

Première partie

Chapitre I : Méthodes d'évaluation de la toxicité

1. Tests d'études de la toxicité aiguë

La toxicité aiguë désigne les effets nocifs (aigu) résultant de l'exposition à une seule forte dose d'un produit ou de multiples doses sur une période ne dépassant pas 24 heures, se manifeste dans les 72 heures suivant la pénétration d'un toxique, c'est la conséquence d'un blocage immédiat des fonctions des organes vitaux. En général, l'intoxication évolue rapidement vers la guérison, ou peut aboutir à la mort.

Les études toxicologiques peuvent être réalisées *in vivo* sur l'organisme vivant entier ou sur les organes isolés, ou *in vitro* sur des cellules en culture ou des organites cellulaires (mitochondries, noyau...).

Plusieurs paramètres permettant l'évaluation de la toxicité aiguë :

1.1. Etude expérimentale *in vivo*

La plupart des études sur la toxicité aiguë (où la manifestation finale typique est la mort) sont programmées pour déterminer la DL50 du toxique.

1.1.1. Détermination de la DL50, CL50 et IC50

La DL50 est la dose qui entraîne le décès de la moitié du lot d'animaux de laboratoire soumis au toxique étudié. Elle est souvent employée dans la littérature classique comme une mesure de la toxicité aiguë des produits chimiques. Plus la DL50 est élevée, plus la toxicité aiguë est faible. Un produit chimique très toxique avec une faible DL50 est dit violent.

a. Choix de l'espèce animale

Le rat est l'espèce préférée mais d'autres espèces peuvent être utilisées comme les souris. La plupart de cas les males sont les plus utilisés, car les femelles sont considérés comme légèrement plus sensibles. L'essai est pratiqué sur 5 à 6 lots, les individus de chaque lot reçoivent la même dose du toxique.

b. Choix des doses

Pour choisir les doses admissibles il faut bien déterminer les trois valeurs suivantes :

La valeur NOEL (NAOEL) : (No Observed (Adverse) Effect Level) qui correspond à la dose à laquelle aucun effet nocif n'est observé, ou encore la plus forte dose n'entraînant aucun effet toxique.

La valeur LOEL : (Low Observed Effect Level) qui correspond à la dose efficace la plus faible, où la plus faible dose provoquant un effet. On utilise les valeurs NOEL ou LOEL obtenues expérimentalement pour définir une dose admissible chez l'animal.

La valeur DMM : la dose minimale de substance capable de tuer un animal par administration intraveineuse lente. La mort est définie par arrêt cardiaque. La DMM aide l'expérimentateur à choisir les doses à tester pour déterminer la DL50 ;

Enfin pour déterminer correctement une DL50, il est indispensable de sélectionner une dose qui tuera environ la moitié des animaux, une dose qui en tuera plus de la moitié (mais de préférence moins de 90%), et une dose qui en tuera moins de la moitié (mais de préférence plus de 10%). Donc quatre doses ou plus sont sélectionnées pour qu'au moins trois d'entre elles soient dans la gamme. Les doses inférieures permettent alors de situer la marge de tolérance du produit chez l'animal.

Remarque

La dose est quantifiée par mg/kg, pour les produits faiblement toxiques, la détermination de la DL50 n'est pas obligatoire, il suffit d'utiliser des doses rapprochées.

c. Mode opératoire

Le mode d'administration le plus utilisé pour déterminer la DL50 est celui par gavage à l'aide d'une sonde gastrique ou toute autre canule, généralement la substance d'essai est administrée en une seule dose, mais s'il n'est pas possible, cette dose peut être fractionnée sur une période de dépassant pas 24 heures. Des voies cutanées et respiratoires peuvent être utilisées en cas des substances causant la toxicologie professionnelle. On utilise également la voie parentérale.

L'observation des résultats (nombre de décès) est réalisée après 24-48 heures d'expérimentation (toxicité immédiate), ou après 72 heures (toxicité retardée). Pour les animaux demeurés vivants pendant 14 jours, des sacrifices font l'objet d'une autopsie.

La CL₅₀ désigne les concentrations du produit chimique dans l'air qui causent la mort de 50 % des animaux de laboratoire au cours de la période d'observation. D'autres durées

d'exposition (vs les quatre heures habituelles) peuvent s'appliquer en fonction des lois particulières en vigueur.

La IC50 ou CI50 désigne la concentration inhibitrice médiane, c'est une mesure de l'efficacité d'un composé donné pour inhiber une fonction biologique ou biochimique spécifique. Souvent, le composé en question est un éventuel médicament. Cette mesure quantitative indique quelle quantité d'un médicament ou d'une autre substance (inhibiteur) est nécessaire pour inhiber à moitié un processus biologique donné (ou un élément d'un processus, par exemple une enzyme, un paramètre cellulaire, un récepteur cellulaire ou un microorganisme.

Le TL50 (temps létal 50) pour une concentration déterminée du toxique dans l'air.

Exemple : Utilisation de 5 lots, chaque lot est composé de 20 rats, les doses sont 0.1, 1, 10, 100 et 1000mg/kg.

d. Méthode de détermination de la DL50

Plusieurs méthodes sont utilisées pour déterminer la DL50 :

Méthode de TREVAN

Méthode de BLISS

Méthode de Lietchfield et Wilcoxon

Méthode de Miller et Tainter

Méthode de Kraber et Berhens

Autres méthodes

d1. Méthode de TREVAN (1927)

Le principe repose sur l'administration des doses croissantes de la substance testée chez tous les animaux du lot tout en notant le pourcentage de mortalité, la représentation graphique des variations du pourcentage de mortalité en fonction de la dose donne une courbe sigmoïde. Il suffit de faire l'extrapolation pour déterminer la valeur de DL50.

Courbe de Trevan :
% de mortalié = f(dose)

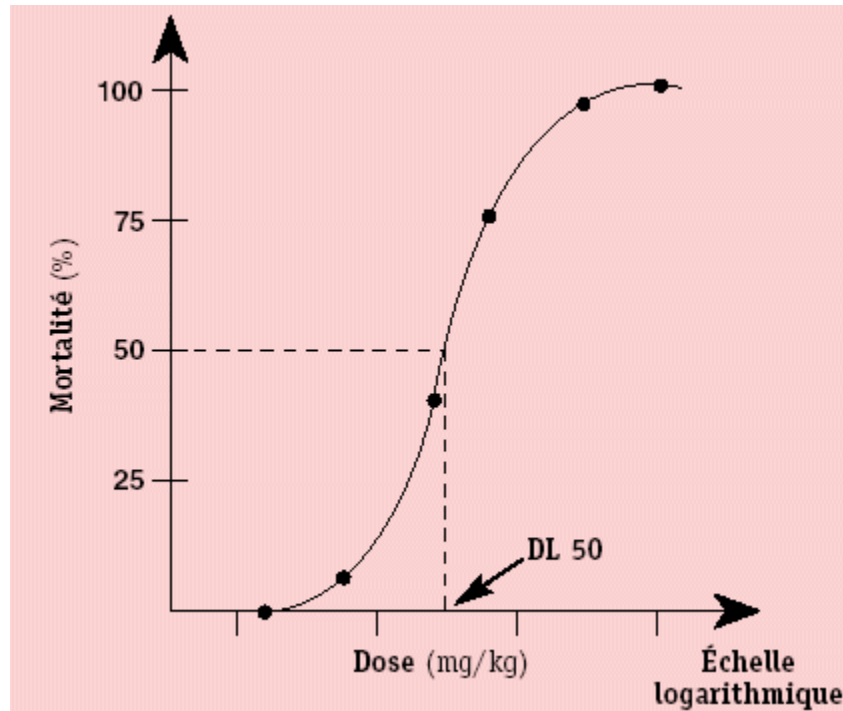


Figure 1 : Détermination de la dose létale 50 (DL 50) par la méthode de TREVAN (Bensakhria, 2018)

Inconvénients de la méthode de TREVAN : elle présente deux inconvénients :

Une grande partie de la méthode de la courbe n'est pas exploitable (DL05 et DL95).

Le nombre des animaux utilisé est très élevé, selon TREVAN un nombre de 30 animaux constitue un minimum.

d2. Méthode de BLISS

Dans ce cas on remplace la dose par log dose et le % de mortalité en probit. On obtient une droite (figure 2). La méthode utilise deux lots au lieu de 5 à 6 lots.

Les unités probits : se sont des écart-type réguliers au tour de la moyenne. La moyenne est fixée à zéro. Pour éviter les valeurs négatives, les unités de probits sont obtenues en ajoutant 5, de sorte que le système s'établit ainsi (Tableau 1).

Tableau 1 : Les unités de probits (Bliss, 1938)

Ecart	probits	% de réponse
-3	2	0.1
-2	3	2.3
-1	4	15.9
0	5	50.0
1	6	84.1
2	7	97.7
3	8	99.9

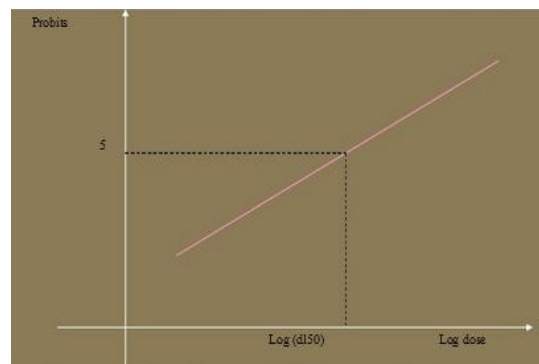


Figure 2 : détermination de la DL₅₀ par la méthode de BLISS (Bliss, 1938)

Avantages et inconvénients de la méthode de BLISS :

Avantage : Suffisamment précise et peut être utilisée avantageusement en analyse.

Inconvénient : Le tracé de la droite de régression entraîne des erreurs par parfois notables, il est nécessaire de définir la position de cette droite par des calculs laborieux.

d3. La méthode de Litchfield et Wilcoxon (1943)

Le principe repose sur la représentation graphique de probit en fonction de log concentration, c'est une méthode semi-graphique, elle détermine la DL₁₆, DL₅₀ et DL₈₄ (Figure 3).

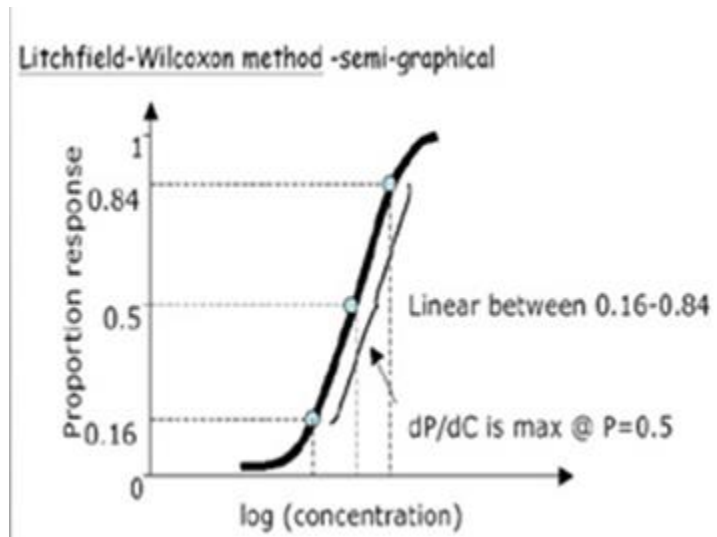


Figure 3 : détermination de la DL50 par la méthode de Litchfield-Wilcoxon (Tallarida et Murray, 1987)

Le calcul de la pente du graphique (S) permet de définir l'intervalle de confiance, ensuite on détermine le facteur de correction FDL₅₀.

$$S = \frac{\frac{dl_{84}}{dl_{50}} + \frac{dl_{50}}{dl_{16}}}{2}$$

La pente

$$f_{dl_{50}} = S^{\frac{2,77}{\sqrt{N'}}}$$

Facteur de correction

$$dl_{50} \in]\mu / f_{dl_{50}}, \mu \times f_{dl_{50}}[$$

Limite de confiance de DL₅₀

N' est le nombre d'animaux utilisé pour obtenir les points situés entre DL₁₆ et DL₈₄.

μ : DL₅₀ de référence.

d4. Méthode de Miller et Tainter (1944)

C'est une méthode graphique, la représentation graphique est réalisée sur papier logarithme probit : % mortalité (probit) = f(log dose) avec correction des valeurs 100% et 0% là où le probit tend vers l'infini. C'est une méthode pratique, simple et rapide (Randhawa, 2009)

Miller et Tainter correction des 0 et 100%

Correction 0% : Y(0) = 50/N

Correction Y(100) = (100N - 50)/N

N c'est le nombre des animaux des lots qui ont donné les pourcentages de mortalité 0 et 100%.

Pour la CL50 et IC50, on les détermine de la même manière en ajoutant la substance à tester (dans l'eau, le sol ou l'air). Pour l'eau, on prend l'eau douce et un poison de l'eau douce puis on ajoute des concentrations croissantes de substance puis on note le temps de décès pour chaque concentration. Pour les végétaux, on utilise les bio indicateurs comme les algues.

d5. Méthode de Kraber et Behens

C'est une méthode arithmétique basée sur l'approximation par calcul de la DL50, donc c'est une méthode qui manque de précision ;

$$DL50 = \text{la faible dose mortelle} - \Sigma AB/N$$

(Bensakhria, 2018)

A : la différence entre deux doses successives

B : moyenne de mort entre deux doses successives

N : nombre moyen d'animaux par lot

Exemple : détermination de la DL50 pour le sulfate de zinc par la méthode de Karber sur cinq animaux (souris âgées de 10 à 20 semaines) dans chaque groupe.

Groupe	Dose (mg/ml)	Nombre de mortalité
1	Véhicule	0
2	600	0
3	700	1
4	800	3
5	900	3
6	1000	4
7	1100	5

Groupe	Différence entre deux doses successives (A)	Moyenne de mortalité entre deux doses successives (B)	AB
3	100	0.5	50
4	100	2	200
5	100	3	300
6	100	3.5	350
7	100	4.5	450

Donc : DL50= la faible dose mortelle- $\Sigma AB/N = 700 - \frac{1350}{50} = 700 - 270 = 430 \text{ mg/kg}$

d6. Autres méthodes

Méthode de Lorcke (1983)

Cette méthode offre la possibilité d'obtenir avec 13 animaux expérimentaux des informations adéquates sur la toxicité aiguë et sur la DL50. Elle se réalise en deux phases :

Phase I : trois groupes de trois souris, chaque groupe reçoit une dose, l'observation dans les 24 heures pour noter les mortalités et les modifications du comportement.

Phase II : trois à quatre groupes d'une souris, l'administration des doses s'effectue en se basant sur les résultats de la première phase.

La moyenne géométrique entre la dose minimale qui tue les souris et la dose maximale qui ne tue pas les souris, représente la DL50.

L'avantage de cette méthode est qu'elle sacrifie peu d'animaux.

L'inconvénient : l'exactitude, la reproductibilité, la fiabilité sont remises en question.

Tableau 2 : Exemple de DL50 de quelques toxiques chez le rat par voie orale.

Substance	DL50
Vitamine C	11900mg/kg
Bisphénol A	3250 mg/kg
Sel de table	3000mg/kg
THC	1270mg/kg
Caféine	192 mg/kg
Digitaline	5-10mg/kg
Strychnine	1mg/kg
Cyanure	0,563mg/kg
Dioxine	0,02 mg/kg
Toxine botulique	1ng/kg

Intérêt de la DL50

▪Classification des substances selon leurs toxicités, les deux échelles les plus couramment utilisées sont « l'échelle de Hodge et Sterner » (Tableau 3) et « l'échelle de Gosselin, Smith et Hodge » (Tableau 4).

Tableau 3. Classes de toxicité : échelle de Hodge et Sterner (https://fr.wikipedia.org/wiki/Dose_1%C3%A9chelle_m%C3%A9diane)

		Voies d'administration			
		DL ₅₀ orale	CL ₅₀ Inhalation	DL ₅₀ cutanée	
Indice de toxicité	Terme couramment utilisé	(une seule dose à des rats) mg/kg	(exposition de rats pendant 4 heures) ppm	(une seule application sur la peau des lapins) mg/kg	Dose probablement létale chez les humains
1	Extrêmement toxique	1 ou moins	10 ou moins	5 ou moins	1 grain (une pincée, une goutte)
2	Hautement toxique	1 à 50	10 à 100	5 à 43	4 mL (1 c. à thé)
3	Modérément toxique	50 à 500	100 à 1000	44 à 340	30 mL (1 on. liquide)
4	Légèrement toxique	500 à 5000	1000 à 10 000	350 à 2810	600 mL (chopine)
5	Presque pas toxique	5000 à 15 000	10 000 à 100 000	2820 à 22 590	1 litre (ou 1 pinte)
6	Relativement inoffensif	15 000 ou plus	100 000	22 600 ou plus	1 litre ou 1 pinte)

Tableau 4. Classes de toxicité : échelle de Gosselin, Smith et Hodge (https://fr.wikipedia.org/wiki/Dose_1%C3%A9tale_m%C3%A9diane)

Dose orale probablement mortelle (humain)		
Indice ou classe de toxicité	Dose	Pour une personne de 150 livres (70 kg)
6 Super toxique	Moins de 5 mg/kg	1 grain (une pincée – moins de 7 gouttes)
5 Extrêmement toxique	5 à 50 mg/kg	4 mL (entre 7 gouttes et 1 c. à thé)
4 Très toxique	50 à 500 mg/kg	30 mL (entre 1 c. à thé et 1 on. liquide)
3 Modérément toxique	0,5 à 5 g/kg	30 à 600 mL (entre 1 on. liquide et 1 chopine)
2 Légèrement toxique	5 à 15 g/kg	600 à 1200 mL (entre 1 chopine et 1 pinte)
1 Presque pas toxique	Plus de 15 g/kg	Plus de 1200 mL (plus d'une pinte)

- utilisée pour déterminer l'effet toxique spécifique du produit, l'organe cible comme elle fournis des données pour déterminer les doses à utilisées dans les études à long terme.
- programmation des essais thérapeutiques chez l'homme.
- évaluation du danger en cas de surdosage.
- contrôle de qualité.

Limites de la DL50

- Ne concerne que la mortalité et ne donne aucune information sur les mécanismes et la nature des lésions.
- Les résultats obtenus ne préjugent pas forcément de ce qui pourrait être observé après administration chez l'homme (différence de réactivité biologique entre l'homme et l'animal).
- Appréciation grossière et préliminaire, influencée par plusieurs facteurs (espèce animale, sexe, âge) (Tableau 5).
- Elle est critiquée sur le plan éthique vu la souffrance et le nombre de mortalité importante qu'elle engendre aux animaux de laboratoire. Le FRAME 'Fonds pour Remplacement des Animaux en Expérimentation Médicale) estime que la DL50 est un test inutile, cruel et scientifiquement invalide.

Tableau 5 : Influence de facteurs sur la dose létale 50, et concentration létale 50 de trois produits (<https://www.cnesst.gouv.qc.ca/sites/default/files/publications/notions-de-toxicologie.pdf>)

Produit (utilisation)	Espèce animale	Dose létale 50 (g/kg) ¹		Concentration létale (ppm/4 h) ²
		Voie orale	Voie cutanée	
Acétone (solvant)	lapin	5,34	20,00	---
	rat	5,80	---	29 853,00
	souris	3,00	---	---
Acroléine (fabrication de polymères)	hamster	---	---	25,40
	lapin	---	0,20	---
	rat	0,046	---	8,30
	souris	0,028	---	---
Méthanol (solvant)	lapin	14,41	15,80	---
	rat	6,20	---	64,00
	souris	7,30	---	---

1. Quantité exprimée en gramme par kilogramme (g/kg).

2. Concentration dans l'air exprimée en partie par million (ppm) pour une période de quatre heures (4 h).

1.1.2. Test de Draize

C'est le test d'évaluation de la toxicité aiguë par voie locale, son but est de déterminer les produits irritants par leur application sur la peau (irritation cutanée) ou la muqueuse conjonctive de l'animal (irritation oculaire).

a. Irritation cutanée

L'irritation est un élément important en milieu professionnel. Elle correspond ici à l'effet qui peut survenir après une projection unique ou une exposition forte mais de courte durée. L'intensité possible de l'action irritante sur la peau est décrite, elle peut aller de la simple sensation de picotement à une brûlure grave (substances corrosives) avec cicatrice séquellaire.

Epiderme de lapin intact et sacrifice maintenu par un bandage adhésif ; la lecture s'effectue après 24-72 heures. Des tables d'évaluation permettent de déterminer les scores, chaque score correspond à une intensité de la réaction.

Les tests d'irritation cutanée mesurent le résultat d'un contact direct, bref et non répétitif, de la substance avec la peau ; les effets s'échelonnent d'une légère rougeur (érythème) à des modifications sévères : œdème (accumulation d'une quantité excessive d'eau dans les cellules, les tissus ou les cavités séreuses), escarre ou nécrose (dégénérescence qui aboutit à la mort d'une cellule ou d'un tissu), hyperplasie, effet corrosif (destruction tissulaire irréversible sur toute la profondeur de la peau)

Ils sont généralement effectués sur le lapin, plus sensible que l'homme pour l'irritation cutanée. Il existe des tests in vitro qui permettent de prédire les effets corrosifs. Selon la gravité et la durée des effets observés, les substances peuvent être classées et étiquetées comme corrosives (R35 ou R34) ou irritantes (R38). Les tests par exposition cutanée répétée peuvent mettre en évidence des effets tels que dessèchement, desquamation ou gerçures de la peau liés aux propriétés dégraissantes des substances (R66).

b. Irritation oculaire

L'index d'irritation correspond à la somme des scores obtenus pour la cornée, l'iris, les conjonctives palpébrales et bulbaires.

Pour l'œil les conséquences sont variables selon le produit (l'action des bases est plus grave que celle des acides) et les parties de l'organe atteintes : la conjonctivite (inflammation de la conjonctive) est souvent superficielle et réversible, les lésions de l'iris et de la cornée (kératite) peuvent se traduire par des perturbations définitives de la vue. Les tests d'irritation oculaire mesurent le résultat d'un contact direct de la substance avec l'œil ; la conjonctive et la cornée sont les premières touchées, l'érosion cornéenne pouvant aller jusqu'à l'opacification. Des effets inflammatoires de l'iris sont quelquefois observés. Les tests sont effectués sur la surface antérieure de l'œil du lapin. Selon la gravité des effets observés, les substances pourront être classées et étiquetées comme irritantes (R36) ou sévèrement irritantes (R41).

L'irritation oculaire est mesurée par le test Eyetex, ce test consiste à mesurer l'irritation oculaire par une protéine végétale extraite du pois sabre. Comme la cornée ce gel protéique

clair devient vitreux lorsqu'il est en contact avec une substance irritante. Le degré d'opacité peut être mesuré par un spectrophotomètre.

1.1.3. Test de toxicité aiguë par inhalation

Concerne les gaz, vapeurs, aérosol ou une forme mixte. L'animal entier ou le nez seul est placé dans une chambre. Exposition durant un temps déterminé (4h selon OCDE) à concentration prédéfinie.

L'action irritante sur les bronches est également mentionnée, les faibles irritations se traduisent par une simple gêne respiratoire accompagnée ou non de toux mais il faut se méfier d'actions plus graves conduisant par exemple à un œdème du poumon et/ou à des séquelles bronchiques graves comme l'emphysème ou le syndrome d'hypersensibilité non spécifique.

L'irritation respiratoire résulte d'une action de la substance sur les voies respiratoires. Il n'existe pas de test spécifique pour mesurer cette action. Toutefois elle peut être confirmée par des données histopathologiques lors d'essais appropriés de toxicité générale par inhalation après exposition unique ou répétée. L'irritation respiratoire peut se traduire par une modification de la fréquence respiratoire mesurée grâce au test d'Alarie (détermination de la RD50 correspondant à la dose qui induit une baisse de 50% de la fréquence respiratoire).

L'observation chez l'animal d'une grave irritation des voies aériennes supérieures fournit des indications pour la classification et l'étiquetage des substances comme irritantes (R 37) qui se fondent toutefois plus souvent sur l'expérience chez l'homme.

Problème de transposition des résultats des études in vivo

- Différence dans le système ADME entre l'homme et l'animal
- Différence anatomique
- Les susceptibilités individuelles qui conduisent à des réponses différentes.
- Certains effets ne peuvent être mis en évidence chez l'animal par ex : céphalées, vertiges, nausées.

1.2. Etude expérimentale in vitro

L'étude in vitro est réalisée sur des cultures cellulaires, cette technique permet d'étudier le mécanisme de toxicité moléculaire, comme elle permet d'éviter de faire souffrir et de tuer les animaux.

1.2.1. Les tests alternatifs aux tests de Draize

Eyetex : (mesure de l'irritation oculaire), mesure de l'irritation oculaire par une protéine végétale extraite du pois sabre. Comme la cornée ce gel protéinique clair devient vitreux lorsqu'il est en contact avec une substance irritante.

Avantage : sur animal on doit estimer quelle partie de l'œil du lapin est très précis. Avec le test Eyetex, le degré d'opacité (dégâts) peut être mesuré par un spectrophotomètre bien plus fiable que le test de Draize.

1.2.2. Tests alternatifs au test de Draize Epiderme humain reconstitué

Consiste à utiliser des couches de peau humaine cultivées en laboratoire pour les tests d'irritation cutanée, commercialisées sous les noms de « Skin Squared » ou « Episkin ». L'évaluation de l'irritation cutanée s'effectue par la mise en évidence des rougeurs et des enflures, et observation microscopique des dégâts au niveau des membranes (extraction des enzymes) et détermination d'une inflammation (libération d'interleukine).

1.2.3. Tests alternatifs au test de Draize Test de fixation du rouge

Les cellules normales absorbent et retiennent le rouge neutre, si la membrane cellulaire ou les lysosomes sont endommagés par une substance chimique irritante, la teinture s'échappe par les membranes perméables. Un spectrophotomètre mesure la quantité de teinture échappée.

1.2.4. Tests alternatifs au test de Draize : Les études humaines :

En cosmétologie : utilisation de volontaire humains pour tester les nouvelles formulations, c'est le test le plus fiable grâce à un patch, on place les substances sur des petites zones en haut du dos (2 jours).

2. Test d'étude de la toxicité à court terme : subaiguë ou subchronique

La toxicité subaiguë/subchronique résulte d'une exposition répétée ou prolongée des animaux d'expérience pendant plusieurs semaines (en général 28 jours) jusqu'à 3 mois (90 jours), ce qui correspond à une période brève au regard de leur espérance de vie. Le rat est l'espèce utilisée de préférence.

Les effets observés peuvent inclure :

2.1.Des altérations légères

Modification du gain de poids corporel, de la consommation de nourriture ou d'eau, des paramètres de la biochimie clinique, de l'hématologie ou du poids des organes sans preuves de dysfonctionnement organique.

Des réactions adaptatives (augmentation du poids du foie par exemple).

2.2.Des lésions graves

-Létalité liée à la substance

-Modifications fonctionnelles majeures du système nerveux ou d'un autre organe.

-Modification importante des paramètres de la biochimie clinique ou de l'hématologie.

-Modifications morphologiques graves, observées au microscope après autopsie, dans des organes vitaux ayant une capacité régénératrice (foie, rein...) ou mortalité cellulaire importante dans des organes vitaux incapables de se régénérer (cœur, nerf...) ou dans les populations de cellules souches (moelle osseuse...).

3. Test d'étude de la toxicité à long terme ou chronique

La toxicité chronique résulte d'une exposition répétée pendant plusieurs mois ou années représentant une grande partie de la vie des animaux. Les études de toxicité chronique permettent de mettre en évidence des lésions cumulatives d'un organe spécifique (système cardio-vasculaire, foie, système immunitaire, reins, système nerveux, système respiratoire). Ces lésions apparaissent après un temps de latence, se développent lentement, sont de longue durée et souvent irréversibles.

Une étude de toxicité par dose répétée permet normalement de déterminer les doses NOAEL et LOAEL. Il est en général admis que la NOAEL décroît lorsque la durée d'exposition de l'étude augmente. Lorsque plusieurs NOAELs sont disponibles pour le même effet, c'est la valeur la plus basse qui est utilisée pour l'évaluation des risques.

3.1. Tests et étude de génotoxicité

Certains toxiques déclenchent une génotoxicité qui se manifeste par une mutation aboutissant à une modification des caractéristiques phénotypiques de l'organisme.

Les altérations peuvent impliquer un gène unique (mutation génique), un ensemble de gènes ou un chromosome entier (élément du noyau cellulaire portant les gènes).

Il existe deux sortes de lésions induites :

a. Les mutations germinales

Endommagent l'ADN du spermatozoïde ou de l'ovule. Ces mutations sont transmises aux générations futures et peuvent être létales pour l'embryon ou le fœtus ; elles sont mises en évidence sur les cellules germinales par des tests réalisés in vivo (léthalité dominante, mutation d'un locus spécifique, translocation héréditaire, anomalies chromosomiques, échanges de chromatides sœurs, synthèse non programmée de l'ADN, ou liaison covalente à l'ADN).

b. Les mutations somatiques

Lèsent l'ADN de toutes les autres cellules, ne sont pas héréditaires ; elles entraînent la mortalité cellulaire, la transmission de la mutation aux cellules du même tissu ou même la cancérogenèse. Les tests sont nombreux, in vitro sur bactéries (test d'Ames) ou cellules en culture (mutagenèse ou cytogénétique) et in vivo sur la moelle osseuse (micronoyau, aberrations chromosomiques, échanges de chromatides sœurs), tests d'effet sur l'ADN (synthèse non programmée, liaison covalente, défauts), le sang périphérique (micronoyau, aberrations chromosomiques) ou essai de taches colorées sur le pelage de souris (spot-test).

Remarque : Les résultats positifs dans les essais de génotoxicité sont généralement considérés comme une alerte pour une éventuelle activité.

3.2. Tests et études de cancérogenèse

La cancérogenèse est un processus complexe multi-étapes de croissance et de différenciation anormale qui peut conduire au cancer. Il existe au moins deux étapes : l'initiation où la cellule normale subit des modifications irréversibles et la promotion pendant laquelle les cellules initiées sont stimulées dans leur progression vers le cancer.

Une substance chimique peut être initiatrice (action directe sur l'ADN) ou promotrice (sans action directe sur l'ADN) ou les deux à la fois. Le résultat est une croissance tumorale (ou néoplasme) bénigne ou maligne.

L'étude du métabolisme de la substance peut mettre en évidence la formation d'un métabolite réactif capable d'interagir avec l'ADN. Cet effet est mis en évidence par une mesure des adduits formés (substance ou partie de substance liée de façon covalente aux macromolécules biologiques).

Les espèces préférées pour les tests de cancérogenèse sont le rat et la souris, l'étude doit en général couvrir la majeure partie de la durée de vie normale des animaux d'expérience, soit 24 mois environ. Les résultats sont évalués au moyen d'une méthode statistique appropriée.

3.3. Tests et études des effets sur la reproduction

La toxicité pour la reproduction comprend l'altération des fonctions ou de la capacité de reproduction chez le mâle ou la femelle et l'induction d'effets néfastes non héréditaires sur la descendance. Elle peut être subdivisée en deux rubriques principales :

a. Effets sur la fertilité

Cette catégorie comprend les effets néfastes sur la libido, le comportement sexuel, les différents aspects de la spermatogenèse ou de l'oogenèse ou sur l'activité hormonale ou la réponse physiologique qui perturberaient la capacité de fécondation, la fécondation elle-même ou le développement de l'ovule fécondé jusqu'à et y compris l'implantation.

b. Toxicité pour le développement

Comprend les effets toxiques sur l'embryon (embryotoxicité) et le fœtus (fœtotoxicité) tels que l'avortement, la mort, la réduction du poids corporel, le retard de croissance et de développement, la toxicité pour les organes, les anomalies structurelles (effets tératogènes), les anomalies fonctionnelles, les anomalies péri- ou postnatales ainsi que l'altération du développement mental ou physique après la naissance.

Plusieurs tests sont utilisés pour évaluer le risque :

- a. Index de gestation :** pourcentage de gestations aboutissant à la mise basse d'animaux en vie
- b. Index de viabilité :** pourcentage de nouveau-nés qui survivent au moins 4 jours ;
- c. Index de lactation :** pourcentage des animaux en vie à 4 jours qui sont encore en vie au moment du sevrage, à 21 jours.

Références bibliographiques

Bensakhria, A. (2018). Toxicité aigüe in book: Toxicologie Générale (pp.21-28) Chapter: II. Liverpool John Moores University.

Bliss, C.I. (1938). The determination of the dosage-mortality curve from small numbers. *Quarterly Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 11(2), 192-216

Lapointe, J. (2004). Notions de toxicologie. Deuxième édition revue et augmentée, Dépôt légal – Bibliothèque nationale du Québec ISBN 2-551-22538-8

Lorke, D.A. (1983). A new approach to practical acute toxicity testing. *Archives of Toxicology*, 54, 275–287. <https://doi.org/10.1007/BF01234480>

Lu, F.C. (1992). Basic toxicology: fundamentals, target organs, and risk assessment. - Hemisphere publishing corporation, Ed. Masson, p. 303, 304.

Randhawa, M. (2009). Calculation of LD₅₀ values from the method of Miller and Tainter, 1944. *Journal of Ayub Medical College, Abbottabad : JAMC*. 21(3), 184-5.

Tallarida, R.J. and Murray, R.B. (1987). Litchfield and Wilcoxon I: Confidence Limits of ED₅₀. In: *Manual of Pharmacologic Calculations*. Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-4974-0_47

Trevan, J.W. (1927). The error of determination of toxicity. *Proc R Soc (London) Ser. B*. 101, 483–514

Sites internet:

https://fr.wikipedia.org/wiki/Dose_1%C3%A9tale_m%C3%A9diane

<https://www.cnesst.gouv.qc.ca/sites/default/files/publications/notions-de-toxicologie.pdf>