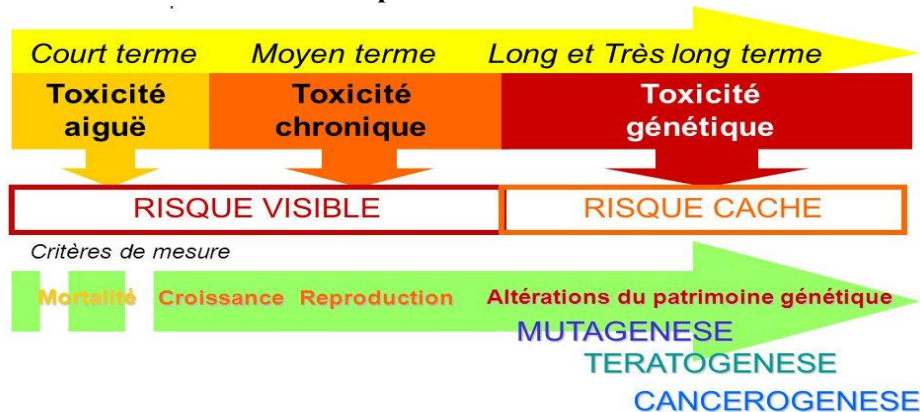


Université Akli Mohand Oulhadj de Bouira
Faculté SNV – Département de biologie – Master 02 Biochimie appliquée

TP 02 – Démarche de détermination du profil toxicologique d'une substance

Les types de toxicité dans l'échelle du temps :



1-Toxicité aiguë

-administration de dose unique de la substance, à deux espèces de mammifères de souches connues, à répartir en plusieurs groupes, en veillant à inclure les deux sexes.

-une dose est administrée par groupe d'animaux de laboratoire, en utilisant la même voie d'administration, en perspective d'utilisation, chez l'homme.

Afin d'évaluer la toxicité aiguë, il va falloir déterminer la dose létale 50 (DL_{50}), qui correspond à la dose du toxique (substance toxique) qui tue la moitié (50%) des individus, testés. De ce fait, des méthodes mathématiques (graphiques) sont utilisées dans le but de calculer (estimer) cette valeur, à travers une courbe dont l'équation, met en relation, les taux de mortalité des individus, en fonction des doses utilisées (gamme de dilutions à partir d'une solution mère préalablement préparée).

Généralement, le *taux de mortalité* = Nombre d'individus décédés suite à l'administration de la dose toxique / Nombre total d'individus testés), est déterminé au bout de 14 jours d'exposition à la substance. Pour avoir une bonne étude statistique, le nombre d'individus morts est déterminé, quotidiennement. De plus l'exposition à l'agent toxique peut être de plusieurs manières, en fonction de la nature physique du toxique et sa cible cellulaire : inhalation pulmonaire (gaz) ; administration orale (liquide, solide) voir contact épidermique.

Parmi les techniques utilisées pour la détermination de la DL_{50} , la technique graphique de Litchfield et Wilcoxon, s'avère la plus employée.

Principe à travers un exemple :

Dans le but de déterminer la toxicité aiguë d'une substance X de pesticide, des doses allant de 125mg/Kg de poids corporel (P.C) à 385mg/Kg P.C ont été injectées à des groupes d'animaux répartis en nombre de 10 individus par groupe, entre *rongeurs et non rongeurs* (**important**).

Après 14 jours, le taux de mortalité a été évalué, comme le montré le tableau suivant :

Doses du toxique	Lots	Nombre de morts sur le total	Taux de mortalité (%)	Taux moyen de mortalité (%)
125 mg/Kg P.C	1-Souris	1	10	10
	2-Rats	2	20	
	3-Lapins	0	0	
	4-Mélange (témoins négatif)	0	0	
180 mg/Kg P.C	1-Souris	3	30	26,7
	2-Rats	4	40	
	3-Lapins	1	10	
	4-Mélange (témoins négatif)	0	0	
250 mg/Kg P.C	1-Souris	6	60	46,67
	2-Rats	5	50	
	3-Lapins	3	30	
	4-Mélange (témoins négatif)	0	0	
385 mg/Kg P.C	1-Souris	9	90	76,67
	2-Rats	8	80	
	3-Lapins	6	60	
	4-Mélange (témoins négatif)	0	0	

Il est à noter que les témoins négatifs sont un lot d'individus qui ne subissent pas d'exposition au toxique, et sont incubés dans les mêmes conditions expérimentales que les autres lots, afin d'estimer la mortalité due à d'autres facteurs possibles : stress, maladie inconnue, ...etc.

Ensuite dans une courbe, le taux de mortalité calculé dans le tableau, sera corrélé à la dose du toxique, et à travers l'équation de la courbe : $y = a(x) + b$: **Taux de mortalité = a (Dose) + b**, la dose qui tue 50% des individus sera déterminée.

En plus, d'autres caractéristiques sont déterminées après observation des individus exposés :

-Observation de l'état général des animaux, en comparaison au témoin négatif : couleur des yeux, forme des oreilles, tremblement, troubles respiratoires, diarrhée, saignements, diminution de la taille des pattes ou malformations, difficultés d'équilibre, ...etc.

-Dosage des paramètres biologiques à travers des prélèvements des liquides biologiques : sang, lymphes, urines, LCR, ponction buccales, ...etc.

-Etat des organes et des tissus : modification de volume, morphologie, de taille, par la réalisation de coupes histologiques, suivies de colorations spécifiques et d'immunohistochimie. Cette étape nécessite de sacrifier les animaux (individus encore en vie, pour estimer la toxicité à long et moyen terme ou la récupération des organes des cadavres des individus décédés).

De ce fait, on peut déterminer (estimer) :

-toxicité subaiguë.

-toxicités spécifiques : hématologique, digestive, hépatique, nerveuse, ...etc.

-étude de mutagenèse voir de cancérogenèse : prélèvement et biopsies.

Dans les domaines agroalimentaire et pharmaceutique, à partir de la DL_{50} , on peut déterminer :

La dose sans effet toxique (DSE) = DL_{50} / facteur (entre 10 et 1000).

No Observed Effect Level (NOEL).

Le facteur dépend de l'étude, de la substance et de son application, il est le résultat de concertation scientifique importante et bien fondée.

Il a comme but de déterminer la toxicité sur l'homme, à partir des résultats du laboratoire, et il s'agit d'un facteur de sécurité, puisqu'il permet de diminuer le risque toxique. D'autre part, à partir de la DSE, on détermine la DJA (Dose journalière admissible) pour des substances additionnées dans des produits quotidiennement consommés par l'homme, à savoir des additifs alimentaires, des pesticides, des auxiliaires technologiques, des excipients pharmaceutiques.

DJA = DSE / P.C (Kg) par jour.

Exemple des pesticides

Ce sont les effets néfastes qui se produisent dans un court laps de temps après l'administration, l'application ou l'inhalation d'une substance. Elles concernent de fortes doses de substances pénétrant dans l'organisme par diverses voies (orale, dermique, respiratoire) en une ou plusieurs fois très rapprochées et susceptibles d'entraîner des effets immédiats ou plus ou moins lointains. On distingue plusieurs types de toxicités aiguës selon la voie de pénétration dans l'organisme : elles s'expriment par leurs doses ou concentrations létales 50 :

DL50H (per os et voie cutanée pour les solides et les liquides – mg/kg de poids corporel), CL 50 (substances gazeuses ou en solution – mg/ L d'air). Ces valeurs sont statistiquement dérivées d'une dose unique dont l'administration, l'application, ou l'inhalation provoque la mort de 50% des animaux traités ; différents modèles statistiques existent pour les calculer.

2-Les toxicités à long terme par administration répétée (répétée)

Elles concernent la pénétration répétée dans l'organisme de petites doses de produits pendant des périodes plus ou moins longues (sub-chronique, chronique, long terme). Les doses peuvent être minimales et prises séparément elles peuvent être sans effet ; prises de manière prolongée elles peuvent s'accumuler dans l'organisme (toxicité cumulative) dans certains organes particuliers et atteindre des niveaux toxiques. Un tel risque doit particulièrement retenir l'attention en ce qui concerne les populations exposées (manufacturiers et applicateurs) et les consommateurs (résidus dans les aliments). Pour ces produits à effets cumulatifs, l'élimination de l'organisme est lente et leurs effets peuvent être prolongés. Il convient de souligner qu'il n'y a pas de parallélisme systématique entre les différents types de toxicité ; un produit peut être dangereux par absorption répétée à petites doses alors qu'à fortes doses il est pratiquement inoffensif ; c'est l'exemple classique de l'hexachlorocyclohexane (HCH) dont les DL50 (rat) des isomères a, b, g et d sont respectivement de 1,70 – non toxique – 0,19 et 1 mg / kg alors que la toxicité cumulative de l'isomère b entraîne des nécroses et des dégénérescences hépatiques (10 mg/kg de régime alimentaire pendant 8 à 9 mois).

Ces types d'intoxication prennent en compte les données fournies par les expérimentations de toxicité aiguë et apportent des informations complémentaires sur les risques potentiels pour la santé résultant d'expositions répétées sur une période de temps limitée.

Les toxicités chroniques ont pour objectif de caractériser le profil toxicologique complet d'une substance chez une espèce animale, à la suite d'une exposition prolongée et répétée dont la durée est d'au moins 12 mois.

Ces études doivent permettre d'identifier la majorité des effets chroniques, d'établir des relations doses/réponses, ou doses/effets et la totalité des impacts sur les fonctions physiologiques, sur les organes et les tissus.

3-Les toxicités particulières

3-1-Cancérogénèse

Elle est caractérisée par des troubles de la prolifération cellulaire de certains tissus donnant naissance à des tumeurs hyperplasiques bénignes ou malignes, métastatiques ou non. Dans le cas des substances cancérigènes, le danger d'accumulation serait plus grand que dans celui des produits cumulatifs ordinaires, il résulterait non plus de l'accumulation du toxique lui-même, mais de ses effets qui, même à petites doses, seraient irréversibles. Certains travaux réalisés avec des cancérigènes de référence ont montré que la dose totale entraînant l'apparition de la tumeur était d'autant plus faible que les fractions administrées sont petites et il est, a priori, impossible d'exclure la sommation des effets d'agents cancérigènes différents.

Ces études sont très difficiles à mener et posent de nombreux problèmes : choix de l'espèce animale dont certaines sont plus susceptibles que d'autres à certaines formes de tumeurs, modalités d'application et de mise en œuvre, existence d'un « bruit de fond », et surtout difficultés d'extrapolation des résultats expérimentaux à l'homme.

Bien qu'un effet cancérigène certain sur une espèce soit considéré comme un signe de potentiel cancérigène chez l'homme, seule l'obtention de résultats négatifs pour toutes les espèces testées peut être regardée comme une preuve négative adéquate. Plusieurs pesticides se sont révélés posséder une action cancérigène à certaines doses, chez certains animaux et par certaines voies d'administration : la thiourée utilisée dans certains pays contre la pourriture grise des oranges (cancer du foie chez le rat), l'herbicide aminotriazole (cancer de la thyroïde chez le rat), l'aramite (acaricide) et l'acétylaminofluorène (insecticide jamais autorisé) ont provoqué des cancers chez divers animaux, par différentes voies d'introduction.

3-2-Mutagenèse et génotoxicité

La mutagenèse se traduit par des changements dans le patrimoine génétique (mutations) des cellules somatiques ou germinales avec alors possibilité de transmission à la descendance, résultant de modifications des bases azotées d'un gène (erreurs d'appariement lors de la division cellulaire) ou de réarrangements de segments de chromosomes. Si la majorité des produits cancérigènes sont métabolisés en produits mutagènes, il est très important de souligner que tous les produits cancérigènes ne sont pas mutagènes et vice-versa. Quelques exemples de produits mutagènes peuvent être cités : les dérivés du benzimidazole (BMC, bénomyl), le phosphamidon sont mutagènes *in vitro* et *in vivo*, le dichlorvos et les diquat et paraquat le sont *in vitro*.

3-3-Tératogenèse

C'est la propriété d'une substance de provoquer des anomalies structurales ou fonctionnelles permanentes au cours de la période de développement embryonnaire ; elle fournit des informations sur le risque potentiel pour le fœtus résultant d'une exposition de la mère durant la gestation. L'embryotoxicité est maximale pendant la phase de segmentation de l'œuf par division des blastomères, mais ces derniers peuvent réparer les lésions limitant ainsi les risques tératogènes. Les risques sont par contre très importants au cours de l'embryogenèse, phase pendant laquelle les feuillettes externes et internes différenciés forment les différents organes et présentent une grande sensibilité aux agents chimiques.

La déviation de la morphogenèse s'effectue au cours de cette période qui est variable selon la nature des organes (7^{ème} au 9^{ème} jour de gestation pour le système nerveux, 11^{ème} au 13^{ème} jour pour les membres chez la ratte). Il est aussi très important de souligner que les substances tératogènes peuvent exercer leurs effets à des doses très faibles qui n'entraînent pas de troubles physiologiques chez la mère.

3-4-Reproduction

Ces troubles peuvent s'étendre, en ce qui concerne cette fonction, de la gamétogenèse (spermatogenèse et ovogenèse) jusqu'au comportement sexuel en passant par toutes les étapes de la physiologie sexuelle (synthèse, sécrétion, transport, action des hormones, cycles sexuels, implantation du corps jaune, pouvant aboutir à l'état de stérilité, etc...).

3-5-Immunotoxicité – Allergénicité

L'impact des pesticides sur les fonctions immunitaires et les éventuels effets allergiques sont difficiles à apprécier en raison de l'existence des vraies et fausses allergies, de la présence de plusieurs produits ou même d'impuretés dans la formulation et du risque de sensibilisation croisée.

Au cours de diverses expérimentations, beaucoup d'autres effets toxiques pouvant être imputables aux pesticides ont pu être mis en évidence, ils peuvent affecter toutes les fonctions physiologiques : neurotoxicité, fonctions de nutrition (respiration, digestion), circulation et fonction d'élimination mais il n'est pas possible de les envisager de façon exhaustive pour des raisons déjà évoquées (propriétés industrielles, confidentialité des dossiers) et en raison du très grand nombre de molécules bénéficiant d'une AMM.

Facteurs susceptibles de modifier les toxicités

Ils sont nombreux et il est capital de les connaître pour évaluer au mieux les potentialités toxiques et pour choisir un coefficient de sécurité suffisant lors de l'extrapolation à l'homme des résultats obtenus chez l'animal.

Parmi ces facteurs, il faut citer ceux qui sont liés :

- A l'animal concerné (espèce, race, âge, sexe, états physiologiques et pathologiques éventuels, etc...)
 - Aux modalités d'administration du produit (voies, solvants, concentrations, moments, etc...)
 - Au produit lui-même et à ses caractéristiques physico-chimiques (solubilité, volatilité, stabilité, etc...)
- qui sont en lien direct avec son comportement pharmacocinétique. Par exemple, une grande solubilité dans les lipides associée à une faible solubilité dans l'eau favorisera la pénétration à travers la peau et les muqueuses et la localisation dans les tissus riches en lipides (système nerveux) ; une grande volatilité favorisera la pénétration par voie pulmonaire aidée en cela par des températures élevées.

Les types d'essais réalisés sur les animaux de laboratoire

Les expérimentations sur les animaux de laboratoire doivent tenir compte des propriétés physicochimiques déclinées dans le dossier d'homologation ; elles concernent la substance active (formules brute et développée, poids moléculaire, méthodes de préparation et impuretés éventuelles, isomères, points de fusion et d'ébullition, densité, tension de vapeur, solubilité dans l'eau et les solvants organiques, stabilité dans diverses conditions de pH, température, lumière) et la formulation (état physique, dimensions des particules, composition détaillée, impuretés, solvants, adjuvants et additifs, stabilité, compatibilité avec les emballages, inflammabilité, ignition spontanée, point éclair, etc...).

Les essais doivent être réalisés sur un nombre suffisant d'espèces domestiques et sauvages pour permettre une bonne évaluation et une extrapolation valable à l'homme. Tous les essais doivent être réalisés suivant les normes des bonnes pratiques de laboratoire concernant l'animalerie et les animaux, leur régime alimentaire et l'eau de boisson, l'air ambiant et les procédures d'administration selon les diverses voies orale, respiratoire et cutanée.

Les toxicités aiguës seront appréciées par les voies d'administration les plus appropriées en déterminant les DL50 et CL50 notamment chez le rat mais il est souhaitable que plusieurs espèces

soient testées (espèces métaboliquement voisines de l'homme) rongeurs et non-rongeurs et éventuellement animaux de ferme, gibiers, poissons, etc...

L'observation des animaux doit être suivie pendant une période suffisamment longue (14 jours au moins) avec description des symptômes et examens anatomo-pathologiques et histologiques des organes.

Les effets locaux sont mesurés par des tests isolés ou répétés d'irritation de la peau et des yeux chez le lapin albinos, selon les méthodes officielles utilisées en cosmétologie : indice d'irritation primaire, irritation oculaire, agressivité superficielle cutanée par applications itératives.

Les toxicités par administration réitérée à court terme prennent en compte les résultats des épreuves des toxicités aiguës notamment pour déterminer les doses à utiliser et la durée de l'intoxication. La voie orale est le plus souvent utilisée mais pas exclusivement, avec plusieurs doses pendant une période de 90 jours et au moins deux espèces de mammifères dont un non-rongeur.

Des essais de toxicité à long terme doivent être réalisés dans plusieurs circonstances : persistance des résidus dans les aliments, contacts répétés par les manipulateurs, accumulation dans certains tissus. Les tests classiques consistent à administrer le produit par la voie la plus appropriée de manière prolongée ; les animaux sont examinés régulièrement puis sacrifiés ; les doses doivent être convenablement choisies afin de permettre de déterminer les doses sans effet (D.S.E.), les coefficients de sécurité adéquats, et les doses journalières admissibles (D.J.A.) ou tolérables (D.J.T.). Ces tests sont réalisés sur une ou deux espèces animales avec des doses calculées d'après les essais de toxicité aiguë et à court terme et administrées à des animaux jeunes pendant pratiquement toute la durée de leur vie (2 ans chez le rat). Le comportement, la croissance, les variations des caractéristiques biologiques sont examinées, les examens macroscopiques et histologiques sont pratiqués sur les organes des animaux décédés ou sacrifiés en cours ou en fin d'expérimentation et la réversibilité des effets peuvent être appréciée après l'arrêt du traitement.

La recherche des effets cancérogènes tend à se généraliser et s'impose quand le composé présente une analogie structurale avec un cancérogène connu, un co-cancérogène ou promoteur tumoral, ou si des effets mutagènes ont été montrés.

Les études de cancérogenèse peuvent être couplées avec les études à long terme moyennant quelques aménagements liés :

- Au choix de l'espèce dont le métabolisme doit être le plus proche possible de celui de l'homme et de durée de vie assez courte pour ne pas trop prolonger l'expérimentation.
- Au nombre d'animaux des deux sexes qui doit être augmenté.
- Aux doses de pesticides administrées qui ne doivent pas exercer d'effets toxiques pouvant masquer la cancérogenèse.

Il est par ailleurs connu qu'une administration très prolongée n'est pas toujours nécessaire pour qu'un cancer apparaisse et que souvent il peut exister un long délai entre l'agression et les effets observés. L'examen des animaux doit tenir compte de ces faits ; il est donc souhaitable d'en sacrifier un certain nombre en cours d'expérience et de prolonger l'observation de la plupart des autres. On compte chez les animaux sacrifiés ou décédés le nombre de ceux qui présentent des tumeurs et par animal positif le nombre de tumeurs locales et générales. Il est utile d'observer et de noter les temps de latence et de survie.

La mutagénicité est appréciée au travers de nombreux tests disponibles actuellement : ceux qui proposent de démontrer des mutations ponctuelles (changement de paires de bases azotées, décalage de lecture), ceux qui mettent en évidence des altérations des chromosomes, ceux qui utilisent l'induction des mutations, ceux basés sur la mise en évidence de caractères récessifs létaux, ceux utilisant l'induction de cellules germinales, ceux basés sur les cassures simples ou doubles brins de l'ADN, les échanges de chromatides sœurs, etc...).

Certains tests sont réalisés *in vivo* (micro-nucléus chez le rat par exemple), d'autres *in vitro* et avec ou sans activation métabolique. Ils peuvent être réalisés sur des bactéries (test d'Ames sur *Salmonella thyphimurium*) ; sur animal entier (mammifères) sur insectes (drosophile) et sur levures ou champignons.

Utilisé seul, aucun de ces tests ne s'est révélé totalement satisfaisant et il convient d'en effectuer plusieurs (deux et même trois si les résultats sont contradictoires), un *in vitro* et un autre *in vivo*. Etant donné leur rapidité d'exécution et l'association fréquente des actions mutagènes et cancérogènes, ils peuvent être utilisés comme tests rapides d'indication de cancérogénicité éventuelle.

L'évaluation des effets sur la reproduction, le développement fœtal et la tératogénèse concerne toute une série d'effets possibles :

- Chez la femelle, l'ovogenèse, les cycles de reproduction, la fécondation, l'implantation, le développement de l'embryon et du fœtus (retard de croissance, malformations, morts avec avortements, résorption, etc...), le métabolisme et l'équilibre endocrinien.
- Chez le mâle : la spermatogénèse, la stérilité, le métabolisme et l'équilibre endocrinien.

Certains des essais pratiqués sont d'exécution particulièrement longue car ils doivent être réalisés sur plusieurs générations, et il est souvent souhaitable que les tests de tératogénicité soient effectués sur plusieurs espèces animales (lapin, rat).

Des allergies et des effets sur les fonctions immunitaires peuvent faire suite à une absorption répétée de produits chimiques. Les recherches de telles actions doivent être pratiquées chaque fois que la structure chimique d'un composé ou d'un de ses métabolites peut faire penser à une possibilité de liaison covalente avec des protéines.

Plusieurs tests sont utilisables, notamment :

- L'étude des modalités d'élimination chez le lapin de la radioactivité d'une substance marquée injectée avec un adjuvant de l'immunité à des moments convenablement choisis,
- Les tests de sensibilisation sur cobaye, en particulier le test de maximisationH de Magnuson et Kligmann,
- La recherche des effets immunosuppresseurs par le test de transformation lymphocytaire effectué sur lymphocytesH humains en présence de mutagènes.

Des épreuves de toxicocinétique doivent être également réalisées, elles permettent d'évaluer la toxicité de différentes substances susceptibles d'être présentes dans les formulations ou dans les produits traités, surtout si elles sont présentes en quantités notables ; il peut s'agir d'impuretés de fabrication, de produits de réaction avec les composants des aliments, des métabolites dans les végétaux et chez les animaux et des produits de dégradation dans les sols. La toxicité des impuretés est en général appréciée avec celles des produits chimiques évalués.

En ce qui concerne les métabolites majeurs et les principaux produits de dégradation, les déterminations de leurs toxicités aiguës et, s'il s'agit de produits stables, de leur toxicité à court terme, doivent être effectuées.

La finalité des diverses expérimentations toxicologiques est d'évaluer avant toute commercialisation et utilisation, les risques pour l'homme, les animaux et l'environnement des divers produits phytosanitaires. Les études de toxicité aiguë constituent le point de départ de tout protocole toxicologique et les données fournies sont prises en compte dans tous les autres essais. Les toxicités sub-chroniques apportent des informations complémentaires sur les risques potentiels pour la santé résultant d'expositions répétées sur une période de temps limitée, elles donnent des renseignements sur les organes cibles, sur la possibilité d'effets cumulatifs, sur le niveau d'exposition sans effet utile pour l'établissement des critères de sécurité concernant l'exposition de l'homme (lieu de travail). Les

épreuves de toxicité à long terme doivent permettre d'identifier la totalité des effets chroniques et d'avoir le profil toxicologique complet d'une substance.

N/B :

Ces notions ont été présentées de façon théorique, mais qui restent exigeantes en terme d'équipements scientifiques de laboratoire et en produits chimiques, afin de permettre de mener des séries d'expériences afin d'obtenir des profils toxicologiques pour un ensemble de substances de différents intérêt, voir même d'extraits naturels ou de mélanges d'extraits naturels, ayant des objectifs biologiques bien précis. C'est là que la toxicologie analytique intervient pour compléter la mission du biologiste dans la détermination des propriétés d'une substance identifiées.