Diffusion Générale

MONOGRAPHIES SUR L'ENVIRONNEMENT

Cette série est destinée à permettre une plus large diffusion de certains rapports techniques préparés par le Comité et la Direction de l'Environnement de l'OCDE. Suite à une recommandation du Comité de l'Environnement, le présent rapport est mis en diffusion général par le Secrétaire général sous sa propre responsabilité. Des exemplaires supplémentaires de ces monographies peuvent être obtenus sur demande en nombre limité.

Cette monographie est également disponible en anglais.

ORGANISATION DE COOPERATION ET DE DEVELOPPEMENT ECONOMIQUES

Copyright OCDE 1990

AVANT-PROPOS PAR LE SECRETARIAT

L'OCDE se place au tout premier rang des organisations internationales pour la promotion de méthodes acceptables au plan international pour les essais de produits chimiques à des fins de réglementation. Les essais de toxicologie font l'objet d'une section importante dans les Lignes directrices de l'OCDE pour les essais. Ces essais, mis-à-part ceux qui visent la détermination du potentiel mutagène et dans lesquels sont utilisées des bactéries et des cultures de cellules, sont, pour la plupart, basés sur des procédures *in vivo* traditionnelles utilisant des mammifères comme animaux de laboratoire.

L'utilisation d'animaux de laboratoire dans l'évaluation des effets de toxicité donne lieu à des préoccupations d'ordre éthique. L'OCDE, par conséquent, doit réviser ses Lignes directrices pour les essais chaque fois que la possibilité est donnée de réduire le nombre et la souffrance des animaux soumis aux essais, et, le cas échéant, de remplacer les essais sur animaux par des méthodes in vitro.

Des essais in vitro pour évaluer des effets sur la santé sont pratiqués dans un grand nombre de laboratoires du monde entier. Avant que des méthodes prometteuses puissent être largement acceptées en remplacement des méthodes in vivo traditionnelles, elles doivent être validées. La validation constitue une étape primordiale dans le parcours d'une méthode, depuis son développement dans un seul laboratoire jusqu'à sa prise en compte dans les essais requis dans le cadre réglementaire. Le processus de validation suscite de nombreuses discussions entre scientifiques.

Les débats qui ont eu lieu au cours des réunions d'organes subsidiaires de l'OCDE ont fait apparaître l'utilité d'un document général sur les critères de validation des méthodes in vitro. Le Secrétariat a demandé au Professeur J. Frazier, Directeur associé du Center for Alternatives to Animal Testing à l'Université Johns Hopkins, de préparer ce rapport comme contribution aux débats sur les processus de validation. Les grandes lignes d'un modèle de validation exhaustif sont esquissées dans le présent rapport. Celui-ci est publié sous la responsabilité du Secrétaire général de l'OCDE.

Le point de vue exprimé dans ce rapport est celui de l'auteur et ne reflète pas nécessairement celui de l'OCDE ni celui des pays Membres.

CRITERES SCIENTIFIQUES DE VALIDATION D'ESSAIS IN VITRO

John M. Frazier, Ph.D.

Johns Hopkins University
School of Hygiene and Public Health
615 N. Wolfe Street
Baltimore, MD 21205

Document préparé

pour

l'Organisation de Coopération et de Développement Economiques

1990

DIRECTION DE L'ENVIRONNEMENT
ORGANISATION DE COOPERATION ET DE DEVELOPPEMENT ECONOMIQUES

TABLE DES MATIERES

		Page
I. Introduction	••••	6
 A. Application et nécessité d'essais de toxicité B. Essais de toxicité et évaluation des dangers C. Essais in vivo D. Essais in vitro 		
II. Aperçu du processus de validation	••••	24
III. Choix des essais pour la validation	••••	26
 A. But des essais et critères de sélection B. Considérations d'ordre scientifique C. Considérations d'ordre économique D. Considérations d'ordre logistique 		
IV. Choix des produits chimiques servant à la validation	••••	30
 A. Le but de l'étude de validation B. Données toxicologiques disponibles C. Eventail des degrés de toxicité D. Relations structure-activité E. Préparations F. Toxines sélectives 		
V. Classifications de substances servant de références dans la validation	••••	33
 A. Etalon premier : données toxicologiques humaines B. Etalon secondaire : données de laboratoire 		
VI. Problèmes techniques dans les études de validation	••••	34
 A. Facteurs à prendre en considération B. Matériaux d'essai incompatibles avec les milieux de culture 		
VII. Evaluation dans un laboratoire	****	36
 A. Procédures opératoires B. Etalonnage des systèmes d'essai C. Evaluation D. Activités d'assurance de la qualité 		

VIII. Comparaison entre laboratoires et elaboration d'une base de données sur les essais	••••	38
A. Vérification de la reproductibilité B. Elaboration d'une base de données sur les essais		
IX. Critères pour l'évaluation des essais	••••	39
 A. Conditions nécessaires et conditions suffisantes B. Corrélation avec la classification servant de référence C. Pouvoir de prédiction D. Fiabilité 		
X. Sélection d'une batterie d'essais	••••	48
A. Stratégie de sélection d'une batterie optimale B. Interpretation des données fournies par une batterie d'essais		
XI. Essais de toxicité in vitro et évaluation des effets sur la santé	••••	50
 A. Le processus d'extrapolation B. Utilisation à court terme des systèmes d'essais in vitro C. Schéma possible pour l'évaluation des dangers 		
XII. Etude de cas : les essais d'irritation des yeux	****	54
 A. Sélection d'essais à des fins de validation B. Sélection des substances pour la validation - Dépositaires d'échantillons C. Classification de référence pour la validation d'essais d'irritation des yeux D. Projets de validation en cours 		
XIII. Références bibliographiques	••••	61
ANNEXE : Echelles graduées et échelles quantifiées/Scores de Draize		68

I - INTRODUCTION

I.A. Application et nécessité d'essais de toxicité

En simplifiant beaucoup les choses, on peut considérer que tous les produits chimiques sont toxiques et que ce qui distingue un produit chimique dangereux d'un autre est la dose à partir de laquelle on constate des effets biologiques indésirables. Ainsi, la toxicité aigüe du chlorure de mercure, comparée à celle du chlorure de sodium en termes de leurs DL50 respectives, se ramène à la quantité qui lorsqu'elle est ingérée provoque la mort. Etant donnée la grande différence de sensibilité chez l'homme aux effets toxiques de ces deux produits chimiques, le chlorure de mercure est traité comme un produit chimique extrêmement toxique dont la distribution est soumise à une réglementation sévère, tandis que le chlorure de sodium, est un produit de consommation courante dont l'emballage ne comporte aucune mention de danger. L'appréciation de la toxicité de ces deux produits chimiques, comme d'ailleurs, de tous les produits chimiques, est basée à la fois sur leur toxicité intrinsèque et leurs conditions d'utilisation normales. C'est ainsi que malgré son potentiel de toxicité, le chlorure de sodium passe pour nontoxique.

Tout produit chimique nouveau mis sur le marché ou décelable dans l'eau potable, dans l'alimentation ou l'atmosphère, doit faire l'objet d'une classification quant à son niveau potentiel de toxicité et de réglementations au niveau de sa fabrication, sa distribution et des déchets qui le contiennent. Tel est l'objet de la toxicologie à des fins de réglementation, démarche essentielle à la protection de la santé de l'homme et de son environnement.

La plupart des substances soumises à évaluation entrent dans quatre catégories : (1) les produits chimiques existants qui n'ont jamais été évalués (2) les produits chimiques existants destinés à des applications nouvelles, (3) les produits chimiques nouveaux, et (4) les nouvelles formulations à base de produits chimiques existants et/ou nouveaux. La première catégorie représente une lacune considérable en matière de travaux de toxicologie qui doit être comblée.

La deuxième catégorie de substances soumises aux évaluations de toxicité concerne les produits chimiques existants mis sur le marché pour un usage nouveau. Si un produit chimique sous forme de pommade ne présente pas d'effets indésirables pour la peau, en sera-t-il de même s'il devient un ingrédient alimentaire? La décision de soumettre un tel produit à des essais de toxicité complémentaires dépend en partie du caractère exhaustif ou non des essais effectués lors de la première commercialisation du produit, et de l'existence ou non d'informations épidémiologiques préoccupantes sur la toxicité du produit chimique.

Naturellement tout produit chimique nouveau doit être soumis à des essais de toxicité. L'ampleur des essais à réaliser dépendra largement de l'utilisation projetée. S'il s'agit par exemple d'un médicament devant être prescrit pour des périodes prolongées, ou d'un additif alimentaire à usage multiple, une évaluation complète s'impose avant toute commercialisation. Par contre, s'il s'agit d'un nouveau dispersant industriel manipulé avec le maximum de précautions par des professionnels avertis et dans de bonnes conditions de sécurité, il n'y aura vraisemblablement pas besoin d'essais aussi poussés que dans le premier cas envisagé.

La quatrième catégorie de produits chimiques nécessitant une evaluation de toxicité sont les nouvelles formulations de produits chimiques, qu'elles soient des combinaisons de produits

existants, de produits nouveaux, ou de produits existants et nouveaux. Dans ce dernier cas, la question qui se pose est de savoir si des produits chimiques qui, pris isolément peuvent être considérés comme inoffensifs, produiront une toxicité accrue si on les mélange, en vertu d'interactions qui déclenchent des effets toxiques. Les effets toxiques dûs aux interactions de produits chimiques sont bien connus dans le cas des médicaments. Dans la mesure où la technologie moderne est capable de produire chaque année des milliers de substances chimiques et formulations nouvelles qui viennent s'ajouter à un nombre déjà important de produits chimiques existants, (qui pour la plupart n'ont jamais été soumis à des évaluations toxicologiques approfondies), les programmes d'essais toxicologiques nécessaires revêtent une ampleur considérable.

Les évaluations de toxicité dont ont besoin l'industrie et les autorités chargées de réglementation sont de plusieurs genres. Au premier rang, figurent les essais de dépistage. Ils forment une étape essentielle de la conception d'un nouveau produit industriel ainsi que de l'évaluation préliminaire de larges échantillons de matériaux, en vue de choisir ceux qui doivent recevoir la priorité dans les programmes d'évaluation à des fins réglementaires. En matière de présélection, on privilégie habituellement les méthodes rapides et peu coûteuses susceptibles de documenter la prise de décision. Les chefs d'entreprise qui doivent choisir parmi plusieurs produits chimiques les produits destinés à être commercialisés, engagent des sommes considérables et savent que comme pour toutes les prises de décision, plus les facteurs d'incertitude sont réduits et plus la prise de décision est pertinente. L'un des facteurs d'incertitude les plus préoccupants concerne les caractéristiques toxicologiques indésirables que pourraient présenter un produit, susceptibles d'en interdire ou d'en limiter la vente. Il est donc capital d'avoir des méthodes de dépistage de toxicité susceptibles de prédire la toxicité du produit fini. A ce stade du développement, et dans la mesure où le produit fini sera de toutes façons soumis à des évaluations toxicologiques approfondies avant de pouvoir être vendu, un décideur préférera la rapidité à la précision (beaucoup plus onéreuse). Plus grande sera la fiabilité de l'essai de dépistage et plus grande également sera son influence sur la prise de décision en matière de développement de produits.

Des essais de dépistage sont également utilisés pour évaluer de grands ensembles d'échantillons en vue d'établir des priorités pour des examens toxicologiques plus poussés. Le même phénomène se retrouve au niveau des pouvoirs publics responsables d'évaluer des échantillons d'eau, d'eaux usées, d'air, d'aliments, et de sols, pour détecter les agents toxiques. En raison du grand nombre d'échantillons à évaluer, il est fortement recommandé de sélectionner les échantillons pour choisir ceux qui sont le plus susceptibles de présenter des risques toxicologiques. Les industriels doivent également passer en revue un grand nombre d'échantillons lorsque l'effet toxique constitue l'activité pharmacologique recherchée, comme cela est le cas pour les médicaments antinéoplastiques, les antibiotiques, et les pesticides. Là aussi les considérations de rapidité et de coût seront déterminantes dans le choix des méthodes d'essai.

Une seconde application majeure des essais de toxicité concerne les évaluations des pouvoirs publics à des fins de protection. Aux USA, les essais de toxicité sont exigés par la Food and Drug Administration, l'Environmental Protection Agency, la Consumer Product Safety Commission, le Department of Transportation et la Occupational Safety and Health Administration. Les exigences en matière d'essais varient suivant le type de produit et d'utilisation projetée. Les évaluations sur lesquelles s'appuient les décisions doivent être absolument précises et fiables. Les possibilités d'erreur de classification d'un produit ou de non-détection d'un risque toxicologique doivent être réduites au minimum. Par conséquent, des essais de toxicité qui peuvent paraître plus

qu'adéquats dans le cadre d'une présélection, peuvent être totalement inacceptables à des fins de réglementation.

Enfin, il faut noter que même s'il n'y avait pas de réglementation en matière d'essais de toxicité, les seules considérations d'ordre éthique obligeraient à mettre en oeuvre les meilleures techniques d'essais de toxicité possibles pour empêcher la commercialisation de produits susceptibles de provoquer la mort ou des troubles sérieux chez l'homme ou détrimentaux pour la qualité de l'environnement. L'attention qu'accorde la presse aux procédures gagnées par des plaignants en matière de toxicité, reflète bien la volonté générale de faire assumer aux entreprises la responsabilité morale des dommages causés par leurs produits. Aussi longtemps que le système juridique permettra les recours en responsabilité contre les entreprises, l'industrie se verra obligée d'entreprendre des essais de toxicité mettant en oeuvre les techniques de pointe, car seules les techniques de pointe seront considérées par les tribunaux comme consituant une preuve de bonne foi.

Ces trois domaines, les essais de présélection, les décisions à des fins de réglementation, et la défense en cas de recours en responsabilité, représentent l'essentiel des raisons pour lesquelles on effectue des essais de toxicité.

I.B. Essais de toxicité et évaluation des dangers

Les procédures d'évaluation de toxicité de produits chimiques ont été élaborées au fil des années et continuent d'évoluer en fonction des progrès de la science de la toxicologie (Hayes, 1989). Le processus d'évaluation des dangers regroupe trois activités principales : identifier le danger, évaluer l'exposition, et déterminer la relation exposition- réponse (Figure I-1). L'identification des dangers toxicologiques permet de désigner les produits qui doivent être soumis à des examens approfondis, en raison des dangers qu'ils font courir au cours de leur fabrication, par suite de leur utilisation ou de leur présence dans les déchets. Ces risques se concrétiseront ou non en fonction d'un ensemble de facteurs qui doivent entrer en ligne de compte dans le processus d'évaluation des dangers. L'évaluation d'exposition fournit des indications quant au nombre de personnes qui peuvent se trouver exposées, les doses et la durée d'exposition ainsi ses conditions (voies d'exposition). Un produit chimique ne posera un danger sérieux que dans la mesure où l'homme risque d'y être exposé en quantité suffisante pour déclencher des effets biologiques indésirables. Il en résulte qu'une substance très toxique mais intervenant pendant une réaction chimique intermédiaire se produisant en système fermé dans un procédé industriel, peut poser un moindre risque qu'une substance infiniment moins toxique mais à laquelle une importante population se trouve régulièrement exposée.

Le second volet de l'évaluation des risques, la relation exposition- réponse, est un rapport quantitatif qui caractérise la probabilité d'une réponse adverse spécifique proportionnelle au degré d'exposition à un produit chimique. On peut en effet présumer qu'à chaque type d'effet indésirable (par exemple : cancer, dysfonctionnement rénal, effet sur la réproduction) correspond un rapport exposition/réponse précis. Ce rapport varie en fonction de nombreux facteurs qui influent sur la toxicité intrinsèque d'un produit chimique tels la voie d'exposition (ingestion, inhalation, contact dermique), et les caractéristiques de l'hôte (âge, condition nutritionnelle, terrain génétique, etc.). En combinant ces deux composantes fondamentales du processus d'évaluation de la toxicité que sont l'exposition et le rapport exposition/réponse, on obtient une évaluation quantitative du risque de toxicité pour l'homme d'un produit chimique donné dans des conditions d'utilisation précises.

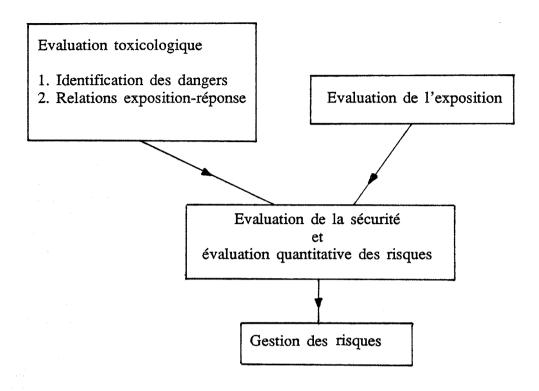


Figure I-1: Le processus d'évaluation des risques

Les données d'études toxicologiques sur animaux ou d'études épidémiologiques servent à identifier les dangers toxicologiques potentiels pour l'homme (identification des dangers). Lorsque les données suggèrent qu'il peut y avoir un problème, il faut procéder à une évaluation des niveaux d'exposition de populations spécifiques. La relation expositionréponse conduit à une estimation des risques d'effets adverses à ces niveaux d'exposition. Si des données épidémiologiques sur la relation exposition-réponse concernant le produit chimique en cours d'évaluation sont disponibles, celles-ci sont prises en compte. En l'absence de données expérimentales de toxicité suffisantes pour faire une estimation fiable des risques dus à un produit chimique donné, on a recours aux relations structureactivité. A l'aide de celles-ci on peut faire une estimation du niveau potentiel de l'effet toxique basée sur l'effet observé pour une substance déjà étudiée qui présente une structure similaire. Dans l'étape finale, on applique un facteur de sécurité au niveau d'exposition jugé non dangereux et ne déclenchant pas d'effets adverses. La grandeur de ce facteur dépendra de la fiabilité des données disponibles. Il sera d'autant plus grand qu'il y a peu de données disponibles. Le résultat de l'évaluation des risques est communiqué aux instances dont le rôle est de proposer des actions réglementaires de contrôle des risques.

Les essais de toxicité à des fins d'évaluation répondent à deux objectifs principaux : 1) déterminer quels peuvent être les effets indésirables d'un produit chimique donné (identification du type de toxicité), et 2) obtenir des informations adéquates pour définir le rapport exposition/réponse chez l'homme et d'autres organismes. La méthode traditionnellement employée pour atteindre ce double objectif était de procéder à des essais sur animaux entiers. Lorsque les travaux en matière de réglementation de la toxicité débutèrent dans les années 20, l'emploi d'animaux était un choix logique et représentait un bond en avant puisqu'il n'y avait pas d'autre moven de détecter les produits toxiques. Les premiers essais de toxicité se bornaient le plus souvent à des essais de toxicité aiguë. Le désormais classique essai DL50, qui fût conçu à l'origine pour étudier les effets de la digitaline et d'autres matériaux biologiques employés à des fins médicales, était une approche statistique permettant de définir la dose à partir de laquelle un produit chimique induit une mortalité de 50% dans une population donnée d'animaux. Plus tard, dans les années 40, les essais d'irritation sur les yeux, qui avaient déjà une longue histoire derrière eux, furent normalisés par le protocole de Draize (Draize, et al., 1944). Les méthodes d'application des produits chimiques dans les yeux des lapins furent normalisées, et une échelle numérique établie, permettant de graduer des effets oculaires spécifiques. Peu à peu, d'autres procédures in vivo pour évaluer différents effets toxiques indésirables furent mises au point. Un certain nombre de ces essais sont énumérés au Tableau I-1.

Les procédures d'essais citées au Tableau I-1 sont régies par des lignes directrices qui fixent la marche à suivre pour chaque catégorie d'essais (OCDE 1981). Dans le cas d'essais de toxicité aiguë (quand on recherche la DL50 par exemple), des animaux (habituellement des rats ou des souris) sont exposés individuellement à une dose forte et unique du produit chimique, pour voir si elle est mortelle et pour combien d'entre eux. Les essais de toxicité aiguë ne fournissent pas seulement des informations sur les doses mortelles (information particulièrement importante dans le cas d'expositions accidentelles), mais aussi quant aux symptômes qui sont en relation avec les effets toxiques. Ce dernier type d'information fournit des indices sur les mécanismes qui se déclenchent et sur les organes affectés.

Identifier la toxicité dans les organes-cibles est un des objectifs principaux des essais de toxicité subchronique. Des groupes d'animaux (des rongeurs et des chiens sont généralement choisis pour cette sorte d'essais) sont exposés à un produit chimique pendant une période pouvant aller jusqu'à 90 jours (essais prolongés). Les doses administrées sont inférieures aux doses employées dans les essais de toxicité aiguë afin que les animaux survivent pendant toute la durée de l'essai. On expérimente différentes doses et voies d'exposition (dans la nourriture, par inhalation, par application dermique) afin de recueillir des informations pertinentes selon les modes d'utilisation envisagés pour le produit chimique. A l'issue des essais, les animaux sont humainement tués et de nombreux tissus sont examinés afin de repérer les altérations pathologiques. On effectue des analyses de sang afin de relever soigneusement tout indice de toxicité. Ces essais ont pour but d'identifier quels sont les tissus affectés par une exposition prolongée au produit chimique à l'essai.

On n'a habituellement recours à des essais de toxicité chronique que lorsqu'on pense qu'un produit chimique risque d'être cancérigène ou si l'on sait que des populations sont susceptibles de se trouver au contact de ce produit chimique pendant des périodes prolongées. On pratique alors plusieurs séries d'essais sur deux espèces d'animaux (habituellement des souris et des chiens). Ces essais comprennent des essais de pathologie exhaustifs permettant de dépister les effet indésirables dans les tissus, et des essais sur la reproduction et de tératogénèse pour voir si la reproduction est affectée ou si l'on constate des effets tératogènes.

TABLEAU I-1 : Essais de toxicologie classique in vivo servant à l'évaluation d'effets toxiques

Toxicité aiguë (administration d'une dose unique - observations jusqu'à 14 jours)

Toxicité subchronique (doses répétées - observations jusqu'à 90 jours)

Toxicité chronique (doses répétées - observations jusqu'à deux ans)

Effets sur la reproduction

Effets sur le développement (tératogénèse)

Irritation des yeux et de la peau

Sensibilisation de la peau

Phototoxicité

Toxicocinétique

Neurotoxicité

Alors qu'on utilise des rongeurs et des chiens pour ces essais, c'est avec des lapins qu'on fait les essais d'irritation des yeux et de la peau (suivant les protocoles de Draize) pour déterminer si les produits chimiques concernés affectent la santé de ces tissus. Dans l'essai sur les yeux, on introduit une dose fixe (0.1 ml s'il s'agit d'un liquide et 0.1 g s'il s'agit d'un solide) dans l'oeil d'un lapin, l'autre oeil servant de témoin. L'effet produit dans les différents tissus de l'oeil inoculé est évalué par étapes de 24h, 48h et 72h (voir Appendice). On se sert aussi généralement de lapins pour les essais d'irritation de la peau. On rase le dos d'un lapin et le produit chimique à l'essai est appliqué directement sur la peau. On recouvre la zone ainsi traitée avec de la gaze et on évalue l'effet produit après 24, 48 et 72 heures ou plus si l'effet est de nature persistante. Dans le cas des essais sur les yeux et la peau, les systèmes de classification établis dans un but de réglementation comportent trois catégories : non irritant, irritant, et corrosif. Les essais d'hypersensibilisation sont une extension des essais sur la peau et ont pour but de déterminer si un produit chimique qui n'attaque pas directement l'épiderme peut déclencher une réaction immunologique du type de celle que produit le "poison ivy". On a recours à des essais de phototoxicité pour savoir si la lumière solaire peut activer un produit et le rendre irritant ou sensibilisant, même si le produit est inactif en l'absence d'une exposition au soleil. Les essais de phototoxicité sont particulièrement importants pour des produits à appliquer sur les parties du corps exposées au soleil (tels que les produits solaires).

Il arrive souvent qu'on observe des différences, d'une espèce à l'autre (entre les souris et les rats par exemple), dans l'absorption, le métabolisme, ou l'excrétion d'un produit chimique. Ces différences relèvent de la toxicocinétique. Les essais de toxicocinétique sont généralement réservés aux cas où les résultats d'essais sont difficiles à interpréter ou incohérents. Enfin, les essais sur le comportement servent à évaluer les effets neurotoxiques éventuels d'un produit chimique, qui sont soit des effets directs, soit des effets dus à une attaque du système nerveux au stade du

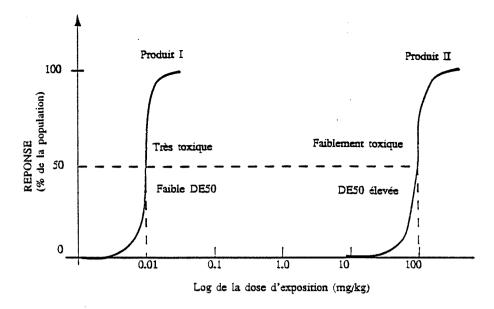
développement fétal. Dans ces essais, on expose des rates en gestation au produit chimique puis l'on observe le comportement des nouveaux-nés dès les premières étapes de leur croissance.

Il ressort clairement de la description succinte des différents types d'essais de produits chimiques in vivo qui précède, que l'évaluation toxicologique complète d'un produit chimique nouveau représente un investissement considérable en temps et en argent. On estime que l'ensemble des essais auquel on peut soumettre une substance chimique, y-compris une étude de cancérogénèse sur 2 ans, peut requérir plusieurs milliers d'animaux, coûter de 500.000 à 1.500.000 dollars et durer jusqu'à trois ans. Dans ces conditions on comprend pourquoi la plupart des produits chimiques auxquels nous sommes exposés n'ont jamais été soumis à des essais exhaustifs.

Par le passé, la seule source d'informations dont on disposait pour évaluer la toxicité provenait d'essais sur animaux, d'études d'épidémiologie humaine, et, le cas échéant, de données d'exposition humaine accidentelle. A l'heure actuelle, et grâce aux progrès réalisés en biotechnologie en matière de culture de cellules et de méthodes de bio-analyse, ont voit se dessiner des perspectives d'utilisation de méthodes d'essais de toxicité in vitro. Il est donc opportun de réévaluer les essais de toxicité traditionnels à la lumière des progrès accomplis dans différents domaines spécifiques de l'expérimentation in vitro. Mais avant d'examiner les progrès récents en matière d'essais in vitro, il convient de poser le fondement théorique de la toxicologie afin de saisir le contexte dans lequel s'inscrit la démarche scientifique de mise au point des méthodes d'essais in vitro.

Un élément important du processus d'évaluation de la toxicité que les essais de toxicité permettent de dégager est le rapport exposition/réponse (voir Figure I-2). Ce rapport fournit une estimation quantitative du pourcentage d'individus dans un groupe d'animaux qui présentent des effets biologiques spécifiques adverses à un niveau d'exposition donné. L'exposition qui induit un effet indésirable chez 50% des individus (la DE 50) est couramment utilisée par les toxicologues comme indication du degré de toxicité. Pour les substances hautement toxiques produisant un effet indésirable spécifique (ex : sur le foie), le niveau de 50% de réponse sera situé aux faibles expositions dans la partie gauche de la courbe de la figure I-2A (produit chimique I). Pour une substance relativement peu toxique la DE50 sera située à droite (produit chimique II). Dans le cas d'une ingestion de chlorure de mercure, la courbe ressemblerait à celle du produit chimique I, tandis que pour le chlorure de sodium, elle ressemblerait davantage à celle du produit chimique II. Notons que la seule DE50 n'est souvent pas suffisante pour connaître à fond le potentiel de toxicité d'un produit chimique. En effet, on peut trouver deux produits chimiques ayant des DE50 très différentes dont les courbes expostion-réponse se croisent aux doses faibles (figure I-2B). On est alors en présence d'une situation où le produit chimique le plus toxique en termes de DE50 est en réalité le moins toxique des deux substances aux niveaux d'exposition faibles. Donc aussi bien la position de la DE50 que la forme de la courbe exposition/réponse sont importantes pour la classification d'un produit chimique en termes de sa toxicité. Dans la mesure où l'on utilise des paramètres quantitatifs pour décrire le niveau DE50 et la courbe exposition/réponse dans les classifications de toxicité des produits chimiques, il est important de bien voir les mécanismes toxicologiques fondamentaux qui influent sur ces paramètres.

Pour se faire une idée de la valeur du rapport exposition/réponse, il importe de résumer les étapes fondamentales du processus toxicologique (voir figure I-3). On distingue deux branches principales de la toxicologie : la toxicocinétique et la toxicodynamique. La toxicocinétique décrit le cheminement d'un produit chimique à l'intérieur du système biologique, son absorption, sa distribution dans les tissus, son métabolisme (conversion chimique en dérivés généralement sous l'action des enzymes), sa fixation et son excrétion.



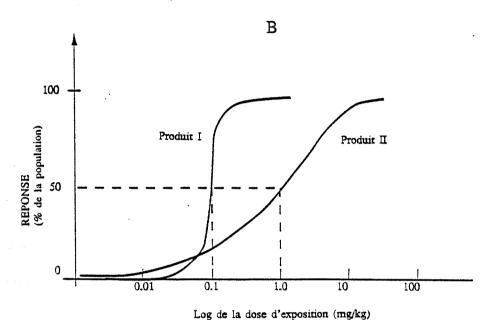


Figure I-2: Relation exposition - réponse

La relation exposition-réponse relie quantitativement le niveau d'exposition au pourcentage de la population exposée dans lequel s'exprime la réponse toxique. La dose mortelle se mesure à l'aide de la DL50 (l'exposition ou la dose qui provoque la mort de 50 % des animaux exposés). Si l'effet mesuré n'est pas l'effet létal (par exemple un effet hépatique) on utilise la DE50 qui est la dose effective produisant un effet dans 50 % de la population. La figure A illustre deux substances qui ont des courbes dose-réponse de forme similaire mais dont les DE50 sont très différentes. Dans la figure B, les deux substances ont des courbes dose-réponse très différentes et également des DE50 différentes. Dans ce dernier cas, on observe que le produit II est plus toxique que le produit I à faible dose tandis que l'inverse est vrai à forte dose. Lorsque de grandes populations peuvent être exposées il faut avoir une idée assez précise des niveaux d'exposition à prendre en compte pour un faible pourcentage de la population. Dans ce cas, la partie critique de la courbe dose-réponse se situe dans la région des faibles doses.

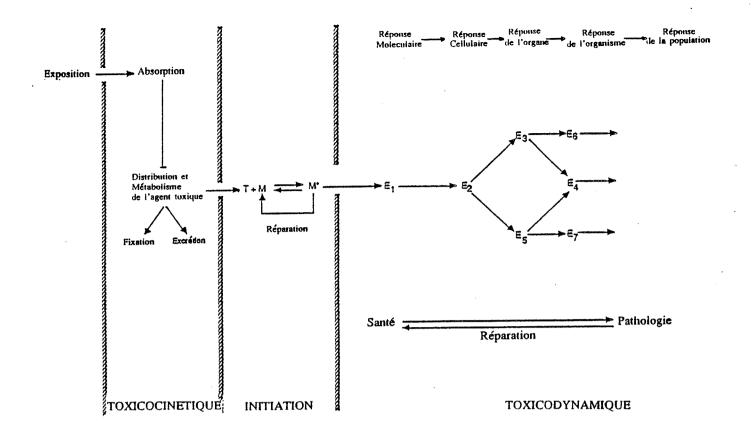


Figure I-3: Le processus toxique

Ce schéma illustre les différents processus qui conduisent à l'expression d'un effet adverse dans un organisme. Suite à l'exposition à une substance susceptible d'être absorbée par l'organisme, divers mécanismes biochimiques et physiologiques contrôlent sa distribution, son métabolisme, sa fixation et son excrétion. L'ensemble constitue la toxicocinétique. La quantité d'agent toxique actif (T) qui atteint la cible moléculaire du tissu sensible (M - une macromolécule dans la cellule) dépend de l'importance relative de ces mécanismes. L'intéraction de la substance ou de son métabolite actif avec la cible moléculaire provoque une altération moléculaire (M*) qui est à l'origine d'une cascade d'évènement (E) conduisant à l'expression de l'effet toxique. Initialement tout se passe au niveau des molécules mais petit à petit les niveaux supérieurs d'organisation biologique sont impliqués - cellules, organes, organismes et finalement populations. Cette cascade d'évènements constitue la toxicodynamique. Il existe des mécanismes de réparation qui peuvent intervenir à tous les niveaux d'organisation biologique. La toxicité qu'on observera finalement dépendra des vitesses relatives des processus toxiques et des processus de réparation.

La toxicodynamique décrit les altérations au sein du système biologique liées à la présence de la substance chimique. Au niveau de la molécule, ces altérations relèvent de la biochimie, comme par exemple l'inhibition d'enzymes qui interviennent dans les fonctions de la cellule, tandis qu'aux niveaux supérieurs de l'organisation biologique les altérations se manifestent sous forme de pathologie des tissus ou d'une toxicité clinique. S'agissant d'exposition humaine, les propriétés toxicocinétiques de l'agent détermineront si ce dernier ou l'un de ses métabolites atteindra ou non une cible moléculaire ou cellulaire déclenchant ainsi une réponse biologique. Si un produit chimique sous une forme active atteint une cible moléculaire (par exemple une macromolécule biologique avec laquelle l'agent entre en interaction), la question sera de savoir dans quelle mesure cette interaction entraînera une cascade d'évènements biochimiques ou physiologiques détrimentaux à la santé de l'individu (c'est-à-dire déclanchera une réponse toxicodynamique).

Un facteur biologique qui joue un rôle important dans les suites qu'un début d'effet toxique peut avoir et qui détermine s'il évoluera ou non vers une pathologie, est la faculté de réparation du système tant au niveau moléculaire et cellulaire que des tissus. Au niveau de la cellule, le processus de réparation peut être initié par des mécanismes qui réagissent aux altérations au sein de macromolécules, intervenant soit directement en réparant les dommages (comme les enzymes réparatrices de l'ADN), soit en éliminant la macromolécule atteinte suivant un processus de dégradation cellulaire. Au niveau des tissus, le processus de réparation consiste habituellement en une prolifération de cellules intactes qui viennent remplacer les cellules nécrotiques ou inhibées. La faculté du système à opérer des réparations à ces deux niveaux influera de manière considérable sur la courbe quantitative d'exposition/réponse.

Le rapport quantitatif d'exposition/réponse dépend de l'ensemble de ces processus : toxicocinétique, initiation, cascade des réponses biologiques et réparation. Ces processus sont très complexes et l'on ne saurait prédire cette relation en se basant sur des principes théoriques. La toxicologie moderne se fonde sur des données obtenues à partir d'essais sur animaux et les relations exposition/réponses obtenues sont extrapolées à l'homme et à d'autres organismes. L'approche in vivo a dans une large mesure donné de bons résultats et elle a contribué au bienêtre en assurant la protection de la santé. On ne peut par conséquent envisager de remplacer les méthodes in vivo sans s'assurer tout d'abord que les nouvelles méthodes sont susceptibles de générer des informations adéquates pour prévoir les réponses toxicologiques chez l'homme et établir des relations quantitatifs exposition/réponse fiables.

I.C. Essais in vivo

Avant d'aborder les essais in vitro, il convient de souligner les forces et les faiblesses des essais de toxicité in vivo sur animaux. Comme noté plus haut, le but des essais de toxicité est de générer des données c'est-à-dire d'aboutir à un profil toxicologique adéquat pour évaluer la toxicité des produits chimiques. Les essais in vivo présentent un certain nombre d'avantages qui ont établi leur valeur au fil des ans. En premier lieu, les systèmes d'essais basés sur des animaux intacts représentent des systèmes biologiques intégrés qui miment les complexités des modèles humains et d'autres modèles d'animaux. L'animal intact est en effet un ensemble de systèmes biochimiques et physiologiques en interaction et fonctionne comme un large filet dans lequel on peut capturer un grand nombre d'effets toxicologiques indésirables. Des fonctions biologiques intégrées hautement complexes, tels le comportement et les réponses immunologiques, peuvent être obervées simultanément pour évaluer d'éventuels effets indésirables. Avec l'animal intact on est donc en présence d'une sentinelle efficace sur un grand nombre de fronts. En deuxième lieu, grâce

à leur organisation physiologique et anatomique, les mammifères employés dans les essais sont un précieux instrument pour déterminer la question essentielle de savoir si la toxicité systémique dépend de la voie d'exposition (alimentaire, inhalation, cutanée) ainsi que pour jauger les niveaux d'exposition toxiques pour chacune des voies d'exposition. Un des domaines dans lesquels les essais in vivo sont particulièrement précieux est le domaine de la toxicité à long terme. Ils permettent de déterminer si un produit chimique administré à faible dose pendant une période prolongée (90 jours dans les essais subchroniques) présentera des aspects toxiques qui n'apparaissent pas dans les essais de toxicité aiguë (qui durent moins de 14 jours). Enfin, il existe des essais de toxicité sur animaux intacts qui permettent de savoir si un effet toxique spécifique est réversible ou pas. Les produits chimiques qui ont des effets irréversibles et permanents sont prioritaires sur ceux qui causent des dommages facilement réparés par le système biologique. Les essais de toxicité sur animaux intacts présentent donc de tels avantages que l'on peut penser qu'ils continueront à être utilisés. Toutefois, l'utilisation d'animaux intacts dans les essais de toxicité soulève des problèmes considérables qu'il importe de reconnaître.

Tout d'abord, l'utilisation d'animaux vivants, en particulier dans les essais de toxicité, pose des problèmes concernant le traitement que subissent ces animaux. La protection des animaux d'essai n'est pas un thème nouveau, mais l'opinion publique y a été fortement sensibilisée dans les années 80. D'autre part, des essais *in vivo* assez approfondis pour générer une base de donnée valable pour évaluer la toxicité coûtent beaucoup de temps et d'argent. Ainsi que nous l'avons noté plus haut, le coût d'un ensemble d'essais sur animaux intacts peut s'élever à 1.000.000 dollars et durer plusieurs années si on inclut des essais de cancérogénicité. La plupart des produits chimiques ne sont pas soumis à des essais approfondis pour des raisons financières. Un troisième problème posé par les essais *in vivo* concerne l'extrapolation des données toxicologiques obtenues à partir d'animaux à l'homme et aux autres organismes.

Dans les essais tels qu'on les mène traditionnellement, il faut extrapoler dans deux domaines afin d'évaluer la toxicité pour l'homme : extrapolation inter-espèces et extrapolation forte dose/faible dose. L'extrapolation inter-espèces répond au problème d'exploitation de données obtenues à partir d'animaux pour les appliquer à l'homme. Beaucoup de problèmes d'extrapolation inter-espèces relèvent de la toxicocinétique : le processus d'absorption d'un produit chimique par voie gastro-intestinale ou par la peau est-il le même chez les animaux que chez l'homme ? L'homme métabolise-t-il un produit chimique de la même façon que celle du modèle animal? Les processus d'excrétion sont-ils semblables ? Il a été élaboré un certain nombre de méthodes pour répondre à ces questions. L'une d'elle est la construction de modèles pharmacocinétiques à partir de données physiologiques (NRC, 1987). Cette technique exploite les connaissances en anatomie, physiologie et biochimie pour projeter la cinétique d'un produit chimique pour l'homme à partir de données recueillies à partir d'animaux. On rencontre aussi des problèmes d'extrapolation interespèces en raison des différences constatées au niveau toxicodynamique du processus toxicologique : les cibles moléculaires de l'homme sont-elles les mêmes que celles des animaux ? Les mécanismes de réparation chez l'homme sont-ils plus ou moins efficaces que chez les animaux ? Des lacunes dans les réponses à ces questions de toxicologie fondamentale nous plongent dans l'incertitude sur la quantification des risques toxiques pour l'homme suite à une exposition à des produits chimiques reconnus nocifs pour les animaux.

Un autre gros problème d'extrapolation concerne l'extrapolation forte dose/faible dose. Si un produit chimique nouveau cause des désordres nerveux chez un rat auquel on a administré une forte dose de produit en laboratoire par intubation gastrique (en introduisant le produit chimique dans l'estomac de l'animal), peut-on en conclure que le produit sera toxique pour l'homme s'il ingère une fraction seulement de la dose du même produit pendant une période prolongée (comme

dans le cas d'une contamination alimentaire). Pour trancher de telles questions il est essentiel de disposer d'informations détaillées sur les effets des différentes doses d'exposition sur l'absorption, la distribution, le métabolisme, l'excrétion, la vulnérabilité de l'organe cible, et les mécanismes de réparation. Là encore, on dispose d'un certain nombre de techniques, mais le degré d'incertitude vis-à-vis de ces prédictions est grand. Par ailleurs, si une information essentielle n'est pas disponible, la fiabilité des prédictions sur les réponses humaines est encore amoindrie considérablement. Les problèmes posés par l'obligation d'extrapoler les données obtenues à partir d'animaux à l'homme, à partir de doses fortes aux doses faibles, et à partir d'une voie d'exposition à une autre, sont malgré tout compensés par la chaîne de précédents historiques répertoriés tout au long des essais de toxicité, qui fait que des facteurs non quantifiables, comme l'expérience et le jugement humains jouent un rôle considérable pour l'évaluation des risques de toxicité. Dans la pratique, les choses étant ce qu'elles sont, la solution ultime pour parer aux incertitudes inhérentes aux différentes extrapolations consiste à inclure un facteur de sécurité dans l'estimation définitive du niveau d'exposition de l'homme jugé sans effet.

I.D. Essais in vitro

Au cours des années 80, les chercheurs se sont intéressés de plus en plus aux systèmes d'essais de toxicité *in vitro* (Goldberg et Frazier, 1989). Les techniques *in vitro* présentent en effet certains avantages. En premier lieu, ils sont de par leur nature susceptibles d'être plus rigoureusement normalisés que les essais *in vivo*. Il s'agit d'un avantage considérable car il permet de générer des informations dont la qualité est vérifiable. Il n'en est généralement pas de même pour les essais de toxicité *in vivo* en raison du coût prohibitif des contrôles tant positifs que négatifs des protocoles d'essai. Les essais *in vitro*, en revanche, se prêtent à de tels contrôles qui permettent ainsi de normaliser les essais individuellement. En deuxième lieu, les essais de toxicité *in vitro* sont habituellement plus rapides et moins chers : on peut pour le même prix effectuer un plus grand nombre d'essais de produits chimiques.

En outre, comme on l'a vu plus haut, les essais de toxicité in vivo posent un gros problème d'extrapolation des informations à l'homme et à d'autres organismes. Le problème des différences entre espèces ne se pose plus avec les essais in vitro, car on peut utiliser directement des cellulles de l'espèce concernée. Lorsqu'il s'agit d'évaluer la toxicité pour l'homme, on peut utiliser des cellules humaines dans les essais de toxicité in vitro. Un autre avantage est qu'on peut doser exactement la quantité de produit chimique apportée aux cellules, ce qui permet de déterminer avec précision les concentrations nocives de produit toxique. Par contre, in vivo, chez l'homme comme chez l'animal, il est souvent difficile de déterminer avec précision la dose de produit chimique présente dans les tissus affectés. Lorsque cette information est indispensable, on doit avoir recours à des analyses toxicocinétiques approfondies. Par ailleurs, on peut pratiquer des analyses in vitro sur des échantillons de cellules dans leur milieu naturel au contact direct du produit chimique et de ses métabolites. De plus il est possible d'effectuer des analyses à différents intervalles afin de suivre l'ordre chronologique des évènements et de déceler les mécanismes associés aux réponses pathologiques. Un avantage supplémentaire des systèmes d'essais in vitro est qu'ils nécéssitent de faibles quantités de substances d'essai. Ceci permet d'entreprendre des essais sur des composés qui sont au stade du développement et qui ne sont souvent disponibles qu'en quantités limitées. Enfin, les essais de toxicité in vitro ont l'avantage de réduire le nombre d'animaux requis pour les essais d'évaluation de toxicité, une amélioration que le public souhaite vivement. On trouvera un résumé de ces avantages au tableau I-2.

TABLEAU I-2: Avantages des systèmes in vitro

Utilisation de cellules humaines
Meilleur contrôle des conditions expérimentales
Elimination d'effets d'interactions systémiques
Exposition d'un grand nombre de cellules à chaque dose
Réduction des variables entre expériences
Possibilité de prendre des échantillons simultanés ou à intervalles répétés
Possibilité de concevoir des expériences complexes interactifs
Rapidité et moindre coût
Faibles quantités de substances d'essai
Peu de déchets toxiques
Réduction dans l'utilisation d'animaux

Pourquoi donc, compte tenu de tous les avantages qu'elles présentent, les méthodes in vitro n'ont-elles pas encore remplacé les méthodes in vivo? La raison principale en est que les méthodes d'essais de toxicité in vitro ne sont pas encore bien acceptées par la communauté scientifique ni au niveau des pouvoirs publics. Le concept des essais in vitro est nouveau dans tous les domaines sauf celui des essais de mutagenicité, tératogenicité et dépistage de cancérogénicité. Jusque vers 1980 seul un nombre très restreint d'essais de toxicité in vitro avaient fait l'objet d'examens approfondis par la communauté scientifique. On constate aujourd'hui des efforts importants dans ce domaine (Goldberg, 1983,1989, Brown, 1983; Purchase et Conning, 1986 : Balls et King, 1988). Cependant l'histoire des essais de toxicité in vitro n'en est qu'à ses débuts, et l'on ne dispose pas encore des informations nécessaires pour définir pleinement les limites de ces nouveaux systèmes. En particulier, on n'a pas encore défini quels ensembles d'essais in vitro fourniront des informations adéquates à des fins d'évaluation de toxicité. Dû à la complexité des modèles animaux intacts, il faudra recourir à une batterie d'essais in vitro. Sera-ttil nécessaire d'effectuer un essai in vitro pour chaque type de cellule cible possible dans l'organisme? Comment des essais in vitro permettront-ils d'évaluer des réponses toxicologiques qui font intervenir des interactions de processus variés (par exemple immunologiques, régulation de la tension artérielle). Les essais in vitro permettent-ils d'évaluer la toxicité chronique, qui est une transformation biologique échelonnée dans le temps, et pourront-ils juger du rétablissement après une agression toxique? Enfin, comment des doses de produits chimiques déterminées pour des cellules in vitro, pourront-elles être extrapolées aux situations d'exposition humaine par voie alimentaire, cutanée, ou par inhalation? Ce qui précède est un aperçu simplifié des questions d'ordre toxicologique qu'il faudra résoudre avant de pouvoir substituer les essais de toxicité in vivo par des essais in vitro.

Les systèmes d'essais de toxicité in vitro peuvent être inclus en principe aux niveaux suivants du processus d'évaluation de la toxicité : 1) la sélection, 2) les essais complémentaires, 3) les essais de remplacement. En matière de sélection, des méthodes d'essai in vitro rapides et peu onéreuses peuvent servir à effectuer des évaluations préliminaires de toxicité. Compte tenu de la nature provisoire du processus de sélection (des essais de toxicité définitifs seront menés ultérieurement), les critères de choix d'une méthode d'essai de sélection sont moins rigoureux que pour des essais plus approfondis. Comme complément d'information les données d'essais in vitro font partie intégrante de l'évaluation de toxicité. De la sorte, les informations obtenues grâce à des essais in vitro complètent celles dont on dispose déjà à partir d'essais in vivo. C'est ainsi que des données obtenues in vitro peuvent entrer dans le cadre d'un système d'essais séquentiels

permettant de réduire le nombre d'animaux requis pour effectuer une évaluation approfondie. Enfin, les protocoles d'essais *in vitro* pourront peut-être un jour remplacer quelques uns sinon l'ensemble des protocoles d'essais de toxicité *in vivo*, limitant ainsi l'utilisation d'animaux. Malgré les efforts enregistrés dans le sens de la mise en place de batteries d'essais de toxicité *in vitro* pour remplacer les essais *in vivo*, le stade d'évolution actuel des essais de toxicité *in vitro* ne permet pas encore d'envisager un tel remplacement. Paradoxalement, c'est cette obsession de vouloir remplacer les essais *in vivo* par des essais *in vitro* qui freine le développement potentiel des essais *in vitro*, développement qui s'inscrit dans le cadre d'essais de sélection et d'essais complémentaires.

Des obstacles d'ordre scientifique et technique doivent être franchis dans le développement d'essais et ces nouvelles méthodes sont souvent vues comme une direction future de la toxicologie. Les 20 dernières années ont vu de nombreux progrès en biotechnologie, et le toxicologue s'est forgé de nouveaux instruments. Les progrès en matière de culture de cellules permettent dans certaines conditions de réaliser la culture de cellules différenciées. Ce progrès est capital pour les essais de toxicité. De nouveaux instruments de bioanalyse tels la chromatographie en phase liquide à haute performance, ainsi que les essais basés sur les anticorps monoclonaux, permettent aujourd'hui d'effectuer des mesures impossibles à réaliser il y a seulement quelques années. La combinaison de nouvelles techniques de culture de cellules et de techniques d'analyse plus fines à des fins d'évaluation des effets toxicologiquement importants stimule la recherche d'approches nouvelles en matière d'essais de toxicité in vitro. D'autres facteurs jouent aussi en faveur des essais de toxicité in vitro notamment : 1) une meilleure connaissance des étapes initiales des processus toxicologiques et des mécanismes d'expression d'effets toxiques. Grâce à ces progrès, le toxicologue est en mesure d'interpréter les résultats des essais in vitro. Ainsi donc. bien que les méthodes in vitro ne sont pas encore suffisamment au point pour détrôner les essais de toxicité in vivo, les chercheurs s'intéressent de plus en plus activement à leur potentiel pour le futur.

A l'heure actuelle, la recherche sur les essais de toxicité *in vitro* porte sur les grands domaines suivants : 1) la cytotoxicité 2) l'irritation et l'inflammation 3) la génotoxicité, 4) la tératogénicité, 5) la toxicité dans des organes cibles, 6) la toxicocinétique et 7) les relations activité/structure. Cette liste n'est pas exhaustive mais tient compte des grandes orientations de la recherche sur les méthodes *in vitro*.

1. La Cytotoxicité

Tous les produits chimiques sont toxiques, la question est de savoir à partir de quelle dose ils commencent à produire leurs effets toxiques. Ce qui distingue un produit chimique dangereux d'un autre est sa capacité à produire des effets toxiques dans des conditions d'exposition associées à la vie de tous les jours (consommation d'aliments, de médicaments, activités professionelles, récréationelles ou domestiques, ou encore utilisation de produits d'hygiène ou cosmétiques). Les essais de cytotoxicité *in vitro* sont conçus de manière à déterminer si un produit chimique a le pouvoir intrinsèque de détruire des cellules.

De nombreux essais *in vitro* ont été mis au point au fil des années et possèdent déjà une longue histoire. Certains répondent à des besoins scientifiques spéciaux comme la sélection de médicaments chimiothérapeutiques qui détruisent les cellules cancéreuses. D'autres répondent à des applications d'ordre général. On peut évaluer la cytotoxicité pour tous les types de cellules cultivables *in vitro*. Les méthodes pour mesurer la quantité de cellules mortes se sont multipliées ces dernières années et il existe donc un éventail de méthodes pour évaluer le potentiel

cytotoxique d'un produit chimique. Les deux systèmes d'essais les plus largement utilisés sont la méthode FRAME (Foundation for the Replacement of Animals in Medical Experimentation), une organisation protectrice des animaux qui a son siège en Angleterre (Clothier, et al., 1988); et l'essai de coloration par le rouge neutre, mis au point par les chercheurs de la Rockefeller University et financé par Revlon (Borenfreund et Puerner, 1985).

La description suivante donne une idée de la façon dont ces essais fonctionnent. L'essai FRAME consiste à cultiver des cellules dans des récipients en plastique. On introduit différentes doses d'un produit chimique dans les milieux de culture et on cultive pendant 24 h les cellules exposées ainsi que les cellules de contrôle (qui n'ont pas été exposées au produit chimique). Après ce délai on élimine le produit chimique et on utilise un agent colorant qui réagit avec les protéines des cellules permettant d'analyser les cultures grâce à la quantité de produit coloré que l'on peut mesurer. Les récipients témoins contenant des cellules qui n'ont pas été affectées par le produit chimique sont de couleur bleu sombre en raison de la présence de nombreuses cellules intactes. Plus les doses de produit chimique sont élevées et moins intense est la coloration à cause de la mortalité croissante des cellules. Ce procédé permet de tracer une courbe d'exposition/réponse semblable à celle décrite pour les essais sur animaux intacts (voir figure I-2) et la dose pour laquelle on constate une réduction de 50% du contenu en protéines (CI50) est déterminée. On peut alors comparer cette valeur à la CI50 de toxines chimiques que l'on connaît déjà afin d'estimer la cytotoxicité relative d'un produit chimique nouveau.

Parmi les variantes de cet éssai on compte celles qui utilisent des préparations d'enzymes hépatiques (S9) qui métabolisent normalement les produits chimiques dans le foie et permettent de déterminer si la cytotoxicité du produit à l'essai dépend d'intermédiaires chimiquement réactifs qui sont métabolisés in vivo. Un des avantages d'essais comme ceux-ci est qu'ils se prêtent à être automatisés, ce qui permet de mettre à l'essai un grand nombre de produits chimiques pour un coût relativement faible. En général, la plupart des systèmes d'essais in vitro offrent ces mêmes avantages.

L'essai de toxicité basé sur le rouge neutre fonctionne de manière légèrement différente. Le principe de base de cet essai est que le rouge neutre est un colorant vital c'est-à-dire qu'il est absorbé et emmagasiné par les cellules vivantes dans les lysosomes. Là encore, on élève les cellules pendant 24h dans des récipients en plastique pour partie en présence du produit chimique et pour partie sans produit chimique. Au bout de la période d'exposition on élimine le produit chimique et on introduit un milieu contenant du rouge neutre. Après un temps d'incubation complémentaire de 3h, on enlève le rouge qui reste et on mesure la quantité qui a été absorbée. La quantité de rouge absorbée est proportionnelle au nombre de cellules vivantes. Les résultats sont exprimés quantitativement de façon analogue à la méthode FRAME et l'on peut classer la cytotoxicité relative du produit chimique à l'essai en comparant sa CI50 aux valeurs établies pour des produits chimiques toxiques connus.

On dispose actuellement d'un large éventail d'essais de ce type allant de méthodes relativement simples, comme celles décrites plus haut, à des essais très sophistiqués nécessitant des instruments d'analyse très coûteux. On recueille dans tous les cas des informations de base sur la toxicité cellulaire intrinsèque d'un produit chimique. Ces informations sont analogues à celles fournies par les essais in vivo de toxicité aiguë. Cependant, les essais de toxicité in vitro ne remplacent pas les essais de toxicité aiguë in vivo dans la mesure où un essai sur animaux intacts permet d'observer simultanément différentes réponses toxiques, alors que l'essai in vitro ne détectera que des toxines universelles capables de détruire tous types de cellules suivant un mécanisme commun (toxines telles que le cyanure qui bloque le métabolisme de l'énergie dans

toutes les cellules) et ne pourra révéler des effets spécifiques à certains tissus ou qui dépendent d'interactions spécifiques de cellule à cellule. Malgré leurs limites, les essais de cytotoxicité fournissent des informations toxicologiques essentielles sur la toxicité intrinsèque de produits chimiques, que ce soit à l'état pur, mélangé, ou dans des préparations.

2. L'irritation et l'inflammation

Dans ce domaine, la recherche concerne l'irritation des yeux et de la peau. Les essais in vivo de Draize existent depuis longtemps et l'on considère généralement qu'il est maintenant nécessaire de mettre au point de nouvelles méthodes d'évaluation des effets d'irritation des yeux. Des efforts de recherche considérables vont actuellement dans ce sens comme le montre une récente étude du Johns Hopkins Center for Alternatives to Animal Testing dans laquelle plus de 30 essais susceptibles de servir en matière d'irritation des yeux ont été identifiés (Frazier, et al., 1987). Ces derniers sont répertoriés suivant les effets toxiques qu'il permettent d'évaluer (cytotoxicité, inhibition des fonction cellulaires, libération de médiateurs inflammatoires). On trouvera à la section XII un tableau résumant les méthodes de remplacement des essais d'irritation des yeux. Une publication récente (Kennah, et al., 1989) démontre qu'aucun essai in vitro ne peut à lui seul prédire tous les effets d'irritation des yeux.

3. Les essais de génotoxicité

Cette catégorie comprend des méthodes de recherche appliquées à la mutagénèse et à la cancérogénèse. Un grand nombre de méthodes, notamment l'essai bactériel d'Ames pour évaluer les dommages génétiques causés par un produit chimique, ont été proposées ou sont en passe d'être mises au point. Ce domaine est probablement le plus dynamique et a bénéficié des meilleurs financements dans la mesure où les essais de cancérogénité sur animaux intacts sont extrêmement coûteux et de très longue haleine. La perspective d'économies importantes suscite un grand nombre de pressions sur les chercheurs pour qu'ils mettent au point des méthodes d'essais de toxicité in vitro en remplacement des essais in vivo. A l'heure actuelle, les essais de toxicité in vitro sont couramment utilisés au niveau du dépistage de génotoxicité éventuelle. Cependant pour des évaluations définitives dans un contexte de réglementation ceux-ci ne peuvent se substituer aux essais portant sur des cycles de vie entiers chez des rongeurs.

4. Les essais de tératogénicité

Les anomalies de croissance causées par des agents chimiques sont un autre domaine crucial de la toxicologie. Les malformations de naissance causées par la thalidomide sont un exemple frappant des dangers toxicologiques associés à des produits chimiques par ailleurs bénéfiques. La thalidomide représente une étape importante dans l'histoire des essais de toxicité puisqu'elle a mis en lumière les limites des essais de toxicité sur animaux intacts tels qu'on les pratiquait à l'époque. Grâce aux leçons apprises avec la thalidomide, les stratégies d'essais in vivo ont été modifiées pour éviter que de tels problèmes ne se reproduisent. Il convient de garder présent à l'esprit l'aspect évolutif des essais de toxicité pour juger des perspectives d'évolution des essais de toxicité in vitro : l'enrichissement des connaissances sur les mécanismes toxiques fondamentaux faciliteront la conception de modèles d'essais in vitro capables de les évaluer.

L'élément clé dans les essais de tératogénicité est de découvrir le rapport entre les indices de réponses toxicologiques relevés à partir d'essais in vitro et le processus complexe de toxicité différentielle qui se déroule dans l'organisme en développement (Kimmel *et al.*, 1982). Les systèmes d'essais qui ont été proposés couvrent un large éventail d'options allant des essais menés

sur des animaux d'ordre inférieur comme l'hydre et la drosophile, à des essais sur des cultures d'embryons intacts, en passant par des cultures de cellules embryonnaires de membres de rongeurs. Bien que prometteurs, ces systèmes d'essais présentent toujours d'importants problèmes d'extrapolation à la tératogénèse chez l'homme.

5. La toxicité dans des organes cibles

Contrairement aux essais de cytotoxicité générale, cette catégorie d'essais in vitro englobe tous les aspects de la toxicité spécifique à un organe donné. Dans les essais in vivo chroniques et subchroniques, les animaux sont continûment exposés à un produit chimique. Une fois l'essai arrivé à son terme, on examine tous les organes pour déceler les altérations pathologiques. Les études qui se basent sur ce principe permettent d'identifier des effets spécifiques dans des tissus spécifiques. Les recherches in vitro dans ce domaine concernent la culture de cellules prélevées dans des organes spécifiques afin d'évaluer la toxicité sélective qui pourrait se manifester au niveau d'organes précis. De plus, la recherche in vitro sert à élucider les mécanismes de toxicité de produits chimiques dans des organes cibles. Les essais in vitro connaissent un essor croissant (en particulier dans les essais préliminaires) en matière de toxicité cardiaque, rénale, hépatique, pulmonaire, et du système nerveux (Davenport, et al., 1989).

L'hépatotoxicité est un domaine riche en développements et illustre les progrès actuels en matière d'essais de toxicité d'organes cibles in vitro. Les méthodes utilisées dans les essais d'hépatotoxicité in vitro découlent de techniques expérimentales mises au point dans des recherches sur le foie à partir de cellules et tranches de foie, ainsi que de foies entiers sous perfusion. Les essais qui emploient des méthodes in vitro ont pour but d'identifier les produits chimiques qui ont des effets toxiques spécifiques pour le foie afin de définir le métabolisme cinétique et l'excrétion billiaire associés à ces produits. Les systèmes d'essais à partir d'hépatocytes isolés de rats (Rauckman et Padilla, 1987) permettent aussi de répérer des marqueurs cellulaires de toxicité potentielle tels que la prolifération de péroxisomes, phénomène qui semble lié aux mécanismes épigénétiques de formation du cancer, ou des réparations d'ADN non programmées, qui indiquent une altération de l'ADN.

Un des principaux avantages des techniques de toxicité in vitro en matière d'hépatotoxicité, est qu'on peut employer des cellules et des tranches de foie humains dans les essais de toxicité (Frazier, et al., 1989). Les progrès réalisés en matière de biotechnologie pour les cultures d'hépatocytes humains, dans la cryopréservation de tissu hépatique humain, et en matière d'ingénierie génétique, permettent de disposer d'une source permanente d'hépatocytes humains différenciés, et de réduire aussi bien les problèmes d'extrapolation inter-espèces des données d'essai que le nombre d'animaux requis pour fournir les cellules et tissus nécessaires aux essais de toxicité.

Les méthodes d'évaluation de toxicité pour d'autres organes évoluent parallèlement à celles décrites pour l'hépatotoxicité. De nouvelles méthodes d'essai sont constamment mises au point en fonction des progrès scientifiques dans le domaine des mécanismes toxiques propres à chaque système d'organe.

6. Les essais de toxicocinétique

La compréhension des phénomènes d'absorption, de distribution, de métabolisme, et d'excrétion des produits toxiques est cruciale pour l'évaluation de la toxicité. Il existe de nombreuses études sur la relation entre la toxicocinétique *in vitro* et la toxicocinétique *in vivo*.

Nous avons cependant un long chemin à parcourir avant de pouvoir déduire avec précision la toxicocinétique *in vivo* à partir de la toxicocinétique *in vitro*. Les modèles mathématiques tels que les modèles de pharmacocinétique basés sur la physiologie s'avèrent précieux en la matière (NRC, 1987). Dès que ces techniques seront pleinement établies, il devrait être possible d'établir une relation entre les rapports dose/réponse observés *in vitro* et les effets en cas d'exposition réelle de l'homme. Etant donné le rôle-clé que joue la toxicocinétique dans l'extrapolation des informations obtenues *in vitro* pour des applications *in vivo*, il convient de lui accorder la priorité pour les recherches futures.

7. Les relations structure/activité

Le but de l'étude des relations structure/activité est de prédire les effets toxicologiques d'un produit chimique à partir d'une analyse de sa structure moléculaire (ECETOC, 1986). Les activités dans ce domaine tendent à établir une corrélation entre des réponses générales de toxicité (mortalité, irritation des yeux, mutagénèse, cytotoxicité) et des paramètres chimiques déduits de la structure moléculaire d'un produit chimique. Ces méthodes sont encore extrêmement empiriques et la fiabilité des prédictions est donc difficile à estimer. Les relations structure/activité servent à l'heure actuelle au niveau des examens préliminaires de dépistage de toxicité. Lorsque seules des informations toxicologiques limitées sont disponibles, le rapport structure/activité revêt une importance particulière pour les besoins de la réglementation. Lorsque nos connaissances permettront d'établir le lien entre les mécanismes de l'action toxique et la structure chimique, ces techniques formeront un outil précieux puisqu'elles s'appuient sur des analyses par ordinateur de la structure physico-chimique des molécules.

Ces sept domaines ou catégories générales d'essais de toxicité *in vitro* font l'objet d'une multitude de recherches dans les laboratoires du monde entier. Il convient de souligner à nouveau qu'il n'existe aucun essai *in vitro* qui, à lui seul, puisse apporter des réponses à l'ensemble des questions toxicologiques. Comme on le constate clairement d'après l'ampleur des essais de toxicité *in vivo*, la toxicologie comprend de nombreuses branches dont chacune est caractérisée par des processus biochimiques et des mécanismes très différents. A l'heure actuelle, et vraisemblablement par le futur, aucun essai *in vitro* unique ne sera susceptible de permettre une évaluation couvrant l'éventail des effets toxicologiques. Dans le meilleur des cas, il faudra une batterie d'essais *in vitro* pour dégager les informations nécessaires à l'évaluation des risques pour l'homme liés à l'exposition à des produits toxiques.

Comme il ressort clairement des remarques qui précèdent, les essais in vitro sont une branche récente de la toxicologie. Son succès dépendra des progrès accomplis dans différentes autres branches et en matière de culture de cellules. Un des principaux buts des essais in vitro est d'utiliser des cellules humaines dans l'ensemble des systèmes d'essai afin d'éliminer les problèmes d'extrapolation. Pour y arriver plusieurs obstacles techniques sont à franchir. Tout d'abord, toutes les cellules humaines ne sont pas également susceptibles d'être élevées in vitro. Celles qui peuvent être cultivées perdent souvent en culture leur caractère différencié et prennent l'aspect de cellules plus primitives que les cellules normalement trouvées in situ. Des recherches sont actuellement en cours pour tenter de préserver les caractéristiques différenciées des cellules en culture mais un effort soutenu dans ce domaine reste indispensable. De plus, on ne dispose que de quantités limitées de cellules humaines pour les essais de toxicité in vitro. Il faudra mettre à contribution la biotechnologie et l'ingénierie génétique pour résoudre les problèmes de disponibilité de cellules humaines et en faire une ressource largement disponible. Des progrès en toxicologie sont nécessaires pour trouver quels sont les indices biologiques de toxicité qui sont susceptibles d'être mesurés in vitro. Plus nous ferons de découvertes en matière de mécanismes de toxicité et plus les

essais de toxicité in vitro pourront se développer. Enfin, les problèmes d'extrapolation in vitro/in vivo doivent être résolus. A priori, l'extrapolation à partir de cellules élevées in vitro pour déduire ce qui se produit dans l'organisme humain est un sujet épineux. Il est malgré tout permis d'espérer que si les efforts des chercheurs sont bien canalisés et encouragés, nous pourrons circonscrire les problèmes et établir des procédures d'extrapolation.

II. APERCU DU PROCESSUS DE VALIDATION

La validation est la démarche qui permet de juger si un essai proposé est ou non adéquat pour une fonction donnée. Ce processus se scinde en deux étapes bien distinctes qui sont la démonstration de la fiabilité de l'essai et la démonstration de son interprétabilité. Fiabilité signifie que n'importe quel laboratoire techniquement compétent appliquant le protocole d'essai obtiendra les mêmes résultats qu'un autre. Cette exigence doit être satisfaite pour différents laboratoires ainsi que pour des essais successifs dans un même laboratoire. Interprétabilité signifie qu'un essai peut étayer valablement une prise de décision scientifique. Naturellement, un essai qui donnera des résultats très fiables, et qui se tiennent, mais qu'on ne peut interpréter ne servira à rien dans le cadre d'une évaluation de toxicité. Inversement, un essai qu'on peut facilement interpréter (qui évalue des effets définis sur la base du mécanisme qui est à l'oeuvre) ne sera d'aucune utilité si différents laboratoires, ou un laboratoire à différents moments, obtiennent des résultats différents. Il en ressort que le processus de validation doit évaluer ces deux aspects pour tout essai nouveau, et ce, dans le contexte du but pour lequel il a été conçu.

Le processus global de validation d'une nouvelle méthode d'essai consiste en plusieurs étapes énumérées à la Figure II-1. Avant de choisir un programme de validation il est essentiel de définir l'objectif du travail de validation. On peut distinguer deux types d'objectifs. Le premier consiste à valider un essai qui doit servir comme remplacement d'une procédure d'essai in vivo. Les domaines où les remplacements sont le plus demandés sont la toxicité aiguë (protocole DL50) et l'irritation des yeux (protocole de Draize). Le but du processus de validation découle directement de l'essai in vivo qui est à remplacer. Comme mentionné aux sections ci-dessus le remplacement ne pourra intervenir que dans la mesure où l'on valide des batteries d'essais considérés comme un tout. Travailler sur des essais isolés est donc à exclure. Le deuxième type d'objectif consiste à valider des essais de toxicité in vitro isolés pour un effet toxicologique spécifique comme par exemple de valider un essai susceptible d'évaluer l'hépatotoxicité d'une série de produits chimiques. Dans ce cas, la stratégie et la conception de l'étude de validation seront différentes de celles du premier cas et un système d'essais unique pourra faire l'objet d'une validation.

Une fois défini l'objectif du travail de validation, on effectue une série de démarches préliminaires. Si le but poursuivi est de remplacer un essai *in vivo*, il sera essentiel de sélectionner un ensemble d'essais qui pourraient être appropriés pour le but recherché. Si, par contre, le but du travail de validation est de valider un essai spécifique répondant à un besoin toxicologique précis, on peut se concentrer sur un essai unique. Une fois choisi(s) l'essai (ou les essais) à valider, la seconde étape sera de sélectionner des produits chimiques adaptés pour les besoins du programme de validation, et ce, afin de découvrir quels en sont les résultats caractéristiques et dans quelles limites l'essai est efficace. De plus, il convient de mettre sur pied un mécanisme permettant d'effectuer l'étude de validation en aveugle, c'est-à-dire sans que le chercheur sache l'identité des produits chimiques soumis à essai. Le processus de validation proprement dit ne débute qu'une fois effectuées ces activités préliminaires.

ETUDE DE VALIDATION

Evaluation dans le premier laboratoire

L'essai permet-il de prédire la toxicité de substances connues lorsqu'il est utilisé dans le laboratoire du chercheur qui est à l'origine de l'essai ?

Evaluation entre laboratoires

D'autres laboratoires peuvent-ils reproduire les résultats obtenus dans le premier laboratoire ?

Elaboration d'une base de données

L'essai permet-il de faire des prédictions exactes concernant la toxicité d'un large évantail de substances d'essai ?

Sélection d'une batterie d'essais optimale

Parmi les différents systèmes possibles, lequel donne des données appropriées sur un effet toxique?

Quelle est la combinaison minimale d'essais avec laquelle on peut construire une base de données nécessaire et suffisante pour une évaluation exacte des risques?

Figure II-1: Etude de validation

La validation de nouveaux essais *in vitro* se compose d'une série d'étapes dans lesquelles sont recueillies les données nécessaires à l'évaluation du potentiel d'un nouvel éssai. Avant de commencer l'étude de validation, il faut définir un ensemble de substances d'essai pour lesquelles les données toxicologiques sont disponibles. Les résultats obtenus avec ces substances permettent d'évaluer la fiabilité du nouvel essai. La fiabilité repose sur la sensibilité (le taux de résultats positifs pour des agents toxiques connus) et la spécificité (le taux de résultats négatifs pour des substances non toxiques). Sur la base de ces données on peut ensuite définir le rôle d'un nouvel essai dans une batterie d'essais.

La validation à l'intérieur d'un laboratoire est la phase initiale de ces travaux. Cette activité est normalement conduite par le laboratoire qui met au point le nouvel essai de remplacement. Cette phase a pour but de définir le protocole d'essai et de démontrer la viabilité de l'essai proposé pour l'objectif poursuivi. Après la validation à l'intérieur d'un laboratoire, on procède à une étude de comparaison entre laboratoires. Cette phase consiste à transférer le protocole d'essai à plusieurs laboratoires afin d'en démontrer la robustesse. En plus, il importe qu'un grand nombre de produits chimiques soit mis à l'essai dans un ou plusieurs laboratoires afin d'obtenir une estimation précise du pourcentage de faux positifs et de faux négatifs. Cette phase peut être désignée par "élaboration de la base de données relatives à l'essai". Sur la base de ces informations il est possible de juger de manière scientifique la valeur d'essais de remplacement spécifiques, et ce, par rapport aux différents aspects de l'évaluation des dangers de toxicité. Lorsque le but recherché est de remplacer une procédure d'essais in vivo donnée, on se base sur les informations obtenues en soumettant à la validation un ensemble d'essais alternatifs afin de retenir la batterie optimale qui permettra de minimiser les risques d'erreur.

La section qui suit est une description plus détaillée de chaque étape du processus de validation. Cette partie de l'exposé cherche à identifier les problèmes-clé de toute validation d'essais de remplacement.

III. CHOIX DES ESSAIS POUR LA VALIDATION

III.A. But des essais et critères de sélection

La première étape dans tout projet de validation consiste à définir avec précision le but du projet. S'il s'agit de valider un essai spécifique avec un but précis à l'esprit, la question du choix d'un essai ne se pose pas. Par contre, s'il s'agit de mettre au point une batterie d'essais pour remplacer une procédure d'essai de toxicité *in vivo*, alors la sélection des essais est cruciale. La section qui suit traite d'un certain nombre de facteurs dont il convient de tenir compte dans la sélection des essais pour s'assurer du succès du programme de validation.

Comme on l'a vu à la section I.D., les types d'essais de toxicité *in vitro* entrent dans trois catégories : les essais de dépistage, de complément, et de remplacement. Dans la première catégorie, les informations issues des essais ne sont pas considérées comme définitives, et il n'est pas indispensable de connaître le mécanisme sur lequel l'essai est basé. Ainsi, si l'objet de l'étude est de valider un essai unique ou une série d'essais pour cerner un problème toxicologique, on peut choisir dans un large éventail d'essais. Par contre, si le but poursuivi est de valider un essai unique ou une batterie d'essais en vue de compléter ou de remplacer des protocoles *in vivo* existants à des fins de réglementation, il conviendra de ne sélectionner que des essais permettant d'obtenir des données qui peuvent être interprétées sur la base du mécanisme qui est à l'oeuvre. D'autres facteurs importants sont à prendre en considération lors de la sélection d'essais à des fins de validation, selon qu'il s'agit d'essais de dépistage d'une part, ou d'essais complémentaires ou de remplacement de l'autre. Chaque facteur de sélection d'essai étant traité individuellement ciaprès, cette distinction sera explicitée.

III.B. Considérations d'ordre scientifique

Afin de sélectionner des systèmes d'essais de toxicité in vitro pour un projet de validation, il importe de comprendre la nature fondamentale de la relation existant entre les

résultats obtenus et les effets qui sont à prévoir. On distingue deux principales philosophies en matière de production et d'utilisation d'informations d'essais dérivées de modèles afin de prédire la toxicité pour l'homme. La démarche corrélative consiste à construire des relations mathématiques empiriques entre des variables de systèmes-modèles et les effets de toxicité observables. La démarche mécanistique consiste à employer des systèmes-modèles pour déterminer de quelle manière se produit l'effet toxique d'un produit chimique, d'établir le rapport dose/réponse et d'extrapoler l'information obtenue dans le modèle à l'homme dans le but de faire une estimation du risque de toxicité à des conditions d'exposition données.

Dans la démarche corrélative, toute variable biologique ou chimique, mesurée en laboratoire ou calculée théoriquement, peut servir de point de départ à une corrélation empirique. La relation mécanistique entre la variable de prédiction et la manifestation toxicologique concernée n'est pas importante. Un rapport mathématique est dérivé empiriquement à partir d'un ensemble de composés de référence et les intervalles de confiance correspondant à ce rapport sont déterminés. On basera le jugement quant à la valeur de la corrélation en constatant l'exactitude de la corrélation entre la variable de prédiction et la manifestation toxicologique à déceler. Une bonne corrélation désigne ce rapport comme une bonne prédiction. Le défaut principal de cette approche est que les produits chimiques qui n'opèrent pas par les mécanismes présumés risquent de donner des corrélations différentes entre la variable de prédiction et la manifestation toxicologique. Ceci sera manifeste lorsqu'on inclut un grand nombre de produits chimiques dans le programme d'essais et que l'étude des courbes fait ressortir deux types de courbes différents (Figure III-1). Les limites inhérentes à cette approche sont particulièrement évidentes dans le cas d'un produit chimique totalement inconnu dont il faut prédire la toxicité. On obtient une certaine valeur pour la variable de prédiction (observée ou calculée) pour ce produit chimique. La question qui se pose alors est de savoir quel mécanisme, I ou II, est à l'oeuvre dans le cas de ce nouveau produit chimique. Les estimations de toxicité du produit chimique inconnu varieront considérablement suivant la corrélation choisie comme principe d'estimation. Une complication supplémentaire est que le produit chimique inconnu peut même produire ses effets suivant un troisième mécanisme totalement inconnu, et qu'aucune des estimations ne donnera de prédiction exacte. Cette incertitude fondamentale associée à la question de savoir si une substance tombe dans le domaine de validité de la corrélation établie signifie que l'on ne peut déterminer à priori la fiabilité de prédictions basées sur la méthode corrélative. De plus, avec cette approche on n'est pas en mesure d'identifier si la relation qui a été utilisée s'applique ou pas. Il en résulte que l'approche corrélative ne saurait servir de base à une évaluation de la toxicité d'un produit chimique à des fins de réglementation.

Ceci ne signifie pas que les informations obtenues par la méthode corrélative sont sans valeur. Elles peuvent être extrêmement utiles dans deux cas précis : 1) lorsqu'on ne dispose d'aucune autre information toxicologique et 2) lorsqu'on estime que les avantages l'emportent sur les inconvénients comme dans les essais de dépistage au stade embryonnaire de la mise au point d'un produit chimique. En raison du risque élevé de prédictions incorrectes, on peut craindre un fort pourcentage de faux négatifs et de faux positifs. Une prédiction négative fausse sera au détriment des fabricants qui auront dépensé des sommes importantes en recherche et développement d'un produit qui finit par se révéler toxique et non commercialisable. Les faux positifs ont un impact négatif sur la société puisqu'on aura écarté un produit potentiellement bénéfique. Tels sont les risques qu'un responsable doit considérer lors de l'utilisation d'évaluations de toxicité corrélatives.

Dans l'approche mécanistique plusieurs simplifications non vérifiables sont admises. Ainsi l'on croit que le modèle est capable d'exprimer l'effet pathologique, que la nature fondamentale du processus toxique est connue, que l'on peut évaluer les relations dose-réponse pour les

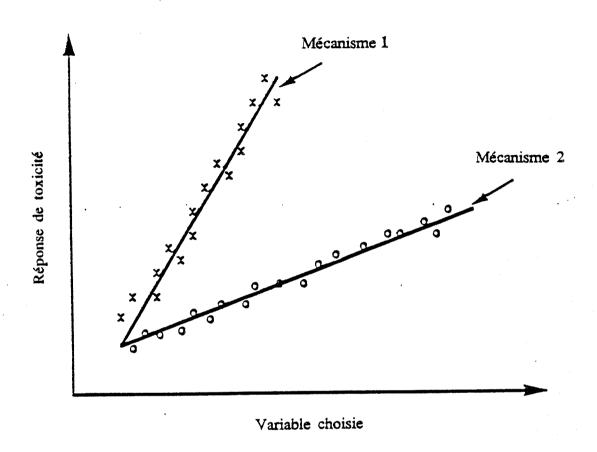


Figure III-1. Approche par corrélation

Dans l'approche par corrélation on établit la relation entre une variable (qui peut être mesurée dans un essai ou calculée à partir de la structure de la molécule) et la réponse de toxicité dans l'organisme concerné. Cette corrélation est établie pour un ensemble de substances dont les toxicités sont connues. Dans l'exemple hypothétique de la figure les substances appartiennent à deux groupes agissant chacun par un mécanisme différent et donnant deux relations différentes. S'il n'existe pas d'autres facteurs qui permettent d'associer une substance inconnue à l'un ou l'autre groupe, aucune prédiction de la toxicité de cette substance n'est possible. Il y a en effet deux résultats possibles pour chaque valeur de la variable choisie. Cela réduit considérablement la fiabilité des prédictions basées sur une approche par corrélation.