3.2. Voie cutanée

Les VTR reposent uniquement sur l'évaluation des données toxicologiques et épidémiologiques relatives à l'exposition par ingestion et inhalation. Celles ayant trait à une exposition par voie cutanée sont inexistantes principalement parce que les données disponibles ne permettent pas

toujours d'établir pour cette voie des valeurs de référence sur le plan sanitaire (études toxicologiques par exposition cutanée non systématiques, difficultés de transpositions de l'animal à l'homme). Cependant, la contribution de la voie cutanée à l'exposition est importante pour certaines substances, comme par exemple les HAP.

### Méthode utilisée par les évaluateurs de risque

L'existence de transpositions entre la voie respiratoire et la voie orale est à l'origine du développement de méthodes similaires pour pallier le manque de données lié à la voie cutanée.

Dans la logique, certains critères sont nécessairement pris en compte :

- Les produits doivent être connus pour générer des effets toxiques à distance du point de contact cutané,
- La VTR pour la voie orale doit répondre aux trois premiers critères de sélection cités au paragraphe 4.

La principale difficulté rencontrée concerne la différence d'expression des VTR selon la voie d'exposition. Les VTR pour la voie orale ou respiratoire correspondent à une dose administrée ou à un excès de risque unitaire par unité de dose administrée. Les doses d'exposition journalières attribuées à la voie cutanée sont, elles, calculées en termes de dose interne à partir des surfaces cutanées au contact du toxique et des fractions d'absorption cutanées (FAC). La comparaison de doses internes avec des doses administrées n'est donc pas cohérente pour le calcul de quotients de danger. L'indice toxicologique doit alors être ajusté en fonction des taux d'absorption connus pour les tractus gastro-intestinal ou respiratoire, car dans ce cas, la valeur défaut de 100 % n'est pas justifiée (aucune étude de comparaison entre des VTR extrapolées et réelles ne peut être menée puisque les VTR cutanées n'existent pas).

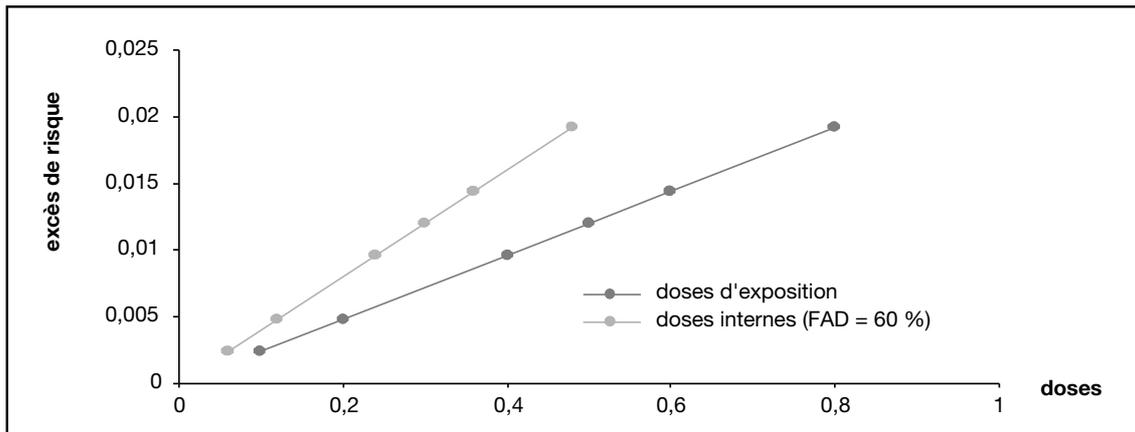
Ces techniques de transposition sont à l'origine d'incertitudes mal déterminées et du manque de transparence parfois reproché dans les évaluations de risque. Si les données de biodisponibilité sont manquantes, les toxicologues doivent conduire des investigations supplémentaires.

### Exemples

Plusieurs situations où les évaluateurs ont été confrontés à ce problème d'inadéquation de voies sont référencées. Certains ont utilisé un indice de la voie orale transformé en termes de dose interne, d'autres ont utilisé un indice de la voie orale pour construire une VTR cutanée.

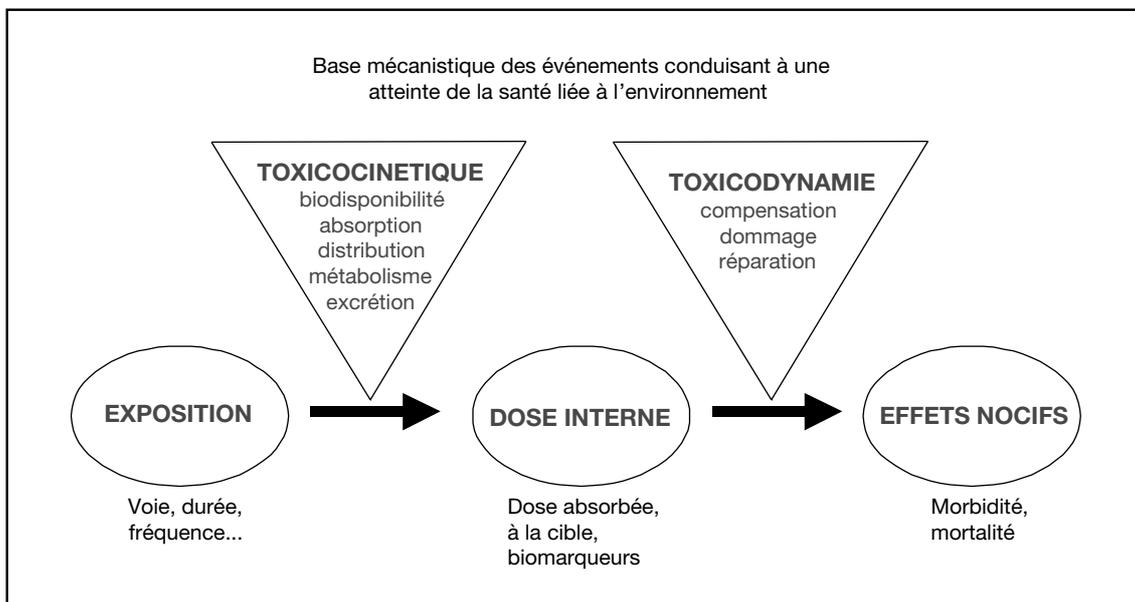
Dans l'étude d'évaluation des risques liée à l'exposition cutanée de HAP après le naufrage de l'ERIKA [9], le risque sanitaire a été calculé à partir de la dose interne de HAP après contact cutané. Malgré le manque de données relatives à la toxicocinétique des HAP, notamment par absorption orale, l'ERU de la voie orale a été transformé pour être applicable à une dose interne. La critique formulée ici est le manque certain de transparence sur l'utilisation ou non des données relatives à la cinétique pour le benzo(a)pyrène. Or l'utilisation de doses internes plutôt que de doses externes conduit à des variations importantes des pentes des relations dose-réponse, donc des ERU. La figure 4 illustre ces variations pour une substance dont la biodisponibilité par voie orale est de 60 %.

FIGURE 4 : Comparaison d'ERU : doses d'exposition ou doses internes.



Certains auteurs ont utilisé un indice de la voie orale pour construire une valeur toxicologique de référence liée à la voie cutanée notée  $RfD_{\text{cutanée}}$ . Dans l'évaluation des risques sanitaires après réhabilitation du site de l'usine à gaz de Gennevilliers [25], le manque de données a conduit à l'utilisation de  $RfD$  orales ajustées en termes de doses internes. En effet, c'est la dose interne, voire idéalement la dose à la cible, qui est à l'origine de l'effet systémique donné (figure 5).

FIGURE 5 : De l'exposition à l'effet observé : mise en jeu des phénomènes biologiques



Aussi, quelle que soit la voie d'exposition, l'effet sera observé pour une dose interne donnée. Si les données ne nous permettent pas de relier chaque VTR à sa dose interne, la transposition de voie devient incohérente.

Par exemple, considérons un toxique X, dont la  $RfD$  est 100 mg/kg/j et dont la biodisponibilité est connue :  $FAD = 90 \%$   
 $FAC = 20 \%$  (figure 6).

En considérant les hypothèses fortes suivantes : (i) le comportement métabolique de la substance est identique quelle que soit la voie d'exposition et (ii) la substance engendre uniquement des effets systémiques ; alors, la relation entre les valeurs toxicologiques de référence pour les voies orale et cutanée, en considérant des doses d'exposition peut s'écrire :

$$RfD_{cut} \times FAC = RfD \times FAD, \text{ ou encore } RfD_{cut} = RfD \times FAD \times \frac{1}{FAC} .$$

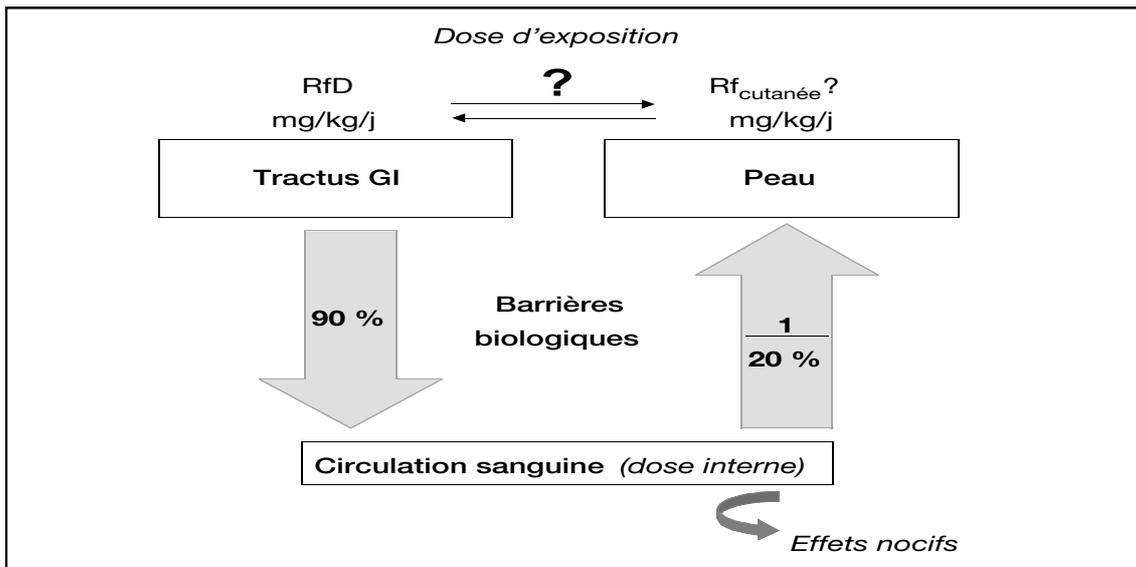
Cependant, il est plus convenable d'exprimer une VTR cutanée en termes de dose interne car les expositions humaines sont exprimées par des doses internes. Cela revient à déterminer une VTR interne, qui est valable quelle que soit la voie d'exposition et donnée par la relation :

$$RfD_{cut}(int) = RfD \times FAD .$$

Si on ne connaît pas le coefficient d'absorption digestive, il est impossible de savoir si cette dose interne peut être reliée à l'effet observé par voie orale.

Dans l'exemple ci-dessus, où  $FAD = 90\%$ , la dose de référence interne devient  $90 \text{ mg/kg/j}$ , quelle que soit la voie d'exposition. Alors, la RfD cutanée doit être, en termes de dose interne, égale à  $90 \text{ mg/kg/j}$  ( $100 \times 90/100$ ), ou, en dose externe,  $450 \text{ mg/kg/j}$  ( $90 \times 100/20$ ). Finalement dans ce cas, on se place plutôt dans une surestimation du risque.

**FIGURE 6 : Relation entre doses externes et doses internes.**



Dans le même ordre d'idée, les VTR existant pour la voie orale ou respiratoire ne tiennent pas compte des taux d'absorption des substances. Aucune différence n'est faite entre un effet local, où toute la dose est responsable de l'effet observé, et un effet systémique, où seule la partie absorbée sera responsable de l'effet, alors que les comportements de la substance en amont de l'effet sont totalement différents (substance telle quelle, absorption, métabolisation, distribution...).

Si aucune étude n'a été réalisée pour la voie d'exposition concernée, on ne peut pas prédire le comportement du produit au contact de la barrière biologique (peau, poumons). L'effet local de type irritation peut être important et le négliger est une erreur. Lorsqu'on est confronté à ces difficultés, le choix de l'effet considéré devient un problème majeur.

Par exemple, à une dose d'exposition cutanée correspond un effet systémique que l'on a choisi pour établir la nouvelle VTR. Pour la substance considérée ci-dessus, la fraction d'absorption

cutanée étant de 20 %, une exposition cutanée de 450 mg/kg/j peut engendrer un effet local important avant d'observer un effet systémique. Cela peut être le cas pour des substances comme les HAP qui ont un effet local irritant très marqué. Dans ce cas, l'effet critique pour construire la VTR cutanée n'est plus un effet systémique, les critères ne sont pas atteints et la VTR cutanée ne peut pas être calculée avec un indice d'une autre voie d'exposition.

#### **4.4.3.3. Evolution**

Idéalement, l'utilisation des connaissances biologiques et toxicologiques devrait permettre à terme de diminuer les incertitudes relatives à la transposition de voie, si on connaît le comportement des toxiques au contact de l'organisme. Leur développement est à l'origine de la remise en cause des techniques simplifiées de transposition utilisées jusqu'alors, et notamment de l'hypothèse concernant l'absorption totale des substances toxiques au niveau des barrières biologiques de l'organisme.

Aujourd'hui, au vu de l'état des connaissances, les taux d'absorption des substances dans l'organisme sont des données nécessaires à la caractérisation des doses internes, et donc à la meilleure connaissance des relations entre l'exposition et l'effet pathologique observé. Les connaissances sur les métabolismes, le transport dans l'organisme, la distribution et l'élimination des substances seraient également une source de données importante pour améliorer la précision des VTR, puisque l'objectif est de déterminer le comportement du produit toxique au niveau de la cible.

Lorsque pour un produit et un effet particulier, une VTR existe pour une seule voie d'exposition, son utilisation dans des conditions d'exposition différentes doit donc faire l'objet d'une réflexion et d'une recherche approfondies par l'évaluateur lui-même.

Ces exemples montrent que le besoin d'arguments forts en faveur de l'utilisation d'une VTR dans un contexte non approprié est important. La recherche toxicologique doit multiplier les travaux pour comprendre les relations existant entre les voies d'exposition et les risques associés, afin de rendre plus cohérents les résultats fournis par les transpositions.

L'objectif final de l'utilisation des VTR est de pouvoir caractériser un risque pour la santé humaine, mais pas au prix de résultats dont on ne peut ni justifier les inadéquations, ni caractériser de manière qualitative les incertitudes liées à la démarche. La mauvaise connaissance des données de toxicocinétique doit remettre en cause l'application de telles méthodes, qui conduisent à des résultats dont il est difficile de déterminer s'ils sont sur ou sous-estimés, et sans que l'on puisse également en apprécier une quelconque valeur.





## 5. Conclusion générale

La démarche d'évaluation des risques s'inscrit dans une dimension de santé publique. La pratique actuelle indique une propension des évaluateurs de risque à retenir la valeur la plus pénalisante dès lors que rien ne semble pouvoir contrecarrer ce choix. C'est la difficulté d'estimer les relations santé environnement notamment en termes de prédictions pour des situations à venir qui explique la précaution prise. Mais favoriser des choix pénalisants à chaque étape de la démarche d'évaluation des risques conduit à s'interroger sur la nature du résultat final et son intégration dans un raisonnement de santé publique.

La plausibilité et la solidité des résultats d'une évaluation des risques sanitaires reposent notamment sur la qualité des données retenues à chacune des étapes. Leur sélection doit être rigoureuse et s'appuyer sur des critères explicites. Il est donc nécessaire de connaître et de comprendre les méthodes ayant contribué à la production des données.

La sélection des VTR n'échappe pas à cette logique. Encore aujourd'hui, cette sélection repose principalement sur une analyse plutôt superficielle des VTR établies par les différentes agences qualifiées pouvant conduire à choisir des VTR pénalisantes ou mal adaptées à la situation analysée. Cependant, les difficultés d'analyse sont réelles, des groupes d'experts différents pouvant aboutir à des résultats divergents à partir d'une même étude.

L'analyse de la construction des différentes VTR a permis d'identifier deux points majeurs. Le premier est représenté par les connaissances sur les mécanismes d'action des substances et sur leur devenir dans l'organisme. Elles permettent de déterminer une dose critique qui sera moins affectée par l'application de facteurs d'incertitude. Si ces connaissances sont établies chez l'animal, il devient envisageable d'avoir une plus grande confiance dans une VTR élaborée à partir de celles-ci plutôt qu'à partir de données humaines moins solides.

Le deuxième concerne les méthodes d'élaboration. Il est difficile d'en décréter une plus appropriée qu'une autre. D'ailleurs, la tendance actuelle est plutôt de déterminer la méthode la plus adaptée à mettre en œuvre en fonction des données disponibles. Fondée sur les observations du comportement de quelques substances comme le plomb, cette tendance conduit à une harmonisation cadrée sur l'utilisation de l'ensemble des données observées et des éléments de toxicocinétique apportés.

La combinaison de ces deux points conduit à remettre en cause le dogme séparant la construction des VTR pour les effets cancérigènes d'une part et non cancérigènes d'autre part.

Enfin cette meilleure compréhension de la construction des VTR permet de mieux définir les possibilités de transposition des VTR établies pour une voie d'exposition vers une autre voie et notamment pour les expositions cutanées.

Le renforcement de la précision des VTR passe par le soutien à des efforts de recherche tant sur les connaissances à acquérir chez l'animal et chez l'homme en matière de toxicocinétique et de susceptibilités individuelles, que sur les méthodes d'extrapolation vers les faibles doses où l'observation est problématique. La réduction des incertitudes à tous les niveaux doit être une priorité.





## 6. Références bibliographiques

1. Ahmed AE, Loh JP, Ghanayem B, Hussein GI, Studies on the mechanism of acetonitrile toxicity : I. Whole body autoradiographic distribution and macromolecular interaction of  $^{214}\text{C}$ -acétonitrile in mice, *Pharmacology and Toxicology*, 1992, 70 : 322-330.
2. Allen BC, Kavlock RJ, Kimmel CA, Faustman EM, Dose-response assessment for developmental toxicity. II. Comparison of generic benchmark dose estimates with NOAELs, *Fundamental Applied Toxicology*, 1994, 23 : 487-495.
3. Anderson EL, Quantitative approaches in use to assess cancer risk, *Risk Analysis*, 1983, 3(4) : 277-295.
4. Baird SJS, Cohen JT, Graham JD, Shlyakter AI, Evans JS, Non cancer risk assessment : a probabilistic alternative to current practice, *Human and Ecological Risk Assessment*, 1996, 2 : 79-102.
5. Barton HA, Andersen ME, Clewell HJ, Harmonization : developing consistent guidelines for applying mode of action and dosimetry information to cancer and noncancer risk assessment, *Human Ecological Risk Assessment*, 1998, 4 : 75-115.
6. Binkowitz BS et Wartenberg D, Disparity in quantitative risk assessment : a review of input distributions, *Risk Analysis*, 2001, 21(1) : 75-90.
7. Bois FY, Les modèles physiologiques pharmacocinétiques in Science et décision en santé environnementale ; les enjeux de l'évaluation et de la gestion des risque, Société Française de Santé Publique (SFSP), collection Santé et Société, n° 6, 1997.
8. Bonvalot Yvette, Evaluation des différentes méthodes de prédiction du risque dû à l'exposition à un cancérigène chimique - application au problème de la 2,3,7,8-TCDD, Rapport de DEA de biomathématiques et biostatistiques, Université Paris VII, 1987.
9. Boudet C, Chemin F, Bois FY, Evaluation du risque sanitaire de la marée noire consécutive au naufrage de l'ERIKA, rapport de l'INERIS n°6, avril 2000.
10. Burin GJ, Saunders DR, Addressing human variability in risk assessment – the robustness of the intraspecies uncertainty factor, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 30, 1999 : 209-216.
11. Calabrese EJ, Uncertainty factor and interindividual variation, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 1985, 5 : 190-196
12. Chou CHS, Holler J, De Rosa CT, Minimal risk level (MRLs) for hazardous substances, *Journal of Clean Technology, Environmental Toxicology and Occupational Medicine*, 1998, 7(1) : 1-24.
13. Ciccollella A, Evaluation des risques pour la reproduction liés aux éthers de glycol, *Extraits de Santé Publique*, 1997, 2 : 157-183.
14. Conolly RB, Andersen ME, An approach to mechanism-based cancer risk assessment for formaldehyde, *Environmental Health Perspectives*, 101(6), 1993 : 169-176.

15. Crump KW, A new method for determining allowable daily intake, *Fundamental Applied Toxicology*, 1984, 4 : 854-871
16. Crump KS, Limitations of biological models of carcinogenesis for low-dose extrapolation, *Risk Analysis*, 14(6), 1994a : 883-886.
17. Crump KS, Use of mechanistic models to estimate low dose cancer risk, *Risk Analysis*, 14(6), 1994b : 1033-1038.
18. Crump KS, The linearized multistage model and the future of quantitative risk assessment, *Human and Experimental Toxicology*, 15, 1996 : 787-798.
19. Crump KS, Clewell HJ, Andersen ME, Cancer and non cancer risk assessment should be harmonized, *Human and Ecological Risk Assessment*, 3(4), 1997 : 495-499.
20. De Rosa CT, Pohl HR, Hansen H, Leonard RC, Holler J, Jones D, Reducing uncertainty in the derivation and application of health guidance values in public health practice, dioxin as a case study, *Annals New York Academy of Sciences*, 1999.
21. Dourson ML, Stara JF, Regulatory history and experimental support of uncertainty (safety) factors, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 1983, 3 : 224-228
22. Dourson ML, Knauf L, Swartout J, On reference dose and its underlying toxicity database, *Toxicology Industrial Health*, 1992, 8(3) : 171-189 (IPCS 170).
23. Dourson ML, Felter SP, Robinson D, Evolution of science-based uncertainty factors in noncancer risk assessment, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 24, 1996 : 108-120.
24. Dourson ML, Teuschler LK, Durkin PR, Stiteler WM, Categorical regression of toxicity data, a case study using aldicarb, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 1997, 25 : 121-129.
25. Empereur-Bissonnet P, Usine à gaz de Gennevilliers : évaluation des risques sanitaires après réhabilitation du site, Rapport final d'étude, EDF GDF, décembre 1996.
26. Faustman EM, Allen BC, Kavlock RJ, Kimmel CA, Dose-response assessment for developmental toxicity. I. Characterization of database and determination of no observed adverse effect levels, *Fundamental and Applied Toxicology*, 23,1994a : 478-486.
27. Faustman EM, Allen BC, Kavlock RJ, Kimmel CA, Dose-response assessment for developmental toxicity. II. Comparison of generic benchmark dose estimates with no observed adverse effect levels, *Fundamental and Applied Toxicology*, 23,1994b : 487-495.
28. Felter S, Dourson M, The inexact science of risk assessment (and implications for risk management), *Human Ecological Risk Assessment*, 1998, 4 : 245-251.
29. Gaylor DW, The use of safety factors for controlling risk, *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 11, 1983 : 329-336.
30. Gaylor DW, Incidence of developmental defects at the no-observed-adverse-effect level, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 15, 1992 : 151-160.
31. Gaylor DW, Kodell RL, Chen JJ, Krewski D, A unified approach to risk assessment for cancer and noncancer endpoints based on benchmark doses and uncertainty/safety factors, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 29, 1999 : 151-157.

32. Gaylor DW, Culp SJ, Goldstein LS, Beland FA, Cancer risk estimation for mixtures of coal tars and benzo(a)pyrène, *Risk Analysis*, 2000, 20, 1 : 81-85.
33. Gori GB, Cancer risk assessment : the science that is not, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 16, 1992 : 10-20.
34. Guth DJ, Carroll RJ, Simpson DG, Zhou H, Categorical regression analysis of acute exposure to tetrachloroethylene, *Risk Analysis*, 1997, 17(3) : 321-332.
35. Haufroid V, Thirion F, Mertens P, Buchet JP, Lison D, Biological monitoring of workers exposed to low levels of 2-butoxyethanol, *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 1997, 70(4) : 232-236.
36. Health Canada, Loi Canadienne sur la protection de l'environnement : Human health risk assessment for priority substances, Canada Communication Group, Ottawa, Canada, 1994 (<http://www.hc-sc.gc.ca>).
37. Heidenreich WF et Hoogenveen R, Limits of applicability for the deterministic approximation of the two-step clonal expansion model, *Risk Analysis*, 2001, 21(1) : 103-105.
38. ILSI, Low dose extrapolation of cancer risks : issues and perspectives, ILSI press, Washington DC, 1995 : 7-84.
39. Janssen PJCM, Speijers GJA, Guidance on the derivation of Maximum Permissible Risk Levels for human intake of soil contaminants, janvier 1997, RIVM report 711701006.
40. Jarabek AM, Menache MG, Overton JH Jr, Dourson ML, Miller FJ, The U.S. Environmental Protection Agency's inhalation RfD methodology : risk assessment for air toxics, *Toxicology and Industrial Health*, 6(5), 1990 : 279-301.
41. Jarabek AM, Interspecies extrapolation based on mechanistic determinants of chemical disposition, *Human and Ecological Risk Assessment*, 1(5), 1995 : 641-662.
42. Johannsen, F.R., Risk assessment of carcinogenic and noncarcinogenic chemicals, *Critical Reviews in Toxicology*, 1990, 20(5) : 341-367.
43. Kavlock RJ, Allen BC, Faustman EM, Kimmel CA, Dose-response assessment for developmental toxicity. IV. Benchmark dose for fetal weight changes, *Fundamental Applied Toxicology*, 1995, 26 : 211-222.
44. Landrigan PJ, Pediatric lead poisoning: is there a threshold? *Public Health Report*, 2000 ; 115(6) : 530-531.
45. Leisenring W, Ryan L, Statistical properties of the NOAEL, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 1992, 15 : 161-171.
46. Lewis SC, Lynch JR, Nikiforov AI, A new approach to deriving community exposure guidelines from « No-Observed-Adverse-Effect Levels », *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 11, 1990 : 314-330.
47. Lovell DP, Thomas G, Quantitative risk assessment and the limitations of the linearized multistage model, *Human and Experimental Toxicology*, 1996, vol 15 n° 2 : 87-104.
48. Lu FC, ADI : inception, evolution and application, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 1988, 8 : 45-60
49. Moolgavkar S, Luebeck G, Two-event model for carcinogenesis : biological, mathematical, and statistical considerations, *Risk Analysis*, 10, 1990 : 323-341.

50. Murrel JA, Portier CJ, Morris RW, Characterizing dose-response. I : Critical assessment of the benchmark dose concept, *Risk Analysis*, 18(1), 1998 : 13-26.
51. Peto R, Gray R, Brantom P, Grasso P, Nitrosamine carcinogenesis in 5120 rodents : chronic administration of sixteen different concentrations of NDEA, NDMA, NPYR and NPIP in the water of 4440 inbred rats, with parallel studies on NDEA alone of the effect of age of starting (3, 6 or 20 weeks) and of species (rats, mice, hamsters), *IARC Scientific Publications*, 1984, 57 : 627-665.
52. Pieters MN, Kramer HJ, Slob W, Evaluation of the uncertainty factor for subchronic-to-chronic extrapolation : statistical analysis of toxicity data, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 1998, 27 : 108-111.
53. Quast JF, Wade CE, Humiston CG, Carreon RM, Hermann EA, Park CN, Schwetz BA, A two-year toxicity and oncogenicity study with acrylonitrile incorporated in the drinking water of rats, prepared by the Toxicology Research Laboratory, *Health and Environmental Sciences*, Dow Chemical USA, Midland, MI, for the Chemical Manufacturers Association, Washington DC, 1980.
54. Rabovsky J, Fowles J, Hill MD, Lewis DC, A health risk benchmark for the neurologic effects of styrene : comparison with NOAEL/LOAEL approach, *Risk Analysis*, 2001, 21(1) : 117-126.
55. Rai K, Van Ryzin J, A generalized multi hit dose-response model for low dose extrapolation, *Biometrics*, 37, 1981 : 341-352.
56. Renwick AG, Symposium paper : Safety factors and establishment of acceptable daily intakes, *Food Additives and Contaminants*, 8(2), 1991 : 135-150.
57. Renwick AG, Data-derived safety factors for the evaluation of food additives and environmental contaminants, *Food Additives and Contaminants*, 1993, 10 : 275-305.
58. Renwick AG, The use of an additional safety or uncertainty factor for nature of toxicity in the estimation of acceptable daily intake and tolerable daily intake values, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 22, 1995 : 250-261.
59. Renwick AG, Lazarus NR, Human variability and noncancer risk assessment – an analysis of the default uncertainty factor, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 27, 1998 : 3-20.
60. Renwick AG, Subdivision of uncertainty factors to allow for toxicokinetics and toxicodynamics, *Human and Ecological Risk Assessment*, 1999, 5(5) : 1035-1050.
61. Schwartz J, Zanobetti A, Using meta-smoothing to estimate dose-response trends across multiple studies, with application to air pollution and daily death, *Epidemiology*, 2000, 11(6) : 666-672.
62. Slob W, Pieters MN, A probabilistic approach for deriving acceptable human intake limits and human health risks from toxicological studies : general framework, *Risk Analysis*, 18(6), 1998 : 787-798.
63. Stebbins KE, Johnson KA, Jeffries TK, Redmond JM, Haut KT, Stott WT, Chronic toxicity and oncogenicity studies of ingested 1,3-dichloropropene in rats and mice, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2000, 32(1) : 1-13.
64. Stott WT, Johnson KA, Jeffries TK ; et al, Telone II soil fumigant : two-year chronic toxicity/oncogenicity study in Fischer 344 rats. Dow chemical Company, Midland, MI. Study # M-003993-0311, 1995.
65. Swartout JC, Price PS, Dourson ML, Carlson-Lynch HL, Keenan RE, A probabilistic framework for the reference dose (Probabilistic RfD), *Risk Analysis*, 18(3), 1998 : 271-282.

66. Tyl RW, Millikovsky G, Dodd DE, et al., Teratologic evaluation of EGBE in Fischer 344 rats and New Zealand white rabbits following inhalation exposure, *Environmental Health Perspectives*, 1984, 57 : 47-68.
67. US EPA, Risk assessment guidance for Superfund (RAGS), volume I : human health evaluation manual, part A, 1989.
68. US EPA, EPA's approach for assessing the risks associated with chronic exposure to carcinogens, Background Document 2, IRIS-EPA, janvier 1992.
69. US EPA, Draft report : a cross species scaling factor for carcinogen risk assessment based on equivalence of mg/kg<sup>3/4</sup>/day, notice, 1992, *Federal register* 57(109) : 24152-24173.
70. US EPA, Methods for the Derivation of Inhalation Reference Concentrations and Application of Inhalation Dosimetry, EPA/600/8-90/066F, Washington DC, 1994.
71. US EPA, Health assessment document for diesel emissions, EPA/600/8-90/057C, Washington DC, 1998.
72. US EPA, Guidelines for carcinogen risk assessment, Risk assessment forum, NCEA-EPA, NCEA-F-0644, Washington DC, 1999.
73. Vermeire T, Stevenson H, Pieters MN, Rennen M, Slob W, Hakkert BC, Assessment factors for human health risk assessment : a discussion paper, *Critical Review in Toxicology*, 29(5), 1999 : 439-490.
74. Vermeire T, Pieters M, Rennen M, Bos P, Probabilistic assessment factors for human health risk assessment : a practical guide, RIVM report 601516005, TNO report V3489, mars 2001.
75. WHO, Assessing human health risks of chemicals : derivation of guidance values for health-based exposure limits, IPCS, Environmental Health Criteria (EHC) n° 170, Genève, 1994.
76. Zeise L, Wilson R, Crouch EAC, Dose response relationships for carcinogenesis. A review, *Environmental Health Perspective*, 1987, 73 : 259-308.





# 7. Annexes

<b>Annexe 1 : Bases de données toxicologiques utilisées .....</b>	<b>73</b>
<b>Annexe 2 : Classification des substances cancérigènes .....</b>	<b>75</b>
<b>Annexe 3 : Description détaillée des modèles mathématiques .....</b>	<b>77</b>
<b>Annexe 4 : Les modèles physiologiques pharmacocinétiques .....</b>	<b>79</b>





# Annexe 1

## Bases de données toxicologiques utilisées

**ATSDR** : Agency for Toxic substances and Disease Registry, Toxicological profiles, USA.

**ECDIN** : Environmental Chemical Data and Information Network, produite par le centre européen de recherche d'Ispra.

**HSDB** : Hazardous Substances DataBank, produite par la National Library of Medicine, USA.

**IRIS** : Integrated Risk Information System, produite par l'US EPA.

**ITER(TERA)** : base de données de Toxicology Excellence for Risk Assessment, USA.

**Toxline** : base de données bibliographique en toxicologie, USA.





## Annexe 2

# Classification des substances cancérogènes

### Critères de classification des substances cancérogènes par l'US EPA

<b>A</b>	Cancérogène pour l'homme
<b>B1</b>	Probablement cancérogène pour l'homme : données limitées
<b>B2</b>	Probablement cancérogène pour l'homme : données uniquement chez l'animal
<b>C</b>	Cancérogène possible pour l'homme
<b>D</b>	Non classable
<b>E</b>	Il existe des preuves de non cancérogénicité chez l'homme

### Critères de classification des substances cancérogènes par l'IARC

<b>1</b>	Cancérogène pour l'homme : données suffisantes
<b>2A</b>	Probablement cancérogène pour l'homme : connaissances limitées chez l'homme mais suffisantes chez l'animal
<b>2B</b>	Cancérogène possible pour l'homme : connaissances limitées chez l'homme ou suffisantes chez l'animal
<b>3</b>	Inclassable
<b>4</b>	Probablement non cancérogène pour l'homme

## Critères de classification des substances cancérogènes par l'IARC

I	cancérogène pour l'homme		
II	probablement cancérogène pour l'homme		
III	susceptible d'être cancérogène pour l'homme	III A	données épidémiologiques montrent une cancérogénicité mais possibilité de biais
		III B	données épidémiologiques insuffisantes, mais études animales suffisantes et tests de génotoxicité positifs
		III C	données épidémiologiques insuffisantes, études animales suffisantes mais génotoxicité négative
		III D	cancérogène chez une espèce animale seulement
IV	peu susceptible d'être cancérogène pour l'homme	IV A	études épidémiologiques ne montrent pas de cancérogénicité et études animales limitées
		IV B	études épidémiologiques ne montrent pas de cancérogénicité, études animales montrent une cancérogénicité mais étude sur les mécanismes de toxicité propres à une espèce non pertinents pour l'homme
		IV C	études épidémiologiques insuffisantes, études animales montrent une cancérogénicité mais étude sur les mécanismes de toxicité propres à une espèce non pertinents pour l'homme
		IV D	études épidémiologiques insuffisantes, études animales ne montrent pas de cancérogénicité
V	probablement non cancérogène pour l'homme	V A	études épidémiologiques ne montrent pas de cancérogénicité, études animales ne permettent pas de montrer une cancérogénicité, tests de génotoxicité négatifs
		V B	études épidémiologiques ne montrent pas de cancérogénicité, études animales insuffisantes
		V C	preuves de cancérogénicité chez l'homme insuffisantes, mais études animales démontrent l'absence de cancérogénicité
VI	inclassable	VI A	données insuffisantes
		VI B	pas de données de cancérogénicité
		VI C	données discordantes entre l'animal et l'homme (causes techniques non discernables)



## Annexe 3

### Description détaillée des modèles mathématiques

#### Les modèles statistiques de densité de probabilités

##### *Modèle probit*

Il est donné par l'équation suivante :

$$P(d) = \gamma + (1 - \gamma) \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{(\alpha + \beta \log d)} e^{-u^2/2} \cdot du,$$

où  $P(d)$  est la probabilité qu'un individu choisi au hasard présente une réponse à la dose  $d$ , en supposant une distribution lognormale des tolérances, c'est-à-dire que le logarithme des tolérances est distribué selon une loi Normale centrée réduite,  $\alpha$  et  $\beta$  sont les paramètres ajustés à partir des données,  $\gamma$  est le taux de réponse chez les groupes non-exposés.

##### *Modèle de Weibull*

Il est représenté par l'équation suivante :

$$P(d) = \gamma + (1 - \gamma)(1 - e^{-\beta d^\alpha}),$$

où  $P(d)$  est la probabilité de développer une maladie pendant la vie entière pour une exposition continue à la dose  $d$ ,  $\alpha$  est le paramètre de dose ajusté à partir des données appelé paramètre de Weibull,  $\beta$  est le paramètre de dose ajusté à partir des données, et  $\gamma$  est le taux de réponse chez les non-exposés.

##### *Modèle logit*

Il est de la forme :

$$P(d) = \gamma + \frac{1 - \gamma}{1 + e^{-(\alpha + \beta \log d)}},$$

où  $P(d)$  est la probabilité de développer un cancer, exposé pendant toute sa vie à une dose  $d$ ,  $\alpha$  et  $\beta$  sont les paramètres ajustés à partir des données, et  $\gamma$  est le taux de réponse chez les groupes non-exposés.

## Modèles mécanistes

– Le modèle un coup est donné par la relation suivante, correspondant à la définition d'une probabilité :

$$P(d) = 1 - e^{(-\lambda d)},$$

Pour  $d$  petit,  $P(d) = \lambda d$  (relation linéaire).

Où  $P(d)$  est la probabilité de développer un cancer lorsqu'on est exposé à une dose continue  $d$  pendant toute la vie et  $\lambda$  est le coefficient de dose ajusté.

– Le modèle multi-coup : Si plusieurs coups sont nécessaires pour obtenir une réponse dans l'intervalle de temps spécifié, si chacun de ses  $k$  coups ne sont pas différents et s'ils ont tous la même probabilité de survenue, alors l'expression de la probabilité  $P(d)$  qu'un individu réponde de son vivant à une exposition continue à la dose  $d$  est donnée par :

$$P(d) = \sum_{i=k}^{\infty} (\lambda d)^i \cdot \frac{e^{(-\lambda d)}}{i!},$$

avec  $k \geq 0$ , et qui peut s'écrire également :

$$P(d) = \int_0^{\lambda d} \frac{u^{k-1} \cdot e^{-u}}{\Gamma(k)} \cdot du,$$

où  $\Gamma(k)$  est la fonction gamma,  $k$  est le nombre de « coups » estimés par le modèle,  $\lambda$  est un coefficient ajusté correspondant à la cote de proportionnalité entre la probabilité d'un coup et la dose. Ce modèle peut être interprété comme un modèle statistique ayant pour distribution de tolérances une fonction gamma (paramètres  $1/\lambda$ ,  $k > 0$ ).



## Annexe 4

### Les modèles physiologiques pharmacocinétiques

Les modèles physiologiques pharmacocinétiques résultent du désir d'incorporer les données biologiques et physiologiques disponibles (différences physiologiques entre les espèces, cinétique, biochimie...) qui n'étaient pas prises en compte lors des modélisations mathématiques. Ils ont été développés dans le but de répondre à trois problèmes d'extrapolation majeurs : (1) pour des raisons éthiques, seules des doses très inférieures à celles provoquant une réponse toxique peuvent être administrées à des volontaires humains ; (2) une transposition interspèces est souvent nécessaire puisque l'étude de la cinétique des doses toxiques ne peut être faite que chez l'animal ; (3) il est rare que toutes les voies d'exposition possibles soient prises en compte lors d'études expérimentales.

Ils permettent de transposer à l'homme les résultats obtenus chez l'animal d'une façon plus scientifique par réduction des incertitudes liées aux hypothèses empiriques.

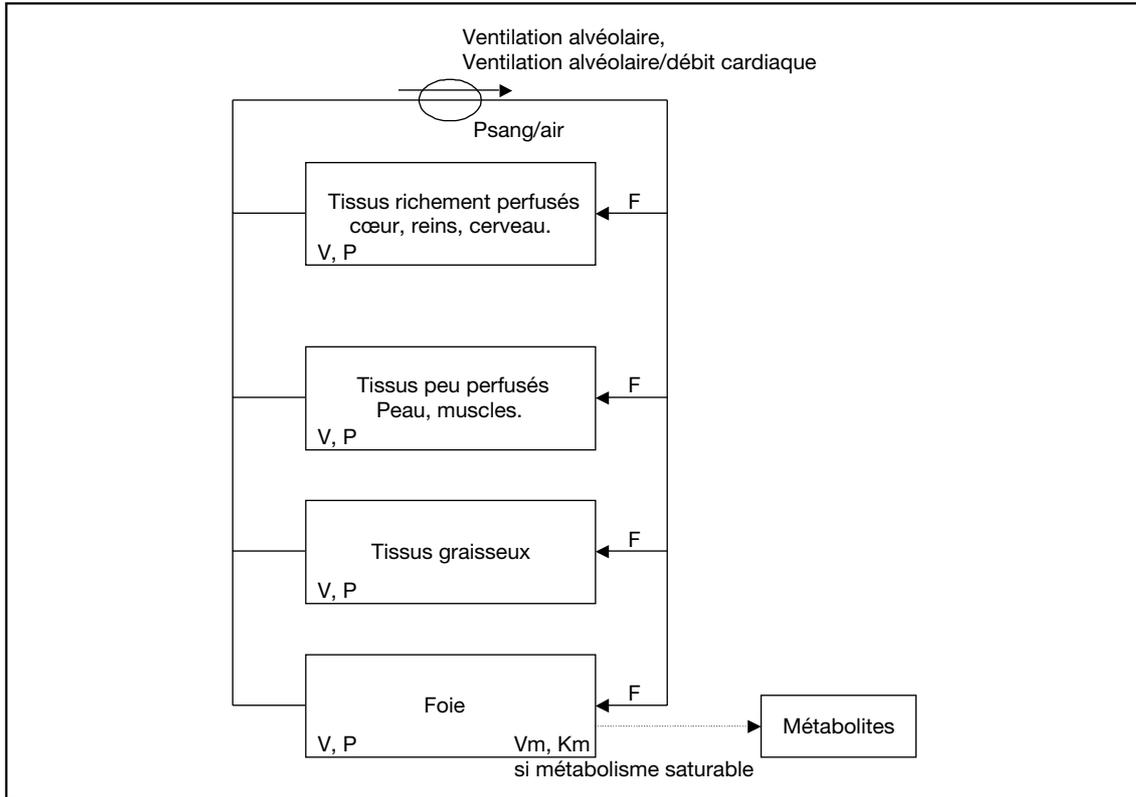
#### Description et principe

On utilise souvent la dose administrée aux animaux pour décrire la relation entre la dose et le risque de survenue d'un effet adverse. Cette utilisation suppose que la dose interne est proportionnelle à l'exposition externe. Cependant, la toxicité dépend avant tout de la quantité de toxique qui atteint la cible que de l'exposition en elle-même. Les modèles PBPK, de plus en plus utilisés dans l'analyse du risque du fait des connaissances croissantes dans ce domaine, fournissent l'opportunité d'améliorer les estimations des risques par une meilleure connaissance de la dosimétrie au niveau des tissus [7].

Pour ce type de modèles, l'organisme est considéré comme une fonction des scénarios d'expositions possibles (absorption orale, concentration dans l'air dépendant du temps...).

L'objectif du modèle PBPK est de prédire en fonction du temps la quantité ou la concentration de la forme biologiquement active du toxique au niveau de la cible. Cette modélisation correspond à une description mathématique des différentes étapes (absorption, distribution, métabolisation et élimination) du devenir de la substance dans l'organisme.

Il est basé sur une structure compartimentale physiologique. Chaque compartiment correspond à un groupe d'organes ou de tissus dont le comportement cinétique est similaire (tissus richement perfusés, tissus gras, tissus peu perfusés...). Le foie est souvent considéré comme un compartiment à part car il joue un rôle important lors de la métabolisation. La figure suivante représente un modèle PBPK.



La structure du modèle permet de poser des équations simplifiées décrivant la cinétique de la quantité de produit dans les différents compartiments :

$$\frac{dC_i}{dt} = \frac{F_i}{V_i} \cdot \left( C_{art} - \frac{C_i}{P_i} \right),$$

où  $C_i$ ,  $F_i$ , et  $V_i$  sont respectivement la concentration de produit, le flux sanguin et le volume du compartiment donné,  $C_{art}$  est la concentration de produit dans le sang artériel et  $P_i$  est le coefficient de partage tissu/sang.

Trois types de données sont nécessaires dans la construction du modèle : il faut connaître les coefficients de répartition exprimant la solubilité relative de la substance dans le sang et les tissus, les constantes physiologiques tels que volumes et flux sanguins, et les constantes biochimiques caractérisant les diverses voies de biotransformations [Johannsen, 1990].

Les paramètres d'ordre physiologique (volume d'un organe, flux sanguins...) sont indépendants du produit considéré. On utilise des valeurs standards définies dans la littérature pour l'homme. Les paramètres d'ordre biochimiques (coefficient de partage, d'absorption, d'excrétion...) dépendent directement du produit considéré. Ils demandent donc des études précises de toxicocinétique pour chaque produit. Les études in vivo sur l'animal sont difficiles à réaliser et elles sont impossibles chez l'homme pour des raisons éthiques. Ce sont donc ces paramètres qui vont poser le plus de problèmes pour la réalisation de ces modèles (études in vitro, études de relation structure-activité).

## Conditions d'utilisation

Les modèles PBPK peuvent intervenir dans la construction des VTR pour tous les types d'effet, à savoir avec ou en l'absence de seuil.

Ils permettent actuellement de limiter certaines incertitudes relatives aux extrapolations entre deux espèces différentes.

Cependant, dans le cas des toxiques à effet de seuil, ils n'empêchent pas l'utilisation des autres facteurs d'incertitude.

Pour les toxiques ayant un effet sans seuil, les modèles PBPK, de par leurs formulations linéaires ou non linéaires, permettent l'extrapolation des fortes doses vers les faibles doses. S'ils n'établissent pas de lien direct entre la dose interne et l'effet pathologique, leur intégration dans les modèles mathématiques prédisant les relations dose-réponse le permet.

Les VTR calculées par ces modèles sont plus appropriées, mais demandent des données qui ne sont pas forcément acquises sur un grand nombre de molécules toxiques, ce qui restreint largement leur utilisation.

## Avantages / limites

Bien qu'ils permettent d'extrapoler les résultats d'une espèce à l'autre, ils ne peuvent à eux seuls caractériser une méthode de construction. A l'heure actuelle, ils sont utilisés en parallèle avec les méthodes de construction classiques citées précédemment et comportent donc en plus tous les avantages et inconvénients de celles-ci. La recherche dans ce domaine devrait permettre d'utiliser ces modèles PBPK en série avec d'autres modèles afin qu'ils soient entièrement intégrés dans la démarche de construction d'une VTR.

Notons que l'utilisation de modèles multicompartimentaux rend possible l'individualisation des compartiments importants pour des produits particuliers (comme par exemple la moelle osseuse) afin de mieux caractériser le comportement du toxique au niveau de sa cible.

# Notes

# Notes

# Notes