

### III. RELATION DOSE-REPONSE

---

#### 1. Postulat d'une relation dose-réponse dans le domaine non observé

Les moyens actuels utilisés pour la mise en évidence d'effets toxiques dans des populations humaines exposées faiblement et à long terme ne permettent pas de mettre en évidence la présence ou l'absence d'un seuil. En revanche, en toxicologie, l'utilisation de doses fortes chez l'animal conduit souvent à mettre en évidence un seuil de toxicité si on se limite à l'observation des données expérimentales. L'hypothèse d'absence de seuil pour des faibles doses, qui ne sont en réalité pas testées, est théorique et ne peut être vérifiée. Elle est fondée sur les hypothèses issues des mécanismes d'action biologiques des substances cancérigènes génotoxiques.

La question pivot de la saisine de la DGS est donc celle de l'acceptation de la théorie qui admet que des expositions faibles à des agents génotoxiques sont associées à un risque de survenue d'effets délétères. Sous cette hypothèse, la relation dose-réponse (RDR) des effets génotoxiques cancérigènes utilisée en évaluation quantitative du risque sanitaire (EQRS) est le plus souvent extrapolée du domaine observable (fortes doses et risques de l'ordre du pourcentage) vers le domaine d'intérêt en santé environnementale (faibles doses et risques inférieurs au pourcentage), et parfois transposée de l'animal à l'homme, ou de groupes particuliers à la population générale. Les hypothèses et les résultats de la modélisation haute dose – basse dose et des transpositions ne sont en général pas vérifiables. En plus de la variabilité biologique et environnementale des phénomènes pris en compte, l'incertitude du modèle de risque sanitaire s'enrichit ainsi des défauts de connaissance scientifique et des inférences choisies pour les contourner. L'évaluation prédictive de l'impact sanitaire d'une exposition aux polluants cancérigènes de l'environnement est donc pour l'essentiel théorique, mais elle est actuellement la seule capable de fournir une prédiction quantifiée d'un excès d'incidence ou de cas de maladie, et de l'incertitude qui lui est associée. C'est pourquoi elle est pratiquée et développée par de nombreuses agences nationales (US-EPA, RIVM par exemple) et internationales (OMS).

La compréhension de l'enjeu de l'acceptation de ce postulat nécessite de décrire, même succinctement, les méthodes d'élaboration des VTR et notamment des ERU. C'est dans un

second temps (chapitre suivant) que seront repris les éléments qui ont une importance dans la validité scientifique du calcul d'impact.

## **2. Éléments concernant l'étape d'identification des dangers et l'élaboration des VTR**

La construction des VTR sera en pratique différente selon que l'on considère un seuil de toxicité ou non. Pour les effets cancérigènes génotoxiques, habituellement considérés comme n'ayant pas de seuil de toxicité, c'est un excès de risque unitaire (ERU) qui est construit. Comprendre le fondement de cette hypothèse nécessite de décrire les phénomènes impliqués dans les cancers. L'objet de ce chapitre est d'éclairer les différents éléments critiques reconnus lors de la construction de l'ERU, dans le but de mettre en lumière certains aspects complexes ou incertains qui conduiraient à un calcul d'impact sanitaire peu approprié. Il ne s'agit pas de réécrire l'ensemble du processus qui amène à la construction d'une VTR. Pour plus d'informations, le lecteur pourra se reporter au document de l'InVS sur les méthodes d'élaboration des VTR [Bonvallot, 2002] ainsi qu'aux documents récents de l'AFSSE sur le sujet ([www.afsse.fr](http://www.afsse.fr)).

### **2.1. Processus de construction d'une VTR**

#### *2.1.1. Généralités*

Les VTR sont établies par des organismes nationaux ou internationaux : JECFA, JMPR, US-EPA, ATSDR, OEHHA, Health Canada, NHMRC, RIVM... Elles sont spécifiques d'un effet, d'une voie et d'une durée d'exposition. Leur construction diffère en fonction des mécanismes d'action biologiques considérés, génotoxique ou épigénétique. En pratique, pour les substances chimiques, un ERU ne sera construit que pour les substances qui induisent des effets cancérigènes, le plus souvent génotoxiques mais pas exclusivement (ex : la VTR de la 2,3,7,8-TCDD, cancérigène non génotoxique, est construite sans seuil de dose par l'US-EPA).

Les méthodes d'élaboration ont été, à l'origine, dictées par les hypothèses proposées sur les mécanismes d'action toxiques. Ainsi, les VTR sans seuil ont été pour la première fois proposées à la fin des années 60. Aujourd'hui, les organismes qui produisent des VTR considèrent que les effets cancérigènes n'ont pas de seuil si la molécule agit directement sur le matériel génétique (ADN). Ils seront à seuil si la substance cancérigène agit de

manière indirecte et ne touche pas le matériel génétique (apparition de cancer par prolifération cellulaire, dérèglement des signaux de transduction, activation de l'expression de gènes et de protéines, etc...). Toutefois, on se rend compte aujourd'hui que ce dogme se fissure, d'une part, parce que le mécanisme non génotoxique de certaines substances, dont la plus médiatique la dioxine, conduit à des analyses divergentes de l'US-EPA et de l'OMS, et, d'autre part, parce qu'il n'est pas possible d'identifier avec certitude un seuil pour certains effets non cancérogènes, comme par exemple la neurotoxicité du plomb.

Par ailleurs, lors de la construction d'une VTR, de nombreuses hypothèses sont formulées et souvent considérées comme des postulats car les connaissances actuelles ne suffisent pas pour avoir un avis toxicologique éclairé fondé sur l'expérience. Certains de ces postulats concernent la nécessité de transposer des données animales à l'homme, d'autres la nécessité d'extrapoler des effets observés pour de fortes doses à des expositions plus faibles et plus longues, d'autres encore la nécessité de prendre en compte un groupe d'individus hétérogènes. Enfin, certaines hypothèses sont formulées pour pallier les manques d'informations, notamment sur les durées d'exposition et les effets associés. Ces hypothèses, souvent majorantes sont utilisées tant que les expériences ne peuvent montrer le contraire (on parle d'une utilisation par défaut).

Lorsque l'on considère une relation dose-réponse linéaire dans le domaine des faibles doses, la construction des VTR comporte trois à cinq étapes, en fonction des organismes qui les produisent (figure 1 et tableau 1). Les trois premières étapes –les 2 et 3 n'ont pas d'ordre prédéfini– sont communes à l'ensemble des organismes et toujours présentes. On retrouve constamment :

- 1) l'identification des effets adverses avec le choix de l'effet critique et de(s) l'étude(s) pour la construction ;
- 2) la transposition de l'animal à l'homme (impliquant une correction allométrique, c'est-à-dire la détermination d'un équivalent de dose pour l'homme ou ajustement d'une concentration) ; cette correction s'établit à partir des données toxicinétiques.
- 3) la modélisation des données toxicologiques.

On peut également avoir d'autres étapes :

4) l'identification d'une dose critique (LED/BMD) ;

5) l'extrapolation à l'origine.

Figure 1 : Illustration des deux possibilités de construction d'un ERU.

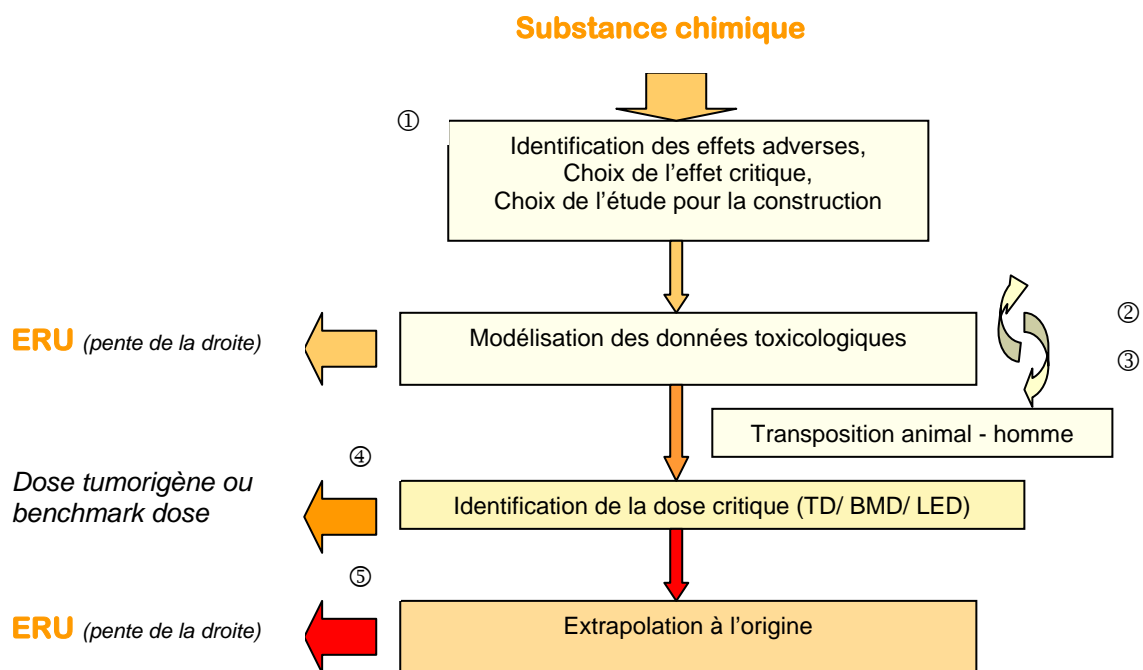


Tableau 1 : Construction des ERU selon les différents organismes

Etape de construction de la VTR	Organisme identifiant cette étape	Type de VTR proposée
Identification des effets adverses, choix de l'effet critique et choix de l'étude (profil toxicologique)	US EPA, OMS, JECFA, JMPR, RIVM, Santé Canada, ATSDR, NHMRC	
Transposition inter-espèces : coefficients de conversion pour la voie respiratoire, ajustements allométrique pour la voie orale	US EPA, OMS, JECFA, JMPR, RIVM, Santé Canada, NHMRC	
Modélisation des données	US EPA, OMS, JECFA, JMPR, RIVM, Santé Canada, NHMRC	SF* (US EPA), CR** (RIVM)
Identification de la dose critique	US EPA, Santé Canada, NHMRC	LED*** (US EPA), TD**** (Santé Canada), BMD***** (NHMRC)
Extrapolation à l'origine	US EPA, repris fréquemment par OMS ou JECFA, JMPR	SF* (US EPA)

\*SF : Slope Factor ; \*\*CR : Cancer Risk ; \*\*\*LED : Lower Limit on Effective Dose ; \*\*\*\*TD : Tumorigenic Dose ; \*\*\*\*\*BMD : Benchmark Dose.

## Le processus de cancérogenèse

Le cancer est une maladie progressive caractérisée par l'accumulation d'anomalies sur différents gènes et/ou par la perte progressive du contrôle de la division cellulaire. La latence est généralement importante, pouvant aller jusqu'à plusieurs décennies. Les mécanismes cellulaires et moléculaires sont variés. Il existe trois types d'actions directes sur le patrimoine génétique des cellules : i) les mutations géniques (mises en évidence par le test d'Ames) : induction de mutation au niveau de l'ADN des cellules germinales ou somatiques par substitution de paires de bases, délétion ou insertion de bases ; ii) les mutations chromosomiques (mises en évidence par le test du micronoyau) : anomalies de structure des chromosomes par cassure, alkylation ou intercalation\* ; anomalies de nombre des chromosomes ou aneuploïdie\*\* ; iii) les altérations primaires de l'ADN (mises en évidence par le test des comètes) : formations d'adduits directement à l'ADN, propriétés des molécules électrophiles.

A titre d'illustration, les mutations géniques<sup>12</sup> induiront des cancers notamment en cas d'atteintes de certains gènes critiques tels que les contrôleurs de la croissance cellulaire, les suppresseurs de tumeurs, ou les régulateurs de la mort cellulaire. Théoriquement, un cancérigène génotoxique entraîne une mutation directe sur un ou plusieurs gènes d'une cellule. La cellule devient « initiée » et conduit au développement progressif du cancer lorsque les mécanismes de réparation sont dépassés ou déficients. Les cancérigènes non génotoxiques n'agissent pas directement sur l'ADN. Ils vont, par d'autres mécanismes cellulaires<sup>13</sup>, provoquer une augmentation du taux de divisions cellulaires et induire un cancer.

Il est difficile de démontrer clairement à l'aide des outils épidémiologiques actuels l'absence d'un seuil dans la réponse induite par une exposition à une substance chimique au sein d'une population hétérogène telle que l'espèce humaine. Les postulats proposés sont donc fondés sur des mécanismes d'action biologiques. La distinction dans le traitement du problème et de la construction d'une VTR résulte de l'action génotoxique ou non d'un cancérigène.

L'hypothèse d'absence de seuil pour ces substances repose ainsi sur le postulat suivant : *la cancérogenèse est un processus à plusieurs étapes (initiation, promotion, progression...) et les agents cancérigènes peuvent agir à une, plusieurs, ou toutes ces étapes. Dans le cas des cancérigènes génotoxiques, il est convenu qu'un petit nombre d'évènements moléculaires peut provoquer des changements dans une seule cellule et déclencher une prolifération incontrôlée.* Ce raisonnement date des années 60 (distinction mise en pratique en 1969) et a été à l'époque fondé sur des supports expérimentaux et épidémiologiques. Le débat se poursuit toujours sur la réalité biologique de ce postulat mais il est encore aujourd'hui largement admis dans la pratique.

---

<sup>12</sup> \*Agents clastogènes, alkylants ou intercalants ; \*\*agents aneugènes par interférence avec les microtubules.

<sup>13</sup> Il existe trois types d'actions non génotoxiques : i) augmentation du taux de mutations spontanées (cytotoxicité : effet irritant, augmentation du taux de divisions cellulaires, débordement des processus de réparation et d'apoptose) ; ii) hyperactivité organique (augmentation de la taille d'un organe avec augmentation du taux de divisions cellulaires, hypertrophie et hyperplasie ; iii) liaison à des récepteurs entraînant la transduction de signaux et une augmentation du taux de division cellulaire.

Lorsque l'on est en présence d'un cancérigène génotoxique, celui-ci va agir directement sur le matériel génétique humain et on considère qu'une seule dose, aussi faible soit-elle, peut porter atteinte à ce génome. Le postulat est donc fondé sur une hypothèse assez fragile puisque c'est sans compter sur la présence de mécanismes de réparation de l'ADN nombreux et performants<sup>14</sup>. En effet, une lésion de l'ADN n'entraîne pas de mutation du patrimoine génétique tant que la cellule ne s'est pas divisée (réparation possible). La mutation résulte donc d'un défaut de réparation. Le nombre de mutations spontanées dans une cellule humaine somatique est estimé entre  $10^{-9}$  et  $10^{-12}$  par nucléotide et par division cellulaire. Le corps humain possède environ  $10^{14}$  cellules et une cellule peut subir sur une vie environ  $10^{16}$  cycles de division. Si chaque mutation était cancérigène, les mutations spontanées seraient responsables de la formation de millions de cellules cancéreuses au cours de la vie d'un homme.

Par ailleurs, en pratique, les expérimentations animales de cancérogenèse indiquent souvent la présence d'un seuil de toxicité statistiquement significatif. Ce seuil n'est toutefois pas retenu car les expérimentations à nombre restreint d'animaux exposés à des doses importantes ne permettent pas d'identifier une incidence faible pour une exposition faible.

Enfin, il peut exister un seuil de toxicité même pour les effets cancérogènes, du fait de l'existence de nombreux mécanismes de réparation, mais là encore les connaissances actuelles et l'hétérogénéité de la population humaine ne permettent pas de l'identifier. C'est donc pour cela que la notion d'absence de seuil est toujours utilisée, bien que beaucoup débattue.

#### 2.1.2. *Identification des effets adverses, choix de l'effet critique et de l'étude*

Cette étape consiste en une revue de la littérature, études toxicologiques et épidémiologiques, afin de mettre en évidence des relations dose-effet et dose-réponse chez l'homme et/ou l'animal. Lors de l'utilisation de données animales, la revue bibliographique doit être complétée par une analyse de la pertinence des effets et des transpositions inter-espèces. Elle permet finalement de faire le choix de l'effet critique. En théorie, les protocoles des études utilisées doivent respecter au mieux certaines règles de bonnes pratiques de

---

<sup>14</sup> Trois types de mécanismes au sein de l'organisme peuvent empêcher la formation d'un cancer : i) détoxification de la substance par métabolisation ou conjugaison : dès l'entrée de la substance dans l'organisme ; ii) mécanismes de réparation de l'ADN : lorsque la substance a agit sur l'ADN par formation d'un lésion (adduit, cassure...), pendant la division cellulaire ; iii) mécanismes de régulation cellulaire : apoptose ou mort cellulaire au moment de la division.

laboratoire. Leur analyse permet de s'assurer de leur qualité et de la validité des résultats observés.

Un des éléments critiques majeurs de cette étape est de définir et de choisir, de la manière la plus rigoureuse possible, un effet adverse pertinent pour l'homme qui sera utilisé pour la construction de la VTR. Deux points sont à distinguer :

- L'identification des effets que l'on va considérer comme adverses pour une substance ;
- Le choix de l'effet adverse retenu pour la construction de la VTR (effet critique ou autre plus pertinent).

Les effets adverses sont définis comme « tout changement dans la morphologie, la physiologie, la croissance, le développement ou la durée de vie d'un organisme, et résultant d'une détérioration de la capacité fonctionnelle ou de la capacité à compenser un stress additionnel ou d'une augmentation de sensibilité ». Ce sont ces effets qui contribuent à la dangerosité d'une substance. Toutefois, lors d'une expérimentation animale, certains effets peuvent ne pas être le reflet d'une toxicité et peuvent être considérés comme physiologiques ou adaptatifs tels que de légères perturbations enzymatiques. Il convient donc de s'assurer que ces effets sont bien la manifestation d'une toxicité avant de les retenir, c'est-à-dire sont bien des effets « adverses » (ou délétères).

L'effet critique est le premier effet adverse qui survient dans la population d'individus exposés lorsqu'on accroît la dose, et jugé pertinent chez l'homme pour l'élaboration de la VTR. *A priori*, ce choix permet d'être protecteur vis-à-vis des autres effets observés, à condition que la nature des relations dose-effet soit conservée de l'animal à l'homme ; c'est principalement cet élément qui peut entraîner des incertitudes importantes sur la VTR.

A l'origine, les manifestations pathologiques des cancers étaient mises en évidence cliniquement ou expérimentalement par l'observation de tumeurs, ce qui rendait aisée la définition de l'effet critique. Les évolutions des techniques analytiques et de la mise en évidence de toxicité cellulaire voire moléculaire entraînent aujourd'hui des difficultés croissantes pour identifier un effet adverse car la distinction entre effet adverse ou prédictif

d'un effet adverse, et effet adaptatif ou changement physiologique non adverse devient infime.

Enfin, l'étude utilisée pour la construction de la VTR doit être analysée afin de s'assurer de la qualité des protocoles retenus. Là encore, ce point amène souvent à devoir tenir d'une incertitude en fonction de la qualité des études, notamment lorsqu'il s'agit de données toxicologiques anciennes.

### 2.1.3. *Modélisation des données toxicologiques et transposition intra-espèce*

Les modèles permettant d'ajuster les données sont nombreux et sont représentés par des équations de régression (linéaires, quadratiques, polynomiales) ou de distribution de probabilités (modèle de Weibull, probit, logistique ou gamma). Lorsque les données le permettent, on peut également appliquer des modèles mécanistes (modèle multi-étapes linéarisé, LMS ou plus rarement modèle de Moolgavkar-Venzon-Knudson, MVK) qui ont été développés à partir d'hypothèses sur les mécanismes d'action de la cancérogenèse. Les régressions logistiques et le modèle LMS sont les plus fréquemment utilisés dans la modélisation des données expérimentales.

Les modèles statistiques ajustent bien les données expérimentales mais ont été progressivement remplacés par le modèle LMS car ils ne considéraient pas les hypothèses admises sur la cancérogenèse. Globalement, les modèles mathématiques, qu'ils soient statistiques ou mécanistes, peuvent être limités par le manque de données expérimentales permettant de conduire à des relations fiables.

Lors de la modélisation des données expérimentales, la plupart des organismes préconisent d'utiliser comme relation dose-réponse la limite inférieure de l'intervalle de confiance de la courbe. Ceci permet de prendre en compte de la variabilité qui existe au sein des animaux testés et dans le protocole expérimental. Dans tous les cas, cette variabilité au sein d'une espèce n'est que peu prise en compte car les lots d'animaux de laboratoire testés ont la particularité d'être le plus homogène possible pour faciliter des observations cohérentes.

### 2.1.4. *Transposition animal / homme*

La détermination d'une dose équivalente humaine à partir de données animales repose sur un ajustement dosimétrique fondé sur plusieurs hypothèses décrites ci-dessous.

En théorie, lors de la construction d'une VTR, il convient d'utiliser les informations issues d'études sur des espèces animales présentant un profil biologique et un métabolisme le plus proche de celui de l'homme ou, si le métabolisme n'est pas identifié, d'utiliser des animaux dont l'espèce, la souche et le sexe sont les plus sensibles possibles. En pratique, il est très fréquent d'utiliser des études réalisées chez les rongeurs car elles sont généralement les seules disponibles (rat et souris). **Il est donc convenu, sauf preuve du contraire, que les effets toxiques d'une substance chez les animaux de laboratoire, quels qu'ils soient, sont supposés se produire aussi chez l'homme** dans des conditions appropriées.

Par ailleurs, si les mécanismes d'action, le métabolisme et les cinétiques ne sont pas connues, **l'hypothèse est que les mécanismes d'action, les cinétiques et les métabolismes sont les mêmes chez l'homme et chez l'animal de laboratoire (donc l'effet généré est le même quelle que soit l'espèce), par unité de surface corporelle quand l'exposition est par voie orale, ou ajustés sur des coefficients physiologiques quand l'exposition est par voie respiratoire.**

La connaissance parcellaire des mécanismes d'action biologiques est souvent à l'origine de l'application d'hypothèses fortes, entraînant des incertitudes difficiles à qualifier et à quantifier lorsque les éléments de toxicocinétique et toxicodynamie sont rares. De même pour la modélisation des comportements physiologiques et cinétiques des espèces humaine et animale.

Précisons enfin que dans le cadre de la construction d'un ERU, très peu d'importance est donnée aux différences existant entre plusieurs individus d'une même espèce. La seule allusion méthodologique est l'utilisation par certains organismes de la limite inférieure de l'intervalle de confiance (à 95 %) de la dose lors de la modélisation des études expérimentales. Or les différences au sein de l'espèce humaine sont bien plus grandes que les différences entre plusieurs animaux de laboratoire utilisés dans une même expérimentation. En effet, on peut noter une variabilité liée aux différences génétiques, de genre, de nutrition, d'état de santé ou encore de co-expositions.

#### 2.1.5. *Identification d'une dose critique*

La dose critique est une dose qui sert de repère dans la relation dose-réponse. Elle se nomme de différentes manières et n'est pas toujours placée au même endroit du graphique. En effet, l'US-EPA, l'ATSDR, l'OEHHA, tout comme l'OMS, identifient la LED<sub>10</sub> ou BMD<sub>10</sub> qui

traduit une augmentation de 10 % de l'incidence tumorale par rapport au lot témoin (en pratique, on choisit le plus souvent la limite inférieure de l'intervalle de confiance à 95 % de la dose). Health Canada utilise la  $TD_{0,05}$ , dose tumorigène (en estimation centrale) correspondant une augmentation d'incidence tumorale de 5 %. Dans les deux cas, la dose critique dépend du modèle d'ajustement utilisé.

#### 2.1.6. *Extrapolation dans le domaine des faibles doses*

L'objectif est de construire une droite représentant le risque de développer un cancer en fonction de la dose. Cette droite peut être obtenue soit à l'aide de l'équation du modèle d'ajustement des données expérimentales, soit par une extrapolation linéaire jusqu'à l'origine à partir de la dose critique.

Les modèles mécanistes définis dans le paragraphe 2-1-3 ont tous la caractéristique de fournir des courbes dose-réponse linéaires dans la région des faibles doses. Ainsi, l'ERU correspond à la pente de la droite préalablement construite. Lorsque les données quantitatives sont suffisantes et les processus carcinogènes connus, on peut développer un modèle fondé sur des données scientifiques bien établies. Dans le cas contraire, qui est encore fréquent, on identifie la  $LED_{10}$  ou  $BMD_{10}$  qui devient le point de départ pour l'extrapolation linéaire jusqu'à l'origine du repère.

## 2.2. **Bilan**

Les nombreuses hypothèses évoquées précédemment expliquent que l'élément critique de la construction des ERU est l'impossibilité de vérifier la vraisemblance de l'extrapolation proposée. Or les différents modèles et méthodes utilisés sont à l'origine de résultats variables. En pratique, la plupart des organismes utilisent le modèle LMS ou l'extrapolation linéaire à partir d'une dose critique qui donnent des résultats assez similaires.

Pour ces raisons, Health Canada et les instances australiennes considèrent que l'extrapolation aux faibles doses et donc aux faibles risques manquent de robustesse car les incertitudes et variabilités ne peuvent, en l'état actuel des connaissances, être maîtrisées. C'est pourquoi, ces organismes s'arrêtent à la construction de valeurs toxicologiques de référence observables. C'est le gestionnaire de risque qui a ensuite la charge de préciser si la marge de sécurité entre l'exposition humaine et la VTR est suffisante. Cette approche

fixant une sorte de « LOAEL » (Lowest observe adverse effect level), il ne peut être calculée, en pratique, un nombre de cas en excès.

Les limites des différentes approches mises en œuvre jusqu'à aujourd'hui sont bien connues et de nombreuses équipes s'engagent dans de nouvelles directions de recherche. On peut citer :

- le développement de méthodes pour une meilleure utilisation des données expérimentales de l'étude sélectionnée, mais également des méta-analyses permettant de prendre en compte des données supplémentaires ;
- l'application des modèles pharmacocinétiques qui permet également de réduire l'incertitude inhérente à la transposition animal-homme.