

Perspectives

Comment mettre fin aux tests de toxicité sur animaux ?

Rapport réalisé par

Dr Gill Langley MA, PhD (CANTAB), MIBiol, Cbiol

Pour la Coalition européenne
pour mettre fin à l'expérimentation animale.



Traduction et distribution par One Voice –
représentant français de la Coalition pour
mettre fin à l'expérimentation animale – BP 41
– 67065 Strasbourg cedex.

 **oneVoice**
UNE SEULE ET MÊME VOIX POUR LES ANIMAUX ET LA PLANÈTE

Agir pour mettre fin aux tests de toxicité sur les animaux

Les tests de toxicité pratiqués sur les animaux sont la source d'une grande souffrance et leur valeur scientifique est douteuse. Leur crédibilité se fonde sur l'usage établi plutôt que sur la fiabilité éprouvée ou sur la valeur prédictive.¹

Les programmes de tests (tels que celui que propose le livre blanc de la Commission européenne dans le cadre d'une nouvelle politique en matière chimique) sont susceptibles de faire augmenter très significativement le nombre d'animaux utilisés dans les expérimentations relatives à la toxicité, mais peuvent aussi - lorsque existe une volonté politique suffisante - être l'occasion de généraliser l'usage des méthodes de tests substitutives.

Ce rapport montre qu'il est possible de remplacer les tests sur les animaux par des alternatives modernes et humaines. Il est destiné à toutes les personnes dont l'influence et l'implication sont nécessaires pour que cet objectif puisse être atteint.

Pour chaque domaine d'expérimentation concerné, le rapport décrit le test sur l'animal et son équivalent substitutif. Il présente en détail les lacunes scientifiques de la méthode courante *in vivo*, et parallèlement, l'action à mener pour mettre en pratique les nouvelles méthodes de tests.

La procédure de test sur les animaux décrite ici est utilisée pour l'évaluation de diverses substances, entre autres des ingrédients entrant dans la composition des cosmétiques ainsi que divers produits chimiques.

Certaines des méthodes substitutives exposées ont déjà été validées, d'autres sont en cours de développement, d'autres sont déjà en usage mais attendent encore la validation finale par l'ECVAM (Centre européen pour la validation des méthodes substitutives).

La description de chaque test effectué sur les animaux donne un bon aperçu de la méthode de test. Il importe de ne pas oublier que chaque test est susceptible de provoquer de la douleur et de la détresse, souvent de manière prolongée.

Selon notre estimation, dans l'optique des méthodes de tests traditionnelles, on devrait utiliser jusqu'à 2123 animaux pour tester chacune des substances chimiques HPV (destinées à la production en quantité). Par ailleurs, le nombre d'animaux nécessaires pour tester 30.000 substances a été estimé à pas moins de 12,8 millions, et ce chiffre augmente encore jusqu'à plus de 50 millions lorsque l'on y inclut les animaux nés dans le cadre des études reproductives².

Les tests pratiqués sur les animaux demandent souvent davantage de temps que les tests substitutifs équivalents. Ainsi, par exemple, tester la carcinogenèse sur l'animal demande un délai de cinq ans, alors que le test substitutif SHE, qui pourrait être validé d'ici deux ans, permet d'obtenir les résultats au bout de quelques semaines seulement (voir page 23).

En 1993, le Parlement européen a voté l'arrêt des tests des produits cosmétiques sur les animaux, par le biais d'une interdiction de vendre des produits testés sur les animaux applicable à compter de 1998. Les méthodes substitutives de tests étaient prévues, mais en raison d'un financement insuffisant (et d'un ajournement prévisionnel de l'interdiction dans le cas où l'on ne disposerait pas de méthodes substitutives validées), leur généralisation est passée au second plan. Aujourd'hui, presque une décennie plus tard, nous attendons toujours les nouveaux tests substitutifs qui y étaient proposés.

Un délai supplémentaire ne saurait être accepté. L'arrêt des expérimentations animales en toxicologie et leur remplacement par des méthodes substitutives est à notre portée. Ce qui s'impose aujourd'hui, c'est une stratégie cohérente et coordonnée permettant de mettre en application ces méthodes substitutives de tests.

¹ Pour chaque substance, on étudie pas moins de douze domaines de test, comme l'exige la législation. Dans la majorité des cas, le recours aux tests sur les animaux est accepté sans qu'ils soient validés selon les normes actuelles : les tests n'ont pas subi le processus de validation exigé pour les tests substitutifs.

² Exigences de tests de l'IEH (2001) pour les directives du livre blanc de la Commission européenne "Stratégie pour une nouvelle politique chimique" (rapport WEB W6), Leicester, Royaume-Uni, Institute for Environment and Health (<http://www.le.ac.uk/ieh/webpub.html>, juillet 2001).

Pour l'application de la stratégie de tests substitutifs

La redéfinition en cours de la politique d'expérimentation chimique de l'Union Européenne représente une occasion unique et à saisir, pour les organismes européens concernés, de réévaluer les forces et les faiblesses de l'approche actuelle en matière de tests chimiques. Il s'agit, là comme dans d'autres programmes de tests chimiques, de saisir l'opportunité de développer une nouvelle stratégie exhaustive allant dans le sens de la modernisation et du progrès.

Au lieu de compter sur les méthodes d'expérimentation du passé, qui sont très controversées et hautement incertaines, la Commission européenne ferait mieux de promouvoir de nouvelles recherches coordonnées et programmées dans le temps ainsi qu'un système de validation et de procédures de régulation qui soit fondé sur des méthodes appropriées, efficaces, rentables et humaines. Ainsi, non seulement on sauverait la vie des animaux, mais la protection de l'environnement, la santé humaine et la confiance des consommateurs en bénéficieraient également.

Il est clair que pour pouvoir le plus rapidement possible identifier les substances chimiques dangereuses et en contrôler l'utilisation, des procédés de tests radicalement différents s'imposent. La seule approche permettant d'associer les considérations pratiques avec des exigences éthiques est celle qui consiste à utiliser des méthodes rapides de tests sans recours aux animaux afin de caractériser un grand nombre de substances chimiques dans un délai minimal.

Les méthodes *in vitro* et les méthodes assistées par ordinateur peuvent être combinées selon des procédures par étapes ou en arbre de décision, adaptées à chaque type de toxicité. Les méthodes de tests par étapes ont déjà été acceptées par l'OCDE (Organisation de Coopération et de Développement Economique), les Etats-Unis et l'Union Européenne, et elles y sont déjà utilisées. Dans une procédure par étapes à base de méthodes substitutives, l'expérimentation va des méthodes simples et rapides de contrôle à l'écran, en passant par les tests spécifiques aux mécanismes de la toxicité, jusqu'aux tests *in vitro* plus élaborés, le cas échéant, lesquels permettent d'étudier l'effet des substances sur des tissus cibles. Les études métaboliques *in vitro*, combinées avec la modélisation sur ordinateur de l'absorption, de la diffusion et de l'élimination des substances chimiques, permettent d'extrapoler les résultats obtenus *in vitro* à l'ensemble de l'organisme.

Pour une substance chimique donnée, des décisions peuvent être prises à chaque étape du processus de test, il n'est donc pas nécessaire de passer par toutes les étapes pour toutes les substances. Les premières étapes sont communes à la plupart des types de toxicité, ce qui fait que les processus de test des diverses substances peuvent être menés en parallèle, au moins jusqu'à un certain point.

Les résultats de la plupart des tests *in vitro* sont obtenus dans un délai qui se compte en jours plutôt qu'en semaines, en mois ou en années comme c'est si souvent le cas avec les tests menés sur les animaux. Une grande partie des méthodes de test proposées ici sont déjà bien connues dans l'industrie pharmaceutique, et sont couramment utilisées en tant que méthodes de contrôle maison ou pour la compréhension des mécanismes de la toxicité. Certains de ces tests permettent d'obtenir non seulement des mesures qualitatives (la substance est-elle toxique ou non ?) mais aussi des évaluations quantitatives du risque (quel est le degré de toxicité de la substance ?).

Certains des tests substitutifs proposés ont déjà été validés et acceptés par les organismes officiels. D'autres sont en phase de validation. Le cas échéant, des actions prioritaires sont identifiées à la fin de chaque section, afin de mieux voir quelles mesures la Commission européenne devrait prendre en premier lieu pour mettre en place une stratégie de tests substitutifs.

Il est urgent de pouvoir disposer des données déjà existantes concernant les substances chimiques, car les tests sur les animaux demandent trop de temps, sont souvent peu fiables, coûteux, et mobilisent une grande quantité de ressources. Il serait souhaitable de recourir exclusivement à des méthodes de tests sans animaux. Cela permettrait de classer et de contrôler efficacement et rapidement les substances potentiellement toxiques. Les substances chimiques tangentes ou suspectes devraient être mises sous surveillance au nom du principe de précaution, en attendant, le cas échéant, des tests à effectuer dans un proche futur à l'aide d'un éventail plus complet de méthodes substitutives validées.

Un préalable fondamental à tout test est l'institution d'un partage obligatoire des données, dans le cadre d'une recherche au niveau mondial des données existantes. Ce partage doit inclure non seulement les documents et bases de données toxicologiques généralement publics mais aussi les données détenues par les laboratoires, les entreprises du secteur chimique et les toxicologues. Il serait nécessaire de rassembler toutes les données existant au sein des hôpitaux, des centres anti-poisons et autres, concernant les effets des diverses substances chimiques sur l'être humain. Les données provenant de tests effectués sur des animaux dans le passé - selon des normes moins rigoureuses que celles de notre époque - peuvent y être intégrées, mais le fait que l'on dispose de ces données ne justifie pas que l'on poursuive ce genre de tests.

TEST SUR L'ANIMAL		Effet irritant sur l'œil
Animal:	lapin albinos adulte	
Nombre:	au moins trois par substance testée	
Objectif:	évaluer l'effet d'irritation aiguë d'une substance appliquée directement sur l'œil.	
Test:	les effets des doses simples sont observés pendant 21 jours. L'autre œil, qui ne subit pas le test, sert de témoin. Dans la plupart des cas, aucun anesthésique n'est administré. Le degré d'irritation est établi d'après un guide standard illustré.	
Symptômes:	aspect trouble, rougeoiement, gonflement de la paupière, ulcération, larmolement	

Critique

- On observe de nettes différences, dans la structure de la cornée, entre le lapin et l'être humain. Chez le lapin, l'épaisseur de la cornée est de 0,37 mm contre 0,51 mm chez l'être humain. Par ailleurs, la cornée du lapin couvre 25% de la surface de l'œil, contre 7% chez l'être humain.
- La membrane de Bowman, un élément essentiel de la structure de l'œil, est six fois plus mince chez l'être humain que chez le lapin.
- Le flot lacrymal du lapin est plus faible que celui que l'on peut observer chez l'être humain, le lapin n'est donc pas capable de réagir à la substance testée dans la même mesure que le ferait l'être humain. Il s'ensuit que tout corps étranger est susceptible de demeurer pendant un laps de temps nettement plus long dans l'œil du lapin.
- L'évaluation des dommages pouvant résulter de l'administration des substances testées est hautement subjective, et elle varie significativement, aussi bien d'un laboratoire à un autre qu'à l'intérieur d'un même laboratoire. Selon Swanston, de Porton Down, "on n'a encore trouvé chez aucune espèce animale un modèle fiable pour l'œil humain, ni en termes d'anatomie ni en termes de réaction à l'irritation". (1)
- Les différences anatomiques au niveau de la paupière ne sont pas neutres vis-à-vis du processus d'élimination d'une substance donnée.

- Les caractéristiques immunitaires, physiologiques et génétiques de l'animal exercent une forte influence sur les réactions à l'irritation et à l'inflammation.
- Les effets des substances testées varient démesurément selon les doses administrées, et il n'est pas possible d'établir une relation claire entre la réaction de l'œil d'un lapin exposé à une dose déterminée (0,1 ml) et la réaction à attendre lors d'une exposition accidentelle chez l'homme. (2)

Stratégie alternative

Une fois rassemblées et analysées les données existantes sur l'homme et l'animal, il est possible d'adopter la stratégie suivante (3) :

Stratégie de tests par étapes pour l'effet irritant sur l'œil

- Etape 1 :** L'irritation est prévisible avec certaines structures moléculaires, il est donc possible d'établir des prédictions sur ordinateur en termes de relations entre activité et structure pour identifier les substances potentiellement irritantes.
- Etape 2 :** Les acides et bases concentrés ont de bonnes chances d'être corrosifs pour les yeux et peuvent être classés comme tels sans que des tests soient nécessaires.
- Etape 3 :** On peut supposer qu'une substance chimique provoquant une sérieuse irritation de la peau sera aussi irritante pour les yeux, on peut donc la classer et la réglementer de façon adéquate selon cette logique.
- Etape 4 :** Les méthodes substitutives de tests ci-après ont été validées par les législateurs de divers pays (respectivement la Grande-Bretagne, l'Allemagne, la France et les Pays-Bas) en ce qui concerne l'identification des substances fortement irritantes pour les yeux. Le test mené sur l'œil de lapin isolé et le test HET-CAM (Hen's Egg Test - Chorio-Allantoic Membrane) permettent de classer les substances chimiques comme légèrement ou sérieusement irritantes pour l'œil. Avec un agrément de l'OCDE concernant l'acceptabilité réciproque des données, les autres pays pourront tenir pour acquis les résultats de ces tests. Les tests en question sont les suivants :
- Test d'opacité et de perméabilité de la cornée du bovin (BCOP)
 - Test HET-CAM
 - Test sur l'œil de lapin isolé
 - Test sur l'œil de poulet isolé

A côté de ces méthodes validées, l'Institut fédéral allemand pour la protection et la santé des consommateurs et la médecine vétérinaire (BgVV) a considéré que (4) un simple test *in vitro* de la précipitation des protéines permettait d'établir la distinction entre les substances chimiques modérément et sévèrement irritantes pour l'œil. Une précipitation substantielle des protéines dans un test tel que l'Irritation System (anciennement appelé Eytex) serait le signe d'une irritation oculaire irréversible.

Ces méthodes substitutives de tests permettent d'identifier, de classer et de contrôler les substances chimiques irritantes ou provoquant des lésions oculaires irréversibles. Les substances chimiques dont les résultats, au cours de ces tests, sont négatifs, présentent des risques extrêmement réduits d'être irritants.

PERSPECTIVES

Action à mener en priorité

L'ECVAM devrait étudier l'intérêt d'inclure un test de précipitation des protéines *in vitro* comme l'Irritation system, et réviser les données relatives aux tests BCOP, HET-CAM et aux tests de l'œil de lapin et de l'œil de poulet, pour décider s'ils peuvent être acceptés par l'Union Européenne au vu des données existantes ou s'il convient d'entreprendre d'urgence une procédure de validation complémentaire.

Délai suggéré : 2 ans maximum.

TEST SUR L'ANIMAL		Effet irritant et corrosion cutanée
Animal:	lapin albinos adulte	
Nombre:	au moins trois par substance testée	
Objectif:	évaluer la toxicité d'une substance chimique appliquée sur l'épiderme.	
Test:	On applique une dose simple sur une zone sur laquelle on a préalablement rasé la fourrure ou les poils. Une zone mitoyenne rasée mais non traitée sert de zone témoin. L'exposition dure habituellement quatre heures. L'irritation est évaluée par comparaison avec la zone témoin.	
Symptômes:	rougeoiement, gonflement, inflammation et ulcération de la peau	

Critique

- L'anatomie de la peau et sa structure cellulaire varient selon les espèces, la réaction à une substance ne peut que varier également d'une espèce à l'autre.
- Il est notoire que le lapin, couramment utilisé dans les tests sur l'irritation, constitue cependant un piètre indicateur du potentiel d'irritation chez l'humain. (5)
- Cette procédure de test pose de nombreux problèmes, du fait des variations que l'on peut observer en fonction des caractéristiques immunitaires, physiologiques et génétiques des lapins utilisés.
- Les réactions à une substance varient également en fonction de l'âge, aussi bien au sein d'une espèce que d'une espèce à une autre.

Stratégie alternative

Il est aujourd'hui possible de classer les substances chimiques corrosives pour la peau en recourant à des méthodes en éprouvette qui ont été validées et qui sont acceptées par l'Union Européenne (voir ci-après). En conséquence, d'après la Directive 86/609/EEC (6), les tests de corrosion cutanée sur les animaux ne sont plus licites.

En ce qui concerne les tests d'irritation de l'épiderme, l'OCDE a établi une stratégie de tests par étapes dans laquelle les données obtenues selon des méthodes *in vitro* peuvent suffire à permettre la classification des substances chimiques (un test sur l'animal est cependant prévu au stade final) (7). La stratégie de l'OCDE présente plusieurs étapes communes avec un programme préparé par le groupe de travail du Centre européen pour la validation des méthodes substitutives (ECVAM) sur les propriétés irritantes (8), ci-après, dans lequel aucun test sur l'animal n'est nécessaire :

Stratégie de tests par étapes pour l'effet irritant et la corrosion cutanée

- Etape 1 :** L'irritation est prévisible avec certaines structures moléculaires, il est donc possible d'établir sur ordinateur les prédictions en termes de relations entre activité et structure pour identifier les substances potentiellement irritantes.
- Etape 2 :** Les acides et bases concentrés ont de bonnes chances d'être corrosifs pour les yeux et peuvent être classés comme tels sans que des tests soient nécessaires.
- Etape 3 :** Les méthodes *in vitro* validées et approuvées, dans le domaine des tests de corrosion cutanée, comprennent le test de résistance électrique trans-épithéliale (sur des fragments de peau *in vitro*) et le modèle d'épiderme humain reconstitué ou Corrositex.
On peut ainsi identifier et placer sous contrôle les substances corrosives. Pour les substances chimiques dont les résultats, au cours de ces tests, sont négatifs, on passe à l'étape suivante, ou bien, dans les pays où les études sur des cobayes volontaires sont admises, on passe directement à l'étape 5.
- Etape 4 :** En ce qui concerne les tests d'irritation cutanée *in vitro*, les résultats sont reconnus par l'Union Européenne et par l'OCDE, mais les méthodes de test n'ont pas encore été entièrement validées. Dans une étude de validation récente de l'ECVAM, les méthodes utilisant des modèles d'épiderme humain reconstitué se sont révélées très prometteuses (9). *Cette stratégie permet une prédictibilité des propriétés irritantes pour la peau, même si, lorsque les études sur des cobayes volontaires sont possibles, ce sont les observations sur l'humain qui fournissent la norme de référence (voir étape 5).*
- Etape 5 :** Une fois les substances chimiques corrosives identifiées, les autres peuvent être classées selon les résultats d'un test d'application de 4 heures sur des volontaires. Il existe un protocole normalisé (10) pour ce test, le groupe de travail de l'ECVAM est favorable à cette approche dans le domaine de l'irritation cutanée, et une directive de l'OCDE va dans le même sens. De tels tests sur les humains constituent la meilleure référence en termes de données normalisées.

Cette procédure permet de classer rapidement et de manière pertinente les substances chimiques selon leurs propriétés irritantes et corrosives pour la peau. Les projets actuels de l'Union Européenne et de l'OCDE ne prévoient un test sur l'animal en dernier ressort que parce que certains états membres n'acceptent pas les tests sur des humains volontaires. Afin de pouvoir éviter entièrement les tests sur les animaux, nous suggérons que, si les quatre premières étapes du programme peuvent se dérouler dans ces pays membres, l'étape 5 soit sous-traitée à un autre pays membre dans lequel les études sur les volontaires sont permises

PERSPECTIVES

Action à mener en priorité

Cette stratégie peut être adoptée dès à présent. Si certains pays membres n'acceptent pas le test d'application cutanée sur des humains (volontaires), la Commission européenne pourrait aussi donner la priorité à la validation finale et à l'admission des tests sur les modèles d'épiderme humain pour l'étude de l'irritation cutanée. Elle pourrait également œuvrer à faire accepter le test d'application cutanée sur l'humain dans les textes législatifs au sein de l'Union Européenne.

Délai suggéré : 1 an

TEST SUR L'ANIMAL Allergie cutanée	
Animal:	cochon d'Inde albinos
Nombre:	au minimum 17, mais parfois jusqu'à 30 par substance testée
Objectif:	évaluer la faculté d'une substance chimique à provoquer une réaction allergique de l'épiderme.
Test:	La substance à tester est administrée par application sur la surface de la peau ou par injection. La zone de test est rasée - il s'agit généralement de l'épaule. On applique des doses multiples afin de provoquer des réactions locales.
Symptômes:	rougeoiement de la peau, éclatement ou pelure de la peau, gonflement, inflammation et ulcération.

Critique

- Les procédures de test sont très variées, et il existe pas moins de 15 protocoles différents dans lesquels les dosages et la fréquence des applications ne sont pas les mêmes. Il est donc très difficile de faire des extrapolations des résultats aux humains et des comparaisons significatives, sans compter le caractère subjectif de l'évaluation des dommages.
- La substance à tester est appliquée sur une zone de peau rasée. La peau de l'animal étant ainsi initialement malmenée par le rasage et l'abrasion, la comparaison avec le cas d'une exposition normale de l'épiderme humain, qui ne fait pas suite à une dégradation initiale, est d'autant moins fondée. Par ailleurs, lorsqu'une injection produit localement une irritation, un léger effet d'allergie passe facilement inaperçu.
- Le recours à des doses souvent massives, lorsqu'il s'agit de tester un allergène potentiel, ne saurait représenter la manière dont se déclenchent les allergies chez l'être humain.
- L'utilisation généralisée du cochon d'Inde comme espèce modèle montre bien les faiblesses d'une approche consistant à utiliser n'importe quelle espèce dont les membres sont obtenus par croisements consanguins ou bien des animaux dont l'histoire génétique n'est pas connue. La comparaison des données entre les études sur les cochons d'Inde et celles sur d'autres lignées, consanguines ou non, pose de gros problèmes d'interprétation.
- L'évaluation du potentiel allergène sur différentes espèces pose problème, et il n'y a pas d'évidence que l'action allergène observée chez le cochon d'Inde ou la souris permette de prédire les effets allergènes chez l'humain. (11)
- Les différences entre les "modèles" animaux et l'être humain, du point de vue du rôle joué par les divers composants des cellules épidermiques et immunitaires, sont importantes. Par ailleurs, la microstructure de l'épiderme de l'animal testé est très différente de celle de l'épiderme humain.
- Le seuil de réaction de l'organisme à une concentration donnée d'une substance à tester est étroitement lié à l'état de santé de l'animal, à l'état de ses défenses immunitaires, à son régime alimentaire et aux autres facteurs potentiellement irritants auxquels il peut se trouver exposé. Les prédispositions immunitaires, physiologiques et génétiques ont aussi une influence sur tous les paramètres de sensibilisation.

Stratégie alternative

Toutes les données existantes devraient être examinées avant que l'on n'entreprenne des tests. Il est probable que l'on puisse disposer notamment, dans les archives des services spécialisés des hôpitaux et autres centres de recherche, de résultats de tests sur l'être humain.

Procédure de tests par étapes pour l'allergie cutanée (sensibilisation)

- Etape 1 :** Certaines propriétés des molécules, comme par exemple leur faculté de se lier aux protéines, aident à prédire leur potentiel allergène cutané. C'est pourquoi on devrait contrôler les substances chimiques à l'aide de programmes quantitatifs sur ordinateur en termes de relation entre structure et activité ou à l'aide de systèmes tels que DEREK (Deductive Estimation of Risk from Existing Knowledge - Estimation déductive du risque en fonction du savoir actuel). Sur ces seules bases, il est possible de classer certaines substances selon leurs propriétés sensibilisantes. Pour les substances chimiques dont le test est négatif en termes de structure, on passe à l'étape 2.
- Etape 2 :** Pour qu'une substance chimique puisse provoquer une réaction allergique cutanée, il faut qu'elle pénètre la partie externe de l'épiderme. Ce phénomène est mis en évidence dans les études de pénétration de l'épiderme *in vitro* dans lesquelles on utilise des fragments d'épiderme fraîchement prélevés (il s'agit d'une méthode validée). On obtient également par cette méthode des informations sur le métabolisme de la substance dans la peau. On identifie ainsi les substances chimiques qui sans être allergènes par elles-mêmes se métabolisent en formes allergènes. Si la structure moléculaire de la substance chimique et/ou de son métabolite est propre à provoquer une sensibilisation et si la substance peut pénétrer l'épiderme, on peut la classer comme substance sensibilisante de l'épiderme sans trop de risque de se tromper (12). Une mise en évidence plus radicale est possible de la manière suivante :
- Etape 3 :** Pour qu'une substance chimique puisse provoquer une allergie cutanée, il faut qu'elle réagisse avec les protéines. Si une telle réaction ne se produit pas dans l'éprouvette avec l'albumine du sérum humain, il y a vraiment peu de chances qu'il s'agisse d'un allergène.
- Etape 4 :** Divers tests *in vitro* sur des cellules cibles permettent d'en savoir davantage si besoin est. On peut notamment utiliser des échantillons de peau humaine pour tester l'activation et le déplacement de cellules importantes, les cellules de Langerhans (13), ou recourir aux études de cellules dendritiques humaines *in vitro*.

Une substance chimique donnant un résultat positif lors de ces tests est de manière quasi certaine une substance sensibilisante, et inversement.

PERSPECTIVES

Action à mener en priorité

Les méthodes de test *in vitro* de l'étape 4 (utilisation des cellules de Langerhans pour étudier la sensibilisation de la peau et études de cellules dendritiques humaines en éprouvette) nécessitent encore un développement et une validation finale, et la Commission européenne devrait en faire une priorité.

Délai suggéré : tout cela pourrait être réalisé en l'espace de 5 ans.

TEST SUR L'ANIMAL Toxicité aiguë	
Animal:	rats en général
Nombre:	15 à 30 par substance testée, selon le protocole et le mode d'administration (oral, cutané ou par inhalation).
Objectif:	évaluer les effets toxiques sur l'ensemble de l'organisme d'une dose unique d'une substance chimique.
Test:	Les animaux sont gardés sur place pendant un minimum de cinq jours pour qu'ils s'acclimatent. La période d'observation est normalement de 14 jours, et en cas d'administration orale les animaux sont préalablement attachés. Tous les animaux sont autopsiés à la fin de la période de test. Toute réaction spécifique au sexe de l'animal est consignée.
Symptômes:	variations de la pression artérielle, perte de poids, salivation excessive, lésions internes des organes, perturbations respiratoires, convulsions, saignements des yeux, du nez ou de l'anus, érection du pelage, tremblements, diarrhée, coma, voire mort de l'animal.

Critique :

- Les critiques relatives aux tests de toxicité aiguë s'appliquent aussi aux tests de toxicité à doses répétées, et vice versa.
- L'état du système immunitaire et physiologique ainsi que le sexe, les caractéristiques génétiques et autres indicateurs de l'état de santé de l'animal exercent une influence sur les résultats du test. De même, le fait que l'animal ait pu être exposé à d'autres substances chimiques et les différents cas de figure génétiques des animaux dont on ignore l'ascendance sont autant de facteurs de variabilité des résultats.
- Il existe un certain nombre de différences significatives entre les espèces quant au rôle que jouent les organes dans l'élimination des toxines et quant à la localisation de leur accumulation. On peut observer des différences à propos du profil enzymatique P450 (dans le foie), et l'élimination des substances par les reins ne se fait pas de la même manière ni à la même vitesse ou au même degré chez les animaux testés que chez l'être humain (14).
- Les modes d'administration sont aussi une variable importante, et induisent de larges variations entre les espèces testées et même entre les laboratoires. Le temps nécessaire à l'organisme pour éliminer une substance donnée varie non seulement d'une espèce à une autre mais même d'une lignée à une autre au sein de la même espèce.
- On observe des variations dans le degré d'élimination des toxiques et dans le métabolisme chez différents animaux. Les voies d'élimination privilégiées par l'organisme et la manière dont évolue la substance à l'intérieur de l'organisme (les bio-transformations) varient considérablement (16, 17 & 18).
- La réaction avec les protéines dans le flux sanguin varie selon l'espèce utilisée ainsi que selon la lignée au sein d'une même espèce, les fortes doses aussi bien que les doses répétées donnent des résultats variables (19).
- On observe également de grandes différences avec le cas de l'être humain, où l'on peut voir des métabolites secondaires se former, être stockées puis éliminées par l'organisme, ce qui n'est pas neutre vis-à-vis du potentiel de toxicité.

TEST SUR L'ANIMAL		Toxicité à doses répétées
Animal:	rats en général ; les chiens peuvent également être utilisés lorsque l'on désire tester sur une seconde espèce.	
Nombre:	40 à 80 rats et/ou 32 chiens.	
Objectif:	évaluer les effets toxiques sur l'ensemble de l'organisme de l'administration répétée d'une dose d'une substance chimique inférieure à la dose létale.	
Test:	On administre régulièrement à l'animal une dose d'une substance chimique, sur une période allant de 28 à 90 jours. L'administration de la substance se fait généralement par voie orale, par gavage, mais elle peut également être faite par voie cutanée ou par inhalation. Ensuite, on tue les animaux pour un examen pathologique et biochimique des tissus. Il arrive que l'on traite un groupe "satellite" de 10 animaux avec la dose la plus forte pendant 28 jours. Cette procédure est censée permettre un point de comparaison pour mesurer les effets des doses plus faibles.	
Symptômes:	variations de la pression artérielle, salivation excessive, anémie, agressivité, faiblesse musculaire, perte de pilosité, lésions internes des organes, érection du pelage, vomissements (chez les chiens), tremblements, diarrhée, coma, et parfois mort de l'animal.	

Critique

- Les critiques relatives aux tests de toxicité à doses répétées s'appliquent aussi aux tests de toxicité aiguë, et vice versa.
- La vitesse du métabolisme et de l'élimination d'une substance donnée influe sur la manière dont les doses répétées provoquent une réaction. Ainsi, par exemple, chez certains animaux, mais pas chez d'autres, la substance chimique s'accumule dans l'organisme au cours du temps, ce qui provoque un effet d'intoxication plus prononcé et rend plus compliquée toute extrapolation à l'être humain. Le fait que la substance testée se mêle à divers organes et à divers types de cellules dans l'organisme entraîne des différences, d'une espèce à une autre, dans la diffusion et dans la concentration de la substance toxique au sein des organes internes. L'interprétation de l'effet des doses simples aussi bien que de celui des doses répétées en sera rendue plus problématique, de même que la nécessaire extrapolation à l'être humain.
- Dans les études sur l'exposition à long terme, l'évaluation finale pose de sérieux problèmes (15).
- La réaction avec les protéines dans le flux sanguin varie selon l'espèce utilisée ainsi que selon la lignée au sein d'une même espèce. Les fortes doses aussi bien que les doses répétées donnent des résultats variables (19).

Toxicité à dose aiguë et à doses répétées

Ces tests consistent à étudier les effets d'une substance chimique à partir du moment où elle pénètre et circule dans l'organisme. Il serait souhaitable de tenir compte des données déjà existantes obtenues sur les animaux et sur les humains (par exemple dans les archives des centres anti-poisons, des hôpitaux et des centres spécialisés dans les maladies professionnelles) et de les analyser avant d'envisager de nouveaux tests.

Un groupe de travail de l'ECVAM a publié un programme par étapes pour tester la toxicité aiguë essentiellement à partir de tests substitutifs (20). Ce programme comprend notamment une modélisation informatique bio-cinétique fondée sur la physiologie de l'absorption, de la diffusion et de l'élimination par l'organisme de la substance chimique, ce qui permet d'estimer pour chaque substance la dose probable de sécurité chez l'être humain, lorsqu'elle existe (21).

La propriété prédictive des tests sur des cultures de cellules pour la toxicité à doses répétées, ainsi que pour la toxicité à dose aiguë (dose simple), ne fait plus de doute (22).

Les quatre premières étapes du programme de l'ECVAM sont les suivantes :

Procédure de tests par étapes pour la toxicité à dose aiguë et à doses répétées

- Etape 1 :** Information d'ordre physique et chimique sur la substance (constante de dissociation, solubilité dans les graisses, volatilité).
Cela permettrait d'effectuer une comparaison avec les substances dont la toxicité est connue, et aussi de recourir aux techniques assistées par ordinateur pour la prédiction de l'admission et de la diffusion de la substance dans l'organisme.
- Etape 2 :** Des tests de base sur des cultures de cellules (cyto-toxicité) permettent d'identifier les substances chimiques qui sont toxiques pour la plupart des cellules par des procédés non spécifiques. [voir encadré 1 pour plus de détails sur le programme MEIC (23)]
Il serait alors possible de classer les substances chimiques hautement toxiques selon les résultats obtenus. Pour les substances chimiques ne se révélant pas toxiques pour les cellules d'une manière générale, on passerait à l'étape suivante.
- Etape 3 :** Intégration des données obtenues *in vitro*, y compris les résultats des études sur le métabolisme, aux simulations sur ordinateur de l'absorption, du métabolisme et de la diffusion dans l'organisme et de l'élimination. On obtiendrait comme résultat une prédiction de la concentration chimique probable et de la vitesse de passage dans les organes cibles.
Les substances chimiques toxiques ayant une forte probabilité de persister dans le flux sanguin sont classées à ce stade. On identifie également les organes cibles.
- Etape 4 :** A l'aide des informations obtenues à l'étape 3, des tests cellulaires plus pointus permettent d'identifier la toxicité chimique sélective vis-à-vis de tissus particuliers tels que tissus des reins, tissus neuronaux et cellules vasculaires ou tissus cardiaques.

Là encore, grâce au recours à la modélisation sur ordinateur, on peut classer les substances chimiques sur la base de ces tests. Toute substance chimique pour laquelle les résultats sont négatifs tout au long de la procédure a peu de chances de représenter un danger d'intoxication. Ces études permettent d'établir un "effet de non toxicité" et d'évaluer les doses toxiques.

PERSPECTIVES

Action à mener en priorité

La Commission européenne devrait donner la priorité à la validation du programme MEIC ou des méthodes similaires, surtout en ce qui concerne les tests à doses répétées. Les tests de l'étape 4 relatifs à la toxicité pour les tissus cibles devraient être validés en collaboration avec l'ECVAM.

Délai suggéré : 5 ans maximum.

Encadré 1 - Programme MEIC

Des scientifiques suédois ont lancé un programme sur sept ans, appelé Evaluation Multi-centre de toxicité cellulaire *in vitro* (programme MEIC), pour déterminer si des tests *in vitro* peuvent permettre de prédire la toxicité des substances chimiques sur les humains. Plusieurs dizaines de laboratoires dans le monde ont utilisé les mêmes substances chimiques de référence dans leurs tests *in vitro*, et les résultats ont été publiés dans une série d'articles (23).

Parmi 61 méthodes expérimentées, une méthode s'est révélée pratique, rentable et hautement prédictive pour la toxicité aiguë chez l'être humain (à travers les mesures des concentrations sanguines critiques obtenues à partir de cas d'empoisonnement aigu chez des humains) : il s'agit d'une combinaison de quatre tests sur des cultures de cellules humaines. *Les quatre tests in vitro ont permis de prédire ces résultats sur l'être humain mieux que les tests de dl 50 (dose létale 50%) sur les rats et les souris n'ont permis de prédire les doses létales chez les humains.*¹

Ces quatre tests *in vitro* sont les suivants :

- Variations du contenu protéique d'une lignée de cellules humaines
- Variations d'ATP dans une seconde lignée de cellules humaines
- Variations de la forme de la cellule, et
- Variations de pH dans une troisième lignée de cellules humaines

Les promoteurs du programme MEIC ont demandé une étude de validation formelle par l'ECVAM de cette sélection de quatre tests. En cas de succès, ces tests sur des cultures de cellules pourraient permettre d'évaluer rapidement et efficacement la toxicité aiguë des substances chimiques pour l'être humain, sans qu'il soit nécessaire de recourir à l'expérimentation animale.

Un groupe de travail de l'ECVAM a recommandé une stratégie de tests par étapes pour classer les substances chimiques selon leur toxicité aiguë. Cette stratégie combine des tests sur des cultures de cellules tels que ceux retenus par le programme MEIC avec des données physico-chimiques. Une seconde série de tests éventuelle, si elle est jugée nécessaire, consisterait à étudier en éprouvette le métabolisme des substances chimiques, à l'aide de cellules hépatiques. Une troisième étape comprendrait des études *in vitro* sur des cellules spécialisées. Selon les experts de l'ECVAM, une telle approche, 100% *in vitro*, permettrait de classer les substances chimiques selon leur toxicité (20). C'est l'ECVAM qui choisirait les meilleurs tests à effectuer pour la seconde et la troisième étapes.

Sur une telle base, il serait possible d'étudier et de classer rapidement et de manière rentable des milliers de substances chimiques existantes, du point de vue de la toxicité aiguë. Les substances pour lesquelles les tests prédiraient une toxicité élevée pourraient alors être mises sous contrôle ou éliminées en vertu du principe de précaution, en attendant une analyse plus complète lorsque des tests *in vitro* plus approfondis, le cas échéant, seront disponibles.

¹ Les concentrations sanguines létales et les doses létales ne sont pas identiques. Les tests *in vitro* et les tests sur les rongeurs prédisent des mesures légèrement différentes de la toxicité aiguë mais il s'agit dans les deux cas de mesures valides.

TEST SUR L'ANIMAL Propriétés mutagènes	
Animal:	rats, souris ou hamsters chinois.
Nombre:	au moins 40.
Objectif:	identifier d'éventuels effets mutagènes de la substance chimique, soit sur les cellules en division rapide de la moelle osseuse, soit sur les noyaux des cellules sanguines.
Test:	La substance à tester est administrée soit par voie orale soit par injection dans la cavité abdominale. Pour chaque substance testée et pour chaque dosage, on utilise deux groupes témoins. L'un des deux groupes ne reçoit aucun produit, l'autre reçoit un composé que l'on sait avoir un effet sur les gènes. On administre des doses simples ou multiples, et l'on prélève des échantillons de tissu jusqu'à 48 heures après l'administration de la dose.
Symptômes:	les animaux subissent une ou plusieurs injections dans la cavité abdominale, ce qui peut être douloureux. On cherche à aboutir finalement à des modifications au niveau des gènes.

TEST SUR L'ANIMAL Propriétés carcinogènes	
Animal:	rats ou souris très jeunes.
Nombre:	au moins 400.
Objectif:	détecter toute manifestation de cancer résultant de l'exposition à une substance chimique.
Test:	L'administration de la substance se pratique aussitôt que possible après l'acclimatation de l'animal. L'administration se fait habituellement par voie orale, mais elle peut aussi se faire par voie cutanée (on enduit l'épiderme) ou par inhalation. Le choix se fait selon le désir d'imiter la manière dont un être humain pourrait se trouver exposé à la substance. L'évaluation de la dose toxique minimale se fait en fonction du poids de l'animal, et la dose maximale est celle qui provoque une baisse du poids marginal sans induction de tumeur. L'effet de l'exposition à la substance est évalué par le biais d'une analyse de sang, de l'examen de l'apparence pathologique et des tissus et des organes, afin de détecter des changements liés à l'apparition de cancers. De tels tests peuvent coûter 2 millions de dollars par substance et durer cinq ans.
Symptômes:	tumeurs, léthargie, nausée et même mort de l'animal.

Critique

Les substances mutagènes sont celles qui provoquent des mutations génétiques. Les mutations constituent souvent une étape dans la formation des cancers. Dans un souci de simplification, nous critiquons en même temps, ci-après, les tests relatifs aux propriétés mutagènes et les tests relatifs aux propriétés carcinogènes. Bien que ce que subissent les animaux ne soit pas comparable entre ces deux types de tests, les critiques que l'on peut formuler sont les mêmes d'un point de vue scientifique, dans la mesure où les substances chimiques qui provoquent des mutations sont souvent celles qui provoquent des cancers.

- Il est maintenant admis que le cancer n'est pas une simple maladie. Les tumeurs, chez l'humain comme chez l'animal, surviennent en principe comme conséquence de divers événements, dont un seul peut être une simple exposition à une substance chimique - et ceci

n'est pas pris en compte dans les expérimentations effectuées sur les animaux pour établir les propriétés mutagènes ou carcinogènes.

- Les critiques faites aux tests de toxicité s'appliquent aussi pour une grande part aux tests des propriétés mutagènes, plus particulièrement en ce qui concerne l'état du système immunitaire de l'animal expérimenté et les inconnues qui pèsent sur son hérédité.
- A moins de connaître en détail la biochimie de la substance testée chez l'espèce utilisée et chez l'être humain, on ne sait pas clairement s'il y a ou non pénétration de la substance dans la moelle osseuse, ainsi des résultats négatifs peuvent-ils être observés et induire en erreur (24 & 25).
- Du fait des difficultés possibles de la substance testée à pénétrer dans la moelle osseuse, on recourt à des doses massives (en général la plus forte dose tolérée). Cela rend l'extrapolation à une autre espèce et à l'être humain douteuse en termes d'exposition probable.
- L'injection des substances à tester dans la cavité abdominale n'est pas un mode d'administration approprié lorsqu'il s'agit de simuler l'exposition à une série de substances chimiques. Combes a mis en évidence les divers problèmes que pose la mise en œuvre de ce test de propriétés mutagènes pour les cosmétiques (26).
- Pour bien des substances chimiques potentiellement mutagènes, la moelle osseuse a peu de chances d'être le tissu à cibler en priorité (26).
- La vitesse du métabolisme varie avec la taille de l'organisme. Les rats et les souris sont des espèces à métabolisme élevé par rapport à l'être humain (27).
- Un certain nombre de substances chimiques présentes dans l'organisme jouent le rôle d'"éboueurs" naturels. Elles éliminent toute molécule potentiellement dangereuse qui se présente ou qui est ingérée. La vitesse d'action de l'une d'entre elles, la glutathione, chez différents animaux, rend périlleuses les comparaisons des dommages cellulaires probables lorsque l'on veut évaluer une substance dangereuse du point de vue génétique (28).
- On sait que les dégâts génétiques aussi bien que la carcinogenèse sont en relation avec les effets d'une forme d'oxygène hautement active (29), et chez nombre d'animaux utilisés pour l'évaluation du potentiel carcinogène et mutagène, les mécanismes de réparation de l'ADN sont bien plus sommaires que chez l'être humain (30). Il n'est donc pas surprenant que les petits rongeurs soient plus enclins à développer des cancers que l'être humain (31), et les comparaisons deviennent de simples suppositions (14).
- Le régime alimentaire des humains n'est généralement pas limité, il est donc nettement plus riche en anti-oxydants naturels et synthétiques que celui des "modèles" animaux, il s'ensuit que les animaux de laboratoire sont beaucoup plus enclins à développer divers cancers (32).
- Au cours de leur existence, les humains sont exposés à un certain nombre de carcinogènes potentiels, à diverses doses et sous diverses combinaisons. En situation de test, au contraire, on administre à l'animal une substance unique, et la réaction toxicologique peut varier selon que celui-ci reçoit une dose simple ou multiple, même s'il s'agit toujours de la même substance chimique (33). C'est pourquoi il est pour le moins hasardeux de vouloir extrapoler les résultats à la situation complexe qui est celle des personnes dans leur vie quotidienne et professionnelle.
- L'état physiologique et immunitaire du "modèle" animal est déterminant par rapport au résultat de toute procédure de test. Des variations d'un animal à l'autre, en ce qui concerne le régime alimentaire, l'état diabétique, l'absorption de graisse, le traumatisme et le stress, ainsi que les conditions d'hébergement, se traduiront par des différences dans les résultats des tests (34).
- Il existe une série de différences entre l'être humain et les rongeurs, au niveau de la plupart des enzymes du foie qui métabolisent les produits administrés, comme le cytochrome P450s. Les conséquences ne sont pas neutres vis-à-vis du potentiel de carcinogenèse de diverses substances chimiques. Par ailleurs, les formes de P450s que l'on trouve chez l'être humain

sont liées au régime alimentaire, à la constitution génétique, à la consommation de tabac et d'alcool, ainsi qu'aux conditions d'exposition aux facteurs environnementaux (14).

- Les variations observées d'une espèce à une autre et d'une lignée à une autre, chez les rongeurs, indiquent que le cheminement de nombreuses substances chimiques nocives dans l'organisme n'est pas simple à appréhender. Mani et al (35) ont montré que les effets du benzène, potentiellement toxique et inducteur de tumeurs à faibles doses, varient considérablement entre différentes lignées endogames de souris appartenant à une espèce couramment utilisée dans les laboratoires. Chez le rat de Fischer, les résultats observés sont encore différents. Les différences de résultats se sont révélées dépendre des facultés métaboliques propres à chaque lignée et à chaque espèce. L'étude des amines hétérocycliques (une molécule organique carcinogène communément répandue, qui se forme au cours de divers procédés de cuisson) conduit aux mêmes conclusions. Turteltaub et al (36) ont découvert que ces amines provoquaient des dégâts génétiques chez les rongeurs, et davantage encore chez les humains exposés aux mêmes doses. Par ailleurs, ils ont relevé des différences substantielles entre l'humain et le rat dans les métabolites de l'administration d'amine. Ces auteurs ont conclu qu'au vu des résultats, les "modèles" rongeurs ne reflétaient pas de manière adéquate la réaction de l'être humain à l'exposition aux amines hétérocycliques (36). Dans leur étude publiée en 1999, Garner et al sont arrivés aux mêmes conclusions (37).
- L'organisme humain a tendance à stocker dans les tissus graisseux un certain nombre de substances chimiques solubles nocives, comme les polychlorobiphényles (PCB), la diffusion des toxines se produisant au cours du métabolisme. Chez le rat, l'organisme a recours à un procédé d'élimination des toxines tout à fait différent, qui consiste à stocker et à décomposer (enzymes de désaturation).
- On constate même des différences de résultats d'un laboratoire à un autre, dans des tests portant sur les mêmes substances chimiques, que l'on soupçonne d'être cancérigènes, et pratiqués sur les mêmes lignées de rongeurs.
- La réaction observée lors du test d'une substance peut varier selon le mode d'administration.
- Le potentiel d'une substance chimique quelconque à déclencher une tumeur varie aussi selon l'espèce. Chez le rat, on a montré que l'administration de saccharine provoquait le cancer de la vessie, et il apparaît qu'une protéine agissant dans une urine alcaline y serait pour quelque chose. Cette protéine n'existe pas chez l'être humain, et l'urine humaine est en principe acide (38).
- Lorsque l'on compare les réactions à ces tests chez le rongeur et chez l'être humain, le fait que l'on trouve des résultats positifs et négatifs faux complique les choses. Les tests sur les rongeurs aboutissent fréquemment à classer par erreur des substances chimiques comme carcinogènes, alors qu'elles ne le sont pas, et inversement.
- Les tests de propriétés carcinogènes, menés sur les animaux, sont coûteux à la fois en temps et en argent, et comme cela a été montré, ces inconvénients ne sont pas compensés par une fiabilité appréciable des résultats.
- On observe de nettes différences en fonction de l'âge, aussi bien à l'intérieur d'une espèce que d'une espèce à une autre, dans les réactions aux substances chimiques potentiellement carcinogènes ou mutagènes.
- Il a été montré que les restrictions alimentaires chez les jeunes souris retardent l'apparition des tumeurs en réaction à un test concernant une substance soupçonnée d'être carcinogène (39 & 40). La transposition de ce phénomène à l'être humain n'est pas évidente.
- Les effets de l'absorption d'une substance chimique, quelle qu'elle soit, sont très variés selon les espèces. Le caractère léthal est variable d'une lignée à une autre. Ainsi, par exemple, les taux d'absorption cutanée peuvent varier du simple au quintuple entre l'être humain et les autres espèces. La peau humaine est moins perméable que celle des rongeurs à bien des substances chimiques - de tels résultats, en termes d'absorption, aboutissent donc à surestimer

les risques de tumeurs (41). Des différences essentielles, observées dans les cas d'absorption avec la nourriture, peuvent être reliées à des différences significatives en termes d'anatomie du système gastro-intestinal entre les diverses espèces (42).

Stratégie alternative

Propriétés mutagènes

On estime à un cinquième la proportion des produits chimiques couramment répandus dans le commerce à présenter des propriétés mutagènes (43). Les mutations d'origine chimique peuvent entraîner des cancers ou des malformations congénitales.

Il existe plusieurs méthodes validées, autorisées et utilisées depuis plus de 20 ans en toxicologie, de façon officielle, permettant de tester *in vitro* les propriétés mutagènes. Ces méthodes figurent depuis longtemps dans les directives de tests de l'OCDE ainsi que dans l'annexe correspondante du côté de l'Union Européenne. Elles sont indiquées pour l'évaluation des substances chimiques simples comme pour celle des mélanges, et permettent également d'identifier les métabolites mutagènes.

L'agence américaine pour la protection de l'environnement accepte les données provenant de deux tests de toxicité génétique *in vitro*, sans tests *in vivo*, dans le cadre du programme américain de production chimique à grand volume (High Production Volume Chemical Challenge Program)(44).

Stratégie de tests par étapes pour les propriétés mutagènes

- Etape 1 :** Les relations structure/activité et les systèmes sur ordinateur tels que DEREK, COMPACT (Computer Optimised Molecular Parametric Analysis for Chemical Toxicity - Analyse paramétrique moléculaire de la toxicité chimique optimisée sur ordinateur) et TOPKAT (Toxicity Prediction by Computer-Assisted Technology - Prédiction de toxicité par technologie assistée par ordinateur) permettent d'identifier les substances potentiellement mutagènes.
- Etape 2 :** Les substances chimiques sont testées selon les trois méthodes *in vitro* normalisées et acceptées : le test d'Ames, les tests de mutation des cellules de mammifères et les tests d'aberration chromosomique, avec et sans activation métabolique.
Trois résultats positifs caractérisent les substances chimiques mutagènes et trois résultats négatifs indiquent l'absence de propriété mutagène. En cas de résultats contradictoires, on passe à l'étape 3.
- Etape 3 :** Les substances chimiques ayant donné des résultats contradictoires à l'étape 2 peuvent être soumises à des tests supplémentaires moyennant des modifications de la procédure ou le recours à d'autres méthodes (comme le test micronucléaire *in vitro*, actuellement en cours de validation au Japon, en Europe et aux Etats-Unis, ou bien la procédure COMET).
Le risque réel que représentent les substances chimiques identifiées lors de ces tests peut être estimé à l'aide de techniques de modélisation sur ordinateur (voir Encadré 2).

Une telle stratégie permet de déterminer si les substances chimiques comportent ou non des risques de provoquer des mutations.

PERSPECTIVES

Action à mener en priorité

La Commission européenne devrait obtenir un avis définitif de l'ECVAM concernant le meilleur choix des tests de l'étape 3. Le test micronucléaire *in vitro* est actuellement en cours de validation. La Commission européenne devrait faire de cela une priorité et mettre ce test en application dès sa validation.

Délai suggéré : 1 an.

Stratégie alternative

Propriétés carcinogènes

De nombreuses substances carcinogènes provoquent le cancer par le biais de mutations de l'ADN, et il est possible d'identifier tout d'abord ces mutations grâce à des tests *in vitro* officiellement acceptés (voir stratégie pour les propriétés mutagènes). Cependant, une fois éliminé les substances chimiques mutagènes, il existe d'autres effets de substances chimiques susceptibles d'aboutir à la formation de tumeurs, et c'est là que s'impose une stratégie de tests permettant d'identifier les propriétés carcinogènes.

Il serait souhaitable d'associer la modélisation sur ordinateur de l'absorption, de la diffusion et de l'élimination des substances dans l'organisme (voir Encadré 2) avec des études *in vitro* du métabolisme.

Stratégie de tests par étapes pour les propriétés carcinogènes

Etape 1 : Les propriétés fondamentales d'une substance chimique, parmi lesquelles le coefficient de division ou la constante de dissociation, ont un rapport direct avec la carcinogénèse. Mentionnons aussi les signaux structurels et les relations structure/activité entre les structures moléculaires et les propriétés carcinogènes. Le recours à la modélisation sur ordinateur et aux systèmes experts est ici très utile (voir Encadré 2).

Etape 2 : Les tests de transformation cellulaire tels que le SHE (Syrian hamster embryo - embryon de hamster de Syrie) (voir Encadré 3) ont été officiellement acceptés par l'agence internationale pour la recherche sur le cancer ainsi que par un groupe de travail de l'ECVAM.

Etape 3 : Les substances chimiques ayant donné des résultats contradictoires à l'étape 2 et aux tests concernant les propriétés mutagènes (voir plus haut) peuvent être soumises à des études complémentaires *in vitro*, comme par exemple le test de communication intercellulaire (48).

Une telle stratégie permet d'identifier les substances chimiques présentant un risque de carcinogénèse, ainsi que celles qui ne présentent pas de risque de provoquer des tumeurs.

PERSPECTIVES :

Action à mener en priorité

La Commission européenne devrait promouvoir et mettre en place une telle stratégie au nom du principe de précaution, à savoir que lorsque le risque de carcinogenèse est mis en évidence, la substance chimique concernée devrait faire l'objet d'un contrôle approprié ou être retirée de la circulation. Il serait souhaitable de donner la priorité à la validation finale et à l'acceptation du test de transformation cellulaire SHE de l'étape 2, ainsi qu'à la validation du test de communication intercellulaire si l'avis de l'ECVAM va dans ce sens.

Délai suggéré : 2 ans.

Encadré 2 - Modélisation sur ordinateur et systèmes experts

Il existe un certain nombre de logiciels permettant d'observer la structure d'une substance chimique, d'examiner ses propriétés et de les extrapoler pour en prédire le comportement dans l'organisme humain.

Les systèmes disponibles actuellement sont les suivants :

- DEREK (Deductive Estimation of Risk from Existing Knowledge - Estimation déductive du risque en fonction du savoir actuel)
- COMPACT (Computer Optimised Molecular Parametric Analysis for Chemical Toxicity - Analyse paramétrique moléculaire de la toxicité chimique optimisée sur ordinateur)
- TOPKAT (Toxicity Prediction by Computer-Assisted Technology - Prédiction de toxicité par technologie assistée par ordinateur)
- HazardExpert

TOPKAT a fait l'objet d'une utilisation récente par l'agence américaine pour la protection de l'environnement à propos des propriétés carcinogènes probables de substances chimiques destinées à la désinfection de l'eau (45).

COMPACT permet d'évaluer la probabilité qu'une substance chimique interagisse avec les enzymes du foie et évolue à travers le métabolisme vers une forme carcinogène (27).

HazardExpert est un logiciel qui reconnaît les structures carcinogènes dans les molécules des substances chimiques. En associant COMPACT et HazardExpert, on a pu identifier correctement 85 pour cent de 40 substances chimiques et médicaments, carcinogènes et non carcinogènes (27).

La modélisation bio-cinétique fondée sur la physiologie est particulièrement bien adaptée aux études de toxicité. Les modèles PBBK permettent de prédire l'absorption, le métabolisme, la diffusion dans l'organisme et l'élimination de la substance, au niveau de l'ensemble de l'organisme. On peut réaliser des prédictions d'après les données normalisées publiées sur les diverses parties de l'organisme en y associant l'information provenant des études cellulaires *in vitro*.

Encadré 3 - Le test de transformation SHE

Lorsque les cellules subissent une "transformation", elles deviennent cancéreuses. Ce test s'effectue sur des cellules d'embryon de hamster de Syrie en éprouvette et sa durée est de quelques jours. Soixante-quinze substances chimiques préalablement testées sur des rats et des souris ont été soumises au test SHE, afin de voir si ce test permettait de distinguer de faire le tri, de façon adéquate, entre les substances carcinogènes et les substances non carcinogènes. Les résultats furent semblables à ceux obtenus sur les rongeurs dans 83 pour cent des cas, ce qui représente une très bonne performance (46).

Une étude complémentaire a été menée sur 19 substances chimiques, à l'initiative de l'Institut international des sciences de la vie. Dans cette étude, publiée en 2001, le taux de concordance avec les résultats obtenus sur les rongeurs était de 89 pour cent.

Le test SHE a été proposé à l'OCDE, et des directives ont été tracées en 1996. Les choses n'ont cependant pas beaucoup avancé depuis. Pourtant, aux Etats-Unis, la Food and Drug Administration reconnaît déjà la validité des tests de transformation cellulaire dans la recherche pharmaceutique.

En 1999, un groupe de travail de l'ECVAM a publié un rapport sur les tests de transformation cellulaire pour la prédiction de la carcinogénèse (47). Selon ce rapport :

- Les tests de transformation ont été adoptés par la prestigieuse Agence internationale pour la recherche sur le cancer pour leur adéquation, du point de vue biologique, dans l'étude de la carcinogénèse, et en tant qu'approche cohérente pour la prédiction du potentiel carcinogène des substances chimiques.
- Le test de transformation SHE peut être hautement prédictif pour la carcinogénèse.
- En cas de résultat positif au test d'Ames et au test SHE, "il devrait être tenu pour acquis que la substance chimique considérée est carcinogène pour les rongeurs".
- On peut légitimement se demander pourquoi les instances officielles ont fait si peu de cas des tests de transformation cellulaire.
- Il serait souhaitable de donner dès à présent la priorité à une étude de validation de ces tests. Il faut que la meilleure méthode d'application de ces tests soit normalisée.

Le test SHE apparaît clairement comme particulièrement indiqué pour l'identification des substances chimiques inductrices de cancers. Une validation finale et une standardisation du protocole de test s'imposent, et un laps de temps de deux ans suffirait pour ce faire.

Associée à des tests de propriétés mutagènes *in vitro* selon une procédure déjà reconnue officiellement, la méthode de test SHE permettrait d'identifier rapidement les substances susceptibles d'être carcinogènes pour l'être humain, dans des délais qui se comptent en jours ou en semaines plutôt qu'en années. Par la même occasion, des milliers d'animaux seraient ainsi épargnés.

TEST SUR L'ANIMAL	Toxicité chronique
Animal:	rats (utilisation éventuelle des chiens comme seconde espèce).
Nombre:	160 rats (32 chiens).
Objectif:	évaluer les conséquences de l'administration d'une substance chimique sur le long terme et sur des périodes significatives de la durée de vie de l'animal.
Test:	L'administration de la substance se fait habituellement par voie orale ou par inhalation. L'étude dure au minimum douze mois, et jusqu'à deux ans.
Symptômes:	variations de la pression artérielle, perte d'appétit, agressivité, agitation, faiblesse musculaire, salivation excessive, lésions organiques internes, érection du pelage, vomissements (chiens), tremblements, diarrhées avec saignements, coma et parfois mort de l'animal.

Critique

- Voir la critique des tests de toxicité aiguë et à doses répétées (38). Là encore, l'état physiologique, l'état du système immunitaire et le régime alimentaire de l'espèce choisie jouent un rôle déterminant. De même, les prédispositions génétiques du "modèle" animal sont un facteur d'ambiguïté dans l'interprétation des résultats des

études à long terme, quel qu'en soit le domaine (49). Par ailleurs, la toxicité chronique se prête mal à une interprétation fiable et définitive.

- Lorsque l'on compare les effets à long terme d'une substance potentiellement toxique, comment assure-t-on les révisions à la hausse ? On sait que dans certains cas, les organismes sont plus sensibles pendant certaines périodes. Les effets toxiques se produisant en dehors de ces périodes sont donc susceptibles d'être sous-estimés.
- Les réactions de l'animal testé varient souvent selon son sexe, mais les conclusions à en tirer à propos de l'être humain ne sont pas toujours évidentes.
- La substance testée est susceptible de provoquer des dégâts au niveau des organes qui éliminent les toxines, comme le foie et les reins, ce qui peut alors rendre la substance encore plus toxique au cours du temps, surtout chez les espèces dont le foie ou les reins sont les plus vulnérables.
- L'histoire des expositions naturelles antérieures du sujet est un facteur crucial à considérer pour évaluer la dose toxique à long terme. Chez l'être humain, il est rare qu'un individu reçoive une dose unique ponctuelle, ou qu'il reçoive régulièrement une dose identique pendant une longue période. Par conséquent, l'extrapolation à partir d'une dose simple ou d'une dose multiple administrée à un animal est par trop simpliste.
- Le mode d'administration joue un rôle capital dans la détermination du degré de toxicité (voir plus haut). Si les substances testées sont administrées par voie orale à des animaux végétariens, il peut très bien se former des métabolites nocives que l'on ne retrouvera pas chez l'être humain (on peut citer comme exemple de cet artéfact celui des saignements intestinaux survenant chez le cochon d'Inde par suite de l'administration de pénicilline, qui ne surviennent qu'en raison des enzymes qui permettent au cochon d'Inde de digérer la cellulose : on n'observe pas ce phénomène chez les espèces qui ne sont pas végétariennes, comme l'être humain) (50).
- Le recours à des tests statistiques sérieux est crucial, et cependant absent dans bien des procédures de tests des effets d'une exposition chronique.
- Les protocoles de tests futurs intègrent trop rarement les résultats cliniques et à long terme déjà disponibles de l'utilisation humaine des substances.
- Pour qu'une extrapolation à l'humain est un sens, toute mesure des effets d'une exposition chronique ou aiguë à une substance testée devrait prendre en compte les effets secondaires qui sont parfois peu palpables. Pourtant, dans les tests portant sur l'effet des substances sur le cerveau, par exemple, on ne tient pas compte des incidences sur la fonction de mémorisation, les effets sensoriels et autres aspects cognitifs similaires (51).
- L'évaluation de l'impact des modes d'administration multiples est problématique. Chez l'être humain, les substances peuvent être inhalées, avalées ou absorbées sous forme de particules fines, ou absorbées par certains organes particuliers. De simples tests effectués sur un "modèle" animal ne permettent pas de représenter une telle complexité. Comme nous l'avons mentionné précédemment, la manière dont une substance testée sera éliminée ou neutralisée varie selon les espèces, et l'état de santé de l'animal influe de diverses manières sur le degré de fiabilité d'une extrapolation du risque pour l'être humain à partir des résultats du test.
- Les interactions chimiques entre la substance testée et le sujet expérimenté ne sont pas à négliger. Les substances chimiques dissoutes de diverses manières pourront avoir des effets très différents de ceux d'autres formes pourtant très proches.
- De nombreuses inconnues persistent à propos des effets toxiques pouvant se produire à différents stades de la croissance chez l'être humain, les enfants étant souvent bien plus vulnérables aux substances chimiques que les adultes. La prise en compte d'un facteur dix est censée garantir des seuils de sécurité, mais il n'est pas évident que l'on puisse véritablement exploiter de cette manière, et sans risque, des données acquises à travers l'expérimentation animale (52).

- Les substances chimiques testées peuvent avoir un effet sur les générations suivantes, comme ce fut le cas avec le Stilboestrol (une hormone sexuelle de synthèse). Ce produit est maintenant bien connu pour être potentiellement cancérigène, mais ce n'est pas toujours chez la génération recevant la substance que l'on observe de tels effets (49).

Stratégie alternative

Les méthodes *in vitro* permettant d'évaluer la toxicité chronique ne sont pas aussi développées que celles qui concernent la toxicité aiguë. Il est néanmoins essentiel, pour des raisons pratiques autant qu'éthiques, de tester la toxicité à long terme sans recourir à l'expérimentation animale. Les tests de toxicité chronique sur l'animal sont un processus très coûteux à la fois en argent et en temps (1 à 2 ans pendant lesquels du personnel est requis de manière intensive) permettant finalement d'obtenir des données dont l'interprétation et la transposition à l'être humain posent problème.

Stratégie de tests par étapes pour la toxicité chronique

Etape 1 : Recours au contrôle des relations structure/activité assisté par ordinateur, avec DEREK par exemple, pour prévoir la toxicité probable.

Etape 2 : Tests de toxicité cellulaire de base, avec exposition prolongée aux substances chimiques, pour identifier les substances présentant une toxicité cellulaire générale et non spécifique. L'utilisation des données se fait aussi à l'étape 3.
A ce stade, il est possible de classer les substances chimiques hautement toxiques.

Etape 3 : Intégration des données acquises *in vitro*, notamment celles des études métaboliques, dans des simulations sur ordinateur de l'absorption, de la diffusion et de l'élimination de la substance, comme le prévoit le projet de test de toxicité intégré ERGATT/CFN (21). On peut ainsi obtenir des prédictions de la concentration chimique et du délai d'élimination dans divers tissus de l'organisme, et identifier les tissus cibles probables pour chaque substance.
Il est possible, à ce stade, de classer les substances chimiques toxiques présentant des risques d'accumulation dans l'organisme.

Etape 4 : Des méthodes plus spécialisées, pour l'étude des effets à long terme (53), consistent à utiliser des cellules des tissus cibles identifiés à l'étape 3. Il peut s'agir des tissus des reins, du foie, du système nerveux ou du système vasculaire. Des "niveaux d'effets non observés" peuvent ainsi être définis pour les substances testées. Ainsi, par exemple, dans une étude récente (21), on a mesuré la toxicité de plusieurs substances chimiques sur des cultures de cellules nerveuses, pour une série de dosages, sur plus de 72 heures. On a pu ainsi caractériser des substances chimiques telles que le lindane, qui s'accumule dans les tissus cibles au cours du temps. Dans cette étape, comme à l'étape 3, l'absorption, le métabolisme, la diffusion et l'élimination sont analysées avec l'aide de l'ordinateur.

On peut ainsi identifier les substances chimiques toxiques pour les tissus cibles et quantifier les seuils de toxicité.

PERPECTIVES :

Action à mener en priorité

La Commission européenne devrait donner la priorité au développement des études de métabolisme *in vitro* et aux études de simulation sur ordinateur de l'étape 3 et des tests de tissus cibles de l'étape 4.

Délai suggéré : 5 ans maximum.

TEST SUR L'ANIMAL		Effet tératogène
Animal:	habituellement, rats ou lapins	
Nombre:	au moins 80 rates prégnantes ou 48 lapines prégnantes.	
Objectif:	voir si la substance testée, une fois ingérée, provoque des malformations chez l'embryon.	
Test:	On administre à la femelle prégnante, pendant la période de formation des organes de l'embryon, une dose graduée, diluée ou non. Trois niveaux de dosage sont définis, le niveau le plus élevé étant suffisant pour provoquer des symptômes mineurs chez la mère (par exemple la perte de poids). L'administration se fait en général par voie orale, et les embryons sont tués puis examinés pour détecter des variations anatomiques notables ou discrètes.	
Symptômes:	Les femelles sont nourries de force quotidiennement, tout au long de la gestation, par tube stomacal. Symptômes observables : prise de poids réduite, perte d'appétit, pertes nasales, érection des poils, chute des poils, diarrhées, déshydratation et parfois la mort. On ignore si les fœtus qui subissent des lésions du fait d'une substance chimique souffrent ou non.	

Critique

- Ces tests sont conçus pour identifier des effets notables. De ce fait, les effets plus discrets et autres légers indices des dégâts pouvant être provoqués par une substance risquent fort de passer inaperçus.
- Mener des études sur l'exposition à long terme, pour évaluer le risque que représenteraient diverses durées d'exposition chez l'être humain, coûte cher, en argent et en animaux.
- L'utilisation de lignées d'animaux endogames compromet la pertinence de la transposition aux situations humaines (54 & 55).
- Les durées de vie des diverses espèces utilisées sont différentes de celle de l'être humain. Par ailleurs, quel peut être le critère de comparaison le plus approprié pour transposer les doses, est-ce le poids total, le rapport entre le temps d'exposition et la durée de vie, ou bien un panachage des deux ?
- Il est difficile de prédire l'estimation des dosages appropriés. Dans le cas de la Thalidomide (56), le seuil de sensibilité, dans le dosage, varie selon les espèces.
- De nombreuses substances se révèlent tératogènes chez les animaux mais pas chez les humains (pour autant qu'on puisse en juger). L'aspirine provoque des malformations embryonnaires chez le rat, la souris, le cochon d'Inde, le chien, le chat et le singe, alors que cela ne semble pas être le cas chez l'humain même avec de fortes doses prolongées (56).
- La structure et la fonction du placenta présentent d'importantes différences d'une espèce de mammifère à une autre. Le temps de pénétration des substances à travers le placenta est variable, et chez certaines espèces il n'y a pas de pénétration du tout. Là encore, on peut observer des différences en ce qui concerne les protéines porteuses et donc la transmission des substances testées à l'embryon en cours de développement.
- Les effets protecteurs de diverses substances chimiques naturelles ou de synthèse jouent aussi un rôle dans la facilité avec laquelle les éléments tératogènes peuvent affecter le développement fœtal et embryonnaire. Ainsi, par exemple, l'organisme peut réagir de différentes manières à l'acide rétinoïque, et la toxicité de celui-ci peut être notable ou non, selon le cas (57).

Stratégie alternative

Les tests portant sur les propriétés tératogènes ont pour objectif d'identifier les substances chimiques qui provoquent des malformations et autres dégâts chez les embryons durant la grossesse. Les méthodes de test généralement utilisées constituent un gaspillage de ressources humaines et financières.

Deux méthodes de test substitutives (le test sur cellules de queue d'embryon et le test de micro-masse) sont actuellement au stade de la validation finale par l'ECVAM, et des résultats positifs sont imminents.

Stratégie de tests par étapes pour les propriétés tératogènes

Etape 1 : Des logiciels tels que DEREK et TOPKAT permettent de contrôler les structures moléculaires des substances chimiques pour déceler d'éventuelles propriétés tératogènes. L'agence américaine pour la protection de l'environnement a récemment utilisé TOPKAT pour rechercher dans des produits chimiques destinés à désinfecter l'eau des effets sur le développement de l'embryon (45). Il est alors possible de diriger les substances chimiques structurellement suspectes vers les tests de l'étape 2.

Etape 2 : Le test sur cellules de queue d'embryon (EST), le test de micro-masse et le test sur l'embryon entier de rat après implantation permettent tous trois de déceler les effets tératogènes (voir Encadré 4).

On applique alors la modélisation sur ordinateur de l'absorption, du métabolisme, de la diffusion et de l'élimination de la substance, au niveau de l'embryon, pour obtenir des données sur les dosages susceptibles d'affecter l'embryon.

On peut ainsi identifier les substances chimiques tératogènes pour les mettre sous contrôle.

PERPECTIVES

Action à mener en priorité

Cette stratégie devrait dès à présent être adoptée, dans la mesure où les études de validation finale du test sur les cellules de queue d'embryon et du test de micro-masse sont achevées. En même temps, toute normalisation éventuellement nécessaire des protocoles devrait être finalisée et traduite en termes de législation. La Commission européenne devrait favoriser le développement des techniques de modélisation sur ordinateur pour l'étape 2.

Délai suggéré : 2 ans maximum.

Encadré 4 - Tests concernant les propriétés tératogènes

Dans les tests concernant les propriétés tératogènes, on utilise au minimum 80 rates prégnantes ou 48 lapines prégnantes, et ces tests reviennent cher en termes d'argent et en termes de temps.

Entre 1999 et 2001, l'ECVAM a validé trois méthodes substitutives de tests. Deux de ces méthodes sont basées sur l'utilisation d'embryons de rats ou de tissus embryonnaires cultivés, et la troisième consiste à utiliser des cellules de queue d'embryon :

- le test sur cellules de queue d'embryon (EST)
- le test sur embryon entier de rat après implantation
- le test de micro-masse

La méthode EST est la méthode substitutive la plus récente. Les cellules de queue d'embryon survivent indéfiniment en culture, et peuvent engendrer des cellules spécialisées telles que les cellules du cœur, que l'on peut voir battre dans l'éprouvette.

Les substances chimiques susceptibles d'effets tératogènes empêchent ou limitent le développement des cellules de la queue de l'embryon en cellules spécialisées du cœur dans les cultures en éprouvette (58). Dans le test de micro-masse, contrairement au test sur embryon entier de rat après implantation, on utilise des cultures de cellules de limbe provenant d'embryons de rat.

Jusqu'à présent, l'étude de validation de l'ECVAM (58) a permis de découvrir que chacun de ces trois tests permet de classer les substances chimiques selon qu'elles sont ou non tératogènes avec une fiabilité de 79 à 84 pour cent, ce qui constitue un excellent résultat provisoire.

Ces trois méthodes substitutives sont très prometteuses pour la distinction entre substances tératogènes et non tératogènes, mais seule la méthode EST requiert l'utilisation de lignées de cellules sans nécessiter la fourniture d'embryons d'animaux. Cela signifie que la méthode EST pourrait être adaptée à des systèmes de contrôle automatiques sophistiqués.

Il semble hautement probable que l'étude menée par l'ECVAM débouche avant fin 2001 sur une alternative valable. Toute standardisation éventuellement requise des protocoles, ainsi que l'aval des instances officielles concernées, pourraient alors être obtenus en l'espace de deux ans.

TEST SUR L'ANIMAL		Toxicité reproductive	
Animal:	rats		
Nombre:	environ 100 femelles (80 prégnantes) et 40 mâles.		
Objectif:	identifier tout effet d'une substance chimique sur les facultés reproductrices des mâles et des femelles.		
Test:	On administre la substance aux animaux mâles et femelles, pendant leurs cycles de reproduction (formation et absorption de sperme chez le mâle, et durant deux cycles menstruels chez la femelle). On évalue les effets postérieurs à l'administration de la substance sur la fertilité, la gestation et le comportement maternel (nourrissage et nidification). On peut observer des effets de la substance sur les tissus reproductifs, sur le cerveau ou sur les systèmes sexuels secondaires.		
Symptômes:	Les animaux sont nourris de force quotidiennement par tube stomacal. Symptômes observables : prise de poids réduite, perte d'appétit, pertes nasales, érection des poils, chute des poils, diarrhées, déshydratation et parfois la mort.		

Critique

- Entre l'être humain et les espèces testées, les systèmes reproductifs et les cycles ne sont pas comparables.
- L'influence de l'état immunitaire et physiologique et du régime alimentaire sur l'interprétation des résultats des tests est problématique, comme nous l'avons vu dans les sections qui précèdent.
- La constitution génétique conditionne profondément la toxicité reproductive des substances chimiques, et l'on observe des variations notables chez les humains et chez les animaux.
- Des organes tels que les testicules et les ovaires ne réagissent pas aux substances testées de la même manière chez les humains que chez les autres espèces animales.
- Un grand nombre de critiques formulées à propos de la toxicité chronique sont également applicables ici.

Stratégie alternative

Plusieurs méthodes *in vitro* permettent d'étudier les mécanismes de la toxicité reproductive. Même si certaines techniques sont d'utilisation complexe, et n'ont pas encore fait l'objet d'une validation pour une utilisation officielle, il n'en est pas moins possible de proposer une stratégie permettant d'identifier les substances chimiques susceptibles d'affecter la fertilité, la fécondation et l'implantation ovarienne.

Stratégie de tests par étapes pour la toxicité reproductive

Etape 1 : Contrôle des propriétés physico-chimiques de la substance étudiée, pour voir si elle est structurellement suspecte, et recours aux résultats des tests cellulaires de base.

Etape 2 : Les tests de contrôle *in vitro* permettent d'évaluer les effets chimiques sur :

- la viabilité, la motilité, la morphologie et la biochimie du sperme humain
- les cellules de Sertoli en culture (cellules jouant un rôle déterminant dans le développement du sperme)
- les cellules des follicules ovariens en culture
- la production de testostérone par les cellules Leydig de rongeur *in vitro*

- les liens aux récepteurs cellulaires, par exemple pour les estrogènes et les androgènes.

Les résultats de ces tests peuvent être extrapolés à l'aide d'une modélisation sur ordinateur pour estimer les niveaux d'exposition de sécurité ou de toxicité. Il est alors possible d'identifier et de mettre sous contrôle les substances chimiques présentant des effets toxiques.

Etape 3 :

Il est possible d'effectuer des tests plus complexes sur les substances chimiques pour lesquelles les résultats obtenus ne sont pas assez clairs. Ainsi, par exemple, il est possible d'étudier la fertilisation *in vitro*, et de modéliser *in vitro* l'implantation de l'embryon à l'aide d'une lignée de cellules humaines cultivées conjointement avec des cellules d'endomètre sur un gel support (59).

PERSPECTIVES

Action à mener en priorité

Les tests de contrôle *in vitro* de l'étape 2 et les tests *in vitro* plus complexes de l'étape 3 mériteraient d'être davantage développés et validés.

Délai suggéré : 5 ans.

TEST SUR L'ANIMAL		Cinétique de la toxicité
Animal:	rongeurs et parfois chiens	
Nombre:	au moins 8 de chaque espèce.	
Objectif:	suivre l'évolution dans le temps des effets toxiques et répondre à des questions telles que celles-ci : La substance chimique passe-t-elle rapidement ou facilement de l'intestin ou de l'épiderme dans le sang ? Combien de temps reste-t-elle dans le sang ? Comment est-elle éliminée ? Est-elle métabolisée par le foie ou par d'autres organes pour donner une substance différente ? S'accumule-t-elle de façon sélective dans certains organes ?	
Test:	Les doses administrées peuvent être simples ou multiples. On utilise de jeunes animaux sains, qui se sont préalablement acclimatés aux conditions du laboratoire pendant au moins cinq jours avant que les tests ne commencent. On vérifie la dépendance ou l'indépendance de la réaction en fonction du sexe : la substance est ensuite administrée aux animaux du sexe le plus réactif. L'administration se fait par voie orale, respiratoire ou cutanée. L'animal est tué puis examiné pour évaluer l'accumulation de la substance testée dans les organes cibles présumés, à différentes dates suivant le début de l'administration. On étudie également les délais de métabolisme et d'élimination.	
Symptômes:	Les animaux sont isolés dans des cages, et certains d'entre eux ont des tuyaux implantés dans leurs canaux biliaires. Les effets toxiques observables sont la perte d'appétit, la léthargie, les pertes nasales, l'érection des poils, la chute des poils, ainsi que diarrhées, déshydratation et vomissements.	

Critique

- Voir les critiques concernant les tests de toxicité pour les espèces et les problèmes génétiques que pose toute interprétation des résultats. De même, les taux de désintoxication et d'élimination dépendent des espèces - et des lignées - et l'extrapolation d'une espèce à une autre pose de sérieux problèmes.
- Les liaisons protéiques dans le sang sont variables selon les espèces utilisées, et même selon les lignées à l'intérieur d'une même espèce. Les espèces réagissent de diverses manières aux dosages aigus aussi bien qu'aux dosages répétés (19).
- On observe également d'importantes différences entre les animaux testés et les humains en ce qui concerne la formation des métabolites secondaires, leur stockage et leur élimination de l'organisme. Tout cela conditionne la toxicité potentielle.
- Les différences observables d'une espèce à une autre et d'une lignée à une autre chez les rongeurs montrent que face à de nombreuses substances chimiques nocives, l'organisme réagit selon des voies complexes et variées. Mani et al (35) ont montré que différentes lignées d'une même espèce de souris couramment utilisée dans la recherche réagissent de manière totalement différente au benzène, un produit connu pour être potentiellement toxique et qui provoque des tumeurs à faible dose. La manière dont le rat de Fischer réagit au benzène est encore différente. Il s'est avéré que les réactions à ce produit variaient en fonction de la capacité métabolique de chaque lignée et de chaque espèce. On a abouti à des conclusions similaires en étudiant les amines hétérocycliques (une molécule organique carcinogène communément répandue, qui se forme au cours de divers procédés de cuisson des aliments).

Turteltaub et al (36) ont découvert que ces amines provoquaient des dégâts génétiques chez les rongeurs, et des dégâts plus graves encore chez les humains exposés aux mêmes doses. Par ailleurs, ils ont observé d'importantes différences entre l'humain et le rat en ce qui concerne les métabolites entraînées par l'administration des amines. Ils en ont conclu que selon les résultats observés, les "modèles" rongeurs ne reflètent pas de façon adéquate les réactions de l'être humain à l'exposition aux amines hétérocycliques (36). Dans une étude publiée en 1999, Garner et al sont arrivés aux mêmes conclusions (37).

Stratégie alternative

Les résultats des tests menés sur les animaux doivent être transformés en prédictions pour les humains, mais tous les paramètres concernés sont susceptibles de varier d'une espèce à une autre. L'approche alternative consiste à associer des études *in vitro*, réalisées de préférence sur des cellules humaines, avec des simulations sur ordinateur des organes et de leurs interactions dans l'organisme humain.

Ainsi, par exemple, pour étudier l'absorption d'une substance chimique, on utilise des cellules d'intestin humain en culture, ou bien, s'il s'agit d'absorption cutanée, des fragments isolés d'épiderme prélevés par biopsie. Le métabolisme lié aux enzymes du foie peut être étudié en éprouvette sur des cellules hépatiques isolées ou des prélèvements hépatiques. Les méthodes *in vitro* permettent aussi de montrer à quelles protéines ou à quels récepteurs cellulaires se lie la substance chimique. Les caractéristiques physiques et chimiques de la substance, telles que son degré de solubilité dans les graisses ou dans les liquides ou sa polarité, conditionnent certains de ses éventuels effets toxiques : elles peuvent être mesurées en éprouvette.

A partir de ces données moléculaires obtenues *in vitro*, il est possible de recourir à des modèles sur ordinateur (par exemple des modèles bio-cinétiques basés sur la physiologie) pour répondre aux questions que l'on peut se poser à propos de la cinétique de la toxicité. Les modèles sur ordinateur permettent d'estimer les variations des effets des substances chimiques en fonction de doses diverses et d'en tirer des règles effectives. Ces méthodes ne sont pas encore toutes entièrement validées, mais chacune bénéficie déjà d'une expérience de plusieurs années, et l'utilité de ces méthodes est déjà reconnue par les instances officielles et autres organismes. Les laboratoires pharmaceutiques recourent déjà de façon régulière à ce genre d'approche pour développer de nouveaux médicaments.

PERSPECTIVES

Action à mener en priorité

La Commission européenne devrait promouvoir la mise en place d'une telle stratégie, sur la base du principe de précaution. En d'autres termes, si de tels tests laissent sérieusement penser qu'une substance chimique a des effets sur la santé, il conviendrait de la mettre sous contrôle ou de la retirer de la circulation. Il serait souhaitable de donner la priorité à la validation des méthodes d'étude sur des cellules intestinales *in vitro*, ainsi qu'au développement des modèles sur ordinateur, afin de permettre d'étendre leur applicabilité aux tests chimiques.

Délai suggéré : 3 ans.

TEST SUR L'ANIMAL

Perturbations endocriniennes

Il n'existe pas encore, à ce jour, de procédures officielles de tests spécifiques aux perturbateurs endocriniens. De nouvelles méthodes de tests, aussi bien sur les animaux qu'*in vitro*, sont en cours de développement, mais aucune n'a encore été entièrement validée.

Critique

Une stratégie de tests par étapes constitue la meilleure approche pour tester les perturbations endocriniennes. Dans le modèle standard en cours de développement (aux Etats-Unis par exemple), la première étape de vérification comprend à la fois des tests *in vitro* et des tests sur les animaux. Cependant, aucun de ces tests n'étant encore validé, il serait sensé de s'intéresser en priorité aux méthodes en éprouvette, qui sont plus rapides et moins coûteuses à appliquer.

- La Royal Society, dans son rapport 2000, a reconnu que les tests sur l'animal ne peuvent permettre d'espérer appréhender l'effet de "cocktail chimique" : "L'utilisation des tests normalisés sur l'animal (tests de toxicité aiguë) pour l'évaluation de ces effets serait une tâche extrêmement complexe et serait susceptible de poser de nombreux problèmes" (60).
- La constitution génétique conditionne profondément la toxicité reproductive des substances chimiques, et les variations sont notables chez les humains comme chez les animaux.
- Des organes tels que les testicules et les ovaires ne réagissent pas aux substances testées de la même manière chez les humains que chez les autres espèces animales.

Stratégie alternative

Une fois qu'une substance chimique a déjà subi des tests pour évaluer ses propriétés mutagènes, carcinogènes et tératogènes et sa toxicité reproductive, on dispose d'un grand nombre de données permettant d'en savoir davantage en ce qui concerne les perturbations endocriniennes. L'intégration de ces données permettrait de disposer dans un certain nombre de cas d'une quantité d'informations suffisante pour qu'il soit inutile de procéder à des tests supplémentaires.

La stratégie proposée consisterait effectivement à inclure le programme de tests de toxicité reproductive défini précédemment.

Stratégie de tests par étapes pour les perturbations endocriniennes

Etape 1 : L'étude quantitative des relations structure/activité, assistée par l'analyse sur ordinateur, permet de classer les substances chimiques susceptibles d'interagir avec les récepteurs hormonaux.

Les résultats ainsi obtenus faciliteraient la définition des priorités pour les futurs tests de substances chimiques.

Etape 2 : Mesure des liaisons des récepteurs hormonaux à l'aide de systèmes sans cellules. L'agence américaine pour la protection de l'environnement effectue actuellement de telles mesures pour 500 substances chimiques, afin d'obtenir une base de données utilisable pour l'étude des perturbations endocriniennes. Une telle approche, qui utilise du matériel sophistiqué, permettrait d'évaluer très rapidement les substances chimiques. Celles qui provoquent une augmentation ou une diminution de l'expression des gènes décisifs pourraient aussi faire l'objet de tests *in vitro*.

Les substances chimiques donnant un résultat positif lors de ces tests feraient alors l'objet d'une mise sous contrôle appropriée, celles donnant un résultat négatif feraient l'objet d'un examen approfondi à l'étape 3.

Etape 3 : Il existe une méthode de test *in vitro* (le test MCF-7) qui se pratique sur des cellules cancéreuses du poumon humain en culture. En réaction aux estrogènes, les cellules modifient l'expression de leurs gènes et les échantillons de cellules normales se mettent à développer des nodules qui prolifèrent. Les substances chimiques anti-estrogéniques inhibent ce phénomène. Il est facile de compter les nodules et de mesurer ainsi le pouvoir de la substance. Cette méthode de test est actuellement en cours de validation.

PERSPECTIVES

Action à mener en priorité

En l'absence de toute méthode de test validée, de quelque nature qu'elle soit, en ce qui concerne le potentiel de perturbation endocrinienne, il serait souhaitable de donner la priorité à la définition et à la mise en œuvre d'une stratégie de tests substitutifs, en vertu du principe de précaution.

La Commission européenne devrait travailler en étroite collaboration avec l'agence américaine pour la protection de l'environnement et l'OCDE, en vue d'un développement prioritaire et coordonné et d'une validation des méthodes substitutives. La méthode de test *in vitro* MCF-7 est actuellement en cours de validation, et il serait souhaitable que la Commission européenne lui accorde la priorité.

Délai suggéré : Les tests, après validation, pourraient être terminés dans un délai maximum de 5 ans.