

anses

agence nationale de sécurité sanitaire
alimentation, environnement, travail



Connaître, évaluer, protéger

Valeurs toxicologiques de référence

Guide d'élaboration de l'Anses

Rapport d'expertise collective

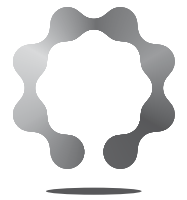
Juin 2017

Édition scientifique



anses

agence nationale de sécurité sanitaire
alimentation, environnement, travail



Connaître, évaluer, protéger

Valeurs toxicologiques de référence

Guide d'élaboration de l'Anses

Rapport d'expertise collective

Juin 2017

Édition scientifique

Valeurs toxicologiques de référence (VTR)

Guide d'élaboration de VTR de l'Anses

Mission permanente
Saisine n° 2017-SA-0016
Troisième édition

RAPPORT

d'expertise collective

Comités d'experts spécialisés
« Caractérisation des dangers et valeurs toxicologiques de référence »

Juin 2017

Mots clés

Méthodologie, document de référence, VTR, valeur toxicologique de référence, agents chimiques, expertise, mode d'action, seuil, sans seuil, effet critique, dose critique, benchmark dose, QSAR, PBPK, ajustement, facteurs d'incertitude, extrapolation linéaire, niveau de confiance, enfant, population générale

Key words

Method, guidance, TRV, toxicological reference value, chemical, mode of action, threshold, no threshold, critical effect, critical dose, benchmark dose, QSAR, PBP, adjustment, uncertainty factor, linear extrapolation, confidence, general population, children

Présentation des intervenants

PRÉAMBULE : Les experts membres de comités d'experts spécialisés, de groupes de travail ou désignés rapporteurs sont tous nommés à titre personnel, *intuitu personae*, et ne représentent pas leur organisme d'appartenance.

RAPPORTEURS

M. Marc BARIL - Professeur associé à l'Université de Montréal – Chimiste toxicologue, VLEP
Mme Michèle BISSON – Responsable d'étude à l'INERIS – Pharmacien toxicologue, toxicologie générale - VTR
M. Claude EMOND – Professeur adjoint de clinique à l'Université de Montréal – Toxicologie, modèle PBPK, toxicocinétique, nanotoxicologie, perturbateurs endocriniens
M. Jérôme THIREAU – Chargé de recherche au CNRS – Docteur es science, physiologie animale, biologie cellulaire, cardiotoxicité

COMITÉ D'EXPERTS SPÉCIALISÉ

- CES « Caractérisation des dangers des substances et valeurs toxicologiques de référence » – 23 février, 11 mai et 23 juin 2017.

Président

M. Michel GUERBET – Professeur de toxicologie à l'UFR médecine pharmacie de Rouen - Pharmacien toxicologue

Vice-président

M. Dominique LAFON – Médecin toxicologue chez Nexter Group – Médecine du travail, toxicologie, reprotoxicité

Membres

M. Marc BARIL - Professeur associé à l'Université de Montréal – Chimiste toxicologue, VLEP
M. Sylvain BILLET – Enseignant chercheur / maître de conférence en toxicologie à l'Université du Littoral Côte d'Opale – Toxicologie respiratoire, nanomatériaux
Mme Michèle BISSON – Responsable d'étude à l'INERIS – Pharmacien toxicologue, toxicologie générale - VTR
Mme Anne CHEVALIER – Epidémiologiste retraitée de l'Institut de Veille Sanitaire
M. François CLINARD – Epidémiologiste à l'Institut de Veille Sanitaire – Pharmacien toxicologue, épidémiologie, évaluation des risques sanitaires
Mme Fatiha EL-GHISSASSi – Scientifique, Section des Monographies de IARC (IMO) Centre International de Recherche sur le Cancer - Docteur es science en biochimie spécialiste en cancérogénèse et génotoxicité

Mme Mounia EL-YAMANI – Responsable d'unité à l'Institut de Veille sanitaire – Docteur es science en biochimie, toxicologie, VLEP

M. Claude EMOND – Professeur adjoint de clinique à l'Université de Montréal – Toxicologie, modèle PBPK, toxicocinétique, nanotoxicologie, perturbateurs endocriniens

M. Guillaume GARCON – Professeur de toxicologie à l'Université de Lille 2 – Toxicologie générale, cancérologie, modèles expérimentaux, toxicologie respiratoire, pollution atmosphérique

M. Ludovic LE HEGARAT – Chef d'unité adjoint Toxicologie des contaminants - Anses – Laboratoire de Fougères- Toxicologie, génotoxicité, nanomatériaux

Mme Véronique MALARD – Ingénieur chercheur en toxicologie au CEA, Centre de Cadarache. Docteur es science – Toxicologie « in vitro », biologie cellulaire, nanotoxicologie, protéomique.

M. Fabrice MICHIELS – Médecin du travail / toxicologue à l'Association Interentreprises pour la Santé au Travail 19

M. Jean-Paul PAYAN – Chef du laboratoire Pénétration Cutanée, Cinétique et Métabolisme à l'INRS, Nancy – Pharmacien toxicologue, toxicocinétique

M. Henri SCHROEDER – Enseignant chercheur à l'URAFPA, INRA USC 340, Faculté des Sciences et Technologies, Université de Lorraine - Pharmacien biologiste - Neurotoxicité, comportement animal, développement cérébral, exposition périnatale

M. Alain SIMONNARD – Pharmacien toxicologue, ERT, retraité de l'INRS

M. Olivier SORG – Chef de groupe de recherche à l'Université de Genève – Docteur es science en biochimie, toxicologie expérimentale, dermatotoxicologie

Mme Lydie SPARFEL – Professeur à l'Université de Rennes 1 / IRSET 'Institut de Recherche en Santé, Environnement et Travail' UMR INSERM 1085– Pharmacien Toxicologue, immunotoxicologie, toxicogénomique, cancérologie, biologie cellulaire et moléculaire

M. Jérôme THIREAU – Chargé de recherche au CNRS – Docteur es science, physiologie animale, biologie cellulaire, cardiotoxicité

PARTICIPATION ANSES

Coordination scientifique

Mme Aurélie MATHIEU-HUART – Chef de projets scientifiques – Anses

Contribution scientifique

M. Laurent BODIN - Chef de projets scientifiques – Anses

Mme Alice BROUSSE - Stagiaire - Anses

Mme Sandrine CHARLES - Chef de projets scientifiques – Anses

Mme Pauline GUILLOU – Chargée de projets scientifiques – Anses

Mme Aurélie MATHIEU-HUART – Chef de projets scientifiques – Anses

Mme Olivia ROTH – Chargée de projets scientifiques - Anses

Mme Camille ROY – Stagiaire - Anses

Secrétariat administratif

Mme Séverine BOIX-PETRE – Anses

SOMMAIRE

Présentation des intervenants	3
Sigles et abréviations	9
Liste des tableaux	13
Liste des figures	14
Glossaire	15
1 Contexte, objet et modalités de réalisation de l'expertise.....	20
1.1 Contexte et objet	20
1.2 Modalités de traitement : moyens mis en œuvre et organisation	21
1.3 Prévention des risques de conflits d'intérêts.	21
2 Définition et généralités	22
2.1 Définition d'une VTR	22
2.2 Identification de la voie d'exposition	24
2.3 Durée et période d'exposition : validité de la VTR	25
3 Etablissement du profil toxicologique	27
3.1 Identification de la substance	27
3.2 Définition du profil toxicologique	28
3.3 Choix des données	28
3.4 Toxicocinétique	29
3.5 Toxicité générale	31
3.5.1 Toxicité chez l'Homme.....	31
3.5.1.1 Les types d'études chez l'Homme.....	31
3.5.1.2 Prise en compte des biais en épidémiologie	33
3.5.2 Toxicité chez l'animal.....	34
3.5.2.1 Toxicité aiguë	35
3.5.2.2 Toxicité subchronique	35
3.5.2.3 Toxicité chronique	36
3.5.3 Génotoxicité	36
3.5.4 Cancérogénicité	40
3.5.5 Reprotoxicité et effet sur le développement	41
3.5.6 Cohérence animal-Homme et détermination du mode d'action	42

4	Recueil des valeurs toxicologiques de référence	43
5	Proposition de VTR	44
5.1	Choix de l'effet critique	45
5.2	Choix de l'hypothèse de construction	47
5.3	Analyse des VTR existantes	49
5.4	Construction de la VTR	49
5.4.1	Choix de l'étude clé.....	49
5.4.1.1	Données humaines	50
5.4.1.2	Données animales.....	50
5.4.1.3	Cotation de l'étude clé.....	51
5.4.1.4	Cas particulier : transposition voie à voie	52
5.4.1.5	Cas particulier : utilisation de méthodes alternatives (QSAR, lecture croisée).....	53
5.4.1.6	Position du CES sur le choix de l'étude clé	54
5.4.2	Choix de la dose critique.....	55
5.4.2.1	NOAEL/C et LOAEL/C	55
5.4.2.2	Benchmark dose/concentration.....	57
5.4.2.1	Position du CES sur le choix de la dose critique	61
5.4.3	Ajustement temporel.....	61
5.4.4	Ajustement allométrique ou dosimétrique.....	62
5.4.4.1	Modèle PBPK.....	62
5.4.4.2	Méthode de l'US EPA.....	63
5.4.4.2.1	Voie orale.....	63
5.4.4.2.2	Voie respiratoire	64
5.4.4.3	Position du CES sur l'ajustement allométrique.....	66
5.4.5	Effets à seuil : choix des facteurs d'incertitude et calcul de la VTR	66
5.4.5.1	Choix des facteurs d'incertitude	66
5.4.5.1.1	Facteur d'incertitude lié à la variabilité inter-espèces : UF_A	68
5.4.5.1.2	Facteur d'incertitude lié à la variabilité interindividuelle : UF_H	69
5.4.5.1.3	Facteur d'incertitude lié à l'usage d'un LOAEL/C : $UF_{L/B}$	70
5.4.5.1.4	Facteur d'incertitude lié à une transposition subchronique à chronique : UF_S	70
5.4.5.1.5	Autres facteurs d'ajustement : UF_D	70
5.4.5.1.1	Position du CES sur le choix des facteurs d'incertitude	71
5.4.5.2	Construction de la VTR à seuil	73
5.4.6	Effets sans seuil.....	74
5.4.6.1	Calcul d'un excès de risque unitaire.....	74
5.4.6.2	Cumul des incidences tumorales.....	77
5.4.6.3	Applicabilité des VTR sans seuil aux enfants	77
5.4.6.4	Position du CES sur la construction de VTR sans seuil	79
5.4.7	Approche hybride : harmonisation des approches à seuil et sans seuil.....	79
5.4.8	Niveaux de confiance d'une VTR	84
5.4.8.1	Revue des approches proposées par différents organismes	84
5.4.8.2	Recommandations du CES	84
5.5	Présentation des VTR	86

6	Valeur toxicologique de référence interne	88
7	Valeur toxicologique indicative	89
8	Processus de révision des VTR	90
9	Conclusions et perspectives	91
10	Bibliographie	93
ANNEXES		103
Annexe 1 : Suivi des actualisations du rapport		104
Annexe 2 : Grille de lecture des études toxicologiques <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i>		105
Annexe 3 : Grille de lecture des études épidémiologiques		108
Annexe 4 : Evaluation des études de toxicité selon Klimisch		110
Annexe 5 : Tests de génotoxicité		113
Annexe 6 : Grille d'analyse des tests <i>in vitro</i> de génotoxicité		116
Annexe 7 : Effets cancérogènes et mécanismes		117
Annexe 8 : Effets néfastes reprotoxiques à prendre en compte		123
Annexe 9 : Modèle de tableau de synthèse des VTR à seuil et sans seuil		126
Annexe 10 : Synthèse des positions des différents organismes sur l'applicabilité des VTR aux enfants		127
Annexe 11 : Questions incluses dans ToxRTool pour l'évaluation de la qualité des études <i>in vivo</i>		156
Annexe 12 : Revue des méthodes de construction des VTR cancérogène sans seuil		158
Annexe 13 : Méthodes de fixation des niveaux de confiance des VTR proposées par les différents organismes nationaux et internationaux		161
Annexe 14 : Outil de fixation des niveaux de confiance		164

Sigles et abréviations

ADAF	Age-Dependent Adjustments factors
ADELFF	Association des Épidémiologistes de Langue Française
ADEREST	Association pour le Développement des Études et Recherches en Épidémiologie sur la Santé au Travail
ADN	Acide Désoxyribonucléique
AEEMA	Association pour l'Étude de l'Épidémiologie des Maladies Animales
AEGL	Acute Exposure Guideline Levels for Airborne Chemicals
Afsset	Agence Française de Sécurité Sanitaire de l'Environnement et du Travail
AFNOR	Association française de normalisation
AIC	Critère d'Akaiké
ALARA	As low as reasonably achievable
Anses	Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail
AOP	Adverse Outcome Pathway
ASF	Age-sensitivity Factor
ATSDR	Agency for Toxic Substances and Disease Registry
BMD/C	Benchmark dose/concentration
BMDxLy	Limite inférieure de l'intervalle de confiance à y% de la benchmark dose associée à x%
BMR	Benchmark Response
BPE	Bonnes Pratiques en Épidémiologie
CAS	Chemical Abstract Service
CES	Comité d'Experts Spécialisé
ChRC	Child Reference Concentration
ChRD	Child Reference Dose
CICAD	Concise International Chemical Assessment Document
CIRC	Centre International de Recherche sur le Cancer (= IARC : International Agency for Research on Cancer)
CLP	Classification, Labelling and Packaging
COT	Committee on Toxicity (Royaume-Uni)
CYP	Cytochrome P450
Danish EPA	Danish Environmental Protection Agency (Agence de protection de l'environnement danoise)
DJA	Dose Journalière Admissible
DECOS	Dutch Expert Committee on Occupational Safety
DEN	Di-Ethyl-N-nitrosamine
DMT	Dose maximale Tolerable
DNEL	Derived No Effect Level (Dose dérivée sans effet)
DT ₀₅	Dose tumorigène 5%

ECETOC	European Centre of Ecotoxicology and Toxicology
ECHA	European Chemicals Agency (= Agence européenne Européenne des substances Substances Chimiques)
EFSA	European Food Safety Agency (= Autorité européenne de sécurité des aliments)
ELR	Excess lifetime risk (= excès de risque vie entière)
ENU	N-éthyl-N-nitrosourée
EPITER	Association pour le développement de l'Épidémiologie de Terrain
EQRS	Évaluation Quantitative de Risques Sanitaires
ERI	Excès de Risque Individuel
ERU	Excès de Risque Unitaire
FAD	Facteur d'Ajustement Dosimétrique
FDA	Food and Drug Administration
FEL	Frank effect level
FoBIG	Forschungs- und Beratungsinstitut Gefahrstoffe
GRADE	Grading of Recommendations Assessment, Development and Evaluation
HAP	Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques
HED/C	Human Equivalent Dose/Concentration
HGV	Health Guidance Value (= valeur guide sanitaire)
IC	Intervalle de Confiance
ICD	International classification of diseases
ICH	International Conference on Harmonisation
INERIS	Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques
IPCS	International Programme on Chemical Safety (Programme international sur la sécurité chimique)
IRIS	Integrated Risk Information System
ITER	International Toxicity Estimates for Risk assessment
IUPAC	Union Internationale de Chimie Pure et Appliquée
JECFA	Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives
KEMI	Kemikalieinspektionen (= Agence suédoise des produits chimiques)
LMS	Linearised MultiStage (= Modèle linéaire multi-étapes)
LOAEL/C	Lowest Observed Adverse Effect Level/Concentration (= Dose/Concentration minimale entraînant un effet néfaste observé)
LSIP	Liste de substances d'intérêt prioritaire réalisée par Santé Canada
MNU	N-méthylnitrosourée
MOA	Mode Of Action (=mode d'action)
MOE	Margin Of Exposure (= marge d'exposition)
MPR	Maximum Permissible Risk
MRL	Minimum Risk Level

NACAD	North American Control Animal Database
NICNAS	National Industrial Chemicals Notification and Assessment Scheme
NHANES	National Health and Nutrition Examination Survey
NHMRC	National health and medical research council (Australie)
NOAEL/C	No Observed Adverse Effect Level/Concentration (= Dose/concentration maximale n'entraînant pas d'effet néfaste observé)
NRC	National Research Council
NTP	National Toxicological Program
OCDE	Organisation de Coopération et de Développement Economiques
OEHHA	Office of Environmental Health Hazard Assessment (équivalent à Cal-EPA : California Environmental Protection Agency)
OHAT	Office of Health Assessment and Translation
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OPPTS	Office of Prevention Pesticides and Toxic Substances
OR	Odds Ratio
PBPK	Physiologically-Based Pharmacokinetic
PBTK	Physiologically-Based Toxicokinetic
PND	Post Natal Day
POD	Point de depart (= Point Of Departure)
QSAR	Quantitative Structure Activity Relationship
REACH	Registration Evaluation Authorisation and Restriction of Chemical substances
REL	Reference Exposure Level
RENI	Registry Nomenclature Information System
RfD/RfC	Reference Dose/Concentration
RITA	Registry of Industrial Toxicology Animal-data
RIVM	Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (Institut National Hollandais pour la Santé Publique et l'Environnement)
RR	Risque Relatif
SAR	Structure Activity Relationship (Relation Structure Activité)
Scirap	Science in Risk Assessment and Policy
SCF	Scientific Committee on Food
SIR	Ratio d'incidence standardisé
SMR	Ratio de mortalité standardisé
STP	Society of Toxicologic Pathology
TCEQ	Texas Commission on Environmental Quality
ToxRtool	Toxicological data Reliability assessment Tool
TTC	Threshold of Toxicological Concern
UBA	Umweltbundesamt (= Bureau Fédéral de l'Environnement Allemand)

UE	Union Européenne
UF	Uncertainty Factor (Facteur d'incertitude)
UF _A	Facteur d'incertitude inter-espèces
UF _D	Facteur d'incertitude au manque de données
UF _H	Facteur d'incertitude interindividuel
UF _{H-TK}	Composante toxicocinétique du facteur d'incertitude interindividuel
UF _{H-TD}	Composante toxicodynamique du facteur d'incertitude interindividuel
UF _{B/L}	Facteur d'incertitude lié à l'utilisation d'un LOAEL ou d'une BMD
UF _S	Facteur d'incertitude lié à la transposition subchronique à chronique
US EPA	United States Environmental Protection Agency
VGAI	Valeur Guide de Qualité d'Air Intérieur
VLB	Valeur limite biologique
VLEP	Valeur limite d'exposition professionnelle
VTi	Valeur toxicologique indicative
VTR	Valeur Toxicologique de Référence
WoE	Weight of Evidence (= poids de la preuve)

Liste des tableaux

Tableau 1 : Applications des différents types d'études épidémiologiques _____	31
Tableau 2 : Pondération des preuves selon les « endpoints » (Brusick <i>et al.</i> , 2016) _____	40
Tableau 3 : Niveau de sévérité des effets considérés par l'US EPA pour dériver une VTR par inhalation (Reference Concentration ou RfC) (adapté de DeRosa <i>et al.</i> , 1985 et Hartung, 1986) (US EPA, 1994b) _____	46
Tableau 4 : Facteurs d'incertitude proposés dans la littérature pour la construction de valeurs de référence _____	67
Tableau 5 : Valeurs des facteurs d'incertitude à appliquer pour la construction de VTR _____	73
Tableau 6 : Méthodes de construction des VTR cancérigènes sans seuil _____	75
Tableau 7 : Niveaux de confiance des VTR selon différents organismes nationaux et internationaux _____	84
Tableau 8 : Tableau de synthèse de VTR à seuil et sans seuil _____	86
Tableau 9 : Critères pour la cotation de Klimisch <i>et al.</i> (1997) _____	112
Tableau 10 : Tests pour l'évaluation du potentiel génotoxique d'une substance _____	114
Tableau 12 : Principales différences toxicocinétiques entre l'enfant et l'adulte (Danish EPA, 2001 ; RIVM, 2002 ; KEMI, 2003 ; ECETOC, 2005 ; OMS, 2006 ; OEHHA, 2008 ; INERIS, 2010) _____	128
Tableau 13 : Tableau des Child-specific References Dose (ChRD) établies par l'OEHHA _____	140
Tableau 14 : Synthèse des méthodes de construction des VTR à seuil applicables aux enfants _____	141
Tableau 15 : Liste des substances considérées dans l'analyse quantitative pour lesquelles des expositions chez des animaux juvéniles et à l'âge adulte sont rapportées dans une même expérience _____	146
Tableau 16 : Résumé des estimations quantitatives des ratios des risques de cancer chez l'enfant par rapport aux adultes (US EPA, 2005b) _____	147
Tableau 17 : Critères correspondant aux différentes étapes de construction d'une VTR et leur subdivision en sous-critères (ou détails du critère) _____	168
Tableau 18 : Niveaux de confiance pour les sous-critères du critère "choix de l'effet critique" dans le cas de VTR basées sur des effets non cancérigènes _____	171
Tableau 19 : Niveaux de confiance pour la convergence des études _____	172
Tableau 20 : Niveaux de confiance pour les deux hypothèses de construction dans le cas de VTR basées sur des effets cancérigènes (Afsset, 2010) _____	174
Tableau 21 : Niveaux de confiance associés à l'hypothèse de construction, dans le cas des VTR basées sur des effets non cancérigènes _____	175
Tableau 22 : Correspondance entre la cotation de Klimisch et le niveau de confiance associé à la qualité de l'étude clé _____	175
Tableau 23 : Niveaux de confiance associé au sous-critère "durée de l'étude" dans le cas où la durée de l'étude diffère de celle de validité de la VTR _____	176
Tableau 24 : Niveaux de confiance proposés pour le sous-critère « durée de l'étude », dans le cas de la construction d'une VTR chronique _____	176
Tableau 25 : Niveaux de confiance associés à la dose critique _____	177
Tableau 26 : Niveaux de confiance associés à l'ajustement allométrique _____	178
Tableau 27 : Niveaux de confiance associés à l'UF _H _____	178
Tableau 28 : Niveaux de confiance associés à l'extrapolation voie-à-voie _____	179

Liste des figures

Figure 1 : Schéma décisionnel permettant d'aboutir à l'hypothèse de construction des VTR cancérogènes	48
Figure 2 : Relation dose – réponse et recherche du LOAEL	56
Figure 3 : Relation dose-réponse et définition de la BMD et de la BMDL (EFSA, 2009)	58
Figure 4 : Illustration graphique de la détermination des excès de risque individuels à partir d'une Benchmark-Dose à 10%	76
Figure 5 : Nouvelle démarche pour l'évaluation de la relation dose-réponse	80
Figure 6 : Nouveau schéma de construction des VTR.	81
Figure 8 : Schéma global de l'approche TTC appliquée par l'EFSA (EFSA, 2012)	133
Figure 9 : Arbre de décision pour évaluer les risques chez les enfants (RIVM, 2007)	137
Figure 10 : Représentation schématique des différents protocoles d'étude de cancérogénèse rapportés dans la revue de la littérature (Barton <i>et al.</i> , 2005)	145
Figure 11 : Représentation graphique des ratios des risques cancérogènes chez l'enfant par rapport aux adultes (moyenne géométrique et 95 ^{ème} percentile) calculés pour des substances cancérogènes mutagènes (A – études répétées et vie entière, B- études aiguës) (Barton <i>et al.</i> , 2005)	148
Figure 12 : Arbre décisionnel pour l'évaluation des risques chez l'enfant utilisant l'approche mode d'action (US EPA, 2005b)	150
Figure 13 : Liste des 23 substances cancérogènes classées selon leur mécanisme d'action génotoxique (OEHHA, 2009)	152
Figure 14 : « LP ratio mixture distribution » pour les études prénatales (OEHHA, 2009)	153
Figure 15 : Dependance à l'âge de la survenue de cancer (OEHHA, 2009)	154
Figure 16 : Distributions des « ASF mixture distributions » pour les études prénatales, post-natales et juvéniles (OEHHA, 2009)	154
Figure 7 : Détermination du POD et extrapolation linéaire aux faibles doses	159
Figure 17 : Représentation schématique de la division du continuum de confiance en cinq niveaux et terminologie qualitative correspondante	167
Figure 18 : Représentation du calcul du niveau de confiance associé aux VTR basées sur des effets non cancérogènes	169

Glossaire

Ajustement allométrique

L'ajustement allométrique est une approche empirique pour l'extrapolation espèce à espèce des doses. Partant du postulat que les différentes espèces auraient la même sensibilité à une dose donnée par unité de surface corporelle (proportionnelle à son poids moyen porté à la puissance un quart), ce calcul permet d'ajuster la dose d'exposition critique retrouvée chez l'animal pour déterminer une dose équivalente humaine.

Benchmark dose/concentration

Dose produisant un effet mesurable correspondant à un niveau de réponse donné par rapport à un groupe témoin.

Etude épidémiologique

Les études épidémiologiques peuvent être classées en 2 catégories : les études expérimentales où le chercheur détermine le facteur à étudier pour ensuite observer l'effet dans des conditions proches de l'expérience de laboratoire et les études d'observation où le chercheur ne fait qu'analyser une réalité qu'il n'a pas choisie. Les études d'exposition en chambre à atmosphère contrôlée et les essais cliniques relèvent de ce premier groupe. Les études cas-témoins, les études de cohorte et les études transversales relèvent du second.

Etude cas-témoins

Etude épidémiologique observationnelle de sujets atteints d'une maladie ou d'un symptôme d'intérêt (appelés les cas) et de sujets exempts de cette maladie (appelés témoins). Le lien potentiel entre la maladie et le facteur de risque suspecté (exposition à un produit chimique, par exemple) est examiné en comparant la fréquence du facteur de risque chez les cas et chez les témoins ou le niveau d'exposition chez les cas et chez les témoins si celle-ci est estimée quantitativement. Le résultat de cette comparaison s'exprime par un Odds ratio (OR) autrement dit, le rapport des cotes de l'exposition chez les cas et les témoins. Généralement, les études cas-témoins sont rétrospectives, allant de l'apparition de la maladie vers la reconstitution de l'exposition qui pouvait la précéder. L'objectif est analytique : il s'agit de mettre en évidence un ou plusieurs facteurs qui pourraient être soit facteurs de risque (si $OR > 1$), soit facteurs de protection ($OR < 1$) et de les interpréter en tant que facteurs de causalité ou facteurs étiologiques.

Etude écologique

Etude dont l'unité d'observation et d'analyse est une population ou un groupe d'individus et non des individus. Le plus souvent les données sont agrégées au niveau géographique. Un exemple d'étude écologique est l'étude de la relation entre la distribution de revenu et la mortalité selon les régions. Les conclusions des études écologiques ne s'appliquent pas forcément aux individus, c'est pourquoi leur interprétation nécessite des précautions, notamment pour éviter le biais

écologique. Les études écologiques sont pertinentes lors de l'implémentation ou de l'évaluation d'une politique ou d'une action sanitaire, lorsque celles-ci affectent des groupes ou des régions mais pas pour évaluer les effets sanitaires d'une exposition à une substance.

Etude transversale

Etude où l'investigateur mesure simultanément la maladie et ses facteurs de risque potentiels (dont l'exposition) dans un échantillon représentatif d'une population d'intérêt. Le but est de surveiller l'importance de la maladie et de l'exposition dans la population et d'explorer les liens entre exposition et maladie. Ce type d'étude apporte généralement un niveau de preuve limité d'une relation causale entre exposition et maladie. Les études NHANES aux USA fournissent un bon exemple d'étude transversale.

Etude de cohorte

Le principe des études de cohorte est de comparer l'incidence (nombre de nouveaux cas par unité de temps) d'une pathologie dans un groupe de personnes exposées à sa valeur dans un groupe de personnes non exposées pris comme référence. Les sujets sont inclus dans l'enquête au moment de leur exposition et sont suivis au cours du temps pour recueillir des informations sur cette exposition et sur l'apparition éventuelle de la maladie. Les études de cohorte peuvent être retrospectives, allant de l'apparition de la maladie vers la reconstitution de l'exposition qui la précède ou prospective, lorsque les sous-groupes composants la cohorte sont définis et suivis en amont de l'apparition des maladies. Le terme de « cohorte historique » est le synonyme de « cohorte prospective ». L'objectif est analytique (mise en évidence de facteurs causaux).

Evaluation quantitative du risque sanitaire (EQRS)

L'EQRS est un outil d'aide à la décision qui vise dans une situation d'incertitudes à organiser les connaissances disponibles afin de statuer sur le niveau de risque collectif pour la santé qu'induit une exposition d'individus à des substances ou à des situations dangereuses.

Les principes de l'évaluation des risques sanitaires sont les suivants :

Le principe de prudence scientifique : il consiste à adopter, en cas d'absence de données reconnues, des hypothèses raisonnablement majorantes définies pour chaque cas à prendre en compte.

Le principe de proportionnalité : il veille à ce qu'il y ait cohérence entre le degré d'approfondissement de l'étude et l'importance des incidences prévisibles de la situation supposée à risque. Ce principe peut conduire à définir une démarche par approches successives dans l'évaluation.

Le principe de spécificité : il assure la pertinence de l'étude par rapport à l'usage et aux caractéristiques d'une situation particulière. L'EQRS doit prendre en compte le mieux possible les caractéristiques propres de la source de pollution, des populations potentiellement exposées et de leur lieu de vie,

Le principe de transparence : les hypothèses, outils utilisés, font l'objet de choix cohérents et expliqués par l'évaluateur, afin que la logique du raisonnement puisse être suivie et discutée par les différentes parties intéressées.

Le processus passe par quatre étapes :

- identification du danger ;
- évaluation de la réponse (en fonction de la dose) ;
- évaluation de l'exposition ;
- caractérisation du risque.

Incidence

Valeur correspondant au nombre de nouveaux cas d'une pathologie donnée survenus dans une période donnée dans une population ou sous-population donnée.

Indicateurs épidémiologiques

Les indicateurs de risques les plus utilisés en épidémiologie sont :

- le risque relatif (RR) : le rapport entre la probabilité d'être atteint d'une pathologie pour les individus exposés et la probabilité d'être atteint pour les non exposés ;
- odds ratio (OR) (« rapport des cotes ») : équivalent au risque relatif dans le cas des pathologies rares. Il permet d'estimer ce dernier lorsque les probabilités ci-dessus ne sont pas estimables, notamment dans le cas des études cas-témoins ;
- le rapport de mortalité ou d'incidence standardisé (SMR : *Standardised Mortality Ratio* ou SIR : *Standardised Incidence Ratio*) est le rapport du nombre de décès (ou de nouveaux cas pour le SIR) observés sur le nombre attendu si la mortalité (ou l'incidence pour le SIR) de la population étudiée était la même que celle de la population de référence.

Pour ces trois indicateurs, la valeur 1 correspond à un risque égal entre les populations comparées. Lorsque l'indice (RR, OR, SMR ou SIR) est supérieur à 1, le risque de survenue de l'événement de santé est supérieur dans le groupe « exposé » à sa valeur dans le groupe non exposé. Des intervalles de confiance accompagnent généralement ces indices pour faciliter leur interprétation.

LOAEL/C

Dose/concentration minimale entraînant un effet biologique ou sanitaire, considéré comme néfaste statistiquement significatif par rapport au témoin.

Modèle PBPK

Les modèles pharmacocinétiques à base physiologique (PBPK pour Physiologically-Based Pharmacokinetic) sont des modèles mathématiques qui permettent de décrire l'absorption, la distribution, le métabolisme, et l'excrétion d'un composé au sein d'un organisme donné. Le corps est décrit comme un ensemble de compartiments (modèle conceptuel) pouvant ou non être regroupés entre eux selon leurs caractéristiques physiologiques. Les interconnexions entre ces différents compartiments sont représentées par les échanges sanguins (circulation systémique) entre les différents organes. Le flux des substances est modélisé par un système d'équations différentielles décrivant la quantité d'une substance chimique dans les différents organes en

fonction du temps. Des paramètres physiologiques comme le flux sanguin, le volume des organes, les coefficients de partage ou encore le taux de ventilation sont utilisés pour paramétrer le modèle.

NOAEL/C (No-Observed-Adverse-Effect Level/Concentration)

Dose/concentration maximale n'entraînant pas d'effet biologique ou sanitaire néfaste statistiquement significatif par rapport au groupe témoin, issue de l'identification du LOAEL/C. Autrement dit, il s'agit de la dose testée qui précède directement le LOAEL/C.

Numéro CAS

Numéro d'enregistrement d'une substance auprès de la banque de données du Chemical Abstract Service, qui est une division de l'American Chemical Society. Un numéro unique et spécifique est ainsi assigné à chaque substance qui a été décrite dans la littérature.

Méta-analyse

Démarche statistique combinant les résultats d'une série d'études indépendantes sur un problème donné pour évaluer un indicateur épidémiologique avec une meilleure puissance statistique. L'hypothèse sous jacente est que les études sélectionnées à partir d'une revue systématique de la littérature, sont autant d'échantillons d'une même population. L'indicateur épidémiologique va dans le même sens dans les différentes études mais n'atteint pas toujours le seuil de significativité en raison d'un manque de puissance.

Le terme de « méta-analyse sur données individuelles » désigne une ré-analyse des données individuelles de plusieurs études rassemblées pour constituer un seul jeu de données.

Prévalence

Valeur incluant tous les cas dénombrés d'une pathologie sur une période donnée, indépendamment du moment de leur apparition.

Revue systématique

Une revue systématique de la littérature scientifique consiste à assembler, évaluer et synthétiser de manière exhaustive toutes les études pertinentes, parfois contradictoire, qui abordent une question précise. Une revue systématique est basée sur la rédaction d'un protocole détaillé au préalable favorisant la transparence de la démarche et sa reproductibilité.

QSAR (Quantitative structure-activity relationship)

Les modèles de relation (quantitative) structure-activité (Q)SAR ont pour but de prédire un effet expérimental (activité biologique, toxicité, affinité pour un récepteur) en s'appuyant sur l'analyse des activités de composés chimiques précédemment testées.

Les relations structure-activité (SAR) sont des prédictions qualitatives souvent sous la forme d'alerte de structure chimique. Les alertes structurales sont définies par des sous-structures moléculaires ou des groupements fonctionnels moléculaires qui sont connus pour être associés à des propriétés biologiques ou toxiques.

L'analyse QSAR pour Relation quantitative structure à activité consiste à établir une relation mathématique à l'aide de méthodes d'analyse de données, reliant les caractéristiques de la structure chimique d'une molécule à un effet expérimental.

Valeur toxicologique indicative (VTi)

Repère toxicologique pouvant être utilisé pour l'évaluation d'un risque. Il s'agit d'une valeur indicative moins robuste que la VTR présentant ainsi un niveau de confiance faible.

1 Contexte, objet et modalités de réalisation de l'expertise

1.1 Contexte et objet

Dans le cadre de ses missions d'expertise scientifique collective et multidisciplinaire et d'élaboration de recommandations en appui aux autorités compétentes, l'Agence¹ a engagé depuis 2004 un programme national de construction et de validation de valeurs toxicologiques de références (VTR).

L'objectif de ce guide est, en s'appuyant sur l'existant, de fournir un socle commun d'information permettant d'encadrer l'élaboration des VTR afin de proposer des VTR de manière cohérente et reproductible et de comprendre le travail d'élaboration des VTR par l'Anses. Ce document constitue une actualisation d'une version précédente élaborée en septembre 2015 (Anses, 2015) par l'ajout des nouveautés scientifiques et par l'intégration des informations nécessaires à la construction de VTR présentes dans deux guides déjà publiés :

- « Valeurs toxicologiques de référence pour les substances reprotoxiques. Méthode de construction de VTR fondées sur des effets toxiques pour la reproduction et le développement » (Afsset, 2007),
- « Valeurs toxicologiques de référence pour les substances cancérigènes. Méthode de construction de VTR fondées sur des effets cancérigènes » (Afsset, 2010b).

Ce guide permet d'expliquer aux décideurs et aux professionnels de santé publique les choix scientifiques des experts des Comités d'experts Spécialisés (CES). Il propose également une démarche pour établir un repère toxicologique pour une substance chimique pour laquelle il y a une insuffisance des données mais dont l'innocuité est mise en doute, intitulé Valeur toxicologique indicative (VTi).

En complément de ce guide actualisé pour l'élaboration des VTR, l'Anses a établi un document expliquant ses pratiques d'analyse et de choix de Valeurs sanitaires de référence élaborées par un autre organisme, afin de déterminer si elle peut être retenue dans le cadre d'une évaluation de risques spécifique (Anses, 2012a). Ce point ne sera pas traité dans ce guide.

¹ L'Anses a été créée le 1^{er} juillet 2010, Agence reprenant les missions de l'Agence française de sécurité sanitaire de l'alimentation (Afssa) et l'Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail (Afsset).

1.2 Modalités de traitement : moyens mis en œuvre et organisation

L'Anses a confié au comité d'experts spécialisé (CES) « Caractérisation des dangers des substances et valeurs toxicologiques de référence » l'instruction de cette saisine.

Les travaux d'expertise ont été soumis régulièrement au CES tant sur les aspects méthodologiques que scientifiques. Le rapport produit tient compte des observations et éléments complémentaires transmis par les membres du CES.

Ces travaux sont ainsi issus d'un collectif d'experts aux compétences complémentaires.

L'expertise a été réalisée dans le respect de la norme NF X 50-110 « Qualité en expertise – prescriptions générales de compétence pour une expertise (mai 2003) »

1.3 Prévention des risques de conflits d'intérêts.

L'Anses analyse les liens d'intérêts déclarés par les experts avant leur nomination et tout au long des travaux, afin d'éviter les risques de conflits d'intérêts au regard des points traités dans le cadre de l'expertise.

Les déclarations d'intérêts des experts sont publiées sur le site internet de l'agence (www.anses.fr).

2 Définition et généralités

L'évaluation quantitative des risques sanitaires (EQRS) est un outil d'aide à la décision qui vise dans une situation d'incertitudes à organiser les connaissances disponibles afin de statuer sur le niveau de risque collectif pour la santé qu'induit une exposition d'individus à des substances ou à des situations dangereuses.

La conduite d'une EQRS telle qu'initée dans les années 1980 aux Etats-Unis (NRC, 1983) et qui fait toujours référence, implique une démarche en 4 étapes :

- Identification des dangers,
- Définition des relations dose-réponse,
- Evaluation de l'exposition,
- Caractérisation des risques.

Les deux premières étapes qui visent à caractériser le danger ont pour objectif la proposition de valeurs toxicologiques de référence (VTR) lorsque les données disponibles sur les substances considérées le permettent.

2.1 Définition d'une VTR

Une VTR est une appellation générique regroupant tous les types d'indice toxicologique permettant d'établir une relation entre une dose et un effet (toxique à seuil d'effet) ou entre une dose et une probabilité d'effet (toxique sans seuil d'effet). Les VTR sont établies par des instances internationales (OMS, *etc.*), européennes (EFSA) ou des structures nationales (US EPA, RIVM, Santé Canada, *etc.*) (Dictionnaire de l'environnement).

Elles permettent d'évaluer des effets sanitaires éventuels d'une exposition à des substances chimiques.

Par définition, une VTR est construite pour l'effet le plus sensible jugé indésirable protégeant ainsi de l'ensemble des effets toxiques observés dans les études disponibles.

Les VTR sont spécifiques d'une substance, d'une durée et d'une voie d'exposition. Elles ne prennent pas en compte l'existence d'effets dus à des mélanges pouvant conduire à des interactions.

Les VTR s'appliquent à l'ensemble de la population, y compris les populations sensibles telles que les enfants, sauf mention contraire. Elles peuvent parfois être spécifiques d'un sous-groupe de la population.

Les VTR peuvent être utilisées dans le cadre des EQRS dans un contexte d'exposition donné et aider au choix de mesures de gestion des risques. Elles peuvent être également utilisées pour l'élaboration de valeurs guide (exemple : valeur guide d'air intérieur ou VGAI).

Le mode de construction des VTR dépend du corpus des données disponibles, des connaissances du ou des mécanismes d'action biologique des substances et d'hypothèses communément admises. On distingue ainsi :

- Les **VTR « à seuil de dose »** sont construites dans le cas de substances provoquant, au-delà d'une certaine dose, des dommages dont la sévérité augmente avec la dose absorbée. Sont classés dans cette catégorie principalement les effets non cancérogènes et cancérogènes non génotoxiques directs. Par exemple dans le cas des VTR chroniques, elles correspondent à une estimation de la quantité de substance à laquelle un individu peut théoriquement être exposé vie entière sans constat d'effet sanitaire néfaste et s'expriment comme des doses journalières ingérées ou des concentrations dans l'air inhalé.
- Les **VTR « sans seuil de dose »** sont construites dans le cas de substances pour lesquelles l'effet peut apparaître quelle que soit la dose reçue et où la probabilité de survenue augmente avec la dose. Il s'agit, pour l'essentiel, des effets cancérogènes génotoxiques directs. Elles se définissent comme une augmentation de la probabilité, par rapport à un sujet non exposé, qu'un individu exposé lors de sa vie entière à une unité de dose de la substance développe une pathologie. Elles s'expriment sous la forme d'un excès de risque unitaire (ERU).

Afin de prendre en compte les expositions de manière intégrée, il est également possible de proposer des « **VTR internes** ». Elle correspond à un indicateur qui peut être directement comparé aux concentrations d'une substance mesurées dans l'air exhalé, dans le sang ou dans l'urine par exemple. Dans ce cas, la dose critique retenue est convertie en dose interne en tenant compte de la biodisponibilité de la substance, i.e. du facteur d'absorption pour la voie orale, respiratoire ou cutanée et des paramètres physiologiques de l'espèce étudiée (Homme, rat, souris, etc.).

L'Anses propose également des **VTR reprotoxiques**. En effet, les effets sur la reproduction et le développement embryo-fœtal représentent un cas particulier. Ils sont considérés comme sévères car la période de l'embryogenèse est critique pour le développement du fœtus et une seule exposition, même très courte, et à une dose faible, est susceptible d'entraîner des conséquences irréversibles (cf. §3.5.5). Ainsi, une VTR établie sur un effet tératogène sera applicable sur une journée. Lors de la construction de VTR reprotoxiques, il est possible d'avoir un effet critique retenu autre que reprotoxique et qui apparaît à une plus faible dose que celui retenu. Cependant, construire une VTR pour un effet reprotoxique se justifie :

- d'une part car les effets sur le développement peuvent survenir pour des durées d'exposition particulières (fenêtre d'exposition courte) ;
- d'autre part car une réponse spécifique aux effets reprotoxiques peut être sollicitée compte tenu de son importance en santé publique.

2.2 Identification de la voie d'exposition

Les VTR sont spécifiques d'une voie d'exposition. On distingue plusieurs voies principales d'exposition :

- la voie respiratoire, pour des substances présentes dans l'air sous forme gazeuse ou particulaire (en fonction de la taille des particules) ;
- la voie orale, pour des substances ingérées ou présentes sous forme particulaire dans l'air qui sont alors dégluties (en fonction de la taille des particules) ;
- la voie cutanée, pour des substances directement en contact avec la peau ou présentes dans l'air (phase vapeur par exemple).

La plausibilité d'une exposition et les voies d'exposition chez l'Homme dépendent des propriétés physicochimiques de la substance étudiée (solubilité aqueuse, liposolubilité, volatilité, etc.) mais aussi des conditions d'utilisations (usages, contexte environnemental, etc.).

Pour les voies orales et respiratoires, il est important de tenir compte des différences anatomiques et physiologiques entre l'Homme et l'animal et de déterminer, lors de l'extrapolation de l'animal vers l'Homme, une concentration ou dose équivalente chez l'Homme au moyen d'un ajustement allométrique (cf. §5.4.4).

- Voie respiratoire

En cas d'exposition environnementale, l'absorption par les voies respiratoires est souvent la voie prépondérante pour des substances volatiles. La dose d'exposition est estimée à partir de la concentration de la substance dans l'air inhalé. La quantité réellement absorbée (ou dose interne) dépendra de différents facteurs extrinsèques (concentration atmosphérique, durée d'exposition, propriétés physicochimiques) et de facteurs intrinsèques (ventilation pulmonaire du sujet, coefficient de rétention, coefficient de partage sang-air, etc.).

- Voie orale

En cas d'exposition environnementale, la contribution de la voie orale peut être plus difficile à estimer pour ce qui concerne les substances présentes dans les différents compartiments de l'environnement (eau, aliments, poussières, etc.). Cependant, cette voie d'exposition peut être importante pour certaines catégories de la population (par exemple le cas des jeunes enfants avec un contact main-bouche important) ou dans certaines situations d'exposition (par exemple le cas des piscines ou encore la douche).

- Voie cutanée

La voie cutanée est une voie d'exposition potentielle. Elle concerne principalement les substances qui ont un taux d'absorption transdermique important.

Des travaux méthodologiques sur la construction de VTR cutanée ont été réalisés. En effet, en 2008, une proposition d'une méthode préliminaire d'élaboration de VTR cutanées a été développée par l'Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (INERIS) pour les **effets sensibilisants** après une application sur la peau (INERIS, 2009a). Puis en 2009, l'INERIS a

publié une méthode de construction de VTR/DNEL² à seuil pour les **effets corrosifs** dus à une exposition cutanée aiguë à partir de tests *in vitro* (INERIS, 2009b).

Cependant, aucun organisme ne construit de VTR pour une exposition cutanée en raison notamment du peu d'études expérimentales conduites par cette voie. Toutefois, quelques VTR cutanées ou DNEL cutanées sont proposées après une extrapolation de voie à voie, le plus souvent de la voie orale à la voie cutanée.

2.3 Durée et période d'exposition : validité de la VTR

Les VTR doivent être définies en fonction de la fréquence de l'exposition : par journée, par semaine et parfois lors de périodes particulières de la vie. Elles sont donc construites pour des durées d'exposition précises. Néanmoins, on suppose un scénario d'exposition continu le long de la période retenue.

Généralement, en évaluation des risques sanitaires chez l'Homme, on distingue trois types de durée d'exposition. L'Anses a décidé de retenir de façon pragmatique les mêmes durées d'application que l'ATSDR (Chou *et al.*, 1998) :

- Pour les expositions aiguës, de 1 à 14 jours ;
- Pour les expositions subchroniques, de 15 à 364 jours ;
- Pour les expositions chroniques, à partir de 365 jours.

Néanmoins, si cela est jugé pertinent, ces durées d'application pourront être différentes pour certaines substances spécifiques et devront être justifiées.

La nature de la VTR (aiguë, subchronique, chronique) est déterminée en partie par la durée d'exposition des études toxicologiques mais également des besoins en EQRS.

Pour les études animales, la durée d'exposition est indiquée dans les protocoles expérimentaux standardisés (OCDE, ICH, NTP, *etc.*). A titre d'information, chez le rongeur, la toxicité aiguë est étudiée après une exposition courte jusqu'à quelques heures (lignes directrices OCDE n°401, 402, 403), la toxicité subaiguë par une exposition répétée sur quelques jours (jusqu'à 28 jours) (ligne directrice OCDE n°407, 410, 412), la toxicité subchronique par une exposition pendant 90 jours (lignes directrices OCDE n°408, 411, 413) et la toxicité chronique lors d'expositions répétées supérieures à 90 jours et généralement d'une durée d'au moins un an (lignes directrices OCDE n° 452 et 453). Les effets cancérogènes sont étudiés par une exposition répétée de 2 ans (lignes directrices OCDE n° 451, 453).

• Cas particulier des effets reprotoxiques

Les expositions pendant des périodes particulières de la vie par exemple, lors de la période fœtale, embryonnaire, voire préconceptionnelle (1-3 mois avant la conception), ainsi que pendant l'enfance peuvent constituer des périodes à risques vis-à-vis de certains effets. Les effets

² DNEL : Dose dérivée sans effet (Derived No Effect Level) correspond à une dose maximale calculée pour laquelle aucun effet néfaste ne devrait apparaître. Elles sont dérivées dans le cadre du règlement REACH.

reprotoxiques (période périnatale et péripubertaire) surviennent après des durées d'exposition plus ou moins longues correspondant à des périodes différentes du cycle de la reproduction, chez l'homme et chez la femme. On parlera ici de fenêtre de sensibilité. Par exemple, lors d'une grossesse, il peut suffire d'une exposition unique ou sur une seule journée pour provoquer une atteinte fœtale. Pour la fertilité, les effets peuvent survenir pour des expositions de plusieurs semaines, voire plus. Il est donc important de tenir compte de ces éléments lors de la construction de VTR ainsi que du type d'étude, de la durée d'exposition et de la période d'exposition.

Au final, il est important de bien caractériser les types de toxicité liés à une substance (effet sur le développement, fertilité) et la durée d'exposition sur lesquels s'appuiera la construction des VTR, car leur champs d'application ne sera pas le même. Il sera ainsi possible de construire, pour une même substance, des VTR reprotoxiques pour des durées d'exposition aiguë, subchronique ou chronique, en fonction des effets mis en évidence. Ces durées d'exposition devront être clairement explicitées pour chacune des VTR construites.

3 Etablissement du profil toxicologique

3.1 Identification de la substance

Les substances chimiques pour lesquelles l'Anses élabore des VTR, peuvent être de nature minérale ou organique, se présenter sous forme de liquide, de gaz, de vapeurs ou d'aérosols constitués de particules solides ou liquides ou de fibres.

La première partie du rapport explicite les conditions et les propriétés physico-chimiques de la substance. Ce paragraphe générique permet d'identifier la substance *via* son numéro CAS (Chemical Abstract Service) et son numéro CE. Quand l'objectif est de fixer des VTR pour une substance et ses sels (cas des métaux par exemple), tous les numéros CAS concernés doivent être mentionnés.

Le nom chimique de la substance selon la nomenclature internationale ainsi que les synonymes couramment utilisés sont cités. **Dans ce document, la substance sera toujours nommée selon sa dénomination officielle établie par l'Union Internationale de Chimie Pure et Appliquée (IUPAC). Des noms particuliers, consacrés par l'usage, mais non conformes à la nomenclature systématique sont tolérés.**

Les propriétés physico-chimiques d'une substance peuvent permettre de prédire son comportement dans l'organisme ou influencer les paramètres toxicocinétiques d'absorption par exemple. Ainsi, l'identification précise de ces propriétés doit être prise en compte lors de l'interprétation des études disponibles. La substance devra également être qualifiée de la façon la plus précise, en particulier s'il existe des impuretés qui lui sont communément associées. En effet, l'évaluation du degré de pureté de la substance testée participe à l'interprétation des résultats observés. Les propriétés physico-chimiques doivent mentionner si disponible, la forme physique, le poids moléculaire, le point de fusion, le point d'ébullition, le point d'éclair, la densité, la pression de vapeur, le facteur de conversion entre ppm et mg.m⁻³ ou mg/kg (à 20°C sous une pression de 101,3kPa), la solubilité dans l'eau et les solvants organiques, le logK_{ow} et le niveau de perception olfactive même si ce dernier est relativement subjectif.

La classification réglementaire européenne est citée ainsi que les mentions de danger telles que définies à l'annexe I du règlement européen n°1272/2008³. Par ailleurs, pour l'effet cancérigène, la classification du Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) est citée. Les autres classifications existantes (US EPA, OEHHA, NTP, etc.) pourront être indiquées.

³ Règlement (CE) No 1272/2008 du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008 relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges, modifiant et abrogeant les directives 67/548/CEE et 1999/45/CE et modifiant le règlement (CE) no 1907/2006

Les informations générales sur les expositions et l'utilisation de la substance (tonnage, usages, *etc.*) sont indiquées afin de mieux appréhender la substance et comprendre les possibles utilisations de la VTR élaborée par l'Anses.

3.2 Définition du profil toxicologique

Un profil toxicologique est le résultat d'un processus d'évaluation des données scientifiques actuellement disponibles et utiles pour la construction de valeurs guides dont font partie les VTR (OMS, 1994).

Cette évaluation permet de porter un jugement pour définir les effets toxiques liés à différents types d'expositions à la substance, caractérisés par leur durée (aiguë / subchronique / chronique) et par la voie d'exposition (inhalation / voie orale / voie cutanée, *etc.*).

Le document ainsi élaboré permet de faire un classement (non exhaustif) des différents effets selon :

- la durée : aiguë, chronique, *etc.* ;
- le type d'action : locale, systémique, *etc.* ;
- le mécanisme d'action : génotoxique, perturbateur endocrinien, sensibilisant, *etc.* ;
- la voie de pénétration : digestive, respiratoire, cutanée, *etc.* ;
- le tissu ou l'organe affecté : sang, foie, rein, système nerveux, *etc.* ;
- la nature de l'effet : irritant, sensibilisant, reprotoxique, cancérigène, neurotoxique, *etc.*

En général, la nature, le nombre, la gravité, l'incidence ou la prévalence des effets toxiques spécifiques augmentent en fonction de l'exposition, qui est déterminée par la dose, la durée et la fréquence des expositions. Une relation dose-réponse est toujours recherchée pour chaque effet identifié.

En plus de la dose, d'autres facteurs peuvent influencer les effets toxiques tels que la voie d'exposition à la substance, les espèces testées (et dans le cas des animaux, la souche), la susceptibilité génétique, l'état physiologique, le sexe et l'âge de la population exposée, *etc.*

Dans ce but, des grilles de lecture des études toxicologiques *in vivo* et des études épidémiologiques ont été élaborées pour aider à la prise de décision quant aux choix des études les plus pertinentes (cf. annexe 2 et 3).

3.3 Choix des données

A partir des informations disponibles, il faut déterminer si les données humaines et/ou animales présentées peuvent raisonnablement être utilisées pour prédire des effets à long ou court termes.

Le CES se doit d'utiliser au mieux toutes les informations disponibles et prendre en compte explicitement les incertitudes sur les données.

Les bases de données recensant des articles sur les dangers, la relation dose-réponse et l'exposition varient considérablement selon la substance, tant en ce qui concerne leur volume que leur portée ou leur qualité. Dans certains cas, les données peuvent être très limitées et dans d'autres, elles sont abondantes et un travail de sélection est nécessaire.

Le profil toxicologique réalisé avec pour objectif la construction de VTR n'a pas pour but de résumer toutes les études publiées. Les études d'une qualité jugée insuffisante ou les études non pertinentes à la construction de la VTR sont généralement écartées.

Le CES se base pour la collecte des données sur une analyse approfondie et documentée des données scientifiques pertinentes provenant de bases de données appropriées, et en particulier de la littérature scientifique ayant déjà fait l'objet d'une évaluation par les pairs.

Lorsque des documents de synthèse et des monographies ont déjà été publiés par des organismes internationalement reconnus (CIRC, ATSDR, DECOS, *etc.*), le CES peut les utiliser comme point de départ pour l'élaboration du profil toxicologique à condition de mettre à jour la bibliographie. Le retour aux articles sources est réalisé à chaque fois que cela est jugé nécessaire et de manière systématique pour les études clés.

Quand elles sont accessibles ou quand elles lui sont fournies, d'autres sources d'études non publiées (provenant par exemple des parties prenantes : syndicats, industries, *etc.*) peuvent être examinées sous réserve de leur pertinence et de la mention explicite de la provenance des informations. Le CES se laisse également la possibilité d'utiliser des données décrites en détail par d'autres organismes (par exemple sur le site internet de l'ECHA⁴) dans la mesure où les données sont assez détaillées et peuvent être évaluées par le CES.

3.4 Toxicocinétique

Cette rubrique résume pour une molécule donnée l'ensemble des données de toxicocinétique et du métabolisme déterminé chez l'animal et chez l'Homme.

La toxicocinétique a pour objet l'étude du devenir des substances dans l'organisme selon quatre phases : l'absorption, la distribution dans l'organisme, le métabolisme et l'élimination (Vialla et Botta, 2005 ; Greim et Snyder, 2008).

L'absorption est le processus par lequel une substance passe dans l'organisme à partir de la zone de pénétration vers les organes ou les tissus. Son importance varie selon le produit chimique et la voie d'exposition.

La distribution est le processus par lequel la substance atteint divers compartiments et organes de l'organisme en fonction de sa mobilité, de sa solubilité dans l'eau et dans les lipides et, globalement, de son affinité pour certains tissus.

⁴ European Chemicals Agency (= Agence européenne Européenne des substances Substances Chimiques)

Le métabolisme est le processus, généralement enzymatique, par lequel une substance chimique est transformée en une autre substance (métabolite par exemple dans le cas des substances organiques) à l'intérieur de l'organisme. Dans le cas des métaux, il peut s'agir notamment de changements de l'état d'oxydation.

Si la majorité des transformations métaboliques de substances organiques donne naissance à des composés plus polaires, plus aisément excrétables par les voies urinaire et biliaire et généralement moins toxiques (détoxication), il arrive qu'un des produits de la biotransformation soit plus réactif et capable de se fixer sur les molécules-cibles, donc plus toxique (bioactivation). Dans ce cadre, les métabolites peuvent alors jouer un rôle prépondérant dans la toxicité de la molécule mère. Il existe des différences inter et intra-espèces dans les mécanismes de biotransformation (en partie liées à la diversité biologique et génétique).

Les enzymes du métabolisme sont largement réparties dans le corps. Cependant, le foie est l'organe de transformation le plus important par sa forte concentration en enzymes. Les reins et les poumons représentent seulement 10 à 30% de la capacité hépatique. D'autres organes tels que la peau, les intestins, les testicules et le placenta sont connus pour leur plus faible capacité à métaboliser les xénobiotiques.

Le mode d'élimination d'un composé hors de l'organisme joue un rôle essentiel dans sa toxicité. En effet l'accumulation d'une substance toxique dans un organisme est en général un facteur aggravant en termes de toxicité. Plusieurs voies d'excrétion existent dont les plus importantes sont médiées par l'urine, les fécès et l'air expiré. L'élimination urinaire ou fécale d'une substance est fortement affectée par ses propriétés physiques (poids moléculaire, hydrosolubilité) et sa fixation éventuelle aux protéines plasmatiques. Les poumons représentent une voie importante d'élimination des substances, ou de leurs métabolites, s'ils sont volatils et que leur coefficient de partage entre le sang et l'air permettent l'élimination par cette voie. La fonction respiratoire (au repos ou à l'effort, par exemple) joue un rôle prépondérant pour l'élimination dans l'air expiré.

D'une façon générale, la toxicocinétique et la toxicodynamie sont importantes dans la construction des VTR. La toxicocinétique permet d'étudier le devenir des substances dans l'organisme tandis que la toxicodynamie permet de prédire les effets d'une substance au niveau d'un site d'action supposé, voire sur tout l'organisme. Elles permettent de comprendre le mécanisme d'action de la substance et de fixer une partie des facteurs d'incertitude.

Les données d'absorption à examiner sont en priorité celles pour la voie d'exposition pour laquelle une VTR est élaborée. Néanmoins, en absence de donnée pour la voie d'exposition à considérer, une extrapolation de voie à voie peut être envisagée.

L'étape de distribution est importante, en particulier pour mettre en évidence des différences inter-espèces et/ou intra-espèces. Elle apporte des éléments pour l'extrapolation inter-espèces, sur les sites d'action de la substance et sur sa disponibilité dans l'organisme. Le passage transplacentaire, tout comme le passage dans le lait maternel sont aussi à documenter.

Les processus de biotransformation et d'élimination étant variables, les différences relatives à l'espèce, à l'âge, au sexe, à la variation génétique, *etc.* sont à indiquer pour caractériser la variabilité dans la population prise en compte.

3.5 Toxicité générale

Dans le cadre de la construction des VTR, les informations toxicologiques sont déterminantes et doivent donner une vue d'ensemble, sur tous les effets sanitaires connus de la substance.

Parfois, la littérature permet de disposer d'un profil toxicologique complet de la substance aussi bien chez l'animal que chez l'Homme (cas des documents UE, US EPA, OMS, ATSDR, *etc.*). Le CES peut utiliser ces documents et en général ne reprend dans sa synthèse que les éléments utiles pour la construction des VTR.

3.5.1 Toxicité chez l'Homme

3.5.1.1 Les types d'études chez l'Homme

Les études épidémiologiques peuvent être classées en deux grands groupes : celles à visée étiologique et celles à visée descriptive. Parmi les études à visée étiologique (fournissant les arguments en faveur ou à l'encontre de l'hypothèse d'un rôle étiologique des facteurs de risque étudiés), on distingue les études de cohortes et les études cas-témoins. Les études transversales qui mesurent simultanément l'exposition et la maladie et explorent leur relation, peuvent être indicatives d'un effet dont le lien causal est à confirmer par d'autres études. Les études à visée descriptive (fournissant des fréquences de maladies, des tendances temporelles ou spatiales) peuvent être réalisées à l'échelle individuelle ou populationnelle.

Le Tableau 1 présente les types d'études épidémiologiques et leurs applications (enHealth Council, 2002).

Tableau 1 : Applications des différents types d'études épidémiologiques

	Ecologiques	Transversales	Cas-témoins	Cohortes
Investigation d'effets sanitaires rares	++++	–	+++++	–
Investigation d'expositions rares	++	–	–	+++++
Etude de plusieurs effets liés à une même exposition	+	++	–	+++++
Etude d'expositions multiples et de leurs déterminants	++	++	++++	+++
Etude de la relation temporelle exposition-effet	++	–	+	+++++
Mesure directe de l'incidence	–	–	+	+++++
Investigation d'effets sanitaires avec de longues périodes de latence	–	–	+++	+/- (+, si rétrospectif)

+ à ++++ : degré de pertinence, – : non pertinent

Les études écologiques, qui reposent sur des mesures agrégées par groupes d'individus et non sur des données individuelles, sont plus vulnérables à des biais comme à des facteurs de confusion que le sont les études réalisées à l'échelle individuelle. De ce fait, les études écologiques permettent rarement d'établir un lien de causalité entre exposition et risque.

Les études à visée étiologique sont celles qui apportent le plus d'informations utiles à la caractérisation de la relation dose-réponse, dans le contexte de construction de VTR. Les études de cohorte et les études cas-témoins associent les différentes expositions étudiées à l'apparition d'un effet chez les sujets et permettent de calculer un risque relatif (RR) ou un odds-ratio (OR) (pour les études cas-témoins). Le RR est le rapport entre la probabilité d'être atteint d'une pathologie pour les individus exposés et la probabilité d'être atteint pour les non exposés. L'OR est une approximation du RR valable lorsque l'événement de santé observé reste peu fréquent (<10%) chez les individus non-exposés. Les RR et OR mesurent la force de l'association entre la survenue de l'événement et l'exposition au facteur de risque.

Les méta-analyses, qui consistent à rassembler les données issues d'études comparables et de les ré-analyser au moyen d'outils statistiques adéquats, sont très utiles pour répondre à une question précise de manière critique et quantitative et arriver ainsi à des conclusions plus solides que ne le permettent les études isolées. Elles permettent d'améliorer la puissance des résultats obtenus.

Il est aussi possible d'examiner des études cliniques et des rapports de cas isolés (CIRC, 2006). Les incertitudes entourant l'interprétation des rapports de cas isolés les rendent inaptes, sauf exception, à former la seule base permettant de conclure à un rapport causal. En revanche, lorsque ces résultats sont étudiés avec les études cas-témoins et les études de cohorte, ils peuvent étayer matériellement le jugement qu'un rapport de cause à effet est bien réel. Il existe différents critères pour étayer la causalité. Les plus connus sont ceux de Hill (Hill, 1965).

Les Bonnes Pratiques en Epidémiologie (BPE) proposent des recommandations précises aux investigateurs qui préparent, mettent en œuvre et diffusent les résultats d'une étude épidémiologique ainsi qu'à ceux qui commandent ou financent de telles études. Ces BPE, actualisées en 2007 par plusieurs sociétés savantes d'épidémiologie (ADELF - ADEREST – AEEMA - EPITER, 2007), sont en accord avec les principes édictés par la fédération européenne de l'International Epidemiological Association. Ces clés de décisions sont qualitatives : elles concernent notamment le contenu du protocole et de la publication. Elles ne peuvent en aucun cas remplacer l'expertise épidémiologique réalisée au cas par cas, notamment sur certains points critiques pour la construction de VTR cancérogènes.

Le CES évalue la pertinence des études épidémiologiques (principalement études de cohorte et études cas-témoin) pour établir des VTR. D'une manière générale, les cinq points-clés communs à toutes ces études, qui vont conditionner leur utilité dans le contexte de la construction de VTR, sont :

- la prise en compte des facteurs de confusion, d'interaction et des biais ;
- la mesure des expositions ;
- le choix de l'effet analysé ;

- la puissance ;
- le lien causal existant ou suspecté entre l'exposition et l'effet.

Quand le calcul des RR (ou OR) par unité d'exposition est possible, ces études sont privilégiées dans la construction de la VTR.

3.5.1.2 Prise en compte des biais en épidémiologie

Il est nécessaire de prendre en compte l'éventuel rôle de biais, de facteurs de confusion et du hasard dans l'interprétation des études épidémiologiques (CIRC, 2006).

Par « biais », on entend l'intervention de facteurs dans le protocole d'une étude ou son déroulement qui mènerait de façon erronée à surestimer ou à sous-estimer l'association entre la maladie et un agent, un mélange ou une circonstance d'exposition (exemple : une erreur de classement).

Par « facteur de confusion », on entend une situation dans laquelle la relation avec la maladie apparaît plus étroite ou moins étroite qu'elle n'est réellement en raison d'une association entre le facteur causal apparent et un autre facteur associé à une augmentation ou à une diminution de l'incidence de la maladie (exemple : le tabagisme).

Les éléments à analyser lors de la construction d'une VTR, sont issus du document méthodologique du CIRC (CIRC, 2006). Par ailleurs, une grille de lecture permettant de juger les études épidémiologiques est disponible en annexe 3. Les principaux critères retenus sont les suivants :

- la population étudiée, la maladie et l'exposition doivent avoir été bien définies par les auteurs. Les cas de maladie dans la population étudiée doivent avoir été identifiés d'une façon indépendante de l'exposition en question, et l'exposition doit avoir été établie de façon indépendante de l'état pathologique ;
- les auteurs doivent tenir compte, d'autres variables qui peuvent influencer sur le risque pathologique et peuvent avoir été liées à l'exposition en question. Dans les études de cohorte, les comparaisons avec les taux locaux de maladie peuvent être plus appropriées qu'avec les taux nationaux dans le choix de la population de référence. Des comparaisons internes de fréquence de la maladie entre les individus ayant différents niveaux d'exposition doivent également avoir été faites dans l'étude ;
- les auteurs doivent avoir signalé les données de base sur lesquelles sont fondées les conclusions, même si des analyses statistiques sophistiquées ont été employées : nombre de cas et de témoins exposés et non exposés dans une étude cas-témoins et le nombre de cas observés et attendus dans une étude de cohorte ;
- l'exposition doit être évaluée en prenant en compte la stratégie d'échantillonnage, les prélèvements et la méthode analytique utilisée ;

- **Enfin, les méthodes statistiques employées pour obtenir les estimations du risque relatif, les taux de maladie, les intervalles de confiance et les tests de signification, et pour prendre en compte les éventuels facteurs de confusion doivent avoir été clairement énoncées par les auteurs.**

3.5.2 Toxicité chez l'animal

Les études toxicologiques doivent permettre d'identifier les effets néfastes pour la santé résultant de l'exposition à la substance, depuis les atteintes fonctionnelles jusqu'aux potentielles modifications histologiques, biochimiques ou hématologiques et tenter d'établir des relations dose-effet.

L'identification de ces effets permet de définir les effets toxiques liés à différents types d'exposition à la substance (aiguë, subchronique, chronique, par inhalation, voie orale, voie cutanée, etc.).

Les 3 formes habituelles de toxicité sont recherchées : la toxicité aiguë, la toxicité à court terme (subaiguë et subchronique) et la toxicité à long terme (chronique).

La plupart des données toxicologiques utilisées pour l'évaluation des risques proviennent d'études menées chez l'animal. Le CES recommande quand cela est possible, la prise en compte d'études expérimentales faites selon les bonnes pratiques de laboratoire et les lignes directrices (OCDE, US EPA, etc.). Toutefois, les études disponibles dans la littérature peuvent être anciennes et ne pas forcément respecter ou spécifier si elles suivent les lignes directrices de l'OCDE. Devant cet état de fait, il convient alors de considérer la qualité des études. Elle peut être déterminée par la cotation de Klimish (Klimisch *et al.*, 1997) (cf. annexe 4) en utilisant des outils tels que ToxRtool ou Scirap (cf. §5.4.1.3)

- **Témoins historiques**

Les données de témoins historiques correspondent à un recensement de données expérimentales (comme par exemple les incidences tumorales ou de malformations), issues de lots d'animaux contrôles ou témoins, sur plusieurs études différentes, conduites sur plusieurs années. Elles proviennent de lots composés d'animaux de même âge, de même espèce et de même souche, maintenus dans des conditions similaires mais non exposés à une substance toxique.

Ces données peuvent s'avérer utiles pour l'interprétation de certaines études notamment dans l'évaluation des résultats (par exemple, faux positifs, morts des lots témoins, incidence tumorale anormalement élevée) ou dans le cas de tumeurs rares. Elles apportent des informations complémentaires aux données issues des lots témoins expérimentaux et permettent de valider les données des témoins actuels.

Les données historiques doivent être justifiées par des informations sur :

- l'identification de l'espèce et la souche, le nom du fournisseur et l'identification de la colonie spécifique si le fournisseur est implanté sur plusieurs sites géographiques,
- le nom du laboratoire et les dates de conduites des études,

- la description des conditions générales dans lesquelles les animaux ont été maintenus, y compris le type ou la marque de la ration alimentaire et, si possible, les quantités consommées,
- l'âge approximatif, exprimé en jours, des animaux témoins au début de l'étude et à la date de sacrifice ou de la mort,
- le poids des animaux des animaux témoins au début de l'étude et à la date de sacrifice ou de la mort,
- la description du schéma de mortalité du groupe historique constaté pendant ou la fin de l'étude et d'autres observations pertinentes (par exemple, maladies, infections),
- le nom du laboratoire et des experts scientifiques chargés de la réalisation de l'étude, de la collecte et de l'interprétation des données,
- la description de la nature des tumeurs qui peuvent avoir été combinées pour produire une augmentation d'incidence.

L'OCDE propose de nombreuses références permettant d'accéder aux données historiques chez l'animal de laboratoire (OCDE, 2002).

Le NTP propose sur son site internet les données historiques d'études de cancérogénèse, pour les animaux de laboratoire dont les animaux génétiquement modifiés en fonction de la voie d'exposition et du type de régime alimentaire utilisé⁵.

Il est important de noter que les données historiques d'incidence tumorale spontanée évoluent avec le temps (Tennekes *et al.*, 2004a et b).

3.5.2.1 Toxicité aiguë

La toxicité aiguë concerne les effets néfastes pour la santé qui peuvent résulter d'une exposition unique, ou répétée sur 24h. La durée totale d'observation des effets s'étend généralement à deux semaines. Les dommages recherchés peuvent être des signes cliniques ou biologiques de toxicité, des modifications anormales au niveau des organes et des tissus, qui peuvent dans certains cas conduire à la mort.

3.5.2.2 Toxicité subchronique

La toxicité subchronique représente la manifestation de l'effet de l'exposition multiple ou continue d'une substance, pendant une période inférieure à 3 mois.

L'étude doit renseigner sur :

- les effets toxiques potentiels après expositions répétées pendant une durée limitée ;
- les organes atteints ;
- les effets réversibles et irréversibles ;
- les éventuels effets cumulatifs et retardés.

⁵ National Toxicology Program : <http://ntp-server.niehs.nih.gov/> (Study Results & Research Projects, Study Data searches)

3.5.2.3 Toxicité chronique

Les données des études à long terme (chroniques) sont d'une importance cruciale puisqu'elles recherchent des effets ou des manifestations toxicologiques graves, notamment le cancer et les effets sur les organes de la reproduction. Les études sur les mammifères doivent porter sur une grande partie de la vie de l'animal.

La toxicité chronique représente la manifestation d'effets dus à l'administration répétée d'une substance, pendant une période déterminée en fonction de l'espèce considérée. L'étude renseigne sur les effets physiologiques, biochimiques, hématologiques et sur les modifications anatomiques. Elle permet d'évaluer, notamment :

- la latence dans l'apparition des effets ;
- la nature des effets (fonctions et organes atteints) ;
- les effets cancérigènes ou tumorigènes ;
- les effets reprotoxiques ;
- la réversibilité des effets.

3.5.3 **Génotoxicité**

La génotoxicité est un terme générique qui englobe l'ensemble des lésions de la molécule d'ADN, qui en absence de réparation fidèle aboutit à la mutagenèse. La mutagenèse se définit comme toute modification de la séquence ou de la structure de l'ADN ou du nombre de chromosomes, permanente et transmissible aux générations cellulaires suivantes. Les différents types de mutations sont :

- les modifications ou les substitutions de paires de bases que l'on nomme mutations géniques,
- les cassures chromosomiques qui aboutissent à des délétions, des duplications ou des réarrangements chromosomiques, que l'on nomme mutations chromosomiques
- les modifications dans le nombre de chromosomes, perte ou gain d'un ou plusieurs chromosomes, que l'on nomme mutations génomiques.

Ces différents types de mutations sont provoqués par des agents génotoxiques qui peuvent provoquer des dommages primaires à l'ADN de différentes natures. Parmi les dommages primaires de l'ADN, on retrouve principalement : les alkylations et les oxydations de bases, les cassures simple et double-brins, les intercalants, les hydrolyses (sites abasiques), les adduits, les mésappariements...

On considère que la capacité génotoxique d'un composé est généralement liée à ces propriétés électrophiles, c'est-à-dire son aptitude à se lier aux sites nucléophiles de l'ADN.

Ainsi, pour évaluer le potentiel génotoxique et mutagène d'un composé, on utilise en général une batterie de tests *in vitro* et *in vivo* afin de pouvoir détecter les différents types de lésions à l'ADN possible et les différents types de mutations.

L'étude de la génotoxicité d'un composé est une étape clé car elle va permettre d'apporter des éléments réponse dans le mécanisme de cancérogenèse en particulier et, par la suite, permettre de distinguer les cancérogènes génotoxiques des cancérogènes non génotoxiques. Un cancérogène génotoxique est une substance qui va initier un processus de cancer en induisant une augmentation du taux de mutations ou d'anomalies chromosomiques ou génomiques. Un cancérogène non génotoxique est une substance qui participe au processus de cancérogenèse (stade de promotion ou progression) sans induire d'augmentation du taux de mutations. Le mode d'action non génotoxique inclut des changements épigénétiques, c'est-à-dire des effets qui n'impliquent pas des altérations de l'ADN, mais qui influencent l'expression génique, la communication entre cellules ou d'autres facteurs du processus cancérogène.

Bien que les mécanismes d'action des deux types de composés apparaissent distincts, des travaux récents relativisent la séparation entre composés génotoxiques et non génotoxiques : de nombreux composés qui ne sont pas génotoxiques, provoquent un stress oxydant pouvant altérer l'ADN et provoquer par ce biais une génotoxicité.

Pour les cancérogènes génotoxiques, il est généralement admis qu'ils agissent selon un mode d'action sans seuil. Dès la première dose d'exposition, on considère qu'un cancérogène génotoxique est responsable d'un excès de risque de cancer. Pour les cancérogènes non génotoxiques, il est admis qu'il existe un seuil de dose, en deçà duquel il n'y a pas d'effet.

Pour juger de l'effet génotoxique et mutagène d'une substance, le CES s'appuie de préférence sur l'évaluation d'organismes internationaux tels le CIRC ou l'Union Européenne en tenant compte des données de publications récentes. Les tests de mutagénicité et génotoxicité *in vitro* et *in vivo* fournissent des éléments importants dont il faut tenir compte dans la description globale du mode d'action cancérogène d'une substance. L'évaluation des résultats de ces tests est une étape décisive dans le choix de la méthode de construction de la VTR cancérogène (à seuil ou sans seuil de dose). Les principaux tests permettant d'identifier différents types de mutations sont décrits dans l'annexe 5. On peut citer les tests suivants :

- tests *in vitro* :
 - o Les tests de mutations géniques sur bactéries ou sur cellules de mammifères : Test d'Ames et MLA/TK,
 - o Les tests de mutations chromosomiques et génomiques : test des aberrations chromosomiques et le test du micronoyau,
- Tests *in vivo* :
 - o Les tests de mutations chromosomiques et génomiques : le test du micronoyau sur moelle osseuse ou sur érythrocytes circulants,
 - o Le test de mutation génique sur animaux transgéniques : BigBlue, Mutamouse,
 - o Le test de détection des lésions primaires de l'ADN : test des comètes.

Le mécanisme de génotoxicité doit être discuté pour statuer sur le seuil ou l'absence de seuil. Les différents critères permettant d'évaluer la qualité et la pertinence des tests de génotoxicité *in vitro* sont reportés en annexe 6.

Les données provenant de différents types de cellules doivent être soigneusement étudiées. Des travaux récents indiquent qu'il est préférable d'utiliser des lignées cellulaires humaines et non des lignées cellulaires de rongeurs (Honma et Hayashi, 2011) même si des lignées cellulaires humaines ayant par exemple des mutations au niveau de *p53* (ou déficient en *p53*) sont généralement plus sensibles aux altérations génétiques.

Les lignes directrices de l'OCDE indiquent *« At the present time, the available data do not allow firm recommendations to be made but suggest it is important, when evaluating chemical hazards to consider the p53 status, genetic (karyotype) stability, DNA repair capacity and origin (rodent versus human) of the cells chosen for testing »*. Ainsi, si les données disponibles ne permettent pas de faire des recommandations fermes, elles suggèrent qu'il est important d'évaluer les dangers chimiques en considérant le statut *p53*, la stabilité génétique, la capacité de réparation de l'ADN et l'origine (murine versus humaine) des cellules choisies pour les tests. Les résultats *in vitro* obtenus sur des cellules de mammifères doivent donc être interprétés avec prudence et le poids de leur contribution dans l'évaluation globale doit tenir compte de ces limites potentielles.

Les résultats « faussement » positifs en termes de prédiction du potentiel cancérigène ou génotoxique peuvent rendre difficile l'évaluation et l'interprétation des résultats de génotoxicité. Les résultats « erronés » peuvent être :

- Des réponses positives non prédictives d'une activité cancérigène ou génotoxique en raison de la faible spécificité des modèles cellulaires utilisés. Les travaux récents soulignent l'importance d'utiliser des cellules humaines et non des cellules de rongeurs qui génèrent plus de résultats faussement positifs (Fowler *et al.*, 2012 ; Whitwell *et al.*, 2015 ; Honma et Hayashi, 2011). Ces études ont également montré que le statut de la protéine *p53* n'avait pas d'impact sur la prédictivité du test du micronoyau et son absence augmentait la réponse génotoxique sans induire plus de résultats faussement-positifs ;
- Des réponses génotoxiques dues à des effets indirects et non pas en raison d'une interaction directe avec l'ADN. En effet, dans les tests de génotoxicité *in vitro*, certaines conditions et/ou limitations expérimentales peuvent conduire à des résultats « faussement positifs » tels qu'un niveau excessif de toxicité, de fortes variations de pH et/ou d'osmolalité, l'apoptose, les phénomènes de chélation (Nesslany, 2016).
- Des lacunes techniques telles qu'une mauvaise conception d'étude, des erreurs lors de la conduite d'un test ou une évaluation des données inappropriée.

Dans ces conditions contextuelles, il est pertinent d'utiliser une approche de type poids de la preuve (Weight of Evidence ou WoE) pour déterminer le mode d'action génotoxique. Ainsi, chaque méthode d'essai individuellement s'est vue attribuer un poids selon sa contribution à la preuve globale (différents types de preuves ou « catégories de preuves » sont pondérés avant d'être combinés dans une évaluation WoE). Quatre considérations peuvent être appliquées :

- a) Les différents types d'essais ont des poids différents: les tests mesurant les mutations et les dommages chromosomiques sont considérés comme ayant un poids supérieur à celui des « indicateurs » qui mesurent exclusivement les lésions primaires de l'ADN ;
- b) Le niveau global (robustesse des protocoles et reproductibilité des effets) et la qualité de la preuve dans la catégorie influencent également le poids : Les études menées sous référentiel BPL et selon les directives de l'OCDE devraient avoir un poids supérieur à celui des études conduites sans ces considérations ;
- c) Le nombre de preuves dans une même catégorie influence le poids : Le fait d'avoir une (ou quelques) réponses divergentes (positives ou négatives) dans une majorité d'études avec des résultats concordants ne doit pas modifier la direction et la force du WoE ;
- d) Les tests ayant une plus grande capacité à transposer les résultats chez l'homme ont plus de poids. Les données provenant des tests *in vivo* (plus prédictifs du danger humain potentiel) apportent un niveau de preuve plus élevé que les données provenant de tests *in vitro* ou effectués sur des cellules ne provenant pas de mammifères (à l'exception du test d'Ames).

On peut ainsi attribuer des poids selon les 4 catégories suivantes :

- Poids négligeable (Negligible weight) : le paramètre d'évaluation ou l'effet investigué n'est pas lié à un effet néfaste ayant une incidence sur le danger / risque génotoxique ou cancérigène et, en tant que tel, il n'est pas considéré comme une preuve de génotoxicité.
- Faible poids (Low weight) : l'effet investigué est révélateur de dommages primaires à l'ADN qui ne sont pas nécessairement liés à des mécanismes impliqués dans la cancérogenèse, et le système d'essai a une faible spécificité (qu'on peut traduire ici comme pouvant générer des résultats « faussement » positifs).
- Poids modéré (Moderate weight) : l'effet investigué est potentiellement pertinent dans le processus de cancérogenèse mais il peut être lié à des mécanismes secondaires considérés à seuil (par exemple, clastogènes cytotoxiques, aneugènes) ou le système d'essai présente un taux élevé de « faux » positifs en ce qui concerne la prédiction ou le mode d'action cancérigène.
- Poids élevé (High weight) : l'effet investigué est celui qui a été démontré avec un haut niveau de confiance comme jouant un rôle critique dans le processus de cancérogenèse.

En 2016, un panel d'experts en génotoxicité a publié une évaluation de la génotoxicité indiquant les « endpoints » à partir duquel les principes de poids de la preuve (WoE) sont compatibles. Les poids suivants ont été attribués selon les 4 catégories (pondération des preuves) : poids négligeable, faible, modéré et élevé (Tableau 2).

Tableau 2 : Pondération des preuves selon les « endpoints » (Brusick *et al.*, 2016)

Endpoint	Negligible Weight	Low Weight	Moderate Weight	High Weight
DNA binding (adduct formation) <i>in vitro</i>				
DNA binding (adduct formation) <i>in vivo</i>				
SSB/DSB <i>in vitro</i> (including comet)				
SSB/DSB <i>in vivo</i> (including comet)				
SCEs <i>in vitro</i>				
SCEs <i>in vivo</i>				
Oxidative DNA damage <i>in vitro</i>				
Oxidative DNA Damage <i>in vivo</i> (detection of 8-OHdG adducts)				
DNA repair effects <i>in vitro</i>				
DNA repair effects <i>in vivo</i>				
Micronuclei <i>in vitro</i>				
Micronuclei <i>in vivo</i> (including human studies)				
Chromosomal aberrations <i>in vitro</i>				
Chromosomal aberrations <i>in vivo</i> (including human studies)				
Gene mutation in bacteria (Ames' Test)				
Gene mutation mammalian <i>in vitro</i>				
Gene mutation <i>in vivo</i>				

* SSB: single-strand breaks; DSB : double-strand breaks; SCE: sister-chromatid exchange

Selon ces principes, les résultats du test d'Ames et ceux des tests du micronoyau, d'aberrations chromosomiques et de mutation *géniques in vivo* sont considérés comme ayant un poids élevé. Les tests ayant un poids modéré sont des tests *in vivo* : le test des comètes, l'induction de dommages oxydatifs et l'induction de la réparation de l'ADN *et in vitro* : les tests du micronoyau, aberrations chromosomiques et mutations géniques sur cellules de mammifère.

Concernant le poids des tests, « lors de l'évaluation du potentiel mutagène d'un produit chimique, il faut donner plus de poids à la mesure des changements permanents de l'ADN (c'est-à-dire aux mutations) qu'aux dommages réversibles de l'ADN » (OCDE, 2015).

Par conséquent, les réponses positives dans des tests « indicateurs » (c'est-à-dire la mesure des cassures de l'ADN, des échanges de chromatides sœurs, *etc.*) sont certes associées à l'exposition mais sont à considérer comme insuffisants pour déterminer un effet mutagène. En revanche, les données de tests mesurant l'induction des mutations géniques ou des altérations chromosomiques stables, en particulier *in vivo* dans les systèmes de mammifères, sont à considérer comme présentant plus de poids pour l'évaluation de la génotoxicité d'un composé.

3.5.4 Cancérogénicité

L'objectif est d'identifier *via* les études *ad hoc* la majorité des effets cancérogènes dans des espèces mammifères et les relations dose-effets à la suite d'une exposition prolongée et répétée. Ces effets sont généralement mis en évidence lors d'études chroniques ou d'études de cancérogénicité menées sur une ou plusieurs espèces animales.

Typiquement, le rat est employé pour une évaluation combinée de toxicité chronique/cancérogénèse. L'OCDE a émis des lignes directrices pour les essais de produits chimiques de toxicité chronique et de cancérogénèse (OCDE, 1993).

Les définitions des termes propres aux mécanismes de la cancérogénèse sont décrites en annexe ainsi que les éléments de connaissance sur ces différents mécanismes (cf. annexe 7).

Pour juger de l'effet cancérogène d'une substance, le CES s'appuie préférentiellement sur l'évaluation d'organismes internationaux tels le CIRC ou l'Union Européenne à condition que les données et l'état des connaissances actuelles aient été pris en compte.

La cancérogénèse est un processus complexe et, aux fins de l'évaluation du potentiel cancérogène, aucune approche prédéterminée ne peut convenir pour toutes les substances chimiques étudiées.

Afin d'arrêter la stratégie à suivre pour évaluer le potentiel cancérogène d'une substance chimique, certains éléments d'information sont déterminants : les propriétés génotoxiques du produit, la voie d'administration, les propriétés pharmacodynamiques chez les animaux et chez l'humain (sélectivité, relation dose-réponse) et les résultats des études de toxicologie à doses répétées.

Chez les rongeurs, l'activité cancérogène des produits chimiques non génotoxiques se caractérise par une grande spécificité par rapport à l'espèce, à la souche et aux organes cibles, ainsi que par les seuils qui ponctuent la relation dose-réponse. Les travaux consacrés aux mécanismes d'action permettent de faire la distinction entre les effets spécifiques aux rongeurs et ceux qui sont susceptibles de se voir également chez l'Homme (Boobis, 2008 et 2006 ; Guyton, 2008).

3.5.5 Reprotoxicité et effet sur le développement

De manière générale, les effets reprotoxiques sont structurés de la manière suivante :

- les atteintes portées au développement de l'enfant au cours de la gestation et après la naissance. Cela comprend notamment les avortements spontanés, la mortinatalité, les retards de développement pondéral à la naissance, les malformations congénitales et les altérations du développement mental et physique, jusqu'à et y compris le développement pubertaire normal ;
- les atteintes de la fertilité. Elles comprennent les effets sur la libido, la spermatogénèse, l'oogénèse, le cycle oestral, la fécondation jusqu'à l'implantation.

L'annexe 8 décrit plus en détail les effets néfastes reprotoxiques à prendre en compte.

Pour juger de l'effet reprotoxique d'une substance le CES s'appuie préférentiellement sur l'évaluation de l'union européenne à condition que les données et l'état des connaissances actuelles aient été pris en compte.

Si un effet reprotoxique est objectivé au cours de la revue de littérature de toxicologie, cela impose au CES de prendre en compte la période d'exposition.

3.5.6 Cohérence animal-Homme et détermination du mode d'action

Toute information sur les mécanismes d'action a une importance majeure dans la compréhension de la survenue des effets néfastes, pour envisager une transposition des effets observés chez l'animal à l'Homme lors de la construction de la VTR et s'assurer de la cohérence des données toxicocinétiques et toxicodynamiques recueillies chez l'animal et chez l'Homme.

Le CES utilise à chaque fois que cela est possible les études expérimentales dont l'espèce et la souche ont une sensibilité la plus proche possible de celle de l'Homme. Cette assertion n'étant pas toujours vérifiable, la plausibilité de l'extrapolation d'effets d'une espèce à une autre peut être renforcée par l'utilisation d'espèces différentes. Dans tous les cas, l'hypothèse par défaut est que l'effet mis en évidence chez l'animal peut également se produire chez l'Homme, à moins que l'analyse du mode d'action permette de démontrer le contraire (US EPA, 1994a).

Les différences de cinétique et de métabolisme d'une substance dans plusieurs espèces sont parfois corrigées par l'application d'un coefficient d'ajustement tenant compte, pour une exposition orale, de la surface corporelle (paramètre physiologique propre à chaque espèce), et pour une exposition par voie respiratoire, du taux d'inhalation (paramètre physiologique) et des coefficients de partage entre l'air et le sang (paramètres physicochimiques liés à la substance) ou de modèles toxicocinétiques à base physiologique (PBPK).

Les études *in vitro* et les modèles de type QSAR (Quantitative Structure Activity Relationship) sont utilisés en complément pour confirmer un effet toxique ou relier les propriétés physico-chimiques de la substance chimique avec l'activité biologique (toxicité, affinité de liaison, *etc.*) mais aussi avec d'autres propriétés telles que la stabilité, la solubilité ou la biodisponibilité.

Par ailleurs, lorsque les données expérimentales de toxicodynamie ne sont pas disponibles, l'hypothèse posée par défaut est de considérer que l'Homme est l'espèce la plus sensible aux variations allométriques près détaillées ci-dessus.

4 Recueil des valeurs toxicologiques de référence

Bien que la toxicité de nombreuses substances chimiques soit connue, la relation dose-réponse reste souvent mal caractérisée. Pour une même substance, on ne peut disposer d'aucune VTR ou d'une ou plusieurs VTR selon la voie d'exposition, la durée d'exposition et/ou la forme chimique (isomère, espèce chimique).

Avant d'envisager la construction d'une VTR, il est nécessaire de recenser, pour la substance concernée et la durée d'application visée, les VTR déjà construites et publiées par les organismes ou institutions reconnus aux niveaux national et international : Anses, ATSDR, EFSA, JECFA, OEHHA (ou Cal-EPA), OMS/IPCS, RIVM, Santé Canada et US EPA. Les VTR construites par d'autres organismes peuvent également être recensées comme celles du National health and medical research council (NHMRC) (Australie), du National Industrial Chemicals Notification and Assessment Scheme (NICNAS) (Australie), du Forschungs- und Beratungsinstitut Gefahrstoffe (Fobig) (Allemagne), du Danish Environmental Protection Agency (Danish EPA) (Danemark), du Committee on Toxicity (COT) (Angleterre), du Ministère de l'environnement du Japon, du Texas Commission on Environmental Quality (TCEQ) (USA – Texas)...

La construction de chaque VTR est décrite afin de comprendre les choix réalisés. De plus, un tableau de synthèse est réalisé suivant le modèle ci-dessous (cf. annexe 9).

Une façon rapide de vérifier l'existence d'une VTR est par exemple de consulter le site internet français Furetox (<http://www.furetox.fr/>), le portail substances chimiques de l'INERIS (<http://www.ineris.fr/substances/fr/>) ou le site internet nord-américain ITER (International Toxicity Estimates of Risk) (<http://www.tera.org/iter/>).

A noter qu'un recensement des valeurs aiguës accidentelles (ex. AEGL⁶) peut être réalisé à titre informatif.

⁶ Acute Exposure Guideline Levels for Airborne Chemicals

5 Proposition de VTR

Le profil toxicologique doit permettre de caractériser le danger et d'établir les rapports qui existent entre la dose de la substance administrée et les réponses qualitative/quantitative provoquées.

La construction d'une VTR pour une substance donnée nécessite de :

- recenser et analyser les données de toxicité disponibles,
- identifier le ou les organes cibles et l'effet critique⁷,
- identifier l'hypothèse de construction, à seuil ou sans seuil de dose,
- choisir une (ou plusieurs) étude clé de bonne qualité la plus pertinente (épidémiologique ou toxicologique),
- définir une dose critique ou point de départ (POD) chez l'Homme ou l'animal à partir de cette étude (NOAEL/C, LOAEL/C, BMD/C),
- réaliser des ajustements temporels et allométriques,
- pour une VTR à seuil, appliquer des facteurs d'incertitude à cette dose de manière à dériver une VTR applicable à l'ensemble de la population visée ; pour une VTR sans seuil, réaliser une extrapolation linéaire⁸ à l'origine afin de déterminer un excès de risque.

Les VTR s'appliquent à l'ensemble de la population. Cependant, dans la construction de VTR, lorsque cela se justifie, le CES s'efforce d'identifier différents sous-groupes de population plus vulnérables pour chaque substance et de les prendre en compte. **A titre d'exemple**, une synthèse des recommandations des organismes pour prendre en compte une plus grande sensibilité potentielle des enfants aux substances chimiques par rapport aux adultes a été réalisée (cf. annexe 10).

L'élaboration des VTR suit une approche très structurée et exigeante qui implique des évaluations collectives par des groupes de spécialistes.

Cette démarche doit s'appuyer sur des méthodes de travail faisant l'objet d'un consensus scientifique et faisant appel à une expertise approfondie et pluridisciplinaire.

⁷ L'effet critique correspond à un effet néfaste, spécifique de la substance survenant aux doses ou concentrations les plus faibles.

⁸ L'étape d'extrapolation aux faibles doses repose sur l'extrapolation linéaire à l'origine à partir du POD, réputée plus protectrice pour la santé publique (US EPA, 2005a et b). Cette extrapolation linéaire est utilisée par défaut (Afsset, 2010b).

5.1 Choix de l'effet critique

Lors de la revue de la littérature, l'ensemble des effets sanitaires est considéré. Les effets néfastes correspondent à tous les changements dans la morphologie, la physiologie, la croissance, le développement, résultant d'une détérioration de la capacité fonctionnelle ou de la capacité de compenser un stress additionnel ou une augmentation de sensibilité (OMS, 2004). Ces effets contribuent à la dangerosité de la substance. Les effets considérés comme physiologiques ou adaptatifs sont exclus dans le choix de l'effet critique. Toutefois, avant de rejeter ces effets lors de l'évaluation de la toxicité, il convient de s'assurer qu'ils ne sont pas la manifestation d'une toxicité (Lu, 1988 ; OMS, 1994). La distinction entre effet néfaste et effet adaptatif repose sur une décision consensuelle du CES après caractérisation de la sévérité de l'effet, du tissu concerné, de la réversibilité, et de la présence ou non d'une relation dose-effet. Un effet adaptatif implique un processus par lequel une cellule ou un organisme répond à une substance chimique afin que celui-ci survive sans altération de la fonction (Keller *et al.*, 2012 citée dans EFSA, 2017 draft). L'homéostasie est un type de réponse adaptative qui consiste en une régulation active d'un paramètre pour le maintenir dans sa gamme physiologique (par exemple, la régulation glycémique, la régulation de la température corporelle). Un autre type de réponse adaptative peut se produire en dehors des limites physiologiques et peut être préjudiciable à la santé (ex. induction enzymatique du foie) (EFSA, 2017 draft). Par exemple, des dommages structuraux (atrophie, hypertrophie, perte cellulaire, fibrose, prolifération cellulaire, etc.) peuvent être observés bien que l'organe continue de fonctionner normalement grâce à une réserve fonctionnelle comme c'est le cas pour les tissus hépatique, pulmonaires ou rénaux. A titre d'exemples, une hépatomégalie peut résulter de la stimulation des fonctions oxydases hépatiques ou d'une synthèse protéique par le réticulum endoplasmique ou encore de l'accumulation de lipides. Une diminution du poids corporel peut provenir d'une diminution de la consommation alimentaire induite par un comportement de stress remarqué chez les animaux de laboratoire. Une déplétion du glycogène hépatique ou une diminution du nombre de leucocytes peut également être le reflet d'un état de stress (InVs, 2002). *A contrario*, le système nerveux central peut difficilement compenser ou seulement dans une certaine limite des altérations structurales : l'apparition de lésion entraîne des conséquences vitales pour son fonctionnement (US EPA, 1994b). Cependant, il est parfois difficile de distinguer des effets néfastes d'autres effets qui ne correspondraient pas à une manifestation directe de la toxicité. Le tableau ci-dessous proposé par l'US EPA (1994b) présente des indications sur la manière dont les effets pourraient être associés à différents niveaux d'effets néfastes ou non. En général, les effets « mineurs » ne sont considérés comme néfastes que dans la mesure où ils sont accompagnés d'autres données structurelles et fonctionnelles suggérant une même toxicité. Par exemple, une altération des enzymes hépatiques (statistiquement hors de la gamme physiologique) ne serait considérée comme néfaste qu'accompagnée d'une altération structurelle (pathologie) et/ou d'une modification du poids du foie (US EPA, 1994b).

Tableau 3 : Niveau de sévérité des effets considérés par l'US EPA pour dériver une VTR par inhalation (Reference Concentration ou RfC) (adapté de DeRosa *et al.*, 1985 et Hartung, 1986) (US EPA, 1994b)

Effect or No-Effect Level	Rank	General Effect
NOEL	0	No observed effects.
NOAEL	1	Enzyme induction or other biochemical change, consistent with possible mechanism of action, with no pathologic changes and no change in organ weights.
NOAEL	2	Enzyme induction and subcellular proliferation or other changes in organelles, consistent with possible mechanism of action, but no other apparent effects.
NOAEL	3	Hyperplasia, hypertrophy, or atrophy, but no change in organ weights.
NOAEL/LOAEL	4	Hyperplasia, hypertrophy, or atrophy, with changes in organ weights.
LOAEL	5	Reversible cellular changes including cloudy swelling, hydropic change, or fatty changes.
(LO)AEL ^b	6	Degenerative or necrotic tissue changes with no apparent decrement in organ function.
(LO)AEL/FEL	7	Reversible slight changes in organ function.
FEL	8	Pathological changes with definite organ dysfunction that are unlikely to be fully reversible.
FEL	9	Pronounced pathologic changes with severe organ dysfunction with long-term sequelae.
FEL	10	Death or pronounced life shortening.

FEL : Frank effect level = Niveau d'exposition qui induit des effets néfastes irréfutables, tels qu'une lésion fonctionnelle irréversible ou la mort, statistiquement plus sévères ou plus fréquents dans la population exposée par rapport au témoin.

Certaines substances à seuil d'effet ont des effets indésirables sur plusieurs organes. Dans le cadre de la construction d'une VTR, l'effet critique, retenu parmi les effets néfastes jugés pertinents, correspond à **l'effet néfaste le plus sensible apparaissant à la plus faible dose chez la population la plus vulnérable**. *A priori*, ce choix permet d'être protecteur vis-à-vis des autres effets observés à condition que, quand l'étude clé retenue est une étude animale, la nature des relations dose-effet soit transposable de l'animal à l'Homme.

Dans le cas des VTR reprotoxiques, il conviendra lors du choix de l'effet critique reprotoxique (hors effet sur la fertilité), de s'assurer également que la toxicité maternelle a bien été rapportée dans les études et que l'effet retenu est généralement observé en l'absence d'une toxicité maternelle.

Finalement, tous les effets reprotoxiques définis dans l'annexe 8 pourront être considérés comme effet critique reprotoxique.

5.2 Choix de l'hypothèse de construction

L'hypothèse par défaut est de considérer une relation monotone entre l'exposition (la dose) et l'effet (la réponse). En l'état actuel des connaissances et par défaut, on considère généralement que, pour les effets non cancérogènes, la toxicité ne s'exprime qu'au-delà d'un seuil de dose. Une VTR à seuil de dose est alors proposée.

Pour les effets cancérogènes, il est possible d'établir des VTR à seuil ou sans seuil de dose selon le mode d'action cancérogène de la substance chimique étudiée. Pour cela, il est proposé de suivre un schéma décisionnel reprenant chacune des étapes de la réflexion, permettant d'aboutir à l'hypothèse de construction des VTR cancérogènes. La Figure 1 est inspirée d'un schéma proposé par Bolt *et al.* (2004) et s'applique pour les substances dont l'effet cancérogène chez l'Homme est suspecté, voire certain. Cinq catégories de substances peuvent être identifiées :

- Substances cancérogènes génotoxiques (altération directe de l'ADN), pour lesquelles l'hypothèse d'absence de seuil est proposée ;
- Substances cancérogènes génotoxiques pour lesquelles une action sur l'ADN ne peut pas être clairement écartée. Dans ce cas, par principe de précaution, l'hypothèse d'absence de seuil est conservée ;
- Substances cancérogènes génotoxiques à des doses d'essais supérieures aux doses maximales tolérables (DMT) ou pour lesquelles une action indirecte sur le génome est avancée. Ce cas impose le jugement d'experts afin de proposer l'hypothèse de construction la plus pertinente ;
- Substances cancérogènes génotoxiques dont l'action sur l'ADN repose sur un mécanisme aneugène ou clastogène. Dans certains cas, il est possible de retenir une hypothèse de construction à seuil ;
- Substances cancérogènes non génotoxiques. Dans ce cas, l'hypothèse de construction à seuil est proposée.

Les tests de mutagénicité et génotoxicité *in vitro* et *in vivo* fournissent des éléments importants à prendre en compte dans la description globale du mode d'action cancérogène d'une substance. Les résultats de ces tests et leur évaluation constituent une étape décisive dans le choix de la méthode de construction de la VTR cancérogène (à seuil ou sans seuil de dose).

Le schéma d'aide à la décision sur l'hypothèse de construction des VTR cancérogènes est le suivant^{9,10} :

⁹ La **génotoxicité directe** correspond à toutes réactions chimiques possibles entre une substance d'intérêt et l'ADN, comme des liaisons covalentes (adduits) ou des cassures du double brin (attaque électrophile). La **génotoxicité indirecte** correspond aux autres mécanismes conduisant à des modifications du matériel génétique (stress oxydatif par exemple). Un cancérogène non génotoxique ou épigénétique correspond à tous mécanismes aboutissant à un processus cancéreux, sans que la molécule d'ADN soit altérée (exemple des esters de phorbol).

¹⁰ Jugement d'expert: Processus intellectuel d'appréciation, d'évaluation, d'estimation ou d'explication conduisant à énoncer une opinion, sur un sujet ou un objet, fondée sur la compétence, l'indépendance et la probité d'une personne reconnue apte à effectuer des travaux d'expertise.

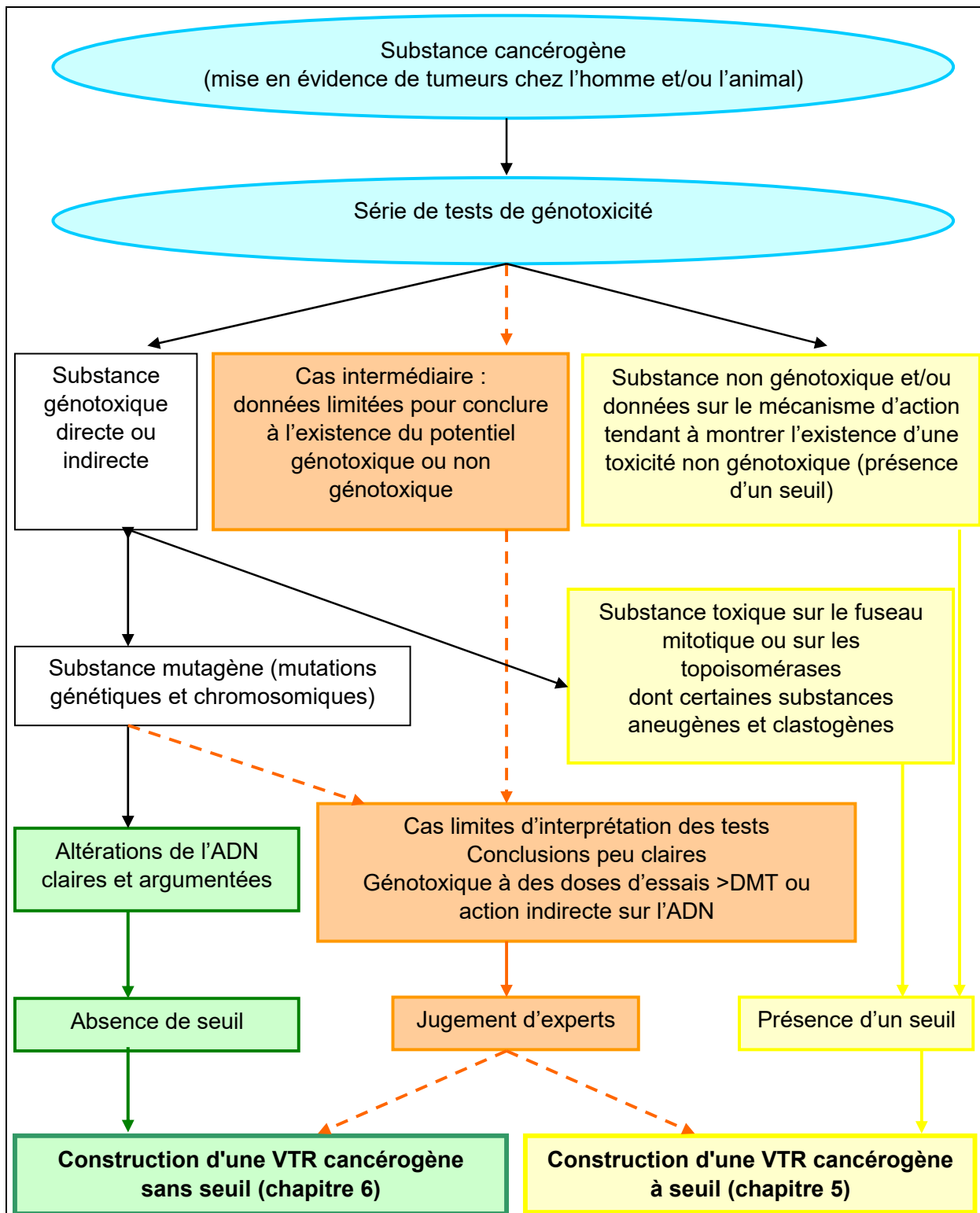


Figure 1 : Schéma décisionnel permettant d'aboutir à l'hypothèse de construction des VTR cancérogènes

5.3 Analyse des VTR existantes

Suite au recensement des VTR existantes (cf. §4), plusieurs cas de figure peuvent alors se présenter :

- Aucune VTR n'est recensée pour la substance chimique considérée dans les bases de données nationales ou internationales. Cette absence de VTR peut être liée à l'insuffisance de données disponibles sur cette substance.
- Une ou plusieurs VTR existent dans l'une des bases de données nationales ou internationales pour la substance chimique considérée. Dans ce cas,
 - o soit la ou les VTR proposées, indépendamment de leur qualité, ne conviennent pas car elles concernent une voie d'exposition, une durée d'exposition ou une population cible différentes de la situation considérée.
 - o soit la ou les VTR proposées correspondent à la situation considérée. L'analyse de la qualité de cette ou de ces VTR doit être faite et éventuellement un choix peut être effectué. Pour ce faire, le détail de leur mode de construction est évalué en regardant plus spécifiquement les hypothèses de construction (mécanisme à seuil et sans seuil), les études sources retenues et les choix de construction (effet critique, dose critique et facteurs d'incertitude) (Doornaert et Pichard, 2006 ; INERIS, 2016).

Comme précisé précédemment, l'analyse et le choix de VTR existantes ne seront pas traités dans le présent rapport. L'Anses a en effet publié en 2012 un guide des pratiques d'analyse et de choix des valeurs de référence (Anses, 2012a). Celui-ci présente la méthode employée par l'Anses lorsqu'elle procède à l'analyse d'une VTR élaborée par un autre organisme. Une démarche itérative est proposée pour l'analyse et le choix de VTR. Elle comporte plusieurs niveaux en fonction du degré de détail accordé à l'élaboration de la VTR selon l'urgence de la demande, le corpus de données disponibles et considéré, le nombre de substances traitées, l'importance de l'exposition et l'objectif de l'évaluation. L'analyse réalisée dans le cadre des VTR correspond à l'analyse la plus poussée avec une description détaillée de la construction des VTR et leur analyse critique en prenant en compte la transparence de la construction et l'argumentation des choix réalisés pour la construction (étude source avec une analyse de la qualité de cette étude, dose critique, ajustements, facteurs d'incertitude, *etc.*). Chaque point du processus d'élaboration de la VTR par un organisme autre que l'Anses est confronté à la méthodologie employée par l'Anses afin de déterminer si cette valeur peut ou non être retenue.

5.4 Construction de la VTR

5.4.1 Choix de l'étude clé

La ou les meilleure(s) étude(s) sont choisies en fonction de l'effet critique retenu. L'objectif n'est pas de classer l'ensemble des études selon un système de notation chiffrée mais plutôt de présenter de manière structurée et systématique les critères permettant d'arriver à un choix final

fondé sur un jugement scientifique. Si des informations complémentaires ne sont pas utilisées directement pour construire les VTR, elles servent à argumenter les choix qui sont faits.

5.4.1.1 Données humaines

D'une manière générale, les données de bonne qualité chez l'Homme sont préférées aux données obtenues sur l'animal. Lorsqu'elles sont disponibles et de bonne qualité, les études épidémiologiques présentent des intérêts majeurs pour l'étude des relations dose – réponse, telle que l'absence d'incertitude liée à la transposition entre espèces. Néanmoins ces données sont souvent plus rares et peuvent ne pas convenir sur le plan méthodologique pour construire des VTR.

A l'exception des expositions sur des volontaires (études épidémiologiques dites « expérimentales »), l'exposition dans les études étiologiques n'est pas caractérisée de façon aussi précise que dans les études chez l'animal et il est rare que l'on puisse démontrer une relation claire entre la dose et l'effet. L'importance accordée aux études chez l'Homme pour fixer une VTR dépendra donc de la nature de l'effet néfaste et de la qualité des études et de l'existence d'une relation dose-effet.

Lorsque l'on dispose de résultats épidémiologiques positifs, il convient de tenir compte des variations de sensibilité chez l'Homme, de la prédisposition génétique, de la sensibilité en fonction de l'âge et du sexe, ainsi que de la présence de certains facteurs confondants éventuels. Par ailleurs, des données épidémiologiques négatives peuvent être difficiles à interpréter car elles peuvent être dues à un manque de puissance statistique de l'échantillon étudié ; élément d'autant plus vrai que le risque à mettre en évidence est faible.

5.4.1.2 Données animales

La plupart des données toxicologiques utilisées pour l'évaluation des risques proviennent d'études menées chez l'animal.

Les études de toxicologie chez l'animal retenues doivent être conçues de façon à établir une dose sans effet adverse observé (de l'anglais NOAEL/C, no observed adverse effect level/concentration), une dose minimale provoquant un effet adverse observé (de l'anglais, LOAEL/C, lowest observed adverse effect level/concentration)¹¹ ou une benchmark-dose/concentration (BMD/C). Dans la mesure du possible, les études chez l'animal doivent fournir des informations sur le mode d'action, la relation entre la dose administrée et la dose effectivement délivrée, ainsi que sur des études pharmacocinétiques et pharmacodynamiques.

Dans les études où les animaux sont exposés par voie respiratoire, l'exposition peut se faire :

- corps entier : les animaux sont alors exposés dans une chambre d'exposition. Un avantage de ce mode d'exposition est qu'il mime une exposition « naturelle » c'est-à-dire comme

¹¹ Parfois les études permettent de statuer non pas sur une dose mais sur une concentration. On utilise dans ce cas les termes de NOAEC : no observed adverse effect concentrations et LOAEC : lowest observed adverse effect concentration sont utilisés.

cela peut être le cas pour une population humaine. Dans la chambre, la concentration délivrée est souvent contrôlée, la concentration est relativement stable et l'environnement contrôlé. Cependant, il existe des incertitudes sur la dose réellement absorbée. En effet, les animaux peuvent être également exposés à la substance par voie cutanée *via* le dépôt de la substance sur la fourrure et par voie orale par le léchage de la fourrure. Pour les substances irritantes, les animaux ont tendance à se protéger en cachant leur museau dans leur fourrure et se serrant les uns contre les autres.

- « nose only » ou « head only » : seule la tête ou le museau est alors exposé à la substance d'intérêt. Cela permet une meilleure maîtrise de la dose d'exposition (pas de contamination cutanée, exposition par voie orale minimale). Cependant, ce dispositif peut stresser les animaux et induire des modifications du rythme cardiaque et de la thermorégulation qui peuvent influencer la toxicité de la molécule. Les animaux ne peuvent ni boire ni manger lors de l'exposition. Pour les substances irritantes, ce type d'exposition entraîne également des congestions par augmentation des sécrétions mucosiques. De plus, un écoulement nasal peut favoriser la déglutition et donc l'absorption digestive de la substance (Pauluhn *et al.*, 2003 ; Phalen *et al.*, 1984 ; Wong *et al.*, 2007).

Pour les études par voie orale, les animaux peuvent être exposés par gavage, ou *via* l'alimentation ou l'eau de boisson.

Il est important de noter qu'il existe des singularités entre les différents mammifères en terme de toxicocinétique, de sensibilité et de développement d'organes/systèmes et, de ce fait, des fenêtres de susceptibilités différentes aux xénobiotiques. Ainsi, lors de la construction de VTR à partir d'une étude chez des animaux juvéniles ou *in utero*, il est important de vérifier que ces différences sont bien prises en compte (UF, modèle PBPK, ajustement).

5.4.1.3 Cotation de l'étude clé

Le CES réalisera une cotation de(s) étude(s) clé(s) en utilisant préférentiellement l'outil ToxRtool (Toxicological data Reliability assessment Tool)¹² lorsqu'il s'agit de données animales. Cet outil est proposé par la Commission Européenne pour permettre une évaluation harmonisée et objective de la qualité des données toxicologiques. Il s'agit d'un fichier Excel dans lequel des questions sont posées afin d'évaluer différents critères (cf. annexe 11). Ces critères sont divisés en cinq groupes : identification de la substance testée, caractérisation de l'animal testé, description du protocole de l'étude, description des résultats et plausibilité du protocole de l'étude et des résultats. L'évaluateur doit répondre à chaque question en lui attribuant une valeur de 0 ou 1 (absence ou présence de l'information).

¹² <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/toxrtool>

L'outil SciRAP (Science in Risk Assessment and Policy)¹³ pourrait être une alternative à l'utilisation de ToxRTool car il évalue de façon plus poussée la qualité de l'étude. Il représente visuellement la qualité de l'étude clé. Cependant, bien qu'étant une aide à la décision, cet outil ne fournit pas de cotation chiffrée.

Pour la cotation des études toxicologiques et/ou épidémiologiques, les approches OHAT (*Office of Health Assessment and Translation*) ou GRADE (*Grading of Recommendations Assessment, Development and Evaluation*) pourraient également être utilisées. L'approche OHAT permet d'évaluer la qualité d'une revue systématique et le poids des preuves scientifiques de celle-ci (NTP, 2015). L'approche GRADE est un « système de gradation de la qualité des données scientifiques et de la force des recommandations » (HAS, 2013). L'approche OHAT permet d'évaluer à la fois les études chez l'Homme et celles menées chez l'animal, alors que GRADE permet uniquement d'évaluer les études menées chez l'Homme (Anses, 2017a).

5.4.1.4 Cas particulier : transposition voie à voie

Pour certaines substances chimiques, la littérature ne permet pas d'appréhender de relation dose-réponse utilisable pour construire une VTR pour une voie d'exposition spécifique. Il est possible, dans ce cas, d'avoir recours à une transposition voie à voie des relations doses-effets observés mais uniquement pour les effets systémiques (ECHA, 2012 ; US EPA, 1994b et 2002). La toxicité d'une substance peut varier d'une voie d'exposition à l'autre, du fait de différences de mécanisme d'action ou toxicocinétique. Ainsi, ce type de transposition demande une analyse des données de toxicocinétique et des propriétés physico-chimiques de la substance. En effet, même pour les effets systémiques, une extrapolation voie à voie n'est considérée appropriée que sous certaines conditions (i.e. prise en compte de la biodisponibilité de la substance en fonction des voies). A titre d'exemple, l'US EPA a listé plusieurs exemples de situations où une transposition de la voie orale à la voie respiratoire n'est pas appropriée (US EPA, 1994b) :

- Lorsque les substances chimiques semblent avoir une toxicité différente selon les voies (ex. métaux, irritants, sensibilisants) ;
- En cas d'effet de premier passage gastro-intestinal et/ ou hépatique ;
- En cas d'effet de premier passage au niveau du tractus respiratoire ;
- Lorsqu'un effet sur les voies respiratoires est établi, mais que la comparaison dosimétrique ne peut être clairement établie entre les deux voies ;
- Lorsque les voies respiratoires n'ont pas été étudiées de manière adéquate dans les études orales ;
- Lorsque les études par inhalation court terme, d'irritation cutanée ou *in vitro* ou des caractéristiques de la substance chimique indiquent des effets au niveau du point d'entrée dans l'organisme, mais que les études elles-mêmes ne permettent pas le développement d'une VTR par inhalation.

¹³ Ce projet est issu d'une collaboration entre le *Department of Environmental Science and Analytical Chemistry*, l'Université de Stockholm, l'*Institute of Environmental Medicine*, le *Karolinska Institutet* de Stockholm et le programme de recherche MistraPharma. <http://www.scirap.org/>

Lorsque l'extrapolation voie à voie est jugée appropriée, des corrections doivent être appliquées pour prendre en compte les différences de cinétique et de métabolisme. En général, il est difficile de quantifier les différences de métabolisme, d'excrétion et de distribution. En pratique, les différences entre les voies sont déterminées uniquement par les pourcentages d'absorption dans la circulation systémique. Les données d'absorption spécifique de la substance pour les différentes voies sont préférées lorsqu'elles sont disponibles. Sinon, des valeurs par défaut sont utilisées. Ceci est utilisé chez l'Homme mais également pour l'animal, à défaut de données de meilleure qualité. Par exemple, des données obtenues par voie orale peuvent être utilisées pour obtenir des VTR pour la voie respiratoire. Les données sont converties en utilisant un volume d'air respiré sur 24 heures de 20 m³ pour un poids moyen de 70 kg (ECHA, 2012).

$$\begin{aligned} \text{VTR}_{\text{voie orale}} &= \text{VTR}_{\text{voie respiratoire}} \times 20 \text{ m}^3 / 70 \text{ kg} \\ \text{VTR}_{\text{voie respiratoire}} &= \text{VTR}_{\text{voie orale}} \times 70 \text{ kg} / 20 \text{ m}^3 \end{aligned}$$

En absence de données d'absorption, l'ECHA (ECHA, 2012) propose :

- Dans le cas d'une extrapolation de la voie orale à l'inhalation, d'utiliser un taux d'absorption de 50% pour la voie orale et de 100% pour la voie respiratoire, ce qui permet d'obtenir un NOAEL interne plus faible et donc plus protecteur. Si des données sont disponibles pour la voie orale, celles-ci doivent être utilisées. En revanche, si des données sont disponibles pour la voie respiratoire, l'ECHA recommande d'utiliser le pire cas, soit 100% d'absorption ;
- Pour une extrapolation de la voie respiratoire vers la voie orale ou de la voie orale vers la voie cutanée, 100% d'absorption pour les 2 voies d'exposition.

Pour les VTR sans seuil, le calcul est fait de la même façon sur la dose critique avant extrapolation à l'origine. L'US EPA recommande préalablement au calcul de faire une analyse qualitative afin de juger si des effets similaires peuvent être observés suite à une exposition par les 2 voies (US EPA, 2009). En absence de données contraires, il est considéré que la substance est cancérigène suite à une exposition si elle est absorbée *via* cette même voie d'exposition pour donner une dose interne.

Il est important de souligner que l'extrapolation voie à voie est associée à un fort degré d'incertitude.

Le choix du taux d'absorption sera décidé au cas par cas en fonction des propriétés des substances.

5.4.1.5 Cas particulier : utilisation de méthodes alternatives (QSAR, lecture croisée)

En l'absence de données expérimentales toxicologiques sur une substance, des méthodes alternatives peuvent être utilisées pour estimer ses effets biologiques et/ou sa réactivité. Deux principaux types d'approches ont été développés : l'analyse croisée (« read across ») et l'approche

QSAR (Quantitative Structure Activity Relationship). Ces deux méthodes consistent en l'utilisation des données provenant d'un ou plusieurs composés chimiques similaires (sources) pour prédire des propriétés d'une ou plusieurs substances (cibles) pour lesquelles des données sont manquantes. Des lignes directrices ont été élaborées par divers organismes dont l'OCDE (OCDE, 2007 et 2014) ou l'ECHA (ECHA, 2008, 2013 & 2015).

Le QSAR consiste en l'utilisation de modèles mathématiques théoriques pour prédire de manière quantitative, des propriétés physico-chimiques, biologiques (ex : toxicologiques) ou environnementales d'une substance, à partir de sa structure chimique. De nombreux modèles ont été développés par différents organismes, tels l'OCDE QSAR Toolbox (OECD QSAR toolbox v.4.0)¹⁴, DEREK (v5.0.2) (Marchant *et al.*, 2008), Danish QSAR database¹⁵, VEGA (VegaNIC, v.1.1.3) (Benfenati *et al.*, 2013), *etc.* Leur intérêt consiste en l'intégration au modèle théorique de données sur des substances structurellement analogues.

La lecture croisée peut se baser sur deux types d'hypothèses : la similitude structurale des composés source(s) et cible(s) ou la (bio)transformation en un composé commun responsable de la toxicité. Dans cet objectif, la comparaison des structures chimiques, des propriétés physicochimiques et des données de toxicologie de chacun des composés concernés est nécessaire afin de conclure sur la validité de cette approche.

Le CES a choisi d'appliquer ces méthodes au cas par cas selon les modalités suivantes pour combler l'absence de données toxicologiques ou lorsqu'on considère comme effet critique un effet lié à une famille de substances :

- L'utilisation de la lecture croisée (« read across ») peut être envisagée lorsqu'elle ouvre la possibilité de sélectionner des substances chimiques pertinentes (similarités de structure) qui conduisent à des prédictions fiables par analogie structurale. Cette approche peut être utilisée dans le cadre par exemple d'un « effet-famille » ;
- Si l'utilisation de la lecture croisée (« read across ») ne peut être réalisée, l'approche QSAR pourra éventuellement être utilisée si la substance se trouve à l'intérieur des domaines de prédiction du modèle.
- L'utilisation d'étude *in vitro* pourrait être envisagée, seule ou en combinaison avec une lecture croisée. Cependant, à ce jour, aucune VTR n'a été dérivée à partir d'études *in vitro*.

5.4.1.6 Position du CES sur le choix de l'étude clé

Le choix de l'étude clé se fonde sur le raisonnement suivant :

- privilégier les données chez l'Homme si elles sont de qualité suffisante et si les données d'exposition sont de qualité suffisante, en particulier si elles permettent d'établir une relation dose-réponse ;

¹⁴ <http://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/theoecdqsartoolbox.htm>

¹⁵ Danish (Q)SAR Database, Division of Diet, Disease Prevention and Toxicology, National Food Institute, Technical University of Denmark, <http://qsar.food.dtu.dk>

- utiliser en deuxième intention les études expérimentales chez l'animal, de bonne qualité (respect des BPL, protocoles standardisés, effectifs suffisants) ;
- utiliser des méthodes prédictives (lecture croisée ou read-across, QSAR, etc.) si elles ont été argumentées, et au cas par cas sur la base d'un consensus d'experts du CES.

Le CES recommande de privilégier les études réalisées selon la voie d'exposition correspondant à la voie ciblée lors de la construction de la VTR. Si ce n'est pas possible, réaliser si possible une transposition voie à voie.

Dans la mesure du possible, l'Agence tentera d'obtenir les données brutes de l'étude clé sélectionnée.

5.4.2 Choix de la dose critique

5.4.2.1 NOAEL/C et LOAEL/C

Les effets à seuil sont ceux qui ne se produisent qu'au-dessus d'un certain niveau d'exposition. Un seuil toxicologique peut être défini comme une dose au-dessous de laquelle aucun effet nocif n'est attendu au regard de la littérature disponible au moment de l'expertise.

L'hypothèse centrale ici est la supposition de l'existence d'un seuil de toxicité de la substance en dessous duquel les individus exposés ne présenteront aucun effet néfaste sur leur santé. Cependant ce seuil n'est généralement pas observable et ne peut qu'être estimé.

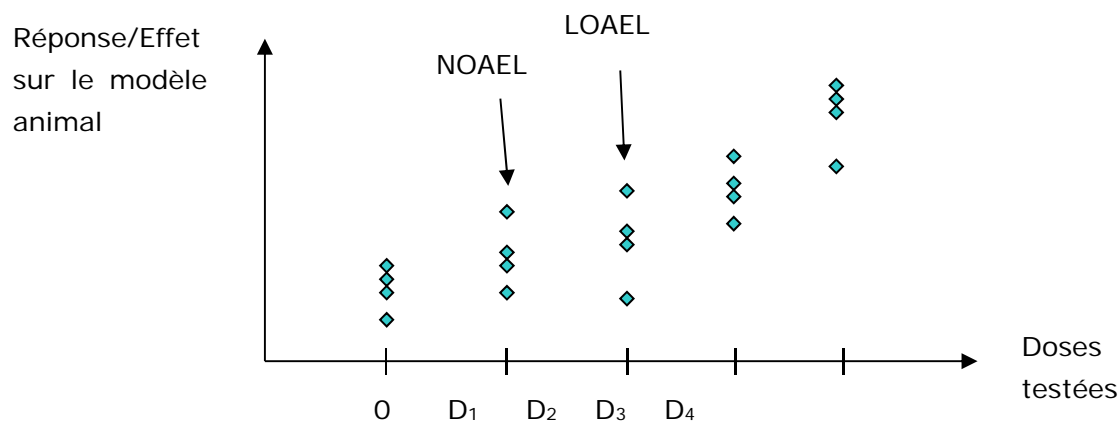
Pour un effet à seuil, il est fait l'hypothèse que de faibles doses d'une substance peuvent être tolérées en raison de la présence des systèmes de détoxification métabolique, d'homéostasie physiologique et d'adaptation et de réparation cellulaires. Au-dessous d'une certaine dose minimale, ces mécanismes compensatoires peuvent atténuer les effets nocifs d'une substance, même au cours d'une exposition chronique. Toutefois, à des doses plus élevées, la capacité de l'organisme à compenser ou à s'adapter est dépassée, ce qui entraîne une insuffisance de la fonction de l'organe ou l'évolution vers un état pathologique. Cela peut aussi se produire à la suite d'expositions répétées, fréquentes ou continues à de faibles concentrations d'une substance qui peut s'accumuler dans l'organisme (Bonvallot et Dor, 2002).

L'évaluation des substances pour lesquelles la réaction toxique présente un seuil nécessite la détermination de la relation dose-réponse dans le but d'identifier la dose la plus forte de la substance qui ne révèle aucun effet nocif. Cette dose est définie comme la dose sans effet nocif observé (NOAEL/C). Ce terme comprend deux qualificatifs spécifiques : « observé », qui indique qu'il pourrait y avoir d'autres effets qui n'ont pas été détectés (par ex. des effets biochimiques mineurs ou des effets hormonaux spécifiques) et « nocif », qui indique que les effets observés ne sont pas tous nocifs.

Si les données expérimentales ne permettent pas de faire l'identification d'un NOAEL/C, il convient d'identifier un LOAEL/C, la dose minimale provoquant l'effet indésirable retenu comme effet

critique (Figure 2). En 1994, l'US EPA a proposé un tableau classifiant le niveau de sévérité de différents types d'effets et le type de dose critique pouvant y être associée (Tableau 3).

Figure 2 : Relation dose – réponse et recherche du LOAEL



En règle générale, il est admis que les effets toxiques d'une substance chez les animaux de laboratoire sont supposés se produire aussi chez l'Homme. En conséquence et du fait de la difficulté de disposer d'études épidémiologiques pertinentes, les études animales sont la source majeure de données toxicologiques. Au cours de ces expérimentations, le recours à des doses élevées permet d'observer des signes manifestes de toxicité, assurant une meilleure appréciation de l'organe cible et d'un effet spécifique.

La variété et la sévérité des effets toxiques observés dans les populations peuvent augmenter avec le niveau d'exposition : c'est la relation dose-effet. Elle est à distinguer de la relation dose-réponse définie comme décrivant la relation entre la fréquence de survenue d'une pathologie dans une population et le niveau d'exposition à une substance toxique (Holsapple et Wallace, 2008).

Il est à noter que la dose critique servant de point de départ à la construction de la VTR était souvent un NOAEL/C ou à défaut un LOAEL/C. Or, l'utilisation des LOAEL et NOAEL pour la construction des VTR a été débattue et remise en question ces dernières années par la communauté scientifique toxicologique pour les raisons suivantes :

- LOAEL et NOAEL font forcément parties des concentrations testées. Leurs valeurs numériques sont donc très dépendantes du protocole expérimental ;
- leurs valeurs dépendent aussi directement de la taille des échantillons d'animaux. La capacité d'une expérimentation à distinguer un effet entre une dose et le témoin augmente avec la taille des échantillons. Plus les échantillons utilisés sont de faible taille, plus le NOAEL est élevé et, par conséquent, plus le risque que le NOAEL produise un effet est grand ;
- on constate en pratique que plus les données expérimentales sont de faible qualité, plus le NOAEL est élevé, et donc moins cette valeur est protectrice pour la population ;

- on ne dispose en aucun cas d'intervalle de confiance pour ces valeurs. On ne dispose pas non plus d'un niveau de précision ou d'un ordre de grandeur pour son incertitude, puisque bien souvent les valeurs expérimentales qui ont conduit à la détermination du couple LOAEL / NOAEL ne sont plus disponibles ;
- le niveau d'effet produit réellement par le NOAEL n'est pas connu. D'après Allen *et al.* (1994), pour les effets sur le développement par exemple, le pourcentage de réponse (effet néfaste) associé à un NOAEL serait en moyenne compris entre 5 et 20 %.

5.4.2.2 Benchmark dose/concentration

L'approche qui est aujourd'hui utilisée est la benchmark dose/concentration (BMD/C) qui, après modélisation des données à partir du domaine observable, permet de définir un niveau de dose correspondant à un niveau de réponse spécifié (BMR ou benchmark response). **Le CES a choisi d'appliquer la méthode de benchmark dose chaque fois que les données disponibles le permettent.**

La benchmark dose est une dose produisant un effet mesurable correspondant à un niveau de réponse donné par rapport à un groupe témoin. Le plus souvent, la limite inférieure de son intervalle de confiance à 95% ou 90% (BMDL_{95%} ou BMDL_{90%})¹⁶ est utilisée (Figure 3). Cette approche repose sur une modélisation des données expérimentales prenant en compte l'ensemble de la courbe dose-réponse. L'analyse de la réponse dans les groupes exposés nécessite de définir plusieurs cas de figure en fonction du type d'effets choisis :

- si les observations concernent le nombre d'animaux atteints (par une altération d'organe, une pathologie, *etc.*), la réponse obtenue est dite **dichotomique ou quantale** : c'est la proportion d'individus touchés ;
- si les observations concernent un paramètre physiologique ou biologique de l'organisme, la réponse obtenue est dite de nature **continue** (par exemple le poids d'un organe, le nombre de globules rouges ou la concentration sanguine d'un enzyme hépatique).

¹⁶ L'US EPA utilise la limite inférieure de l'intervalle de confiance à 95% (two sided), le RIVM la limite inférieure de l'intervalle de confiance à 90% (one side), les deux approches conduisent des résultats identiques.

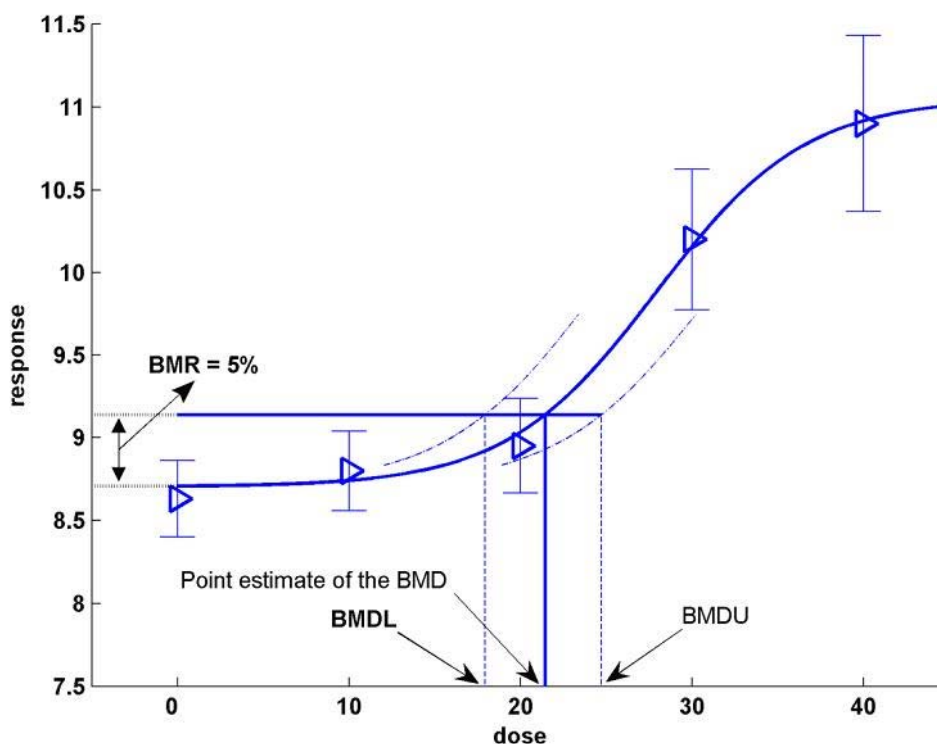


Figure 3 : Relation dose-réponse et définition de la BMD et de la BMDL (EFSA, 2009)

Des outils tels que BMD Software de l'US EPA (<http://www.epa.gov/ncea/bmds/>) et PROAST du RIVM (www.proast.nl) ont été développés spécifiquement pour l'estimation des BMD, ces dernières années. Plusieurs étapes sont nécessaires, en particulier pour les choix :

- d'un modèle théorique de relation dose-réponse,
- d'une méthode d'ajustement,
- du niveau de réponse.

• Réponse dichotomique

Dans le cas de données dichotomiques, la BMD_x est définie comme la dose qui engendre une augmentation de x % de l'incidence de la réponse observée dans le groupe exposé par rapport au témoin. Cette augmentation de x % est appelée benchmark response (BMR) : le choix du pourcentage associé à la BMD (proportion d'individus) se fait en fonction de la sensibilité du test expérimental, de la sévérité de l'effet étudié et de l'incidence de base retrouvée chez les témoins. Dans la pratique, des valeurs par défaut de 1, 5 et 10 % sont plus souvent employées et recommandées par l'US EPA.

Ce BMR se définit le plus souvent comme suit :

$$\text{Extra Risk} = \frac{P(D) - P(0)}{1 - P(0)} = 1\%, 5\% \text{ ou } 10\%$$

Avec $P(D)$: la probabilité d'avoir un effet à la dose D ,

$P(0)$: probabilité d'avoir l'effet à la dose 0 (bruit de fond).

Cette valeur traduit un excès de risque standardisé (ou « extra risk »). Cette approche est plus souvent utilisée pour des raisons de comparabilité des données.

Selon l'US EPA (US EPA, 2012a) :

- un excès de risque de 10 % doit être pris par défaut pour les données quantales. Ces 10 % représentent la plupart du temps la limite de sensibilité des tests toxicologiques de cancérologie ou autres ;
- un excès de risque de 5 % est proposé pour certaines études dont la sensibilité est plus importante comme les études sur la reproduction et le développement ;
- un excès de risque de 1 % peut être proposé pour des résultats d'études épidémiologiques humaines qui ont en général la sensibilité suffisante.

Le CES a choisi pour les données dichotomiques, d'appliquer un BMR de 10% pour des études animales et variable entre 1 et 10% pour les études chez l'Homme. Le choix du pourcentage associé à cette valeur qui correspond à la proportion d'individus concernés par l'effet sanitaire retenu, se fera en fonction de la sensibilité du test expérimental, de la sévérité de l'effet étudié et de l'incidence de base retrouvée chez les témoins. Ces choix seront explicites et les arguments d'experts soutenant ce positionnement clairement décrits dans le rapport.

• Réponse continue

La principale difficulté concerne le choix de la modification maximale que l'on tolère en la considérant comme étant physiologique (ou non néfaste) pour le paramètre étudié. Cela revient à se demander quelle variation biologique peut être considérée comme acceptable d'un point de vue physiologique. Il est nécessaire de définir un niveau de réponse considéré comme néfaste à partir d'arguments descriptifs biologiques et statistiques, et/ou par l'analyse des données sur les témoins historiques. Ce seuil devrait être fondé sur la signification biologique de la réponse étudiée. L'approche par défaut proposée par l'US EPA, lorsque aucune connaissance n'est disponible, est de considérer comme seuil, la valeur de la moyenne du paramètre estimé chez les témoins, plus ou moins une fois l'écart type de cette valeur chez les témoins de l'expérimentation ou chez les témoins historiques (soit 1 d'écart type).

Ce BMR peut être défini de plusieurs manières selon l'US EPA. Parmi les plus utilisés, on retrouve :

- un pourcentage d'augmentation ou de diminution par rapport au groupe contrôle ;
- la valeur correspondant à la moyenne du groupe contrôle moins une fois l'écart type du groupe contrôle (c'est l'approche par défaut préconisée par l'US EPA) ;
- une valeur seuil (« cutt off » ou « point »), cette approche est possible si on dispose de connaissances nécessaires pour définir ce qui devient néfaste comme réponse ou pas (exemple taux d'enzymes circulant chez l'Homme).

Selon l'US EPA, le BMR peut être de nature différente. Cependant, selon l'EFSA, le BMR (ou CES pour critical effect size) correspond à un pourcentage (augmentation ou diminution) de réponse par rapport au groupe contrôle, par défaut 5% (historiquement et par comparaison, ce seuil de 5% aboutit à une BMDL proche du NOAEL).

Au final, il s'agit de choisir un niveau de réponse à partir duquel on considère la réponse observée comme néfaste. Ce choix de la BMR doit être clairement expliqué et soumis à un jugement d'experts.

Pour les données continues, le CES a choisi d'appliquer un BMR de 5%.

- **Modélisation**

Quel que soit le type de données (continues ou dichotomiques), les données expérimentales sont modélisées au moyen de logiciel d'ajustement de courbe (Proast, BMDs, etc.). Dans la majorité des cas, plusieurs équations (modèles) peuvent décrire de façon adéquate les données (test du goodness of fit : qualité d'ajustement du modèle aux données expérimentales), ce qui peut conduire à la détermination de plusieurs BMD et BMDL. Bien qu'il existe des critères statistiques pour le choix du meilleur modèle (critère d'Akaike ou Akaike information criterion (Bozdogan, 1987), AIC par exemple), l'EFSA estime que l'objectif de la modélisation de la dose réponse n'est pas de trouver la « vraie » BMD, mais de trouver toutes les valeurs plausibles de cette BMD compte tenu des données disponibles. Ceci prend en compte le modèle qui s'adapte le mieux (meilleur ajustement aux données expérimentales), mais aussi les modèles qui ont pour résultat un ajustement légèrement inférieur.

Ainsi, il y a eu une évolution au cours de ces dernières années quant aux choix de la dose/concentration critique pouvant être utilisée comme point de départ (POD) :

- sélection de la BMD et BMDL issues du modèle qui s'adapte le mieux aux données expérimentales (« best fit model » selon l'AIC) ;
- sélection de la plus faible BMDL issu d'un modèle qui décrit les données expérimentales de façon adéquate, mais qui n'est pas forcément celui qui les décrit le mieux selon l'AIC.

Dans la plus part des cas, il n'y a pas de différences majeures entre les valeurs de BMD et BMDL issues des différents modèles. En effet, les valeurs sont relativement proches et restent dans un intervalle de deux entre les valeurs extrêmes.

Cependant, dans certains cas particuliers, il peut être observé de plus grandes différences entre les BMD et BMDL des différents modèles. Dans de telles situations, l'EFSA propose d'avoir recours au « model averaging », qui permet de prendre en considérations l'ensemble des modèles acceptés (ceux qui décrivent les données expérimentales) et de les pondérer en fonction de leur AIC (les modèles qui décrivent le mieux les données bénéficient d'une pondération plus forte : plus l'AIC est faible plus l'ajustement est jugée de bonne qualité).

Le CES fait le choix de retenir par ordre de préférence :

- 1. BMD et BMDL issues du modèle qui s'adapte le mieux aux données expérimentales,**
- 2. Modèle des modèles (« model averaging »), lorsque les valeurs de BMD et BMDL issues des différents modèles présentent des différences majeures (intervalle des valeurs extrêmes supérieure à 10 par exemple).**

Pour le choix du niveau de réponse (BMR), le CES fait le choix de retenir par ordre de préférence :

- 1- la valeur d'un BMR à partir de laquelle la réponse observée a été considérée comme anormale sur des considérations biologiques et/ou toxicologiques et de retranscrire les arguments d'experts soutenant ce positionnement,
- 2- les valeurs de BMR proposées par l'EFSA (5 et 10%, pour les données continues et dichotomiques respectivement).

5.4.2.1 Position du CES sur le choix de la dose critique

Le CES fait le choix de retenir par ordre de préférence :

- l'utilisation de l'approche BMD/C dans les situations où les données se prêtent à ce type de modélisation : la BMD/CL (la limite inférieure de l'intervalle de confiance de la BMD/C) est alors utilisée ;
- les études qui donnent le maximum d'informations, notamment sur le couple NOAEL/C / LOAEL/C pour l'effet critique retenu ;
- enfin, quand les études ne permettent d'appréhender qu'une dose (LOAEL/C ou NOAEL/C), il est pertinent de favoriser les études qui donnent le NOAEL/C plutôt qu'un LOAEL/C.

5.4.3 Ajustement temporel

Dans les études montrant des effets néfastes pour des expositions long-terme chez l'Homme (travailleurs) ou l'animal, le mode d'administration de la substance étudiée est souvent discontinu, c'est-à-dire que les animaux ou les Hommes sont exposés pendant un nombre d'heures et de jours limité. Un ajustement temporel peut être appliqué à la dose critique déterminée afin de prendre en compte l'intermittence de cette exposition,

Pour les études dans une population non professionnelle, cet ajustement correspond à l'application de la loi de Haber selon laquelle la concentration d'une substance et la durée d'exposition sont des paramètres influençant la toxicité. Il consiste à déterminer un équivalent d'exposition continue en appliquant un coefficient d'ajustement de la dose critique expérimentale :

$$\text{Dose critique}_{\text{ajustée}} = \text{Dose critique}_{\text{ADJ}} = \text{Dose critique} \times N_1 \text{ heures}/24 \text{ heures} \times N_2 \text{ jours}/7 \text{ jours}$$

N_1 heures = nombre d'heures par jour d'exposition à la substance

N_2 jours = nombre de jours par semaine d'exposition à la substance

Toutefois, cet ajustement ne doit pas être appliqué de façon systématique, notamment lorsque la toxicité observée, pour une substance donnée, est plus dépendante de la concentration d'exposition que de la durée d'exposition (Afsset, 2008 ; Belkebir *et al.*, 2011). C'est le cas par exemple du formaldéhyde dont l'effet cancérigène repose sur un mode d'action concentration-dépendant (cytotoxicité et génotoxicité).

Dans le cadre d'une exposition professionnelle, l'ajustement temporel peut également se faire selon la formule suivante (OEHHA, 2000 ; US EPA, 1994b) :

$$\text{Dose critique}_{ADJ} = \text{Dose critique} \times (\text{VE}_{\text{travailleur}}/\text{VE}_{\text{Homme}}) \times (5 \text{ jours}/7 \text{ jours})$$

Avec $\text{VE}_{\text{travailleur}}$: volume minute par défaut chez un travailleur = 10 m³ respiré pendant une journée de travail de 8 h.

VE_{Homme} : volume minute par défaut chez un Homme exposé pendant une journée entière (24 h) = 20 m³

Les modèles PBPK valides (bonne prédictibilité) (cf. 5.4.4.1) peuvent également être utilisés pour réaliser cet ajustement temporel.

Lors de la construction de VTR construites à partir d'un effet sur le développement, aucun ajustement temporel ne sera appliqué, ceux-ci survenant sur des fenêtres d'exposition délimitées et non extrapolables dans le temps.

5.4.4 Ajustement allométrique ou dosimétrique

L'objectif de ces ajustements dosimétriques est de recalculer une valeur du POD (point of departure) chez l'Homme (NOAEL/LOAEL, BMD) à partir de celle identifiée chez l'animal.

Les ajustements allométriques et/ou dosimétriques, quelle que soit la voie concernée, permettent de remplacer la valeur du facteur d'incertitude inter-espèces (UF_A), en particulier la composante toxicocinétique (US EPA, 2009).

5.4.4.1 Modèle PBPK

Des modèles PBPK (Physiologically-based pharmacokinetic), également appelés PBTK (Physiologically-Based Toxicokinetic), ont été développés pour plusieurs substances. Cette méthodologie repose sur une description mathématique du devenir d'un polluant dans le corps à partir d'équations différentielles. Ainsi, l'organisme est décrit comme un ensemble de compartiments reliés entre eux par la circulation systémique (artérielle et veineuse). La variation du taux de contaminant dans chacun des compartiments est décrite par des équations mathématiques comme exprimé ci-dessous à titre d'exemples :

- Variation du taux de produit chimique dans un compartiment dans le temps (organe ou groupe d'organe) en fonction du temps

$$\frac{dA}{dt} = Qt \times (Ca - Cvt)$$

Avec Qt : débit tissulaire ; Ca : concentration artérielle ; Cvt : concentration veineuse en sortie du tissu

- Quantité de substance au sein d'un compartiment (A_t) en fonction du temps

$$A_t = \int_t^A \left(\frac{dA}{dt}\right) \cdot dt$$

- Concentration de substance au sein d'un compartiment en fonction du temps (t)

$$C_t = \frac{A_t}{V_t}$$

avec C_t : concentration tissulaire ; A_t : quantité de substance dans le tissu, V_t : volume tissulaire

- Concentration à la sortie d'un compartiment en fonction du temps

$$C_{vt} = \frac{C_t}{P_t}$$

Avec P_t : coefficient de partage entre le sang et le tissu

La représentation des organes n'est pas nécessairement exhaustive. Elle dépend de la substance étudiée et des organes cibles jouant un rôle dans la cinétique et le stockage de la substance (Loizou *et al.*, 2008).

Les paramètres physiologiques comme les volumes tissulaires, les flux sanguins perfusant les compartiments ou encore le poids corporel sont indépendants de la substance étudiée. Ces valeurs sont issues de la littérature et sont fonction de l'espèce (rongeur, humain, *etc.*) et du poids de l'animal. Les autres paramètres physicochimiques et biochimiques tels que les coefficients de partage, les constantes métaboliques, dépendent quant à eux directement de la substance. Ces paramètres sont généralement déterminés à partir d'études expérimentales ou proviennent de la littérature.

Les modèles PBPK lorsqu'estimés comme prédictif, après une évaluation, présentent l'avantage d'apporter une réponse aux questions d'extrapolation (inter-doses, inter-espèces, inter-individuelles, ajustement temporelle), et donc, de remplacer certains facteurs d'incertitude lors de l'élaboration des VTR. Ils permettent également de prendre en compte les particularités liées au fonctionnement d'organes spécifiques et de simuler la relation entre la concentration sanguine (ou plasmatique) et le temps, en vue de déterminer les concentrations dans l'organe cible.

Avant toute utilisation d'un modèle PBPK, il est nécessaire d'établir un niveau de confiance globale en suivant les recommandations de l'OMS/IPCS (OMS, 2010a). Le niveau de confiance d'un modèle repose sur l'analyse de la structure du modèle, la simulation et validation, et enfin un regard sur la fiabilité avec l'analyse de sensibilité et des incertitudes.

Le CES a choisi de recourir aux modèles PBPK à chaque fois que ceux-ci ont été développés et validés dans la littérature scientifique pour la substance afin de réduire les facteurs d'incertitude (facteurs inter-espèces ou inter-individuelles).

5.4.4.2 Méthode de l'US EPA

5.4.4.2.1 *Voie orale*

L'objectif des ajustements allométriques est de réduire la valeur de l'incertitude due à la variabilité inter-espèce lors de la détermination d'une dose équivalente humaine (ou HED : Human Equivalent Dose). Cet ajustement est réalisé selon les recommandations de l'US EPA (US EPA, 2006 et 2011). Les équations utilisées sont fonction de la voie d'exposition et des propriétés physicochimiques de la substance.

Dans un souci d'harmonisation entre les méthodes de construction de VTR à seuil et sans seuil de dose, ces ajustements allométriques peuvent donc être réalisés quelle que soit l'hypothèse choisie (à seuil/sans seuil).

Pour la voie orale, l'ajustement allométrique se fait selon l'équation suivante :

$$\text{Dose équivalente humaine} = \text{Dose animal} \left(\frac{\text{Poids animal}}{\text{Poids Homme}} \right)^{1/4}$$

Cette équation repose sur le paradigme selon lequel deux espèces exprimeront des effets toxiques similaires si elles absorbent la même dose par unité de surface corporelle (US EPA, 2006 et 2011). Les rapports des surfaces corporelles correspondent approximativement aux rapports des poids corporels à la puissance 2/3 à 3/4¹⁷. Le CES a choisi d'appliquer la méthode de l'US EPA par défaut, c'est-à-dire l'application de l'exposant 1/4, pour passer d'une dose animale à un équivalent de dose humaine. Cette approche permet de remplacer le facteur d'incertitude lié à la composante toxicocinétique UF_{A-TK} (lors de la transposition de l'animal à l'Homme valeur de 4).

Le poids moyen des animaux en fin d'étude est déterminé d'après les données décrites dans l'étude. Cependant, lorsque ce poids n'est pas disponible, on retient un poids moyen par défaut (US EPA, 1988). Il est à noter que dans le cas d'effets observés chez des rates gestantes, le poids corporel des rates en fin d'étude est corrigé sur le poids de l'utérus gravide.

Dans les études humaines, le poids est estimé à 70 kg, que l'effet ait été observé chez la femme ou l'homme.

5.4.4.2.2 Voie respiratoire

L'US EPA considère 2 catégories¹⁸ de gaz basées sur la solubilité et la réactivité de la substance considérée (US EPA, 1994b et 2009) :

- Catégorie 1 : gaz très hydrosolubles (> 1000 mg.L⁻¹) et/ou qui peuvent réagir rapidement et de façon irréversible avec les tissus des voies respiratoires. Ces gaz se déposent rapidement sur les surfaces des voies respiratoires supérieures (parties extrathoracique et trachéo-bronchique) et la fraction atteignant les alvéoles pulmonaires est beaucoup plus faible. A faible concentration, les effets ne s'observent que dans la partie extrathoracique. Ces gaz sont faiblement absorbés, en raison de leur grande réactivité avec les voies respiratoires. Ils présentent un effet toxique à la porte d'entrée (toxicité locale) ;
- Catégorie 3 : gaz relativement insolubles dans l'eau (< 10 mg.L⁻¹) et non réactifs dans les voies respiratoires, dans les régions extrathoraciques et trachéo-bronchiques. Ils provoquent surtout des effets systémiques.

L'US EPA a développé différents ajustements dosimétriques qui sont appliqués en fonction des propriétés physicochimiques de la substance inhalée (particules ou gaz) et du site où sont

¹⁷ Si on raisonne en dose totale : $\text{Dose H}_{\text{mg}} / \text{Dose A}_{\text{mg}} = (\text{Poids H} / \text{Poids A})^{3/4}$ avec Dose H : dose chez l'Homme, Dose A : dose chez l'animal, Poids H : poids chez l'Homme, Poids A : poids chez l'animal

Si on passe en mg/kg pc : $(\text{Dose H}_{\text{mg/kg}} \times \text{Poids H}) / (\text{Dose A}_{\text{mg/kg}} \times \text{Poids A}) = (\text{Poids H} / \text{Poids A})^{3/4}$

$\text{Dose H}_{\text{mg/kg}} / \text{Dose A}_{\text{mg/kg}} = (\text{Poids A} / \text{Poids H}) \times (\text{Poids H} / \text{Poids A})^{3/4} = (\text{Poids H} / \text{Poids A})^{-1} \times (\text{Poids H} / \text{Poids A})^{3/4} = (\text{Poids A} / \text{Poids H})^{1/4}$

¹⁸ A l'origine, l'US EPA considérait 3 catégories de gaz, le gaz de catégorie 2 correspondant à des gaz modérément solubles (10 à 1000 mg.L⁻¹) qui peuvent réagir rapidement, avec un effet réversible, ou agir de façon plus ou moins lente mais entraîner un effet irréversible. Cependant, du point de vue de la toxicité, l'US EPA ne considère maintenant que les gaz de catégorie 1 et 3.

observés les effets critiques (respiratoires ou extra-respiratoires), conduisant à quatre équations distinctes (US EPA, 1994b et 2009).

Pour un **gaz de catégorie 1**, c'est-à-dire ayant une action locale au niveau du tractus respiratoire, l'équation suivante peut être appliquée :

$$\text{Concentration équivalente humaine} = \text{concentration animale} \times \text{FAD}$$

Avec FAD : Facteur d'Ajustement Dosimétrique. La valeur de ce facteur sera fonction de la localisation au niveau du tractus respiratoire.

- Pour la région extra-thoracique

$$\text{FAD} = (\text{Ve} / \text{S}_{\text{ET}})_{\text{animal}} / (\text{Ve} / \text{S}_{\text{ET}})_{\text{Homme}}$$

Avec Ve : volume inhalé par minute (cm³/minute)

S_{ET} : surface de la région extra-thoracique (cm²)

- Pour la région trachéo-bronchique

$$\text{FAD} = [(\text{Ve} / \text{S}_{\text{TB}}) \times \text{fp}_{\text{ET}}]_{\text{animal}} / [(\text{Ve} / \text{S}_{\text{TB}}) \times \text{fp}_{\text{ET}}]_{\text{Homme}}^{19}$$

Avec Ve : volume inhalé par minute (cm³/minute),

S_{TB} : surface trachéo-bronchique (cm²),

fp_{ET} : correspond à la fraction de la concentration inhalée de la substance dans la région extra-thoracique, et qui peut être ainsi déposée dans la région trachéo-bronchique. Cette fraction se calcule comme suit :

$$\text{fp}_{\text{ET}} = \exp [-(\text{Kg}_{\text{ET}} \times \text{S}_{\text{ET}} / \text{Ve})]$$

où Kg_{ET} correspond au coefficient de transfert de masse de la substance dans la région extrathoracique. Si sa valeur n'est pas connue, l'US-EPA propose de retenir une valeur de 1.

- Pour la région pulmonaire

$$\text{FAD} = [(Q_{\text{alv}} / \text{S}_{\text{PU}})_{\text{animal}} / (Q_{\text{alv}} / \text{S}_{\text{PU}})_{\text{homme}}] \times [\exp^{-(\text{S}_{\text{TB}} / \text{Ve})_{\text{animal}}} / \exp^{-(\text{S}_{\text{TB}} / \text{Ve})_{\text{homme}}}]^K$$

Avec Q_{alv} : ventilation alvéolaire (cm³/minute),

S_{PU} : surface pulmonaire (cm²),

Ve : volume inhalé minute (cm³.minute),

S_{TB} : surface trachéo-bronchique (cm²),

¹⁹ Il s'agit d'une simplification de l'équation $\text{FAD} = [(\text{Ve} / \text{S}_{\text{TB}}) \times \text{fp}_{\text{ET}}]_{\text{Homme}} \times (1 - \text{fp}_{\text{TB}}) / [(\text{Ve} / \text{S}_{\text{TB}}) \times \text{fp}_{\text{ET}}]_{\text{animal}} \times (1 - \text{fp}_{\text{TB}})_{\text{animal}}$, dans laquelle fp_{TB} correspond à la fraction adsorbée dans la région trachéo-bronchique.

K correspond à $K_{GET} = K_{GTB}$ (chez l'animal et l'Homme). si on considère que le coefficient de transfert de masse de la substance dans la région extrathoracique est équivalent à celui de transfert de masse dans la région trachéo-bronchique.

Pour un **gaz de catégorie 3**, c'est-à-dire ayant une action systémique, la formule suivante peut être utilisée :

$$\text{Concentration équivalente humaine} = \text{concentration animale} \times (\text{Hb/g})_{\text{animal}} / (\text{Hb/g})_{\text{Homme}}$$

Avec (Hb/g): coefficient de partage sang/air²⁰.

Si les coefficients de partage sang/air de la substance pour l'Homme et l'animal ne sont pas connus, l'US EPA propose de retenir une valeur de 1. L'US EPA propose également de retenir 1 par défaut quand le coefficient de partage sang/air de la substance pour l'animal est supérieur à celui de l'Homme (US EPA, 2012b).

La plupart des substances ne présentant qu'un effet court terme, quand elles sont à l'état gazeux, appartiennent à des gaz de catégorie 1.

5.4.4.3 Position du CES sur l'ajustement allométrique

Le CES a choisi d'appliquer ces ajustements à partir de modèles PBPK validés quand ils sont disponibles, sinon en appliquant la méthode de l'US EPA (US EPA, 1994b, 2006 et 2009).

5.4.5 Effets à seuil : choix des facteurs d'incertitude et calcul de la VTR

5.4.5.1 Choix des facteurs d'incertitude

Des facteurs d'incertitude (UF) (également retrouvés sous le terme facteur de sécurité, facteur d'ajustement, facteur d'évaluation, facteur d'extrapolation, facteur de protection) reflètent à la fois l'incertitude scientifique existante sur la transposition d'une espèce et d'un individu à l'autre comme sur la transposition d'une situation d'exposition à une autre ou sur la disponibilité des connaissances au moment de la construction de la VTR.

Les raisons de l'emploi des différents termes ne sont pas toujours évidentes. **Le CES a choisi d'utiliser le terme « facteur d'incertitude » car c'est celui qui, selon lui, décrit le mieux la situation.**

Ils sont appliqués aux données sur la toxicité pour faire en sorte d'établir une marge protectrice entre la dose repère observée et la dose qui ne devrait pas produire d'effet dans la population, y compris les individus les plus sensibles. Cette marge a pour but de fournir une certitude raisonnable qu'aucun dommage à la santé humaine ne résultera de l'exposition au produit. La certitude absolue de l'innocuité est impossible à atteindre étant donné l'extrapolation nécessaire

²⁰ Lorsque la substance gazeuse considérée est en contact avec deux phases différentes (exemple le gaz alvéolaire et le sang capillaire pulmonaire), une certaine proportion de la substance gazeuse va s'équilibrer dans une phase (le sang) et une autre proportion dans l'autre phase (le gaz alvéolaire). A l'équilibre, le rapport des deux proportions est défini comme le coefficient de partition (coefficient de partition sang / gaz ou sang/air).

des résultats des études à une population générale (Dourson et Stara, 1983 ; Lewis *et al.*, 1990 ; OEHHA, 2000).

Malgré les efforts déployés pour utiliser les meilleures données scientifiques disponibles, l'utilisation des facteurs d'ajustement permet de prendre en compte le caractère incertain des données et fournit des assurances que la valeur de VTR choisie garantisse avec une certitude raisonnable l'absence de danger pour la santé humaine.

Les différents facteurs d'incertitude proposés dans la littérature pour la construction de valeurs de références peuvent être retrouvés dans les documents suivants : OMS, 1994 ; ECETOC, 1995 ; Mohamed, 1995 ; US EPA, 1996 ; OMS, 2001.

On retrouve classiquement cinq facteurs d'incertitude que le tableau ci-dessous détaille. Ils ne sont pas spécifiques des VTR.

Tableau 4 : Facteurs d'incertitude proposés dans la littérature pour la construction de valeurs de référence

Acronyme	Interprétation des UF	Valeurs des UF
UF _A	Variabilité inter-espèce cinétique/dynamie	1- 4/ 2,5 ou 1-3,16*/3,16 (10)
UF _H	Variabilité interindividuelle cinétique/dynamie	1- 3,16*/ 3,16 (10)
UF _{B/L}	Usage d'un LOAEL plutôt que d'un NOAEL ou une BMD	1, 3 ou 10
UF _S	Transposition d'une exposition subchronique à chronique	1, 3 ou 10
UF _D	Insuffisance des données (en qualité et en quantité)	1, 3 ou 10
	Sévérité de l'effet	1, 3 ou 10

** $\sqrt{10} = 3,16$

Le nombre de facteurs d'incertitude et leur valeur numérique sont variables d'un groupe d'experts à l'autre, si bien que les résultats d'une même étude toxicologique peuvent aboutir à des valeurs de référence différentes (Kalberlah, 1998).

Les VTR pour les substances chimiques exerçant des effets à seuil sont établies en divisant la dose critique identifiée dans l'étude clé par le produit de plusieurs facteurs d'incertitude :

- la variabilité inter-espèces (transposition animal-Homme de données expérimentales) ;
- la variabilité intra-espèce ou interindividuelle (sensibilité particulière de certains individus) ;
- l'inadéquation de la durée de l'étude (si la période d'observation est insuffisante) ;
- l'usage d'un LOAEL/C plutôt qu'une BMDL ou NOAEL/C ;
- l'inadéquation de la voie d'exposition (par exemple transposition à la voie respiratoire des données observées par voie orale) ;
- et d'autres éventuelles insuffisances méthodologiques de l'étude.

La littérature évoque souvent (surtout pour les évaluations de risques en milieu environnemental) que lors de l'élaboration de valeurs de référence, lorsqu'aucun élément d'information n'est disponible, une valeur haute fixée par défaut à 10 est utilisée pour chaque facteur d'incertitude.

L'application d'une valeur plus basse doit être argumentée par des éléments scientifiques pertinents (Stevenson, 1995).

Il n'existe pas d'approche universellement admise pour l'application d'UF dans le cadre d'une construction de VTR et le recours au jugement d'expert est utilisé à chaque fois que cela est nécessaire pour compléter ou suppléer des données objectives.

Pour la construction de VTR aiguës (généralement sur la base d'un effet de type irritation locale ou corrosion), le document du National Research Council (1993a) a recommandé que deux facteurs soient appliqués pour la prise en compte des variabilités inter- et intra-espèce. Ces facteurs doivent tenir compte des différences de sensibilité inter-espèces, de la sensibilité individuelle, de la variabilité de la population, des mécanismes d'action toxicologiques, de la biodisponibilité et de l'évaluation de la qualité des bases de données.

5.4.5.1.1 Facteur d'incertitude lié à la variabilité inter-espèces : UF_A

Le facteur d'ajustement inter-espèces est appliqué lorsqu'une étude animale est utilisée pour construire la VTR. Il est destiné à prendre en compte les différences de toxicocinétique et de toxicodynamie entre l'espèce testée et l'Homme. La valeur maximale utilisée internationalement par défaut est de 10, postulant ainsi que l'Homme est plus sensible que l'animal.

Cette valeur de 10 correspond à l'application de 2 composantes respectivement pour les variabilités toxicocinétique et de toxicodynamie. Le choix de ces composantes a fait l'objet d'un document publié par l'OMS (OMS, 2001).

Des ajustements dosimétriques ou allométriques fondés sur des paramètres physico-chimiques et biologiques (flux sanguins, coefficient de partage, etc.) peuvent être réalisés si les connaissances sont suffisantes, permettant également de réduire au maximum la part toxicocinétique de ce facteur d'ajustement (US EPA, 1994a). En pratique, l'US EPA propose un UF_{A-TD} de 3 lorsqu'un ajustement est réalisé tandis que l'OMS/IPCS recommande un facteur 2,5 (OMS, 2005). Le CES suit les recommandations de l'OMS/IPCS.

Toujours selon l'OMS/IPCS, cette valeur peut être remplacée par les facteurs d'ajustements spécifiques à la substance (CSAF, chemical specific ajustemt factor) (OMS, 2005). Ces CSAF sont basés sur des connaissances toxicocinétiques de la substance à la fois chez l'Homme et chez l'animal. Ces CSAF peuvent permettre :

- la transposition toxicocinétique animal/Homme à partir de données PK ou TK (ratio entre données TK chez l'animal/données TK chez l'Homme),
- la transposition toxicodynamique animal/Homme à partir de données TD ou PD (ratio entre données TD chez l'animal/ données TD chez l'Homme).

Dans le cas de l'application d'un modèle PBPK prenant en compte les différences toxicocinétiques entre l'animal et l'Homme, il peut être justifié de ne pas utiliser la valeur de 10 par défaut mais de réduire cette valeur en ne considérant que la composante toxicodynamique de l' UF_A de 2,5.

5.4.5.1.2 Facteur d'incertitude lié à la variabilité interindividuelle : UF_H

Le facteur d'incertitude de variabilité intra-espèce tient compte de la variabilité potentielle de la réponse dans la population humaine. Cette variabilité peut être le résultat de différences dans des critères d'effet comme la constitution génétique, l'âge, le sexe, le mode de vie ou l'état de santé. En conséquence, ce facteur tient compte des différences de réponse entre la personne moyenne et une personne sensible dans la population.

La valeur maximale utilisée internationalement par défaut est de 10. Cette valeur de 10 correspond à l'application de 2 composantes respectivement pour les différences de toxicocinétique et de toxicodynamie.

Comme pour l' UF_A , cette valeur peut être remplacée par les facteurs d'ajustements spécifiques à la substance (CSAF, chemical specific ajustemt factor) (OMS, 2005). Ces CSAF sont basés sur des connaissances toxicocinétiques (distribution au sein de la population humaine) de la substance. Ce CSAF se calcule au moyen du ratio entre le 95^{ème} percentile de la valeur du paramètre toxicocinétique au sein de la population/ le 50^{ème} percentile de ce même paramètre toxicocinétique. Si des données toxicodynamiques sont connues, le même calcul peut être réalisé pour tenir compte de la variabilité toxicodynamique, et ainsi remplacer le facteur par défaut de 3,16.

De la même manière, il est possible d'intégrer dans les modèles PBPK des distributions de paramètre physiologique et toxicocinétique : variation du poids, du métabolisme (V_{max} et K_M) et ainsi obtenir non plus une concentration veineuse, mais une aire sous la courbe correspondant à une distribution de cette valeur avec la détermination d'un 95^{ème} percentile et d'une médiane. Le même calcul proposé précédent (CSAF) peut alors être réalisé pour remplacer la valeur de 10 par défaut, et de réduire cette valeur en ne considérant que la composante toxicocinétique de 3,16.

Dans le cas précis des enfants, si des informations existent sur le mode d'action de substances induisant des effets critiques et sur une plus forte sensibilité de cette population, ces données doivent être considérées dans le choix du facteur d'incertitude pour l' UF_H .

L'analyse des données disponibles sur les variations de sensibilité des très jeunes enfants et des enfants liées, par exemple, à des différences de voies métaboliques, peut permettre de délimiter un intervalle des valeurs par défaut chez cette population, qui sera considéré comme une part du facteur d'incertitude UF_H (i.e. pour un paramètre donné, les variations entre la moyenne et un percentile fixé, au sein de la population générale prenant en compte les enfants ou uniquement chez des enfants).

La sélection de facteurs par défaut tenant compte de l'incertitude réelle (i.e. UF_{LB} , UF_s , UF_D) a évolué au cours du temps et le raisonnement pour prendre en compte ces zones d'incertitude parmi d'autres qui auraient pu être identifiées, n'est pas bien justifié dans la littérature. Le chevauchement potentiel des zones d'incertitude couverte par ces facteurs n'a pas non plus été bien décrit. Dans ce contexte, l'ajout d'un facteur d'incertitude supplémentaire par défaut spécifique aux enfants n'est pas recommandé par les experts. De plus, la sensibilité des enfants est prise en compte de façon plus appropriée par les facteurs de variabilité que par les facteurs d'incertitude.

Le CES recommande que :

- **En absence de données montrant une sensibilité particulière des enfants, un facteur d'incertitude interindividuel UF_H de 10 par défaut soit appliqué ;**
- **En présence de données montrant que les enfants sont plus sensibles que les adultes mais non exploitables pour la construction d'une VTR, un facteur d'incertitude additionnel soit utilisé au cas par cas pour protéger des populations sensibles.**
- **En présence de données quantitatives montrant que les enfants sont plus sensibles que les adultes, ces données soient prises en compte pour la construction d'une VTR (choix de l'étude clé). La VTR sera applicable à l'ensemble de la population.**

5.4.5.1.3 Facteur d'incertitude lié à l'usage d'un LOAEL/C : $UF_{L/B}$

Ce facteur d'incertitude est appliqué lorsque la VTR est construite à partir d'un LOAEL/C. Certains auteurs ou organismes peuvent aussi utiliser ce facteur lorsque la dose critique est une BMDL, considérant qu'à la BMDL (à la différence d'un NOAEL), un effet est attendu. La discussion doit, dans ce cas, porter sur le niveau de réponse retenu pour la construction de la BMDL.

Ce facteur est historiquement issu de l'étude de ratios LOAEL/NOAEL déterminés pour différentes substances sur différents modèles animaux. L'ECETOC recommande d'utiliser dans la majorité des cas un facteur 3, valeur correspondant à une moyenne approximative des données existantes (ECETOC, 1995). Néanmoins, cette valeur ne peut pas être considérée comme protectrice, puisque dans 50 % des cas environ, un ratio LOAEL / NOAEL supérieur peut être observé. **Le CES considère donc que dans certains cas, un facteur 10 peut être assigné à ce facteur d'incertitude.**

5.4.5.1.4 Facteur d'incertitude lié à une transposition subchronique à chronique : UF_s

Ce facteur d'incertitude est appliqué s'il est nécessaire de faire une extrapolation d'études de subchronique à un scénario d'exposition de longue durée à cause d'un manque de données pertinentes. Les études de toxicité chronique pourraient révéler l'existence d'effets sur la santé non décelés dans des études à court terme. De plus, les effets critiques observés dans les études à court terme peuvent progresser avec une exposition chronique, ce qui aurait pour effet de faire baisser le NOAEL/C.

5.4.5.1.5 Autres facteurs d'ajustement : UF_D

D'autres facteurs d'incertitude peuvent être liés à l'insuffisance de données ou à la sévérité de l'effet critique.

Dans le premier cas, diverses sources d'incertitude dues aux lacunes de la base de données peuvent justifier l'utilisation de ce facteur d'incertitude. Les cas d'extrapolation d'un LOAEL/C à un NOAEL/C et de l'exposition subchronique à l'exposition chronique décrits ci-dessus peuvent être assimilés à des lacunes de la base de données, mais le CES a choisi de les traiter séparément.

L'US EPA recommande d'ajouter un UF_D pour le manque de données quand la réalisation de nouvelles études pourrait diminuer la valeur de la VTR (US EPA, 2002).

5.4.5.1.1 Position du CES sur le choix des facteurs d'incertitude

L'application de ces facteurs suit des règles qui ne sont pas immuables, elles sont susceptibles d'être modifiées au cas par cas. Il est donc important d'avoir recours à un jugement d'expert qualitatif, en fonction du type d'effet étudié, du mécanisme de la substance et du type d'exposition. En outre, ces considérations sont utilisées dans une démarche fondée sur le poids de la preuve pour faire un jugement scientifique du niveau préoccupant. Cette méthode intégrée maximise l'utilisation de toutes les informations disponibles plutôt que de se baser sur des constatations isolées.

La valeur haute de 10 pour chaque UF est utilisée par défaut lorsqu'aucune connaissance ne permet de la réduire. L'application d'une valeur plus faible doit être argumentée par des éléments scientifiques pertinents.

Pour la construction de VTR à seuil, les facteurs d'incertitude suivants sont appliqués à la dose critique retenue (Tableau 5) :

- un **facteur pour la transposition inter-espèces UF_A** (valeur variable selon les données), tenant compte de la variabilité existant d'une espèce à l'autre dans la réponse biologique ultime. Ce facteur est composé de 2 composantes toxicocinétique et toxicodynamique ;
 - o Dans la majorité des cas, un ajustement allométrique ou dosimétrique est réalisé sur la dose critique. Dans ce cas, la composante toxicocinétique est prise en compte dans le modèle PBPK. L' UF_A prend alors la valeur de 2,5 pour tenir compte uniquement de la composante toxicodynamique ;
 - o En absence d'ajustement allométrique, ce facteur est généralement fixé à 10 pour la voie orale par défaut pour tenir compte des différences de sensibilité des espèces et extrapoler les résultats de laboratoire aux conditions d'exposition de la population et lorsqu'il n'est pas possible ou pertinent de réaliser un ajustement allométrique ou dosimétrique. En présence de données, ce facteur peut diminuer à 3 sur la base du jugement d'experts ;
- un **facteur inter-individuel ou intra-espèce UF_H correspondant à la variabilité au sein d'une même espèce**. Des différences de réponses toxicocinétiques (polymorphismes génétiques dans les enzymes du métabolisme par exemple) ou toxicodynamiques (sensibilités différentes au niveau de la cible, maladie héréditaire entraînant une déficience des réparations de l'ADN) peuvent être examinées ;
 - o le CES prend en considération les informations disponibles concernant les groupes de personnes particulièrement vulnérables ;
 - o l'application de facteurs d'incertitude à des valeurs issues d'études humaines dépend largement de la robustesse de l'étude et la représentativité de la population de l'étude par rapport à la population cible. Si l'étude sur laquelle l'effet critique a été basé est robuste et de bonne qualité, le CES peut n'appliquer aucun facteur d'ajustement ;

- Afin d'affiner la composante toxicocinétique, un modèle PBPK peut être utilisé ;
- **un facteur $UF_{L/B}$ tenant compte de l'utilisation d'une BMDL, d'un LOAEL/C ou d'un NOAEL/C ;**
 - Lors de l'utilisation d'un couple NOAEL/C-LOAEL/C, un facteur de 1 est appliqué. Lors qu'un LOAEL/C ou un NOAEL/C seul utilisé, un facteur de 3 ou 10 est appliqué sur jugement d'experts ;
 - l'utilisation d'une BMDL n'empêche pas d'envisager l'application d'un facteur d'incertitude dans la mesure où cette démarche permet d'estimer la dose correspondant à un niveau de réponse défini. Il ne s'agit donc pas d'une dose sans effet. En pratique, le CES appliquera un UF de 1. Néanmoins, un UF de 3 pourra être appliqué en le justifiant lors de l'utilisation d'une BMDL. En effet, la qualité de la BMD dépend également de la qualité de données qui ont permis de la calculer.
- **un facteur UF_s prenant en compte la transposition d'une exposition subchronique à chronique, pourra être envisagé et sa valeur sera appréciée au regard des données toxicologiques :** l'appréciation scientifique pour déterminer la valeur de ce facteur tient compte du potentiel de bioaccumulation, de la nature de la réponse (par exemple s'il y a un risque d'aggravation ou d'augmentation de la fréquence). Il n'y a pas de justification concrète à l'application d'une valeur fixe de ce facteur. Cette application est donc laissée au jugement d'expert.
- **un facteur UF_D , tenant compte de l'exhaustivité des données toxicologiques et de la quantité et la qualité des informations disponibles, dont l'application sera également proposée au cas par cas.** Cet UF_D est appliqué quand le manque de données pourrait impacter la valeur de la VTR.

Tableau 5 : Valeurs des facteurs d'incertitude à appliquer pour la construction de VTR

Acronyme	Interprétation des UF		Valeurs des UF	
UF _A	Variabilité inter espèces	Composante toxicocinétique UF _{A-TK}	Si absence de donnée	4
			Si une partie de la toxicocinétique est identique entre l'Homme et l'animal	1 ou 3
			Si l'ensemble de la toxicocinétique est sensiblement la même ou si utilisation d'un coefficient d'ajustement de doses	1 ou 3
			Si modèle PBPK renseigné	1
		Composante toxicodynamique UF _{A-TD}	Si utilisation d'une étude humaine	1
			Si absence de données	2,5
			Si toxicodynamie identique	1
			Si Homme moins sensible	1
UF _H	Variabilité inter individuelle	Composante toxicocinétique UF _{H-TK}	Si absence de données	3 ou valeur affinée avec le modèle PBPK
			Si utilisation d'une étude réalisée sur le groupe sensible chez l'Homme (fonction de l'effet)	1
		Composante toxicodynamique UF _{H-TD}	Si absence de donnée	3
			Si utilisation d'une étude réalisée sur le groupe sensible chez l'Homme (fonction de l'effet)	1
UF _{L/B}	Utilisation d'une BMDL ou d'un couple NOAEL/LOAEL Utilisation d'un LOAEL seul ou d'un NOAEL seul		1, 3 ou 10 au cas par cas	
UF _S	Transposition subchronique à chronique		1, 3 ou 10 au cas par cas	
UF _D	Insuffisance des données (en qualité et en quantité)		1, 3 ou 10 au cas par cas	

Si l'ensemble de ces facteurs est appliqué, on peut se retrouver avec un UF global de 100 000 qui est considéré par les organismes d'expertise comme trop important pour accorder une confiance à la VTR (US EPA, 2002). La valeur numérique finale des UF est considérée comme un indicateur de confiance accordé à l'étude source à partir de laquelle la VTR a été construite. Si l'ensemble des facteurs appliqué dépasse 1 000, aucune VTR ne sera construite. Il sera alors possible de proposer une valeur toxicologique indicative (cf. §6).

5.4.5.2 Construction de la VTR à seuil

La VTR à seuil est construite de la manière suivante :

$$\text{VTR} = \text{Dose critique} / \text{UF global}$$

$$= (\text{BMDL ou NOAEL ou LOAEL}) / (\text{UF}_A \times \text{UF}_H \times \text{UF}_{L/B} \times \text{UF}_S \times \text{UF}_D)$$

Elle s'exprime en mg.kg⁻¹.j⁻¹ ou en µg.kg⁻¹.j⁻¹ pour une exposition par voie orale, et en mg.m⁻³ ou en µg.m⁻³ pour une exposition par inhalation.

5.4.6 Effets sans seuil

5.4.6.1 Calcul d'un excès de risque unitaire

Pour construire une VTR basée sur un effet sanitaire sans seuil de toxicité, on admet l'hypothèse qu'il existe une relation (souvent linéaire) entre l'exposition et la probabilité d'apparition de l'effet nocif aux faibles doses (généralement le cancer) et on détermine la pente de la droite obtenue (US EPA, 1996a).

L'indicateur d'intérêt est l'excès de risque unitaire (ERU), défini par la probabilité supplémentaire, par rapport à un individu non exposé, qu'un individu développe une pathologie (souvent cancéreuse) s'il est exposé pendant une longue durée à une unité de dose de la substance considérée. Les ERU sont généralement établis à partir des relations dose-effet observées chez l'animal de laboratoire ou plus rarement à partir des études épidémiologiques. Dans la plupart des cas, les études portent sur de fortes doses de la substance chimique et des extrapolations sont effectuées aux faibles niveaux de doses. En effet, les études expérimentales ne sont en général pas assez puissantes pour mettre en évidence un effet statistiquement significatif aux faibles niveaux d'exposition, à moins de disposer d'un très grand nombre d'animaux (Williams *et al.*, 2009).

Pour les effets cancérogènes, la probabilité d'occurrence du cancer sur la vie entière des sujets exposés, vient s'ajouter au risque de base non lié à cette exposition, et est appelée excès de risque individuel (ERI) (Calabrese, 2009). Pour calculer l'ERI (effets sans seuil), il faut connaître l'ERU qui correspond au nombre de cas supplémentaires pour une dose donnée et une exposition vie entière et la dose reçue par l'individu (concentration et durée d'exposition) extrapolée sur la vie entière.

Il existe différentes méthodes de construction de VTR cancérogènes sans seuil de dose proposées par les organismes compétents dans ce domaine. Sur certains points méthodologiques, il n'existe à l'heure actuelle ni consensus scientifique, ni décision harmonisée. Aussi, afin d'aider à l'élaboration d'une approche méthodologique, une revue la plus exhaustive possible des méthodes pratiquées par des organismes compétents a été réalisée (cf. annexe 12). Le Tableau 6 illustre les différences méthodologiques de construction de VTR cancérogènes sans seuil pour 5 organismes de référence nationaux et européens. Pour disposer d'un état des lieux plus complet, il est possible de se référer à l'article de Mullot *et al.* (2006).

Tableau 6 : Méthodes de construction des VTR cancérogènes sans seuil

	US EPA (2005a)		Santé Canada (2004)	RIVM (2001)	EFSA (2005)	NHMRC (1999)
Expression de la VTR	Excès de risque unitaire (ERU)		Marge d'exposition (MOE : <i>Margin of exposure</i>)	Excess lifetime cancer risk (CR)	Marge d'exposition (MOE : <i>Margin of exposure</i>)	Marge d'exposition (MOE : <i>Margin of exposure</i>)
Modélisation des données	Modèle linéaire multi-étapes (LMS)	Modèles mathématiques → BMD _{10L}	Modèles mathématiques → DT ₀₅ (Dose tumorigène 5%) = BMD ₀₅	Non précisé → NOAEL / LOAEL	Modèles mathématiques → BMD _{10L} ou T25	Modèles mathématiques → BMD ₀₅
Extrapolation vers les faibles doses		Extrapolation linéaire à l'origine		Modèles mathématiques ou extrapolation linéaire à l'origine	Facteurs d'incertitude	Facteurs d'incertitude

A la suite de l'évaluation des différentes méthodologies existantes, il est proposé pour l'élaboration d'une VTR sans seuil de suivre la démarche de l'US EPA. Celle-ci est fondée sur la séparation entre l'interpolation dans le domaine de l'observable et l'extrapolation aux faibles doses et bénéficie d'un important recul en matière d'utilisation.

L'analyse des méthodologies existantes a montré qu'il était possible de faire appel à de nombreux modèles différents (biologiques, mécanistiques, mathématiques) pour réaliser cette extrapolation aux faibles doses. Le consensus actuel est l'utilisation de l'extrapolation linéaire à l'origine qui semble être plus précautionneuse pour la santé publique, et apporterait des résultats très similaires à ceux obtenus avec le modèle linéaire multi-étapes (LMS) par exemple. **Pour ces raisons, le CES conseille d'appliquer une extrapolation linéaire à l'origine à partir du point de départ (POD).** Celle-ci est réalisée par régression linéaire simple à partir du POD jusqu'à l'origine en tenant compte naturellement de l'effet à l'origine. Si le POD correspond à un niveau d'effet excédentaire de x%, le facteur de pente (slope factor) correspond à x% / POD ; c'est donc un risque par unité de dose. La pente de la droite reliant le POD à l'origine représente l'excès de risque unitaire (ERU). Il peut être utilisé pour évaluer les risques sanitaires correspondant à différents niveaux de dose. Le graphe ci-dessous illustre la manière dont s'effectue une telle construction lorsque c'est une BMDL à 10% qui est retenue comme dose critique.

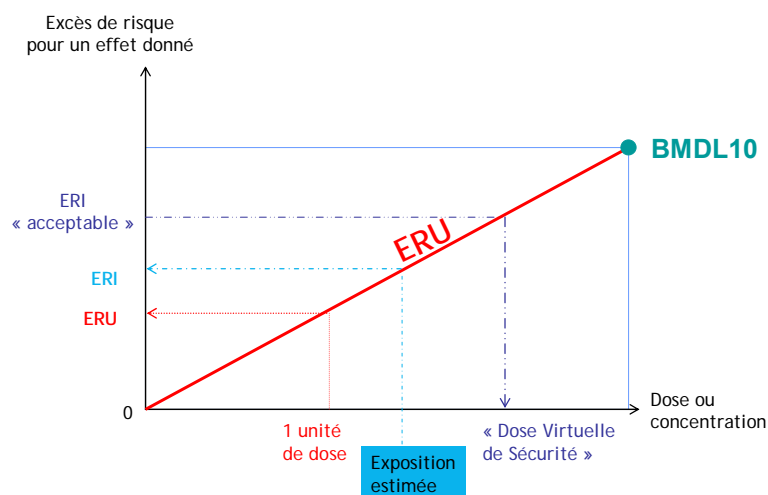


Figure 4 : Illustration graphique de la détermination des excès de risque individuels à partir d'une Benchmark-Dose à 10%

Dans la méthodologie décrite par l'US EPA, il est fait l'hypothèse que les risques sont proportionnels aux doses reçues, c'est-à-dire qu'ils décrivent une relation linéaire. Dans ce cas, la proportionnalité veut qu'un risque résiduel demeure même si la dose est très faible.

Au problème de la transposition animal-Homme, qui est souvent pris en compte par un ajustement sur le poids corporel, s'ajoute celui de l'extrapolation forte dose/faible dose des données observées. Divers modèles d'extrapolation (droite de régression, mécaniste, etc.) permettent d'estimer les risques encourus aux faibles et très faibles doses. Ces modèles ajustent correctement les résultats enregistrés à fortes doses et, pour certains, intègrent sous forme mathématique les connaissances portant sur les mécanismes de la cancérogenèse.

Il est important de comprendre que du fait des nombreuses hypothèses et approximations faites pour établir une telle VTR, les valeurs numériques produites ne sont que des ordres de grandeur et non des valeurs exactes et précises.

Aucune correction n'est faite pour la toxicité à forte dose, l'intensification de la prolifération cellulaire ou la réparation de l'ADN, de sorte que l'on considère que les modèles linéaires actuels surestiment quelque peu le risque, d'autant que le point de départ est la limite supérieure de l'intervalle de confiance de la relation dose-réponse. C'est ce que l'on exprime en déclarant que les risques déterminés par ces modèles constituent une "limite supérieure plausible" ou qu'ils ont été calculés dans l'hypothèse la plus défavorable.

Etant une estimation haute de la probabilité d'apparition d'un cancer par unité de dose, cet indice est applicable à tous les individus d'une population, qu'ils appartiennent ou non à un groupe sensible (Nielsen et Ovrebo, 2008).

Parfois, pour réduire la surestimation des risques inhérents à l'extrapolation linéaire, un modèle non linéaire satisfaisant mieux aux critères statistiques de la qualité de l'ajustement des données peut être proposé.

L'ERU peut aussi être calculé en utilisant des indicateurs épidémiologiques (risque relatif RR, odds ratio OR, *etc.*), et la concentration d'exposition (en moyenne ou cumulée sur la durée d'exposition) reliée à l'indicateur de risque. La VTR calculée correspond à un excès de risque unitaire, c'est-à-dire l'excès de risque (RR-1) rapporté à une unité de dose. Seules les relations dose-réponse publiées par les auteurs peuvent être utilisées car leurs calculs nécessitent de disposer de l'ensemble de la base de données individuelles.

La modélisation des risques relatifs (RR) est rarement une fonction linéaire. De plus, le calcul des excès de risque en fonction d'un scénario d'exposition prédéfini peut être fait de deux façons pour tenir compte de la fréquence de la pathologie dans la population étudiée ou d'autres pathologies survenant « naturellement » dans une population humaine :

- approche simplifiée, linéaire en prenant en compte la probabilité P de survenue de la pathologie dans une population de référence : $ELR = \text{Excess lifetime risk} = RR * P - P$
- approche par la technique des tables de survie qui consiste à additionner les excès de risque en fonction des tables de survie de la population de référence

Pour appréhender la durée de l'exposition, les scénarios pris en compte pour calculer les excès de risques doivent être clairement décrits.

Ainsi, le choix de retenir tel ou tel calcul d'excès de risque doit être argumenté en prenant en compte les différentes étapes de la construction des excès de risque et en acceptant les limites inhérentes à ces extrapolations (Goldbohm, 2006).

Dans le cas d'une VTR sans seuil déterminée à partir d'une étude épidémiologique, il conviendra de préciser si les données exploitées correspondent à des données de mortalité ou d'incidence.

5.4.6.2 Cumul des incidences tumorales

Selon la localisation, les études peuvent mettre en évidence plusieurs types de tumeurs (bénignes et/ou malignes). Dans le cas où le mode d'action cancérigène met en évidence ou suspecte l'évolution possible d'une tumeur bénigne (lésion précurseur) à une tumeur maligne, au sein d'un même organe et pour une localisation tissulaire identique, il est alors possible de cumuler les incidences de ces tumeurs. En revanche, il n'est généralement pas possible de cumuler les incidences de tumeurs de différents organes.

Le recours aux nomenclatures de classification tumorale peut s'avérer utile dans ce cas (cf. annexe 7). Il est donc important de vérifier que les tumeurs soient caractérisées précisément d'un point de vue anatomopathologique.

5.4.6.3 Applicabilité des VTR sans seuil aux enfants

Le facteur d'ajustement pour calculer les risques cancérigènes chez les enfants ou Age Dependent Adjustments factors (ADAF) proposé par l'US EPA, est aujourd'hui appliqué à quelques substances cancérigènes mutagènes par l'US EPA et également en France par certains bureaux d'études (ex : benzène, chlorure de vinyle). Cependant, cette démarche reste controversée au niveau international. Plusieurs limites ont été identifiées par le Navy and Marine Corps Public Health Center (Navy and marine corps public health center, 2008) telles que :

- Le nombre limité d'études qui a permis d'évaluer la susceptibilité des enfants aux substances mutagènes. En effet, des études répétées ou vie entière, nécessaires pour

évaluer la susceptibilité au début de la vie, ne sont disponibles que pour 6 substances cancérigènes et mutagènes ;

- L'US EPA s'est basé uniquement sur les études répétées (4 substances uniquement) pour calculer les ADAF en considérant que le protocole des études vie entière n'était pas optimal pour distinguer les susceptibilités potentielles au début de la vie ;
- Les ADAF sont dérivés à partir d'études pour lesquelles les expositions sont beaucoup plus importantes que celles habituellement observées dans l'environnement. Le potentiel mutagène des substances chimiques pourrait être plus important, et pourrait saturer les mécanismes de réparation de l'ADN existant à des niveaux d'exposition environnementale ;
- Les ratios d'incidence tumorale chez les enfants par rapport à l'incidence chez les adultes sont très variables dans les études répétées ;
- Le guide US EPA ne présente pas les critères permettant de déterminer si une substance chimique est une substance cancérigène et mutagène ou non ;
- Les périodes d'augmentation de la réplication cellulaire sont très variables selon les tissus, ce qui peut entraîner des fenêtres de sensibilité différentes selon les tissus cibles des substances chimiques. Pour cette raison, l'application d'un même ADAF par défaut pour des groupes d'âge pour toutes les substances chimiques avec un mode d'action mutagène pourrait être inadapté (Navy and marine corps public health center, 2008).

L'approche retenue par l'OEHHA s'est inspirée de la méthode de l'US EPA et propose également l'application d'un facteur d'ajustement pour calculer les risques cancérigènes chez les enfants (Age-sensitivity factor ou ASF).

Le détail des approches de l'OEHHA et de l'US EPA sont détaillées dans l'annexe 10.

Le CES souligne que les facteurs d'ajustement proposés par les différents organismes (ADAF, ASF, pour calculer les risques cancérigènes chez les enfants) ne s'appliquent pas lors de la construction de la VTR mais lors du calcul de risque.

De plus, pour les substances cancérigènes et génotoxiques, l'hypothèse d'absence de seuil est retenue pour construire une VTR cancérigène. Pour ce faire, le CES recommande d'appliquer une extrapolation linéaire à l'origine à partir du point de départ (POD).

De plus, le CES recommande que :

- **En présence de données montrant que les enfants sont plus sensibles que les adultes mais non exploitables pour la construction d'une VTR, un facteur d'incertitude additionnel soit utilisé au cas par cas pour protéger ces populations sensibles comme le préconise certaines autres agences (US EPA, OEHHA). Ce facteur d'incertitude ne s'appliquera pas lors de la construction de la VTR mais lors du calcul de risque. De façon systématique, une mention sera ajoutée afin d'avertir les utilisateurs de VTR et d'expliquer son utilisation.**
- **En absence de données montrant une susceptibilité particulière des enfants, soit appliquée l'extrapolation linéaire aux faibles doses qui est considérée comme protectrice pour la santé des populations ;**

- **En présence de données quantitatives montrant que les enfants sont plus sensibles que les adultes, ces données soient prises en compte pour la construction d'une VTR (choix de l'étude clé) qui sera applicable à l'ensemble de la population.**

5.4.6.4 Position du CES sur la construction de VTR sans seuil

Quand les données le permettent et qu'aucune VTR sans seuil publiée n'est jugée satisfaisante pour construire la VTR d'une substance, le CES peut décider de construire une VTR sans seuil en appliquant sa propre méthodologie.

Le CES suit la démarche de l'US EPA pour l'élaboration d'une VTR sans seuil. Celle-ci est fondée sur la séparation entre l'interpolation dans le domaine de l'observable et l'extrapolation aux faibles doses et bénéficie d'un important recul en matière d'utilisation.

Dans le cadre de l'exploitation des données épidémiologiques, le calcul des excès de risque vie entière (ELR : Excess lifetime risk) peut être plus complexe que l'extrapolation linéaire aux faibles doses à partir d'une dose de départ, exposée ci-dessus.

L'ERU (ou *slope factor*) correspond à la VTR sans seuil calculée à partir du POD suivi d'une étape d'extrapolation linéaire à l'origine. Il s'agit de l'inverse d'une dose ou de concentration. La VTR sera donc exprimée en $(\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{j}^{-1})^{-1}$ ou en $(\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{j}^{-1})^{-1}$ pour une exposition par voie orale, et en $(\text{mg}\cdot\text{m}^{-3})^{-1}$ ou en $(\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3})^{-1}$ pour une exposition par inhalation. La VTR est également accompagnée de 3 excès de risque individuel (respectivement 10^{-4} , (i.e un excès de risque de développer un cancer supplémentaire pour 10 000 personnes exposées), 10^{-5} et 10^{-6}) et les niveaux de concentration en polluant leur correspondant. En adoptant cette approche, le CES a souhaité que la détermination d'un niveau de risque acceptable soit une décision qui incombe au gestionnaire de risques.

5.4.7 Approche hybride : harmonisation des approches à seuil et sans seuil

Le National Research Council (NRC) préconise de nouvelles perspectives d'évolution de la démarche d'évaluation des risques sanitaires.

Son document publié en 2009 donne une approche différente qui se focalise moins sur la distinction des critères cancérigènes/non cancérigènes mais plutôt sur les possibles modes d'actions des substances et les facteurs de susceptibilité dans la population qui pourraient influencer la relation dose-réponse aux faibles doses (Figure 5).

Ce concept s'appuie sur des considérations mécanistiques dans lesquelles le mode d'action de la substance peut interagir avec des bruits de fond de type pathologique ou avec d'autres expositions à des substances chimiques et ainsi produire une courbe linéaire aux faibles doses.

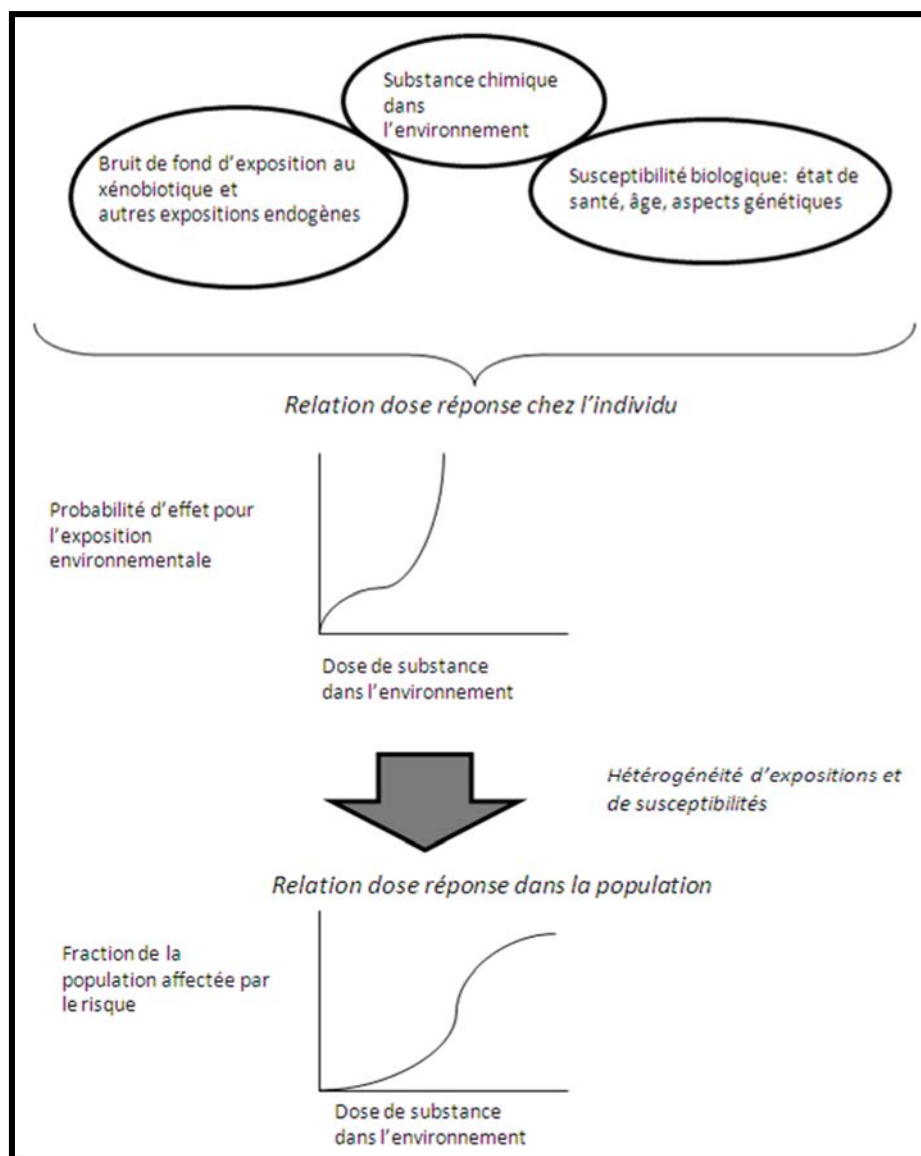
De plus, dans les situations où la linéarité à faible dose doit être rejetée, le rapport du NRC propose d'autres approches alternatives pour développer une dose de référence qui permet de quantifier le risque attribuable.

Pour le NRC, une description de la probabilité de la réponse adverse à des expositions données apparaît comme une finalité commune quelle que soit la caractéristique de la substance.

L'approche à seuil pour définir la VTR et le Quotient de danger fournit un outil binaire aux gestionnaires de risques.

Bien que cette approche soit utile dans certains contextes, cela ne permet pas de donner un aperçu du niveau de population touché par ce risque au-dessus de la VTR.

Les recommandations du NRC se focalisent essentiellement sur une expression probabiliste du risque et fournit les premières pistes pour unifier les approches utilisées en évaluation des risques pour les substances quelque soit leur type d'effet.



Le risque lié à l'environnement dépend de la susceptibilité biologique de chaque individu (l'état de santé, l'âge, les facteurs génétiques) et des expositions endogènes ou exogènes auxquelles il est confronté. Ces différences de facteurs entre les individus affectent la courbe de la relation dose-réponse dans la population (NRC, 2009).

Figure 5 : Nouvelle démarche pour l'évaluation de la relation dose-réponse

Le NRC a proposé un nouveau schéma de construction des VTR plus cohérent d'un point de vue biologique, qui prend en compte le bruit de fond en termes d'exposition et en termes de facteurs de prédisposition (âge, état de santé, facteurs génétiques).

Il permettrait, après avoir rassemblé les données d'effets, d'évaluer de façon systématique le mode d'action de la substance, les populations vulnérables et le bruit de fond d'exposition (Figure 6).

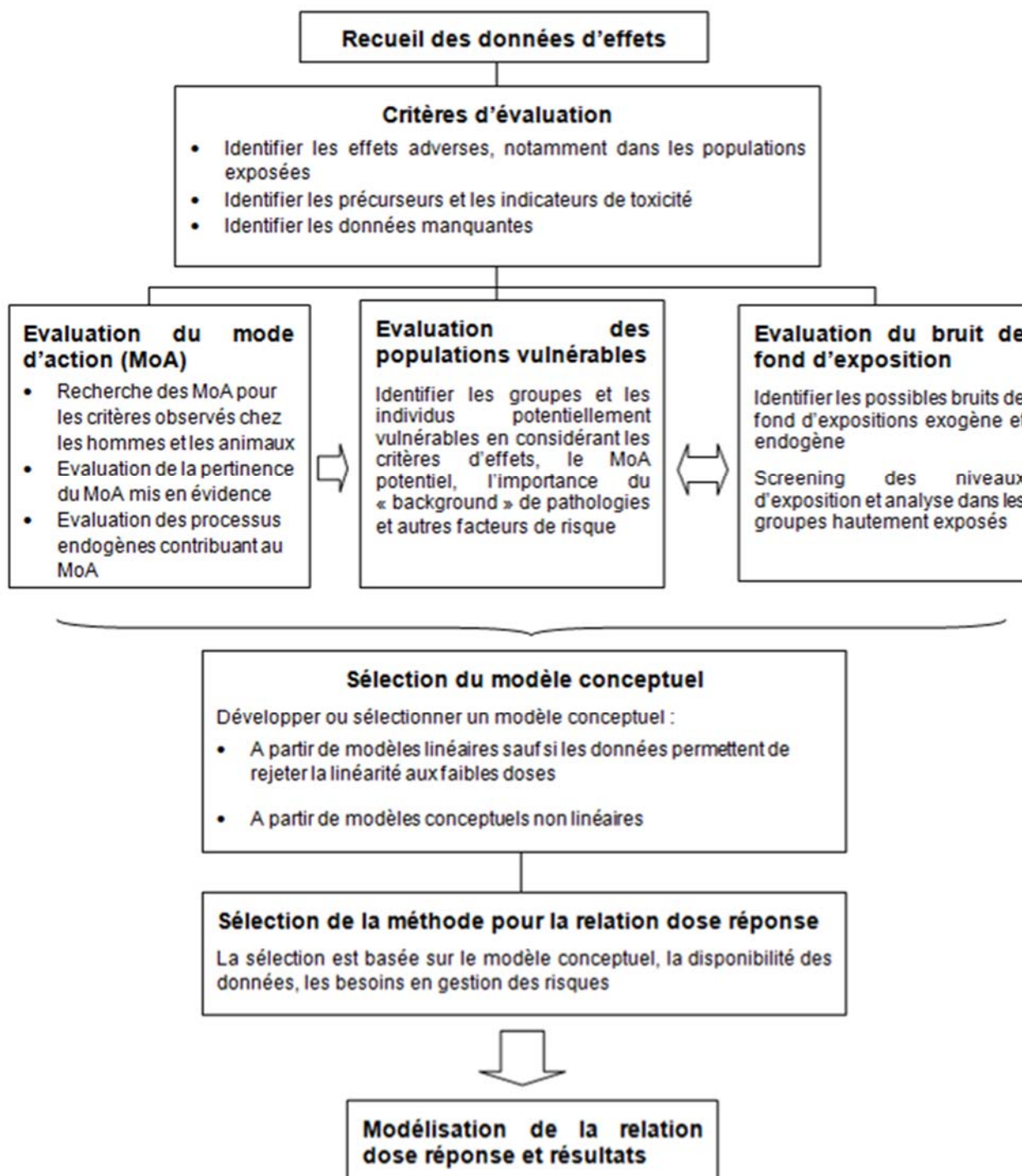


Figure 6 : Schéma de construction des VTR (NRC, 2009)

Cette évaluation conduit ensuite à la sélection des modèles de relation dose-réponse à l'échelle individuelle et populationnelle en fonction de la présence ou l'absence de linéarité aux faibles doses. Le rapport du NRC propose trois modèles.

- Le modèle 1 est basé sur une relation dose-réponse à seuil à l'échelle individuelle mais sans seuil à l'échelle de la population en raison de l'importance du bruit de fond.
- Le modèle 2 est basé sur une relation dose-réponse à seuil à l'échelle individuelle et populationnelle.
- Le modèle 3 est basé sur une relation dose-réponse linéaire à l'échelle individuelle et populationnelle.

La sélection du modèle et de la méthode doit se faire en fonction des données disponibles, et des difficultés liées à la gestion des risques pour le type de risque considéré.

Chacun des modèles fournit une description probabiliste de la relation dose-réponse à l'aide de la combinaison des distributions des facteurs d'ajustements. Mais seul le modèle 2 applique des distributions de variabilité chez l'Homme pour extrapoler le risque aux faibles doses. Les modèles 1 et 3 utilisent l'extrapolation linéaire.

Il est à noter que les trois modèles reposent sur l'utilisation de distributions lognormales développées en grande partie par Hattis et ses collaborateurs (Hattis *et al.*, 2002).

Dans un premier temps, le NRC recommande l'utilisation de distributions par défaut de la variabilité associée aux facteurs d'incertitude, plutôt que des valeurs nominales imprécises. Cela permettrait de mieux rassembler les données existantes, et de fournir une première représentation de la variabilité et de l'incertitude qui pourra être affinée au fur et à mesure.

Une des principales conséquences de l'approche harmonisée est la redéfinition de la VTR qui serait alors une valeur d'une dose spécifique d'un risque.

L'objectif est de fournir une caractérisation probabiliste du risque, et de pouvoir dire « à la dose D, R fraction de la population sera probablement affectée, avec un intervalle de confiance à 95% de R_L - R_H », avec R_L la fraction inférieure et R_H la fraction supérieure de la population.

Cette nouvelle définition de la VTR permettra d'estimer le risque à n'importe quelle dose, pas seulement à la VTR. Pour les gestionnaires de risque, cela facilitera la compréhension des bénéfices liés à une diminution de l'exposition.

- **Limites de l'approche harmonisée**

L'harmonisation des approches en évaluation des risques nécessite d'analyser en profondeur les facteurs de bruit de fond (nombre de sources d'exposition, état de santé et âge de l'individu...) qui génèrent la variabilité.

Les évaluateurs et gestionnaires de risque devront pour cela être formés par les agences sanitaires qui devront fournir les méthodes de cette analyse.

Des travaux sont déjà menés à l'US EPA pour inclure les éléments de cette approche dans les évaluations de risque.

Une autre difficulté du plan d'harmonisation est le manque de données pharmacocinétiques et pharmacodynamiques pour établir les distributions reflétant la variabilité au sein de la population pour la substance considérée.

Par ailleurs, le NRC souligne l'effort de collecte et d'analyse de la plupart des données cliniques humaines entrepris par Hattis (Hattis et Lynch, 2007), sur lesquelles le NRC s'appuie pour élaborer les modèles.

Cependant, même si cela représente un début utile pour l'analyse, le NRC reconnaît que toutes ces données ne pourront jamais capturer le spectre de la variabilité dans sa globalité au vue des nombreuses différences d'âge, des différences génétiques, de nutrition, de maladies, de prise de médicaments et d'exposition.

Néanmoins, le NRC suggère d'appliquer à la molécule d'intérêt des variables pharmacodynamiques connues pour certains produits chimiques, soit par analogie structurale, soit lorsqu'elle appartient à la même classe chimique.

La recherche devra ensuite jouer son rôle pour combler ces lacunes grâce notamment aux études épidémiologiques et à l'utilisation de biomarqueurs d'exposition et d'effets.

Pour contourner ces limites liées aux manques de données, le NRC recommande à court terme le développement d'approches par défaut, telles que :

- l'extrapolation linéaire aux faibles doses pour les substances chimiques qui présentent un bruit de fond important (modèle 1 et 3).
- les distributions de variabilité interindividuelle par défaut (modèle 2).

Cette approche n'est pas actuellement appliquée au sein de l'Anses.

5.4.8 Niveaux de confiance d'une VTR

5.4.8.1 Revue des approches proposées par différents organismes

Le Tableau 7 illustre les différents paramètres pris en compte par 6 organismes nationaux et internationaux de référence pour proposer des niveaux de confiance sur les VTR.

Tableau 7 : Niveaux de confiance des VTR selon différents organismes nationaux et internationaux

	Nom du niveau de confiance	Niveaux proposés	Critères
US EPA VTR à seuil	Confiance (Confidence)*	Haut (high) Moyen (medium) Faible (low)	- Ensemble des données (database) - Etude (study) + Description dans le chapitre « Confidence in the oral RfD / inhalation RfC »
US EPA VTR sans seuil	Confiance (Confidence)*	Description des forces et des faiblesses	Description dans le chapitre « Discussion of confidence »
OEHHA (Cal-EPA)	Description des forces et des faiblesses de la VTR traitée dans le chapitre « Data strengths and limitations for development of the REL »		
ATSDR	Pas de niveau de confiance mais discussion		
Santé Canada	Degré de confiance (Degree of confidence)*	Haut (high) Moyen (moderate) Faible (low) Possibilité de combiner les niveaux	Description dans le chapitre « Incertitudes et degré de confiance dans la caractérisation du risque pour la santé humaine » (« Uncertainties and degree of confidence in the human health risk characterization »)
RIVM	Fiabilité (Reliability)*	Haut (high) Moyen (medium) Faible (low)	Jugement d'experts qui implique : - Qualité de l'étude - Durée de l'étude - Données - Consensus entre experts
OMS/IPCS	Confiance (Confidence)*	Haut (High) Moyen (Moderate) Faible (Low)	Description dans le chapitre « Uncertainties in the evaluation of health risks »

* les termes entre parenthèses sont les termes anglais que l'on retrouvera dans les différents documents consultables sur le sujet.

Certains organismes ne détaillent pas les critères sur lesquels ils se basent pour fixer un niveau de confiance mais décrivent les forces et les faiblesses des VTR dans un chapitre dédié. La méthodologie et les recommandations de chaque organisme sont détaillées en annexe 13.

5.4.8.2 Recommandations du CES

L'Anses attribue un niveau de confiance global à chaque VTR en prenant en compte les critères suivants et en argumentant leurs forces et leurs faiblesses. Ceux-ci ont été attribués à titre exploratoire :

- **Niveau de confiance dans la nature et la qualité des données** : les études épidémiologiques et/ou toxicologiques doivent couvrir autant que possible différents types

d'effets, des durées d'exposition et des fenêtres d'exposition variées, des espèces différentes, des protocoles d'étude différents réalisés par des équipes différentes. Si l'on ne dispose, par exemple, que d'un petit nombre d'études ou d'études sur une seule espèce, le niveau de confiance sera au mieux moyen, voire faible.

Ainsi, pour des effets reprotoxiques, un niveau de confiance faible est attribué si *au minimum* une étude subchronique est disponible et un niveau de confiance fort si l'on dispose d'une étude de reprotoxicité sur plusieurs générations et d'une étude de développement sur 2 espèces différentes.

Dans le cas où des données manquent, il est recommandé de décrire les recherches nécessaires pour combler cette absence de donnée.

- **Niveau de confiance dans le choix de l'effet critique et mode d'action**

- Lors de l'utilisation d'une étude chez l'animal, le CES devra s'être assuré de la transposabilité de l'effet et du mode d'action de l'animal à l'Homme pour la durée et la voie d'exposition considérées (plus le mode d'action sera plausible chez l'Homme, plus le niveau de confiance sera élevé).
- Convergence des études : l'effet considéré doit être validé par des données histologiques, des observations microscopiques, des études de mécanismes moléculaires, etc.
- Consensus sur la nature des effets et le mode d'action associé (seuil ou sans seuil).

- **Niveau de confiance dans choix de l'étude clé**

- Les études menées chez l'Homme sont à privilégier. Lors de l'utilisation d'une étude chez l'animal, le CES s'assure de la qualité de l'étude (ex. cotation de Klimisch pour les études animales, ToxRtool ou Scirap).
- L'étude clé doit également expliciter la qualité de la méthode de mesure ou de l'estimation des expositions.
- Le protocole de l'étude doit permettre de mettre en évidence la significativité d'un effet et d'établir une relation dose-réponse.
- Une VTR est spécifique d'une durée d'exposition. Ainsi, pour la construction d'une VTR chronique, il est préférable de disposer d'une étude chronique, éventuellement subchronique. Si ce n'est pas le cas, le niveau de confiance sera alors moyen ou faible.

- **Niveau de confiance dans le choix de la dose critique**

- L'utilisation d'une BMD est considérée comme conduisant à un niveau de confiance plus élevé que l'utilisation d'un couple NOAEL/LOAEL lui-même conduisant à un niveau de confiance plus élevé que l'utilisation d'un seul LOAEL ou NOAEL.
- La présence et qualité de la relation dose-réponse : la qualité de la relation dose-réponse (qui dépend également du nombre de doses testées et de l'écart entre chacune des doses) conditionne le niveau de confiance sur le choix de la dose critique.

- L'utilisation et la justification d'un ajustement temporel cohérent avec la toxicité (loi de Haber) sont à privilégier. De même, l'ajustement dit allométrique, à partir de la dose critique utilisant un modèle PBPK validé, sera considéré plus solide que l'usage d'une valeur par défaut. Pour les VTR à seuil, l'utilisation de données toxicocinétiques ou toxicodynamiques validées pour les variabilités intra- et inter-espèces sont également jugées plus solides que l'usage de valeurs par défaut.

La subjectivité liée au choix des niveaux de confiance est minimisée dans le cadre d'une expertise collective par un groupe pluridisciplinaire d'experts. Ainsi, une confiance plus importante pourra être attribuée à une VTR lorsqu'elle résulte de l'évaluation par un comité d'experts reconnus (RIVM, 2001 et 2009).

Pour chaque critère, un niveau de confiance fort, moyen ou faible doit être fixé et en combinant les niveaux de chaque critère, un niveau de confiance global est déterminé par avis d'experts.

Afin de proposer une démarche transparente et reproductible d'une substance à l'autre et d'un évaluateur à l'autre, un outil de fixation des niveaux de confiance pour les VTR a été développé et est actuellement en phase de test au sein du CES Substances (cf. annexe 14).

5.5 Présentation des VTR

Les VTR à seuil ou sans seuil sont synthétisées sous la forme d'un tableau récapitulatif, intégrant les différentes étapes de construction (Tableau 8).

**Tableau 8 : Tableau de synthèse de VTR à seuil et sans seuil
VTR à seuil (précisant la voie d'exposition et la durée d'application)**

Effet critique Etude clé	Dose/Concentration critique	UF	VTR
Effet critique Référence bibliographique de l'étude clé (en précisant le type d'étude, la durée et l'espèce)	BMD/C, NOAEL/C, LOAEL/C <u>Ajustement allométrique</u> (dose critique _{HED/C} =) <u>Ajustement temporel</u> (dose critique _{HED/C ADJ} =)	Facteur d'incertitude total UF _A = UF _H = UF _{L/B} = UF _S = UF _D =	VTR = Niveau de confiance

UF_A : Variabilité inter-espèces (toxicocinétique/toxicodynamie), UF_H : Variabilité inter-individuelle (toxicocinétique/toxicodynamie), UF_{L/B} : Utilisation d'une BMDL, d'un LOAEL/C ou d'un NOAEL/C, UF_S : Transposition d'une exposition subchronique à chronique, UF_D : Suffisance des données (en qualité et en quantité)

VTR sans seuil (préciser la voie d'exposition)

Effet critique Etude clé	Dose/Concentration critique	VTR
<p>Effet critique</p> <p>Référence bibliographique de l'étude clé (en précisant le type d'étude, la durée et l'espèce)</p>	<p>BMD/C, NOAEL/C, LOAEL/C</p> <p><u>Ajustement allométrique</u> (dose critique $HED/C =$)</p> <p><u>Ajustement temporel</u> (dose critique $HED/C_{ADJ} =$)</p>	<p>Détail du modèle d'extrapolation aux faibles doses</p> <p>ERU =</p> <p>Correspondance des doses/concentrations associé(e)s aux niveaux de risque de 10^{-6}, 10^{-5}, 10^{-4}</p> <p>Niveau de confiance</p>

6 Valeur toxicologique de référence interne

L'Anses propose également des VTR dites internes afin d'intégrer les différentes voies d'expositions (orale, cutanée, respiratoire) et les sources d'exposition (alimentation, professionnelle, environnementale).

Ces VTR internes sont le plus souvent des concentrations urinaires ou sanguines de polluants pour lesquelles des données de biosurveillance humaine existent (cadmium, plomb) (Anses, 2012b et 2013a). Dans le cas de métaux lourds, par exemple, la littérature est riche en données reliant l'effet néfaste et la concentration interne (concentrations urinaires et/ou sanguines). Il est alors possible de déterminer une concentration critique qui se traduira en VTR « interne », basée sur les mêmes approches que pour une VTR dite « externe » (orale ou respiratoire), en utilisant l'approche benchmark dose.

Il est possible au moyen de modèles pharmacocinétiques de relier cette VTR interne à une dose ou concentration d'exposition journalière (VTR externe) et ainsi comparer la VTR externe à une dose d'exposition externe afin de caractériser les risques. A l'inverse, un calcul de risque peut être réalisé en comparant une VTR interne à une dose d'exposition journalière transformée en dose interne (ex. EQRS sur le bisphénol A ; Anses, 2013b).

La méthode de construction des valeurs limites biologiques (VLB)²¹ en milieu professionnel est proche de la construction des VTR internes (Anses, 2017b). Des précisions sur la méthode de construction des VTR interne peuvent être trouvées dans la partie C « Critères pour le choix des indicateurs biologiques et la construction des valeurs limites biologiques » du Document de référence pour la construction et la mesure de valeurs limites d'exposition à des agents chimiques en milieu professionnel (VLEP) (Anses, 2017b).

²¹ La VLB correspond à la valeur limite des indicateurs biologiques pertinents pour une exposition à un agent chimique donné.

7 Valeur toxicologique indicative

Une valeur toxicologique indicative (VTi) est un repère toxicologique pouvant être utilisé pour l'évaluation d'un risque. Il s'agit d'une valeur indicative moins robuste que la VTR présentant ainsi un niveau de confiance faible.

Une VTi pourra être proposée lorsque les conditions nécessaires à l'élaboration d'une VTR ne sont pas remplies et qu'une EQRS est nécessaire dans un contexte d'exposition donné :

1. en cas d'**insuffisance des données** disponibles sur la substance pour caractériser le danger de la substance ou de **doute sur le caractère néfaste de l'effet**. Dans ce cas, une veille bibliographique sera menée par l'Anses sur ces substances en vue de remplacer les VTi par des VTR si de nouvelles données le permettent ;
2. Si l'ensemble des **facteurs d'incertitude appliqué dépasse 1 000**, aucune VTR ne sera construite. Il sera alors possible de proposer une valeur toxicologique indicative ;
3. en cas de **contraintes de temps et/ou de ressources**. Dans ce cas, la VTi serait élaborée au mieux dans le temps imparti afin de répondre aux impératifs d'action des décideurs, puis un travail complémentaire sera le cas échéant réalisé afin de proposer une VTR.

Sur la base de l'approche OMS/IPCS proposant une démarche par étapes pour l'évaluation des risques sanitaires dont la première étape consiste en une évaluation préliminaire (screening), la VTi pourra être utilisée pour écarter un risque dans une approche d'évaluation de risque de premier niveau, conservatrice (OMS, 2010b).

A la différence d'une VTR, une VTi ne devrait être utilisée que pour répondre à la situation et au contexte spécifique qui ont justifié sa construction. Les conditions d'application devront donc être clairement explicitées pour chacune des VTi proposées. Comme pour les VTR, l'utilisation et l'interprétation des VTi devront obligatoirement tenir compte de la voie d'exposition, de la durée d'exposition, de la période d'exposition, du type d'effet auquel elle est associée et de la population cible pour laquelle elle est destinée. Le mode de construction des VTi dépend des données disponibles sur les mécanismes d'action biologique des substances et d'hypothèses communément admises. On distingue ainsi des VTi à seuil de dose et des VTi sans seuil de dose. Une VTi est élaborée en suivant les mêmes étapes de construction qu'une VTR.

Les VTi ne seront pas publiées sur le site internet de l'Anses indépendamment des évaluations du risque simplifiée qui auront justifié leur élaboration.

8 Processus de révision des VTR

Concernant les substances disposant d'une VTR élaborée par l'Anses, l'Agence assure une veille afin d'identifier toute publication d'une nouvelle VTR émise par un organisme reconnu. Une analyse critique de cette VTR sera réalisée et présentée à un comité d'experts compétent afin d'évaluer l'opportunité de réviser la VTR recommandée par l'Anses.

Lors de la construction d'une VTi, l'Anses mènera une veille bibliographique sur ces substances en vue de remplacer les VTi par des VTR si de nouvelles données le permettent.

9 Conclusions et perspectives

Le présent rapport rassemble les informations générales permettant de construire une VTR. Il s'agit d'une actualisation d'un précédent document méthodologique publié en 2015 (Anses, 2015) complété par les évolutions scientifiques et méthodologiques. Il reprend les rapports publiés par l'Agence : « Méthode de construction de VTR fondées sur des effets toxiques pour la reproduction et le développement » (Afsset, 2007) et « Méthode de construction de VTR fondées sur des effets cancérigènes » (Afsset, 2010) afin de n'avoir plus qu'un seul guide d'élaboration des VTR. De plus, le CES a développé un nouveau type de valeur de référence intitulée valeur toxicologique indicative ou VTi. Cette valeur, moins robuste que la VTR, sera proposée en cas d'une insuffisance des données disponibles sur le danger de la substance, de doute sur l'adversité de l'effet ou de contraintes de temps et/ou de ressources et permettra de réaliser une évaluation quantitative de risques sanitaires.

Le Comité d'Experts Spécialisés « Caractérisation des risques des substances et valeurs toxicologiques de référence » a identifié certains points qui méritaient d'être développés en termes d'amélioration des connaissances et de développements méthodologiques :

- Harmonisation des approches à seuil et sans seuil

Actuellement, les effets sont répartis en 2 groupes distincts : les effets à seuil de dose et les effets sans seuil de dose. Cependant, la distinction entre ces 2 types d'effets est de plus en plus discutée par la communauté scientifique (Neumann, 2009 ; NRC, 2009, Rodricks *et al.*, 2013). Une réflexion sur la manière de caractériser la relation dose-effet vers une approche harmonisée entre effets cancérigènes et non cancérigènes, en y adaptant les concepts du NRC (cf. §5.4.7), devra être menée.

- Le développement de VTR pour des effets sensibilisants (ex. toluène diisocyanate) ;
- Le développement de VTR pour des effets perturbateurs endocriniens ;
- Le développement de VTR pour des nanoparticules (ex. dioxyde de titane) ;
- les VTR s'appliquant à des mélanges connus de substances, à travers l'identification de méthodes pour évaluer la toxicité des mélanges, le développement d'outils comme les modèles PBPK qui permettraient d'extrapoler les résultats de mélanges testés *in vitro* à l'*in vivo*.
- la prise en compte du mécanisme d'action dans l'élaboration des VTR et le choix d'effets critiques précoces (événements clés ou keys events), à travers l'identification de la séquence d'événements conduisant à la toxicité (AOP ou "adverse outcome pathway"), qui

décrit l'enchaînement des évènements moléculaires aboutissant aux effets délétères au niveau d'un organisme. Cette approche est préconisée dans le document guide de l'OCDE "Guidance document on developing and assessing adverse outcome pathways" (OCDE, 2013),

- la finalité de construction des VTR, les conditions d'utilisation et les limites de validité des VTR,
- la prise en compte de la voie cutanée dans l'élaboration des VTR,
- l'application d'une approche probabiliste des facteurs d'incertitude. Cette réflexion a été amorcée au sein du CES « Valeur Limite d'Exposition Professionnelle » (VLEP) avec la mise en place d'une approche probabiliste en proposant pour chaque facteur d'incertitude une distribution de probabilités (Anses, 2014).

L'ensemble de ces éléments donnera lieu à des travaux méthodologiques et permettra dans le futur d'actualiser les rapports de l'Anses relatifs aux VTR.

Date de validation du rapport d'expertise collective par le comité d'experts spécialisés : 23 juin 2017

Signature :

Maisons-Alfort, le _____,

Au nom des experts du CES
« Caractérisation des dangers des substances et
valeurs toxicologiques de référence »,

M Guerbet
Président du CES

10 Bibliographie

- ADELFF - ADEREST – AEEMA - EPITER (2007) Recommandations de bonnes pratiques en épidémiologie (version France – 2007). 37p. Disponible sur <http://www.epiter.org/spip/Recommandations-et-bonnes>
- Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail (Afsset) (2007) Valeurs toxicologiques de référence (VTR) pour les substances reprotoxiques. Méthode de construction de VTR fondées sur des effets toxiques pour la reproduction et le développement, Saisine n°2003/AS03. (Afsset, Maisons-Alfort) 81p. Disponible sur <https://www.anses.fr/fr/system/files/CHIM2003etAS03An-2.pdf>
- Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail (Afsset) (2008) Problématique de la prise en compte systématique des ajustements temporels dans la construction des valeurs toxicologiques de référence (VTR). Mémoire d'Emel Belkebir de Master « Médicaments et autres produits de santé ». (Afsset, Maisons-Alfort) 67p. Disponible sur <https://www.anses.fr/fr/system/files/CHIM2008etPharmaRa.pdf>
- Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail (Afsset) (2010) Valeurs toxicologiques de référence (VTR) pour les substances cancérogènes. Méthode de construction de VTR fondées sur des effets cancérogènes. Saisine n° 2004/AS16. (Afsset, Maisons-Alfort) 107p. Disponible sur <https://www.anses.fr/fr/system/files/CHIM2004etAS16Ra.pdf>
- Agence national de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses) (2012a) Valeurs sanitaires de référence (VR). Guide des pratiques d'analyse et de choix. Saisine n°2011-SA-0355. Juillet 2012. (Anses, Maisons-Alfort) 43p. Disponible sur <https://www.anses.fr/fr/system/files/CHIM2011sa0355Ra.pdf>
- Agence national de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses) (2012b) Valeur toxicologique de référence pour le cadmium et ses composés. Juillet 2012. (Anses, Maisons-Alfort) 96p. Disponible sur <https://www.anses.fr/sites/default/files/files/CHIM2009sa0344Ra.pdf>
- Agence national de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses) (2013a) Expositions au plomb : effets sur la santé associés à des plombémies inférieures à 100 µg/L. Janvier 2013. (Anses, Maisons-Alfort) 146p. Disponible sur <https://www.anses.fr/fr/system/files/CHIM2011sa0219Ra.pdf>
- Agence national de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses) (2013b) Évaluation des risques du bisphénol A (BPA) pour la santé humaine. Tome 1. Mars 2013. Janvier 2013. (Anses, Maisons-Alfort) 146p. Disponible sur <https://www.anses.fr/fr/system/files/CHIM2009sa0331Ra-0.pdf>
- Agence national de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses) (2014) Développement d'une approche probabiliste lors de la construction des VLEP à seuil. Avril 2014. (Anses, Maisons-Alfort) 50p. Disponible sur <https://www.anses.fr/fr/system/files/VLEP2013sa0235Ra.pdf>
- Agence national de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses) (2015) Valeurs toxicologiques de référence (VTR). Guide d'élaboration de VTR. Février 2010. Seconde édition – mise à jour en septembre 2015. (Anses, Maisons-Alfort) 102p.
- Agence national de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses) (2017a) Evaluation du poids des preuves à l'Anses : revue critique de la littérature et recommandations à l'étape

- d'identification des dangers. Juillet 2017. (Anses, Maisons-Alfort) 116p. Disponible sur <https://www.anses.fr/fr/system/files/AUTRE2015SA0089Ra.pdf>
- Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses) (2017b) Expertise en vue de la fixation de valeurs limites d'exposition à des agents chimiques en milieu professionnel. Document de référence pour l'élaboration de valeurs limites d'exposition à des agents chimiques en milieu professionnel (VLEP). A paraître. (Anses, Maisons-Alfort)
- Allen BC, Kavlock RJ, Kimmel CA, Faustman EM. Dose-response assessment for developmental toxicity. II. Comparison of generic benchmark dose estimates with no observed adverse effect levels. *Fundam Appl Toxicol.* 1994 Nov;23(4):487-95.
- Barton HA, Cogliano VJ, Flowers L, Valcovic L, Setzer RW, Woodruff TJ. (2005) Assessing susceptibility from early-life exposure to carcinogens. *Environ Health Perspect.* 2005 Sep;113(9):1125-33.
- Belkebir E, Rousselle C, Duboudin C, Bodin L, Bonvallot N. Haber's ruleduration adjustments should not be used systematically for risk assessment in public health decision-making. *Toxicol Lett.* 2011 Jul 28;204(2-3):148-55.
- Benfenati E, Manganaro A, Gini G. (2013) VEGA-QSAR: AI inside a platform for predictive toxicology. Proceedings of the workshop "Popularize Artificial Intelligence 2013". December 5th 2013, Turin, Italy Published on CEUR Workshop Proceedings Vol-1107.
- Bolt H.M, Foth H., Hengstler J.G, Degen G.H. (2004) Carcinogenicity categorization of chemicals. New aspects to be considered in a European perspective. *Toxicol Lett* 2004; 151:29-41.
- Bonvallot N and Dor F. (2002). Analyse des méthodes d'élaboration des valeurs toxicologiques de référence (VTR) : une aide à la sélection ? *Environnement Risques et Santé*; 1(3): 178-183.
- Bonvallot N, Bodin L, Duboudin C, Bard D. (2009). Benchmark dose : définitions, intérêt et usages en évaluation des risques sanitaires. *Environnement, Risques & Santé*, 2009; 8(6): 529-537.
- Boobis AR, Cohen SM, Dellarco V, McGregor D, Meek ME, Vickers C, et al. (2006). IPCS framework for analyzing the relevance of a cancer mode of action for humans. *Crit Rev Toxicol*; 36(10): 781-792.
- Boobis AR, Doe JE, Heinrich-Hirsch B, Meek ME, Munn S, Ruchirawat M, et al. (2008). IPCS framework for analyzing the relevance of a noncancer mode of action for humans. *Crit Rev Toxicol*; 38(2): 87-96.
- Bozdogan H (1987) Model-selection and Akaike's information criterion (AIC): The general theory and its analytical extensions. *Psychometrika*, 1987 Sep;52(3):345-370.
- Brusick D, Aardema M, Kier L, Kirkland D, Williams G. (2016) Genotoxicity Expert Panel review: weight of evidence evaluation of the genotoxicity of glyphosate, glyphosate-based formulations, and aminomethylphosphonic acid. *Crit Rev Toxicol.* 2016 Sep;46(sup1):56-74.
- Calabrese EJ. (2009). The road to linearity: why linearity at low doses became the basis for carcinogen risk assessment. *Arch Toxicol*; 83(3): 203-25.
- Chou C-H S, Holer J, De Rosa CT. (1998) Minimal risk levels (MRLs) for hazardous substances. *J. Clean Technol. Environ. Toxicol., & Occup. Med.* 1998; 7(1):1-24
- Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC). (1992). IARC Scientific Publications n°116 - Mechanisms of carcinogenesis in risk identification. International Agency for Research on Cancer, Lyon. 608 p.
- Centre international de recherche sur le cancer (CIRC). (1992-1997) International Classification of Rodent Tumours, Part I: the Rat. IARC Scientific Publications No.122 Vol.1 – 10.
- Centre international de recherche sur le cancer (CIRC). (2001) International Classification of Rodent Tumours, Part II: the Mouse. IARC Scientific Publications.

- Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC). (2006). IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans – Preamble. International Agency for Research on Cancer, Lyon. 27 p.
- Clayton B, Kroes R, Larsen JC, Pascal G. (1998) Applicability of the ADI to infants and children. Food additives and contaminants 1998; 15 S001
- Committee on mutagenicity of chemicals in food, consumer products and TGE environment (COM). (2000) Guidance on a strategy for testing of chemicals for mutagenicity. Department of Health (Royaume-Uni),
- Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France (CSHPF). Les éthers de glycol dans les produits de consommation et la santé. Rapport du groupe d'experts. CSHPF. Section des Milieux de vie. 2002.
- Danish EPA (2001) Children and the unborn child Exposure and susceptibility to chemical substances – an evaluation. Environmental Project No. 589 2001. (Danish EPA, København K, Danemark) 117p. Disponible sur <http://www2.mst.dk/udgiv/Publications/2001/87-7909-574-7/pdf/87-7909-333-7.pdf>
- Dennis C. (2003) Epigenetics and disease: altered states. Nature 2003 Feb; 421 (6924):686-688.
- Dictionnaire de l'environnement. (2015) Site internet consulté le 19 janvier 2015 http://www.dictionnaire-environnement.com/valeur_toxicologique_de_reference_vtr_ID1833.html
- Doornaert B, Pichard A. (2006) Valeurs toxicologiques de référence : comment choisir ? Environnement risques et santé ; 5 (3) : 191-198
- Dourson ML and Stara JL. (1983). Regulatory history and experimental support of uncertainty (safety) factors. Regul Toxicol. Pharmacol; 3(3): 224-238.
- European chemicals bureau (ECB). (2003) Technical guidance document in Support of Commission Directive 93/67/EEC on Risk assessment for new notified substances. Commission Regulation (EC) No 1488/94 on Risk assessment for existing substances. Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council concerning the placing of biocidal products on the market. Part I. European Commission; 2003.
- European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals (ECETOC). (1995). Assessment factors in human health risk assessment. Technical report n°86. European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals, Brussels. 90 p.
- European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals (ECETOC). (2005) Trends in children's health and the role of chemicals: state of the science review. Technical report N°96 (ECETOC, Bruxelles) 148p.
- enHealth Council. (2002) Environmental health risk assessment. Guidelines for assessing human health risks from environmental hazards. Department of health and ageing and enHealth Council. Commonwealth of Australia. Juin 2002.
- European Chemicals Agency (ECHA) (2008). Guidance on information requirements and chemical safety assessment. Chapter R.6: QSARs and grouping of chemicals. May 2008 (ECHA, Helsinki).
- European Chemicals Agency (ECHA) (2012) Guidance on information requirements and chemical safety assessment. Chapter R.8: Characterisation of dose [concentration]-response for human health. Version 2.1. ECHA-2010-G-19-EN. November 2012 (ECHA, Helsinki). 195p.
- European Commission. Council Directive 67/548/EEC of 27 June 1967 on the approximation of laws, regulations and administrative provisions relating to the classification, packaging and labelling of dangerous substances. Official Journal of the European Communities 196, 16.8.1967, p. 1.
- European Food Safety Authority (EFSA) (2005). Draft opinion on a harmonised approach for risk assessment of compounds which are both genotoxic and carcinogenic. Bruxelles: EFSA Scientific Committee GENTOX; 2005.

- European Food Safety Authority (EFSA) (2009) Scientific opinion. Use of the benchmark dose approach in risk assessment. Guidance of the Scientific Committee (Question No EFSA-Q-2005-232) Adopted on 26 May 2009. The EFSA Journal (2009) 1150, 1-72. Disponible sur http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_output/files/main_documents/sc_op_ej1150_bmd_en.pdf
- European Food Safety Authority (EFSA) (2012) Scientific Opinion on exploring options for providing advice about possible human health risks based on the concept of Threshold of Toxicological Concern (TTC) EFSA Journal 2012;10(7): 2750 (EFSA, Parme, Italie) 103p. Disponible sur http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_output/files/main_documents/2750.pdf
- European Chemicals Agency (ECHA) (2013). Read-across illustrative example. Part 2. Example 1 – Analogue approach: similarity based on breakdown products. April 2013 (ECHA, Helsinki).
- European Chemicals Agency (ECHA) (2015). Read-across Assessment Framework (RAAF). (ECHA, Helsinki).
- EFSA (European Food Safety Authority) (2016). Draft Guidance on Uncertainty in Scientific Assessment. Revised Draft for Internal Testing. Scientific Opinion. EFSA Journal. Version du 21/03/2016.
- European Food Safety Authority (EFSA) (2017) Draft. Guidance on biological relevance. Disponible sur <https://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/consultation/170306.pdf>
- Fowler P, Smith K, Young J, Jeffrey L, Kirkland D, Pfuhrer S, Carmichael P. (2012) Reduction of misleading ("false") positive results in mammalian cell genotoxicity assays. I. Choice of cell type. *Mutat Res.* 2012 Feb 18;742(1-2):11-2
- Goldbohm RA, Tielemans EL, Heederik D, et al. (2006). Risk estimation for carcinogens based on epidemiological data: a structured approach, illustrated by an example on chromium. *Regul Toxicol Pharmacol*; 44(3): 294-310.
- Greim H and Snyder R. (2008). *Toxicology and risk assessment, A Comprehensive Introduction*. John Wiley & Sons Ltd. editors, Chichester. 698 p.
- Guyton KZ, Barone S Jr, Brown RC, Euling SY, Jinot J, Makris S. (2008). Mode of action frameworks: a critical analysis. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*; 11(1): 16-31.
- HAS (Haute Autorité de Santé) (2013). Niveau de preuve et gradation des recommandations de bonne pratique – État des lieux.
- Hattis D, Baird S, Goble R (2002) A straw man proposal for a quantitative definition of the RfD. *Drug and chemical toxicology* 25(4):403-36, 2002
- Hattis D, Lynch MK. (2007) Empirically observed distributions of pharmacokinetic and pharmacodynamic variability in humans: Implications for the derivation of single point component uncertainty factors providing equivalent protection as existing RfDs. *Toxicocinetics and Risk Assessment*:69-93, 2007
- Hill BA. (1965). The environment and disease: Association or causation? *Proceedings of the Royal Society of Medicine*; 58: 295-300.
- Honma M, Hayashi M. (2011) Comparison of in vitro micronucleus and gene mutation assay results for p53-competent versus p53-deficient human lymphoblastoid cells. *Environ Mol Mutagen.* 2011 Jun;52(5):373-84
- Holsapple MP, Wallace KB. (2008). Dose response considerations in risk assessment - an overview of recent ILSI activities. *Toxicol Lett*; 180(2): 85-92.
- Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (INERIS) (2009a) Valeurs toxicologiques de référence et méthodes de construction pour les effets sensibilisants pour une exposition cutanée.

- Rapport d'étude N°INERIS-DRC-09-94380-01323A. (INERIS, Verneuil en Halatte) 51p. Disponible sur <http://www.ineris.fr/centredoc/drc070908.pdf>
- Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (INERIS) (2009b) Tests *in vitro* cutanés et proposition d'une méthode d'établissement de VTR/DNEL. Rapport d'étude N°INERIS-DRC-09-94380-0318A. (INERIS, Verneuil en Halatte) 40p.
- Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (INERIS) (2010) Notions de sous-populations sensibles en lien avec l'évaluation toxicologique. Rapport d'étude DRC-09-103110-14517A. (INERIS, Verneuil en Halatte). 51p. Disponible sur <http://www.ineris.fr/centredoc/drc-09-103110-14517a.pdf>
- Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (INERIS) (2016) Choix de valeurs toxicologiques de référence (VTR). Méthode appliquée par l'INERIS. Première édition. Décembre 2016. (INERIS, Verneuil en Halatte). 68p. Disponible sur <http://www.ineris.fr/centredoc/drc-16-156196-11306a-1494926651.pdf>
- Institut National de Santé publique du Québec (2007) La santé des enfants et l'environnement. Numéro thématique. BISE (Bulletin d'information en santé environnementale). Mai –août 2007. Vol 18. Num 3-4. 68p. Disponible sur <https://www.inspq.qc.ca/pdf/bulletins/bise/BISE-18-3-4.pdf>
- Institut de Veille Sanitaire (InVS). (2002). Valeurs toxicologiques de référence : méthodes d'élaboration. (InVS, Saint Maurice). 84p.
- Kalberlah F and Schneider K. (1998). Quantification of extrapolation factors: Final Report Research Project N°116 06 113 of the Federal Agency. Wirtschaftsverlag NW, Bremerhaven. 200p.
- Keenan C. et al. (2002) The North American control animal database: a resource based on standardized nomenclature and diagnostic criteria. *Toxicol Pathol* 2002; 30 (1):75-79.
- Kemikalieinspektionen (KEMI) (2003) Human Health Risk Assessment. Proposals for the use of assessment (uncertainty) factors. Application to risk assessment for plant protection products, industrial chemicals and biocidal products within the European Union. Report N°1/03. (KEMI, Solna, Suède) 141p. Disponible sur https://www.kemi.se/Documents/Publikationer/Trycksaker/Rapporter/Rapport1_03.pdf
- Kittel B et al. (2004) Revised guides for organ sampling and trimming in rats and mice – Part 2. A joint publication of the RITA and NACAD groups. *Exp Toxic Pathol* 2004; 55: 413–431.
- Klimisch HJ, Andreae M, Tillmann U. A systematic approach for evaluating the quality of experimental toxicological and ecotoxicological data. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 1997;25(1):1-5.
- Kumaravela TS, Jha AN. Reliable Comet assay measurements for detecting DNA damage induced by ionising radiation and chemicals. *Mutat Res/Genetic Toxicol Env Mutagenesis*. Volume 605, Issues 1-2, 16 Juin 2006, Pages 7-16.
- Lewis SC, Lynch JR and Nikiforov AI. (1990). A new approach to deriving community exposure guidelines from 'no-observed-adverse-effect levels.' *Regul Toxicol Pharmacol*; 11(3): 314-330.
- Loizou G, Spendiff M, Barton HA, Bessems J, Bois FY, d'Yvoire MB, Buist H, Clewell HJ 3rd, Meek B, Gundert-Remy U, Goerlitz G, Schmitt W (2008) Development of good modelling practice for physiologically based pharmacokinetic models for use in risk assessment: the first steps. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2008 Apr;50(3):400-11.
- Lu FC. (1988). Inception, evolution and application. *Regul Toxicol Pharmacol*; 8: 45-60.
- Marchant CA, Briggs KA, Long A. (2008) In silico tools for sharing data and knowledge on toxicity and metabolism: derek for windows, meteor, and vitic. *Toxicol Mech Methods*. 2008;18(2-3):177-87.
- Mohamed S. (1995). EPA uncertainty factor workshop. *Hum Ecol Risk Assess*; 1(5): 459–662.

- Morawietz G et al. (2004) Revised guides for organ sampling and trimming in rats and mice – Part 3. A joint publication of the RITA and NACAD groups. *Exp Toxic Pathol* 2004; 55: 433–449.
- Mullot JU, Solal C, Bonvallot N, Zmirou D. (2006) Méthodes de construction de valeurs toxicologiques de référence (VTR) pour les substances chimiques cancérigènes. *Environnement Risques et Santé*. 2006; 5(3):181-189.
- Mutation Research/Reviews in mutation research. Volume 681. Issue 1. Janvier-Février 2009:1-109.
- NTP (National Toxicology Program) (2015). Handbook for conducting a literature-based health assessment using OHAT approach for systematic review and evidence integration. Office of Health Assessment and Translation (OHAT).
- National Research Council (NRC) (1983) Risk Assessment in the Federal Government: Managing the Process. Washington, DC: National Academy Press; 1983
- National Research Council (NRC). (1993a). Guidelines for developing community emergency exposure levels for hazardous substances. (National Academy Press, Washington DC). 130 p.
- National Research Council (NRC) (1993b) Pesticides in the diets of infants and children. Committee on pesticides in the diets of infants and children. Commission on life sciences. (National Academy Press, Washington, DC) 408p. Disponible sur <http://www.nap.edu/openbook.php?isbn=0309048753>
- National Research Council (NRC) (1994) Science and judgment in risk assessment. Committee on risk assessment of hazardous air pollutants. Commission on life sciences (National Academy Press, Washington, DC) 672p. Disponible sur <http://www.nap.edu/openbook.php?isbn=030904894X>
- National Research Council (NRC) (2009) Science and decisions. Advancing Risk Assessment. Committee on Improving Risk Analysis Approaches Used by the US EPA, Board on Environmental Studies and Toxicology, Division on Earth and life Studies. (National Academy Press, Washington, DC) 403p. Disponible sur http://www.nap.edu/catalog.php?record_id=12209
- Navy and Marine corps public health center (2008) Risk characterization for carcinogens that have a mutagenic mode of action. Supplemental Navy guidance for conducting human health risk assessments. February 2008. 9p. Disponible sur http://www.med.navy.mil/sites/nmcphc/Documents/environmental-programs/risk-assessment/Risk_Characterization_for_Chemicals_with_Mutagenic_MOA_Feb_2008.pdf
- Nesslany F. (2016) The current limitations of in vitro genotoxicity testing and their relevance to the in vivo situation. *Food Chem Toxicol*. 2016 Aug 31
- Neumann HG. (2009) Risk assessment of chemical carcinogens and thresholds. *Critical reviews in toxicology*. 2009;39(6):449-61.
- Nielsen GD and Ovrebo. (2008). Background, approaches and recent trends for setting health-based occupational exposure limits: a mini-review. *Regul Toxicol Pharmacol*; 51(3): 253-269.
- Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE). (1993). Essai n°453: Études combinées de toxicité chronique et de cancérogénèse in 'Lignes directrices pour les essais de produits chimiques, Section 4: effets sur la santé'. Organisation de coopération et de développement économique, Paris. p. 21.
- Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE). (2002) Guidance notes for analysis and evaluation of chronic toxicity and carcinogenicity studies. OECD Environment, health and safety publications. Series on testing and assessment n°35 and pesticides n°14. ENV/JM/MONO(2002)19. Septembre 2002.
- Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE) (2005) Overview of the Set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and Updates Performed in 2014–2015. Paris (France): Organization for Economic Co-operation and Development (OECD), Environment

- Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE) (2007) Guidance on Grouping of Chemicals [Internet]. Paris (FR): OECD, Environment Directorate. Disponible sur [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?doclanguage=en&cote=env/jm/mono\(2007\)28](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?doclanguage=en&cote=env/jm/mono(2007)28)
- Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE) (2008) Guidance document on mammalian reproductive toxicity testing and assessment. Series on Testing Assessment N°43. Juillet 2008. Disponible sur [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono\(2008\)16&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2008)16&doclanguage=en)
- Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE) (2013) Guidance Document on developing and assessing adverse outcome pathways. OECD Environment, Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No 184. (Paris, France) 45p. Disponible sur [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono\(2013\)6&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2013)6&doclanguage=en)
- Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE) (2014). Guidance on grouping of chemicals, second edition. Series on testing & assessment. No. 194. Paris (FR): OECD, Environment Directorate.
- Office of Environmental Health and Hazard Assessment (OEHHA). (2000). Air toxics hot spots program risk assessment guidelines. Part III: Technical support document for the determination of noncancer chronic reference exposure levels. Office of Environmental Health Hazard Assessment, Oakland. 41 p.
- Office of Environmental Health and Hazard Assessment (OEHHA) (2005) Development of health criteria for school site risk assessment pursuant to health and safety code section 901(g): child-specific reference doses (chRDs) for school site risk assessment – cadmium, chlordane, heptachlor, heptachlor epoxide, methoxychlor, and nickel. Integrated Risk Assessment Branch (OEHHA, Sacramento) 109 p. Disponible sur http://oehha.ca.gov/public_info/public/kids/pdf/FinalSchoolReport121205.pdf
- Office of Environmental Health and Hazard Assessment (OEHHA) (2008) Technical support document for the derivation of noncancer reference exposure levels. Air toxic hot spots. Risk assessment guidelines. (OEHHA, Sacramento) 131p. Disponible sur http://oehha.ca.gov/air/hot_spots/2008/NoncancerTSD_final.pdf
- Office of Environmental Health Hazard Assessment (OEHHA) (2009) Technical Support Document for cancer potency Factors: Methodologies for derivation, listing of available values, and adjustments to allow for early life stage exposures (OEHHA, Sacramento) 89p. Disponible sur http://oehha.ca.gov/air/hot_spots/2009/TSDCancerPotency.pdf
- Organisation Mondiale pour la santé (OMS) (1994) IPCS Environmental Health Criteria 170: Assessing human health risks of chemicals: Derivation of guidance values for health based exposure limits. World Health Organization: Genève. Disponible sur <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc170.htm>
- Organisation Mondiale pour la santé (OMS) (1999) Principles for the assessment of risks to human health from exposure to chemicals. IPCS EHC 210. Geneva. 91p. Disponible le 24 juillet 2015 sur : <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc210.htm>
- Organisation Mondiale pour la santé (OMS). (2001). Integrated risk assessment: Report for the WHO/UNEP/ILO international programme on chemical safety. World Health Organisation, Genève. Disponible sur <http://apps.who.int/iris/handle/10665/67358>
- Organisation Mondiale pour la santé (OMS) (2004) IPCS Risk assessment terminology. (OMS, Genève) 122p.

- Organisation Mondiale pour la santé (OMS) (2005) Chemical-specific adjustment factors for interspecies differences and human variability : guidance document for use of data in dose/concentration-response assessment. (OMS, Genève) 100p.
- Organisation Mondiale pour la santé (OMS) (2006) Environmental health Criteria 237. Principles for evaluating risks in children associated with exposure to chemicals. (OMS, Genève) 351p. Disponible sur <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc237.pdf>
- Organisation Mondiale pour la santé (OMS) (2009a) Environmental health Criteria 240. Principles and methods for the risk assessment of chemicals in food. (OMS, Genève) Disponible sur <http://www.who.int/foodsafety/chem/principles/en/index1.html>
- Organisation Mondiale pour la santé (OMS) (2009b) Food Safety. Project to update the 1348 principles and methods for the assessment of chemicals in food. Principles and methods 1349 for the risk assessment of chemicals in food. EHC 240.
- Organisation Mondiale pour la santé (OMS) (2010a) Characterization and application of physiologically based pharmacokinetic models in risk assessment. (OMS, Genève) 97p. Disponible sur : http://www.who.int/ipcs/methods/harmonization/areas/pbpbk_models.pdf?ua=1
- Organisation Mondiale pour la santé (OMS) (2010b) WHO human health risk assessment toolkit : chemical hazards. (OMS, Genève) 105p.
- Pauluhn J. (2003) Overview of testing methods used in inhalation toxicity: from facts to artifacts. *Toxicol Lett.* 2003 Apr 11;140-141:183-93.
- Phalen RF. (1976) Inhalation exposure of animals. *Environ Health Perspect.* 1976 Aug;16:17-24.
- Pohl HR, Abadin HG. (1995) Utilizing uncertainty factors in minimal risk levels derivation. *Regul Toxicol Pharmacol.* 1995 Oct;22(2):180-8.
- Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM) (2001) Re-evaluation of human-toxicological maximum permissible risk levels. Rapport 711701025. Bilthoven, Pays-Bas. 297p.
- Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM) (2002) Risk assessment of chemicals: what about children ? RIVM report 613340005/2002. (RIVM, Bilthoven, Pays-Bas) 29p. Disponible sur <http://rivm.openrepository.com/rivm/bitstream/10029/9260/1/613340005.pdf>
- Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM) (2007) Guidance for assessment of chemical risks for children. RIVM report 320012001/2007. (RIVM, Bilthoven, Pays-Bas) 30p.
- Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM) (2009) Re-evaluation of some human-toxicological Maximum Permissible Risk levels earlier evaluated in the period 1991-2001. Rapport 711701092/2009. (RIVM, Bilthoven, Pays-Bas) 68p.
- Rodricks JV, Levy JI. Science and decisions: advancing toxicology to advance risk assessment. *Toxicol Sci.* 2013 Jan;131(1):1-8.
- Ruehl-Fehlert C et al. (2003) Revised guides for organ sampling and trimming in rats and mice – Part 1. A joint publication of the RITA and NACAD groups. *Exp Toxic Pathol* 2003; 55: 91–106.
- Santé Canada (1994) L'évaluation du risque à la santé humaine des substances d'intérêt prioritaire. (Santé Canada, Ottawa) 47p.
- Science advisory board. (1997) Review of the Office of research and development's draft guidelines for cancer risk assessment by the Environmental health committee. EPA-SAB-EHC-97-010. Washington (DC): U.S. Environmental Protection Agency, Science Advisory Board.
- Stevenson H, Bos PMJ, de Raat WK. (1995). Review of applied factors to derive health based recommended exposure levels. TNO Report No V95.092. TNO Nutrition and Food Research, Zeist.

- Tennekes H., Gembardt C., Dammann M., Van Ravenzwaay B. (2004a) The stability of historical control data for common neoplasms in laboratory rats: adrenal gland (medulla), mammary gland, liver, endocrine pancreas and pituitary gland. *Regul Toxicol Pharmacol* 2004; 40:18-27.
- Tennekes H., Kaufmann W., Dammann M., Van Ravenzwaay B. (2004b) The stability of historical control data for common neoplasms in laboratory rats and the implications for carcinogenic risk assessment. *Regul Toxicol Pharmacol* 2004; 40:293-304.
- Umwelt Bundesamt (UBA) (2001) Schneider K. Zur Frage von Unterschieden der Empfindlichkeit von Kindern gegenüber krebserzeugenden Stoffen im Vergleich zu Erwachsenen. Dans : Eikmann T., Heinrich K., Heinzow B., Konietzka K. : Gefährdungsabschätzung von Umweltschadstoffen. Ergänzbare Handbuch: Toxikologische Basiswerte und ihre Bewertung, Erich Schmidt Verlag Berlin, Bielefeld, München : Kennzahl B100.Vorhaben 295 74 124. Septembre 2002, 238p.
- United States Environment protection agency (US EPA). (1986) Guidelines for carcinogen risk assessment. EPA/630/R-00/004. Washington (DC): U.S. Environmental Protection Agency, Risk Assessment Forum.
- US Environmental Protection Agency (US EPA) (1988) Recommendations for and Documentation of Biological Values for Use in Risk Assessment. EPA/600/6-87/008
- US Environmental Protection Agency (US EPA). (1991) Guidelines for developmental toxicity risk assessment. Risk Assessment Forum. EPA/600/FR-91/001. December 1991. 70p.
- US Environmental Protection Agency (US EPA) (1993) Reference Dose (RfD): description and use in health risk assessments, background Document 1A, March 15, 1993. Disponible sur : <http://www.epa.gov/ncea/iris/rfd.htm>
- US Environmental Protection Agency (US EPA) (1994a). Health effects assessment summary tables. United-States Environmental Protection Agency, Washington. 316 p.
- US Environmental Protection Agency (US EPA) (1994b) Methods for derivation of inhalation reference and concentration and application of inhalation dosimetry. Environmental Criteria and Assessment Office. Office of Health and Environmental Assessment. EPA/600/8-90/066F. (US EPA, Washington DC.) 389p.
- US Environmental Protection Agency (US EPA) (1996a). Proposed guidelines for carcinogen risk assessment. (US EPA, Washington DC). 172 p.
- US Environmental Protection Agency (US EPA) (1996b) Guidelines for reproductive toxicity risk assessment. Risk Assessment Forum. EPA/630/R-96/009. October 1996. 126p.
- United States Environment protection agency (US EPA) (1999) Guidelines for carcinogen risk assessment. NCEA-F-0644. Washington (DC): U.S. Environmental Protection Agency, Risk Assessment Forum.
- US Environmental Protection Agency (US EPA) (2002) A review of the reference dose and reference concentration processes. Final report EPA/630/P-02/002F. (US EPA, Washington DC.) 192p.
- US Environmental Protection Agency (US EPA) (2005a) Guidelines for carcinogen risk assessment. EPA/630/P-03/001F. (US EPA, Washington DC.) 166p.
- US Environmental Protection Agency (US EPA) (2005b) Supplemental guidance for assessing susceptibility from early-life exposure to carcinogens. EPA/630/R-03/003F (US EPA, Washington, DC) 126p.
- US Environmental Protection Agency (US EPA) (2006) Harmonization in Interspecies Extrapolation: Use of BW^{3/4} as a Default Method in Derivation of the Oral RfD. Risk Assessment Forum Technical Panel External review draft, EPA/630/R-06/001. (US EPA, Washington DC.) 34p.
- US Environmental Protection Agency (US EPA) (2009) Advances in inhalation dosimetry of gases and vapors with portal of entry effects in the upper respiratory tract. EPA/600/R-09/072. (US EPA, Washington DC.) 100p.

- US Environmental Protection Agency (US EPA) (2011) Recommended use of body weight^{3/4} as the default method in derivation of the oral reference dose. EPA/100/R11/0001. (US EPA, Washington DC.) 50p.
- US Environmental Protection Agency (US EPA) (2012a) Benchmark dose technical guidance. EPA/100/R-12/001. June 2012. (US EPA, Washington DC.) 99p.
- US Environmental Protection Agency (US EPA) (2012b) Advances in Inhalation Gas Dosimetry for Derivation of a Reference Concentration (RfC) and Use in Risk Assessment. EPA/600/R-12/044. September 2012. (US EPA, Washington DC.) 145p.
- Watson R.E., McKim J.M., Cockerell G.L., Goodman J.I. (2004) The value of DNA methylation analysis in basic, initial toxicity assessments. *Toxicol Sci* 2004 May; 79(1):178-88.
- Williams DE, Orner G, Willard KD, et al. (2009). Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and ultra-low dose cancer studies. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*; 149(2): 175-181.
- Whitwell J, Smith R, Jenner K, Lyon H, Wood D, Clements J, Aschcroft-Hawley K, Gollapudi B, Kirkland D, Lorge E, Pfuhler S, Tanir JY, Thybaud V. (2015) Relationships between p53 status, apoptosis and induction of micronuclei in different human and mouse cell lines in vitro: Implications for improving existing assays. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2015 Aug;789-790:7-27.
- Wong BA. (2007) Inhalation exposure systems: design, methods and operation. *Toxicol Pathol*. 2007 Jan;35(1):3-14.

ANNEXES

Annexe 1 : Suivi des actualisations du rapport

Date	Version	Page	Description de la modification
Février 2010	01	/	Première version publiée en février 2010
Septembre 2015	02	/	<ul style="list-style-type: none"> - Mise à jour des chapitres 2 (Considérations générales), 3 (Principes de construction d'une VTR), 4 (Ajustements et modélisation utilisables lors de la construction de VTR), 6 (Niveaux de confiance), 7 (VTR construites/sélectionnées par l'Anses), 10 (Conclusions et perspectives) - Ajout des chapitres relatif à l'applicabilité des VTR aux enfants (chapitre 5), au processus de révision des VTR (chapitre 8) et présentation des VTR (chapitre 9)
Juin 2017	03	/	<ul style="list-style-type: none"> - Fusion de la précédente version avec les rapports suivants : <ul style="list-style-type: none"> • Afsset (2007) Valeurs toxicologiques de référence (VTR) pour les substances reprotoxiques : Méthode de construction de VTR fondées sur des effets toxiques pour la reproduction et le développement • Anses (2010) Valeurs toxicologiques de référence pour les substances cancérigènes. Méthode de construction de VTR fondées sur des effets cancérigènes - Changement de la structure global du rapport - Ajout d'un glossaire, des chapitres relatifs à l'établissement du profil toxicologique (chapitre 3), au recueil des VTR (chapitre 4), au VTR interne (chapitre 6), et au valeur toxicologique indicative (chapitre 7) - Mise à jour des chapitres 2 (Définitions et généralités), 5 (Proposition de VTR) en fusionnant les anciens chapitres 3, 4, 5 et 6, 10 (Conclusions et perspectives) - Suppression du chapitre 7 (VTR construites/sélectionnées par l'Anses)

Annexe 2 : Grille de lecture des études toxicologiques *in vivo* et *in vitro*

- Grille pour les études toxicologiques *in vivo*

Logistique	Nom du relecteur	
	Date de lecture	
	Saisine associée	
Article	Auteur	<i>Tous éléments permettant l'identification de l'étude afin de pouvoir s'y référer au besoin et de pouvoir la citer</i>
	Date	
	Titre	
	Journal	
	Objectif de l'étude	<i>Contexte, objectifs de l'étude et/ou les hypothèses testées</i>
Design de l'étude	Type d'étude	<i>Toxicité aiguë (sensibilité, irritation, sensibilisation) ou chronique (cancérogénicité, reprotoxicité –fertilité ou développement-)</i>
	Respect BPL - ligne directrice	<i>BPL, guidelines de l'OCDE, protocole réglementaire, etc.</i>
	Modèle	<i>espèce / souche / âge / poids / sexe</i>
	Description du protocole de l'étude	<i>nombre d'animaux par condition et par sexe</i>
		<i>présence d'un témoin positif / négatif / contrôle cage</i>
	<i>test en aveugle</i>	
	Conditions de vie	<i>T, humidité, cycle lumière, alimentation, nombre d'animaux par cage</i>
Exposition	Agent d'exposition (substance, agent physique, microbiologique, etc.)	<i>Caractérisation de l'agent : définition (nom, n°CAS, pureté, composition, véhicule, etc.), type d'indicateur (biomarqueur, métabolite, etc.), type de signal (source, fréquence, etc.)</i>
	Description du système d'exposition	<i>per os (dans la nourriture, dans l'eau, gavage), cutanée (sous occlusion ou non, peau abrasée ou intacte, etc), voie inhalée (corps entier, nose only, etc.), antenne, contention lors de l'exposition, etc...</i>
	Doses/concentration/niveau d'exposition	<i>valeurs nominales ou mesurées ? Méthode de mesure ?</i>
	Fréquence et durée d'exposition	
	Exposition non contrôlée	<i>présence de phyto-œstrogènes dans le régime alimentaire, polycarbonate dans les cages d'hébergement, composition de l'eau de boisson, composition de la litière, etc.</i>
Analyse statistique	Méthode d'analyse statistique	<i>Type de test, uni ou bilatéral</i>
	Puissance de l'étude à posteriori	<i>Calcul a posteriori de la puissance</i>
Résultats	Résultats détails	<i>description des résultats pour sexe, chaque génération</i>
		<i>prise en compte de doses critiques ?</i>
Discussion	Description des incertitudes	
	Relation effet / dose	<i>Toute information en rapport à la relation dose réponse</i>
	Discussion et conclusion des auteurs	

	Commentaires relecteur(s)	<i>Pertinence du protocole d'exposition</i>
		<i>Discussion sur les mesures, les résultats</i>
	Références bibliographiques à récupérer	
	Sources de Financement / lien d'intérêt potentiel	
CONCLUSION	Classement de l'étude	<i>Critère qualité méthodologique.</i> <i>A déterminer selon les groupes de travail</i> <i>(bonne qualité, limites méthodologiques non majeures, limites méthodologiques majeures)</i>
		<i>Réponse à la question posée</i>
	Etude à retenir pour l'expertise	oui/non

- Grille pour les études toxicologiques *in vitro*

Logistique	Nom du relecteur	
	Date de lecture	
	Saisine associée	
Article	Auteur	<i>Tous éléments permettant l'identification de l'étude afin de pouvoir s'y référer au besoin et de pouvoir la citer</i>
	Date	
	Titre	
	Journal	
	Objectif de l'étude	<i>Contexte, objectifs de l'étude et/ou les hypothèses testées</i>
Design de l'étude	Type d'étude	<i>génotoxicité, cinétique, etc.</i>
	Respect BPL - ligne directrice	<i>BPL, guidelines de l'OCDE, protocole réglementaire, etc.</i>
	Modèle cellulaire	<i>lignée cancéreuse / non cancéreuse / âge des cellules</i>
	Description du protocole de l'étude	<i>nombre d'échantillons</i>
		<i>nombre de répétitions</i>
		<i>présence d'un témoin positif / négatif test en aveugle</i>
Conditions de vie	<i>T, humidité, cycle lumière, substrats, conditions de culture</i>	
Exposition	Agent d'exposition (substance, agent physique, microbiologique, etc.)	<i>Caractérisation de l'agent : définition (nom, n°CAS, pureté, composition, véhicule, etc.), type d'indicateur (biomarqueur, métabolite, etc.), type de signal (source, fréquence, etc.)</i>
	Description du système d'exposition	
	Doses/concentration/niveau d'exposition	<i>détailler les différents groupes d'exposition</i>
	Fréquence et durée d'exposition	
	Exposition non contrôlée	
Analyse statistique	Méthode d'analyse statistique	<i>Type de test, uni ou bilatéral</i>
	Puissance de l'étude à posteriori	<i>Calcul a posteriori de la puissance</i>
Résultats	Résultats détails	<i>description des résultats par sexe, par génération</i>
		<i>prise en compte de doses critiques ?</i>
		<i>décalage d'observation entre exposition et mesure de l'effet</i>
Discussion	Description des incertitudes	
	Relation effet / dose	<i>Toute information en rapport à la relation dose réponse</i>
	Discussion et conclusion des auteurs	
	Commentaires relecteur(s)	<i>Pertinence du protocole d'exposition Discussion sur les mesures, les résultats</i>
	Références bibliographiques à récupérer	
	Sources de Financement / lien d'intérêt potentiel	
CONCLUSION	Classement de l'étude	<i>Critère qualité méthodologique. A déterminer selon les groupes de travail (bonne qualité, limites méthodologiques non majeures, limites méthodologiques majeures)</i>
		<i>Réponse à la question posée</i>
	Etude à retenir pour l'expertise	<i>oui/non</i>

Annexe 3 : Grille de lecture des études épidémiologiques

Logistique	Nom du relecteur	
	Date de lecture	
	Saisine associée	
Article	Auteurs	<i>Tous éléments permettant l'identification de l'étude afin de pouvoir s'y référer au besoin et de pouvoir la citer</i>
	Date	
	Titre de l'étude	
	Journal	
	Objectif de l'étude	<i>Etude analytique, étude descriptive, etc.</i> <i>Contexte, objectif de l'étude et/ou hypothèses testées</i>
Design de l'étude	Type d'étude	<i>Cohorte, cas-témoins, étude transversale, méta-analyses, rapport de cas...</i>
	Paramètres de santé étudiés ou pathologie étudiée	<i>Définition de l'/les effet(s) sanitaire(s) étudié(s)</i> <i>Description de la mesure de l'effet sanitaire/mode de recueil de l'effet sanitaire</i>
	Sélection des individus	<i>Critères inclusion/ exclusion</i> <i>Mode de recrutement : volontariat, registres...</i>
	Description de la population ou des groupes	<u><i>Description de la Cohorte/des cas et des témoins/des groupes exposés et non exposés</i></u> <i>Industrie, Pays</i> <i>Effectif, caractéristiques sociodémographique des sujets (age, sexe ratio, etc.)</i>
	Séquence dans le temps	<i>Exposition précédent les effets observés ?</i>
Exposition	Agent d'exposition (substance, agent physique, microbiologique, etc.)	<i>Caractérisation de l'agent : définition (nom, n°CAS, etc.), type d'indicateur (biomarqueur, métabolite ...)</i>
	Voie d'exposition	<i>Voie respiratoire, cutanée, orale...</i>
	Méthode d'évaluation des expositions	<i>Matrice emploi-exposition, Expertise individuelle des dossiers, Déclaration des sujets ou des proches (téléphone, face-à-face, auto-questionnaire), évaluation quantitative des expositions (méthodes de prélèvements, LD, LQ)</i>
	Indicateurs (ou paramètres) d'exposition	<i>Probabilité d'exposition</i> <i>Fréquence d'exposition</i>

		<i>Niveau d'exposition : Données semi-quantitatives, quantitatives (moyenne géométrique ou arithmétique, intervalle de confiance, étendue – maximum, minimum -), etc.</i>
		<i>Durée d'exposition</i>
		<i>Exposition cumulée</i>
Analyse statistique	Méthode d'analyse statistique	<i>Type de test, uni ou bilatéral, type de modèle (linéaire, logistique, Cox, etc.)</i>
	Ajustement	<i>oui/non sur quelles variables ?</i>
	Puissance	<i>Calcul a posteriori de la puissance</i>
	Autres éléments de discussion	<i>variabilité de l'exposition dans la population source, surappariement ou surajustement...</i>
Résultats	Résultats / Force de l'association observée	<i>Risques relatifs, Odds ratio...</i>
Discussion	Informations complémentaires	<i>Méthodes de traitement des données pour retrouver les données manquantes</i>
	Biais	<i>Mention de biais de sélection, de classement ...</i>
		<i>Biais de confusion : mention, méthodes de prise en compte des facteurs</i>
	Relation dose réponse	<i>Toute information en rapport à la relation dose réponse</i>
	Discussion et conclusion des auteurs	
	Commentaire Relecteur(s)	<i>Pertinence du protocole d'exposition / discussion des incertitudes liées aux mesures d'exposition</i>
		<i>résultats, prise en compte des facteurs de confusion, etc.</i>
Références bibliographiques à récupérer		
Sources de Financement / lien d'intérêt potentiel		
Conclusion	Incertitude/Niveau de preuve	<i>Critère qualité méthodologique. A déterminer selon les groupes de travail (bonne qualité, limites méthodologiques non majeures, limites méthodologiques majeures)</i>
		<i>Réponse à la question posée de la saisine</i>
	Etude à retenir pour l'expertise	<i>oui/non</i>

Annexe 4 : Evaluation des études de toxicité selon Klimisch

Les études toxicologiques doivent permettre d'identifier les effets résultant de l'exposition à la substance, les caractéristiques histologiques, et d'établir des relations dose-effet. L'OCDE a développé depuis 1981 des lignes directrices pour les essais des produits chimiques. Une des thématiques du programme concerne les effets sur la santé. Des protocoles expérimentaux standardisés sont ainsi proposés par l'OCDE afin d'évaluer correctement les différents effets concernés et les relations dose-effet quand elles existent. L'utilisation de ces protocoles standardisés permet de s'assurer de la qualité scientifique d'une étude et de sa reproductibilité.

En comparant les études à ces lignes directrices, il est possible d'évaluer leur qualité et de comparer plusieurs études entre elles afin de sélectionner celles considérées comme de meilleure qualité scientifique ou tout du moins de donner plus de poids à celle jugée la plus fiable et la plus pertinente. Dans le cadre de la construction d'une VTR, il est souhaitable que les études expérimentales retenues suivent les lignes directrices de l'OCDE ou en soient proches. Elles peuvent également suivre d'autres lignes directrices proposées par des organismes reconnus dans le domaine de la toxicologie (par exemple, le National Toxicology Program).

Toutefois, les études disponibles dans la littérature peuvent être anciennes et ne pas forcément respecter les lignes directrices de l'OCDE. Devant cet état de fait, il convient alors de considérer la qualité des études sur la base d'autres critères pertinents, comme la pureté de la substance testée, l'espèce des animaux étudiés, les conditions du test ou la durée de l'exposition. C'est ce que propose l'évaluation selon Klimisch *et al.* (1997). De nombreuses autres méthodes ont été proposées dans la littérature scientifique pour évaluer la qualité des études, mais elles ne seront pas détaillées ici. En effet, le choix de retenir l'évaluation de Klimisch est fondé sur le fait que ce système de cotation est reconnu et validé au niveau européen et international et est le plus utilisé en pratique dans le domaine de l'évaluation réglementaire des substances chimiques (TGD, OCDE, US EPA, REACH).

Dans l'approche de Klimisch *et al.*, lorsque l'étude ne répond pas aux protocoles standardisés de l'OCDE, sa fiabilité est déterminée selon les critères suivants :

- Type d'animaux testés (espèces, souches, sexe, âge) ;
- Composition, pureté et origine de la substance ;
- But des investigations (observations histopathologiques, cliniques, *etc.*) ;
- Précision de la description des lésions observées ;
- Présence d'un groupe contrôle ou contrôle historique ;
- Description des conditions du test ;
- Description des voies et doses administrées ;
- Identification d'une relation dose-réponse si possible ;
- Description et pertinence des méthodes statistiques utilisées ;

- Informations sur la période d'investigation pendant la vie de l'animal ;
- Informations sur les conditions de vie des animaux (notamment alimentation).

Klimisch *et al.* (1997) ont alors établi une cotation des études expérimentales en prenant en compte la fiabilité des études (méthodes standardisées, BPL (Bonnes Pratiques de Laboratoire)), le détail de description de la publication ainsi que la pertinence et l'utilité des données dans le cadre de l'évaluation du risque. Cette cotation est comprise entre 1 et 4. Le détail de ces cotations est rappelé ci-après et le tableau 1 présente les critères permettant cette cotation :

- Cotation 1 : Valide sans restriction
- Cotation 2 : Valide avec restrictions
- Cotation 3 : Non valide
- Cotation 4 : Non évaluable

Les études les plus pertinentes décrivent avec précision la nature de l'effet toxique, le nombre et le pourcentage d'animaux concernés par les effets observés ainsi que les conditions de l'exposition (durée - concentration).

Lors de la construction des VTR, les études expérimentales retenues, mais ne suivant pas les lignes directrices de l'OCDE, doivent être examinées et cotées selon la méthode de Klimisch. Il est alors conseillé de prendre en compte uniquement les études expérimentales cotées 1 et 2.

Tableau 9 : Critères pour la cotation de Klimisch *et al.* (1997)

Cotation	Catégorie de validité
1	Valide sans restriction
1a	Etude BPL respectant les tests standardisés (OCDE, US EPA, FDA, etc.)
1b	Comparable to guideline study
1c	Protocole en accord avec une méthode standardisée nationale (AFNOR, DIN ²² , etc.)
1d	Protocole en accord avec les méthodes standards scientifiquement acceptées, et suffisamment détaillé
2	Valide avec restriction
2a	Etude standardisée sans documentation détaillée
2b	Etude standardisée avec restrictions acceptables
2c	Comparable à une étude standardisée avec restrictions acceptables
2d	Protocole en accord avec les méthodes standardisées nationales, avec restrictions acceptables
2e	Etude bien documentée et en accord avec les principes scientifiques, acceptable pour l'évaluation
2f	Méthode de calcul acceptée
2g	Données provenant d'ouvrages de références et de collecte de données
3	Non valide
3a	Document insuffisant pour l'évaluation
3b	Déficiences méthodologiques significatives
3c	Protocole inconcevable
4	Non évaluable
4a	Résumé
4b	Littérature secondaire
4c	Référence originale non disponible
4d	Référence originale dans un autre langage que le langage international (anglais)
4e	Documentation insuffisante pour l'évaluation

²² Institut allemande de normalisation

Annexe 5 : Tests de génotoxicité

• Description

L'évaluation du potentiel génotoxique d'une substance nécessite de disposer de données sur les différents types d'altérations de l'intégrité du patrimoine génétique (potentiel mutagène), les aberrations chromosomiques (potentiel clastogène) ou modifications du nombre de chromosomes (potentiel aneugène). La mise en évidence d'un tel éventail de lésions (ou altérations) potentielles repose aujourd'hui sur des batteries de tests menés *in vitro* et *in vivo* :

- Tests de mutations géniques sur procaryotes telles que *Salmonella typhimurium* (test d'Ames) ou sur cellules de mammifères telles que les lignées de lymphomes de souris (mousse lymphoma Thymidine kinase *TK* assay) ;
- Test d'aberrations chromosomiques et de numération des micronoyaux (chromosomes entiers ou fragmentés non incorporés dans le noyau pendant la mitose). Les modes d'apparition des micronoyaux peuvent être regroupés en effet clastogène (production de fragments acentriques) d'une part et effet aneugène d'autre part (perte de chromosomes). Les substances peuvent être testées *in vitro* sur des cellules de mammifère (lymphocytes circulants en métaphase, lignée CHO) ou *in vivo* (érythrocytes de moelle osseuse, lymphocytes circulants) ;
- Dosage des adduits à l'ADN ;
- Synthèse non programmée de l'ADN (UDS²³) qui mesure l'incorporation de bases par le système de réparation de l'ADN suite à une altération de l'ADN par une substance génotoxique) ;
- Numérotation des échanges de chromatides sœurs (test SCE²⁴ effectué sur des lymphocytes de mammifères en métaphase) ;
- Test des comètes qui permet de mesurer les lésions primaires de l'ADN, cassures simple et double-brins, sites alcali-labiles, sites de réparation de l'ADN suite à l'exposition à un génotoxique (Kumaravel, 2006 ; Mutation Research, 2009).

Le Tableau 10 reprend la liste des tests de génotoxicité.

²³ Unscheduled DNA synthesis

²⁴ Sister chromatide exchange

Tableau 10 : Tests pour l'évaluation du potentiel génotoxique d'une substance

Types d'effets		Intitulé du test	Référence OCDE
Mutations géniques	<i>In vitro</i>	Test de mutation génique inverse sur procaryotes (<i>Salmonella typhimurium</i> ou <i>Escherichia coli</i>)	471
		Test de mutation génique sur cellules de mammifères (mouse lymphoma TK +/-)	476
		Test de mutation génique sur <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	480
		Test de recombinaison mitotique sur <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	481
	<i>In vivo</i>	Test de mutation létale récessive liée au sexe sur <i>Drosophila melanogaster</i>	477
		Spot test chez la souris	484
		Essais de mutations génétiques des cellules somatiques et germinales de rongeurs transgéniques	488
	Mutations chromosomiques	<i>In vitro</i>	Test cytogénétique ou d'aberration chromosomique sur cellule de mammifères
Test du micronoyau sur culture cellulaire			487
<i>In vivo</i>		Test cytogénétique ou d'aberration chromosomique sur cellules de moelle osseuse de mammifères	475
		Test du micronoyau sur érythrocytes de mammifères	474
		Test de mutation dominante létale sur rongeurs	478
		Test d'aberration chromosomique sur spermatogonies de mammifères	483
		Test de la translocation héréditaire chez la souris	485
Altération primaire de l'ADN (lésions à l'ADN)	<i>In vitro</i>	SOS chromotest sur bactéries	
		Test de synthèse non programmée de l'ADN (UDS) sur cellules de mammifères	482
		Test d'échange de chromatides sœurs sur cellules de mammifères (SCE)	479
		Test des comètes (cassure des brins d'ADN) sur culture cellulaire	
		Mesure des adduits de l'ADN	
	<i>In vivo</i>	Test de synthèse non programmée de l'ADN (UDS) sur hépatocytes de mammifères	486
		Chez le rongeur : mesure des adduits de l'ADN	
Autres méthodes	<i>In vitro</i>	Test de transformation de cellules de mammifères	

Afin de détecter le potentiel génotoxique d'une substance *via* les métabolites formés, les tests de génotoxicité *in vitro* sont menés avec et sans système d'activation métabolique. L'activation métabolique se produit généralement par l'addition d'une fraction S9 de foie de rats préalablement traités par un inducteur enzymatique (ex. : Arochlor) additionné de co-facteurs (mélange final métabolisant S9 MIX).

D'après les guidelines de l'OCDE sur les tests de génotoxicité, la plus forte dose utilisée dans les tests *in vivo* est la Dose Maximale Tolérée (DMT)²⁵ ou à défaut, la dose limite de 2000 mg.kg¹.j¹ pour une administration unique ou de 1000 mg.kg¹.j¹ dans le cas d'administrations répétées sur

²⁵ La Dose Maximale Tolérée ou DMT correspond à la dose maximale de substance administrée chez l'animal provoquant des manifestations toxiques sans conséquence néfaste sur la survie de l'animal.

plus de 14 jours. Pour les tests *in vivo*, il est important de prouver que la substance a atteint l'organe/tissu cible (exposition suffisante, mesure de biomarqueurs d'exposition).

D'après le règlement CLP, la classification du potentiel mutagène des substances repose sur le caractère héréditaire des mutations sur cellules germinales : catégorie 1A (effet héréditaire avéré chez l'Homme) et 1B (effet héréditaire probable chez l'Homme). La catégorie 2 définit des effets mutagènes avérés sur cellules somatiques (effet héréditaire possible chez l'Homme).

Dans le domaine du médicament, les conférences internationales d'harmonisation (ICH) proposent de disposer d'une batterie de trois types de tests soit deux tests *in vitro* (mutations géniques sur bactéries et mutations géniques ou clastogénicité sur cellules de mammifères) et un test *in vivo*, soit un test d'Ames et deux tests *in vivo*.

Le TGD propose une batterie de tests pour les substances chimiques nouvelles et existantes et les produits biocides. Dans un premier temps, les tests de mutations géniques (sur bactéries puis sur cellules de mammifères si les résultats sont positifs sur bactéries) sont complétés par des tests cytogénétiques sur cellules de mammifères. Des tests complémentaires sont conduits en fonction des résultats obtenus, la nécessité de conduire des essais *in vivo* devant être solidement justifiée (diminution du recours aux études expérimentales dans l'objectif de réduction, raffinement et remplacement des études animales).

- **Critères de qualité**

L'évaluation de la qualité des essais de génotoxicité peut faire appel à la cotation de Klimisch, valable pour les études toxicologiques mais également pour les essais de génotoxicité *in vivo* et *in vitro*.

Annexe 6 : Grille d'analyse des tests *in vitro* de génotoxicité

Afin d'évaluer la qualité et la pertinence des tests de génotoxicité, des informations et des données sont nécessaires dans le cadre des études menées *in vitro* (hors méthodes standard de reconnaissance nationale ou internationale). Ces critères sont proposés notamment par le système de cotation de Klimisch, un TGD (Technical Guidance Document) et par d'autres organismes internationaux.

Quel est le degré de pureté de la substance testée ? Sa composition et son origine ?

Les propriétés physico-chimiques de la substance sont-ils précisés (pH, solubilité de la substance, stabilité, volatilité...)?

Les propriétés physico-chimiques, l'osmolarité du mélange ou de l'excipient utilisé sont-ils précisés ?

Le choix de l'espèce animale ou de la souche cellulaire testée est-il précisé et justifié ? Les conditions de bioactivation sont-elles précisées ? Si un OGM est utilisé, des informations qualitatives ou mécanistes sont-elles disponibles pour interpréter un autre test ?

Le choix du matériel et de la méthode est-il défini précisément ?

Concentrations testées : les mécanismes sont-ils identiques à toutes les doses (présence d'une cytotoxicité à des doses trop élevées non spécifique à la génotoxicité de la substance) ?

Y a-t-il des données sur le rapport dose-concentration dans le système test ?

Dans le cas de mise en évidence d'effets prolifératifs, s'agit-il d'une action sur la régulation de la mitose (effets mitogènes) ou d'une régénération suite à une cytotoxicité ?

Des données sur les effets indésirables pouvant avoir un effet sur les résultats de l'étude (solubilité, impuretés, variation de pH, impact sur l'osmolarité...) sont-elles disponibles ?

Quel est le taux de validation de la méthode du test ? Respecte-t-il les BPL, les guidelines validés par la communauté scientifique internationale ?

Des références prouvant l'adéquation de la méthode employée sont-elles disponibles ?

Des contrôles positifs et négatifs sont-ils utilisés ? Quel est le degré de description de ces contrôles ?

Peut-on définir une relation dose-réponse ? Quelle est la force des associations ?

Annexe 7 : Effets cancérogènes et mécanismes

Dans le cadre de la construction de VTR pour une substance cancérogène, la connaissance de son mode d'action peut permettre d'orienter vers une hypothèse de construction avec ou sans seuil de dose. Afin de fonder ce choix sur des bases justifiées, il est nécessaire de définir précisément les termes propres aux mécanismes de la cancérogénèse et de rassembler les éléments de connaissance sur ces différents mécanismes.

- **Définitions**

- Substance cancérogène

Une substance **cancérogène** est une substance qui, par elle-même ou par un de ses métabolites, est capable d'augmenter, chez l'homme ou l'animal, l'incidence de tumeurs bénignes/malignes par rapport à un groupe témoin non exposé. Les mécanismes conduisant au cancer sont divers. Ils peuvent impliquer des mutations au niveau de l'ADN, des altérations des systèmes de réparation et de réplication fidèle de l'ADN, ou des effets sur des structures cellulaires comme le fuseau mitotique et le centrosome. Une distinction est établie entre les substances cancérogènes génotoxiques et les substances cancérogènes non génotoxiques.

Dans un souci de clarté pour la compréhension du document, il a été convenu de regrouper sous le terme de cancérogène génotoxique, toute substance qui altère le matériel génétique comprenant les composés génotoxiques directs (ou primaires) et les composés génotoxiques indirects (ou secondaires). Un composé cancérogène non génotoxique se définira comme une substance cancérogène qui n'entraîne pas d'altération de la molécule d'ADN (sont inclus dans cette définition les cancérogènes épigénétiques).

- Substance cancérogène génotoxique

Une substance **cancérogène génotoxique** est une substance capable d'augmenter l'incidence de tumeurs bénignes/malignes en altérant la transmission fidèle du génome d'une génération de cellules à l'autre (altération du matériel génétique). Elle peut être mutagène, clastogène et/ou aneugène.

Une substance cancérogène **mutagène** est une substance qui, par elle-même ou par le biais d'un de ses métabolites, est capable de provoquer un cancer en induisant et en augmentant la fréquence des mutations. Une mutation est une modification permanente d'une séquence d'ADN conduisant à un changement du matériel génétique d'une cellule (gènes, chromosomes). Une substance mutagène peut induire des mutations sur des portions de gènes spécifiques critiques, le plus souvent des proto-oncogènes, des gènes suppresseurs de tumeurs et/ou des gènes de réparation de l'ADN.

Une substance génotoxique n'est mutagène qu'à la condition qu'elle soit capable d'altérer la structure du gène de façon permanente et transmissible aux cellules filles par mitoses successives (notion de fixation de la mutation). Les systèmes de défense permettant à la cellule de se protéger de l'induction de mutations permanentes sont alors dépassés et ne peuvent plus restaurer l'intégrité du matériel génétique ou empêcher la transmission de mutations.

Une substance cancérigène **clastogène** est une substance capable de provoquer l'apparition d'un cancer par des modifications structurales des chromosomes (cassure du matériel génétique). Une partie de chromosome se retrouve à un emplacement différent dans le même chromosome, ou sur un autre, et peut être perdu ou en excès.

Une substance cancérigène **aneugène** est une substance capable de provoquer l'apparition d'un cancer en modifiant le nombre des chromosomes (aneuploïdie). Le mécanisme peut être soit l'altération des protéines constitutives de l'appareil mitotique, soit la formation d'adduits encombrant (*bulky adduct*) empêchant ainsi la bonne ségrégation des chromosomes.

- Substance cancérigène non génotoxique

Une substance **cancérigène non génotoxique** est une substance capable de provoquer l'apparition d'un cancer sans action directe sur le matériel génétique. Le mode d'action non génotoxique inclut des effets qui n'impliquent pas des altérations de l'ADN, mais qui influencent l'expression génique, la communication entre cellules ou d'autres facteurs du processus cancérigène. Les effets cancérigènes épigénétiques reposent sur ce mécanisme. Il s'agit de substances dites « promoteurs » de tumeurs.

- Caractérisation des effets cancérigènes

L'effet cancérigène d'une substance se caractérise par la formation de tumeurs ou néoplasmes (masses de cellules anormales provenant d'un tissu sain préexistant). Ces tumeurs sont le résultat d'une prolifération cellulaire excessive et non coordonnée. Les tumeurs bénignes se distinguent des tumeurs malignes, ces dernières ayant la capacité d'envahir les tissus voisins voire distants en disséminant des cellules cancéreuses par la circulation sanguine et lymphatique (métastases) (OCDE, 2002).

Lorsqu'une tumeur est mise en évidence chez l'homme ou chez l'animal, elle est systématiquement caractérisée, le plus précisément possible, selon sa localisation, sa morphologie et son histologie. Les termes employés sont généralement standardisés. A cet effet, des nomenclatures de classification des types de tumeurs chez l'animal ont été élaborées afin d'uniformiser les terminologies employées ainsi que les méthodes de caractérisation des types de tumeurs. Elles sont en règle générale disponibles sur internet et permettent d'accéder aux données par organe ou par système biologique :

- une nomenclature de classification et de critères de diagnostic a été proposée par le Society of Toxicologic Pathology (STP)²⁶ aux Etats-Unis dès les années 1980 ;
- l'OMS a établi en 1988 une nomenclature de classification et a créé à cet effet la base de données européenne RITA (Registry of Industrial Toxicology Animal-data)²⁷ permettant d'accéder en ligne aux données histopathologiques historiques (rats et souris), à la nomenclature de classification et aux critères de diagnostic tumoral. La nomenclature et les

²⁶ www.toxpath.org/

²⁷ <http://reni.item.fraunhofer.de/reni/public/rita/>

critères de diagnostic ont été publiés par le CIRC pour le rat et la souris (CIRC, 1992-1997 ; CIRC, 2001). Cette nomenclature attribue à chaque type de lésion une appellation spécifique : H = hyperplasie, B = tumeur bénigne, M = tumeur maligne, S = tumeur maligne systémique ;

- une nomenclature calquée sur le modèle RITA a été mise en ligne en 1996 aux Etats-Unis par des scientifiques du North American Control Animal Database (NACAD), prenant en compte les classifications proposées par la STP et RITA (Keenan, 2002 ; Ruehl-Fehlert, 2003 ; Kittel, 2004 ; Morawietz, 2004). La classification repose sur des appellations scientifiques : N = lésion non prénéoplasique, H = hyperplasie, B = tumeur bénigne, M = tumeur maligne, S = tumeur maligne systémique ;
- la base de données internationale RENI (Registry Nomenclature Information System)²⁸ propose depuis 1998 le système de classification harmonisée « International Harmonization of Rat Nomenclature » d'après les principales classifications existantes (RITA/OMS, NACAD, STP). La classification des types de tumeurs proposée est identique à celle du NACAD,
- enfin, une classification standardisée des pathologies en général et des cancers en particulier, est proposée par l'OMS (International classification of diseases ou ICD²⁹). Une actualisation de cette base doit être rendue disponible en mai 2010.

• Principaux mécanismes biologiques cancérigènes

Les exemples proposés ci-dessous n'ont pas pour vocation à être exhaustifs.

- Mutagenicité et génotoxicité

Les mutations peuvent se produire sur un gène unique, un ensemble de gènes (mutations géniques) ou sur un chromosome entier (mutations chromosomiques). Celles portant sur un gène unique peuvent être ponctuelles (sur une seule base de l'ADN) ou sur plusieurs bases, conduisant ainsi à de profondes modifications. Celles portant sur les chromosomes peuvent être structurales ou numériques.

Altérations primaires de l'ADN

Des molécules électrophiles peuvent se lier de façon covalente à l'ADN et créer des adduits ayant un fort potentiel tumorigène.

Par exemple, les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) comme le benzo[a]pyrène sont transformés en époxydes, composés très électrophiles se fixant notamment sur le carbone C8 des guanines. Les adduits formés entraînent une distorsion de la structure hélicoïdale de l'ADN, perturbant gravement la réplication et la transcription. Ces adduits peuvent être promutagènes : s'ils sont présents au moment de la réplication de l'ADN (à la suite d'une réparation erronée par exemple), ils peuvent conduire à une mutation.

²⁸ www.item.fraunhofer.de

²⁹ <http://www.who.int/classifications/icd/en/>

Mutations géniques

Il s'agit de mutations par substitution, insertion ou délétion de nucléotides.

Par exemple, les agents alkylants et intercalants, en introduisant dans la double hélice d'ADN un radical alkyl pour les premiers et un radical bifonctionnel pour les seconds, provoquent des mutations conduisant ainsi à des erreurs lors de la réplication de l'ADN.

Mutations chromosomiques

Elles sont provoquées par des agents clastogènes ou aneugènes. Actuellement, les preuves du potentiel cancérigène des substances aneugènes sont limitées. Cependant, de nombreuses substances aneugènes induisent une transformation maligne de cellules de mammifères *in vitro*. Aussi, certains comités ont décidé d'inclure les essais sur les propriétés aneugènes des substances dans les stratégies de tests de génotoxicité (COM, 2000). Dans le *Technical Guidance Document* européen, les substances aneugènes n'agissant pas directement sur l'ADN mais sur le fuseau mitotique cellulaire sont considérées comme des substances à seuil (ECB, 2003). Bolt *et al.* (2004) précisent que des tests d'aberrations chromosomiques positifs, en l'absence de tests de mutagenicité positifs, peuvent soutenir (ou justifier) l'hypothèse de substances à seuil. Ils précisent également que les substances n'agissant pas directement sur l'ADN mais sur certaines topoisomérases, dont les effets se traduisent par une clastogénicité, peuvent être également considérées comme des substances à seuil.

Stress oxydatif et espèces réactives de l'oxygène

Certaines substances cancérigènes induisent la formation d'espèces réactives de l'oxygène et/ou de l'azote (stress oxydatif) dont les effets sont multiples : lésion de l'ADN (oxydations, cassures simple brin), mutagenicité, cytotoxicité et changement au niveau de l'expression des gènes. Il est à noter que ce mécanisme est également valable pour des composés génotoxiques (dérivés nitrés des HAP par exemple).

Un stress oxydatif peut être à l'origine de cancer *via* un mécanisme génotoxique (mutations) et non génotoxique (*via* la formation de peroxyde d'hydrogène et son impact sur la signalisation cellulaire).

- Mécanismes non génotoxiques

Expression ou inactivation de gènes (mécanisme épigénétique³⁰)

L'expression ou l'inactivation des gènes est un mécanisme naturel qui peut être perturbé par l'action de substances chimiques :

- méthylation de l'ADN : la méthylation par les méthyltransférases a lieu sur la cytosine au niveau de la région promotrice d'un gène et est associée généralement à une mise sous

³⁰ Sont concernées ici les modifications de la séquence ADN basées sur une modification de la méthylation de l'ADN et de l'acétylation des histones et de la chromatine.

silence de l'expression du gène. Les gènes actifs ne sont généralement pas méthylés (Watson *et al.*, 2004) ;

- remodelage de la chromatine : la chromatine est une structure compacte d'ADN associée aux histones et enroulée en pelotes (nucléosomes). Les modifications chimiques des histones (addition d'un groupement acétyl, méthyl, phosphate) peuvent altérer la structure de la chromatine et modeler ainsi l'expression des gènes. Ces modifications ainsi que le degré de compaction de l'ADN permettent de réguler l'accessibilité du génome à la machinerie responsable de la transcription. Par exemple, les gènes associés à des histones acétylées sont généralement activés. Cependant, les conséquences des multiples modifications des histones restent encore mal connues (Dennis, 2003).

Augmentation du taux de divisions cellulaires

A titre d'exemple :

- La cytotoxicité et l'inflammation chronique peuvent entraîner une régénération cellulaire compensatrice, responsable d'une augmentation du nombre de divisions cellulaires et donc de prolifération cellulaire. Celles-ci peuvent être accompagnées d'une dérégulation des processus de réparation du matériel génétique et d'apoptose ;
- La prolifération ou « expansion » clonale de cellules déjà initiées, issue par exemple d'une hyperactivité métabolique, conduit dans ce cas à une hyperplasie ; les taux de transformation spontanée sont accrus par le biais de la prolifération cellulaire ;
- La liaison à des récepteurs entraînant la transduction de signaux responsables d'une augmentation du taux de division cellulaire. Par exemple, le 12-O-tétra-décanoyl-phorbol-13-acétate (TPA), ester de phorbol entrant dans la composition de l'huile de croton, est un promoteur de tumeur très étudié : sa liaison à des récepteurs membranaires induit la transduction d'un signal mitogène, notamment *via* les protéines kinase C ;
- Certains états physiologiques naturels tels que la croissance ou la gestation s'accompagnent naturellement d'un accroissement du taux de divisions cellulaires constituant un facteur de risque pour la fixation de mutations provoquées par des agents génotoxiques exogènes.

Inhibition de l'apoptose

La mort cellulaire induite par les agents cytotoxiques est le plus souvent de type apoptotique, dans les cellules tumorales comme dans les cellules normales.

L'apoptose est un processus physiologique, génétiquement programmé et déterminant dans la morphogénèse, le vieillissement et l'élimination des cellules porteuses de mutations de l'ADN. Certains stimuli pro-apoptotiques endogènes ou exogènes (stress oxydant, xénobiotiques, UV...) déclenchent différentes voies de signalisation aboutissant à l'activation de caspases (protéases exécutrices de l'apoptose) puis à la mort de la cellule.

La régulation de ce processus est sous contrôle de protéines pro- et anti-apoptotiques, les mieux caractérisées étant celles de la famille Bcl-2 dont le déséquilibre orientera la cellule vers la survie ou vers la mort. Il est bien établi que les dérèglements de l'apoptose sont au cœur de la formation des tumeurs, puisque les cellules cancéreuses ont perdu leur capacité à s'autodétruire. Ainsi, les

cellules cancéreuses présentent fréquemment une altération des voies d'induction ou d'inhibition de l'apoptose et plusieurs formes de cancers et leur résistance aux chimiothérapies sont liées à une suppression atypique des protéines anti-apoptotiques telles que Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1 ou BCL2A1.

Annexe 8 : Effets néfastes reprotoxiques à prendre en compte

- **Définition des effets reprotoxiques**

- Effets sur la reproduction

Effets sur la reproduction masculine

Ce sont les effets sur les organes reproducteurs, le système hormonal correspondant ou la conception de l'enfant, résultant d'une exposition à n'importe quel moment de la vie de l'individu masculin.

Les manifestations majeures de cette toxicité comprennent les effets sur l'initiation et le déroulement de la puberté et de la maturation sexuelle, sur la production ou le transport des spermatozoïdes (nombre, motilité, altérations morphologiques), le comportement sexuel (libido, érection...), la fertilité (la fertilité est la capacité biologique déterminée par les items précédents), l'activité hormonale ou la réponse physiologique qui perturberait la capacité de fécondation, la fécondation elle-même ou le développement de l'ovule fécondé jusqu'à, et y compris, l'implantation, un vieillissement prématuré des organes reproductifs ou une modification des fonctions de la progéniture dépendant de l'intégrité du système reproductif masculin (European Commission, 1967 ; US EPA, 1996b).

Effets sur la reproduction féminine

Ce sont les effets sur les organes reproducteurs, le système hormonal correspondant ou la conception de l'enfant, résultant d'une exposition à n'importe quel moment de la vie de l'individu féminin.

Les manifestations majeures de cette toxicité comprennent les effets sur l'initiation et le déroulement de la puberté et de la maturation sexuelle, sur la production et le transport des ovules, le cycle menstruel, le comportement sexuel (libido...), la fertilité (la fertilité est la capacité biologique déterminée par les items précédents), la gestation, la parturition, la lactation, l'activité hormonale ou la réponse physiologique qui perturberait la capacité de fécondation, la fécondation elle-même ou le développement de l'ovule fécondé jusqu'à, et y compris, l'implantation, une ménopause prématurée ou une modification des fonctions de la progéniture dépendant de l'intégrité du système reproductif féminin (European Commission, 1967 ; US EPA, 1996b).

Enfin, lorsque des effets reprotoxiques ont été mis en évidence dans les études humaines ou animales, et que leur caractère néfaste a été souligné dans la mesure du possible, la construction de la VTR nécessite de choisir un effet spécifique appelé effet critique.

- Effets sur le développement

La toxicité sur le développement est considérée dans son sens le plus large, y compris tout effet perturbant le développement normal de l'enfant, aussi bien avant qu'après la naissance. Elle correspond aux effets sur l'enfant résultant d'une exposition des parents avant la conception, pendant le développement embryofœtal ou pendant la période de lactation.

Les manifestations majeures de cette toxicité diffèrent en fonction des fenêtres d'exposition et des cibles. Elles comprennent les effets embryo- ou fœtotoxiques, réversibles ou irréversibles, tels que

mort prématurée, fausse couche précoce ou tardive, anomalies structurelles (effets tératogènes), altérations de la croissance intra-utérine, déficiences fonctionnelles (toxicité pour les organes et systèmes), les anomalies péri- ou post-natales ainsi que les anomalies du développement mental ou physique, de la naissance à la maturation sexuelle (European Commission, 1967 ; US EPA, 1991). Il n'existe pas de définitions consensuelles pour chaque type d'effets sur le développement, aussi seront reprises ci-dessous celles proposées par l'US EPA (US EPA, 1991).

- Malformations

Les malformations sont définies comme des altérations irréversibles qui affectent la survie de l'organisme, le développement ou une fonction particulière. Elles correspondent à la tératogénicité. Il existe d'autres types d'effets malformatifs, appelés « variations », considérées comme des altérations mineures de la constitution structurelle de l'organisme. Notons que la différence entre une anomalie congénitale mineure et une variation n'est pas toujours évidente et qu'il est préférable de rester prudent lors de l'interprétation d'un résultat (CSHPF, 2002).

- Altérations de la croissance

Les altérations de la croissance correspondent à une altération du poids ou de la taille des organes ou des mensurations de la progéniture. Cet effet peut être engendré par une exposition de la mère à n'importe quel moment du développement de l'enfant. Il peut être réversible ou non. Il peut être observé jusqu'à la maturation sexuelle de l'enfant.

A noter que le retard d'ossification peut être un signe de retard de croissance embryofœtale, mais peut également être considéré comme le signe d'une embryotoxicité s'il n'est pas associé à une baisse du poids fœtal ou à une toxicité maternelle (CSHPF, 2002).

- Déficiences fonctionnelles

Les déficiences fonctionnelles correspondent à une altération ou un retard des capacités de l'organisme, d'un système ou d'un organe (par exemple, altération comportementale ou neurocognitive) et sont liées à une exposition pendant la période critique de développement du système ou de l'organe, ou à une exposition post-natale (pendant la lactation).

- **Evaluation des effets néfastes**

Les effets analysés dans les études toxicologiques et qui sont considérés pour la construction d'une VTR sont les effets « néfastes ». Ils correspondent à tout changement dans la morphologie, la physiologie, la croissance, le développement ou la durée de vie d'un organisme, résultant soit d'une détérioration de la capacité fonctionnelle ou de la capacité à compenser un stress additionnel, soit d'une augmentation de sensibilité.

Cette définition générique est très vaste et il est parfois difficile de distinguer des effets néfastes d'autres effets qui ne correspondraient pas à une manifestation directe de la toxicité. Ceci est particulièrement vrai dans le domaine de la toxicologie de la reproduction et du développement, où la distinction entre des effets considérés comme des malformations ou ceux classés uniquement comme variation est délicate et repose principalement sur le jugement du responsable de l'étude.

De même, déterminer les effets dus à une toxicité directe et spécifique d'une substance de ceux dus à une toxicité induite chez la mère n'est pas toujours aisé.

Ces points devront donc être particulièrement discutés et argumentés. Le document intitulé *Guidance document on mammalian reproductive toxicity testing and assessment*, édité par l'organisation de coopération et de développement économique pourra y aider (OCDE, 2008).

Finalement, l'évaluation des effets reprotoxiques nécessite de connaître précisément les types d'effets susceptibles de se produire lors d'une exposition à une substance reprotoxique.

Annexe 9 : Modèle de tableau de synthèse des VTR à seuil et sans seuil

Modèle de tableau de synthèse des VTR à seuil existantes

	Type de VTR (aiguë, subchronique, chronique)
Organisme	
Année	
VTR	
Valeur VTR	
Effet critique	
Espèce	
Type d'exposition	
Voie d'exposition	
Dose critique	
Ajustements	Ajustement temporel Ajustement allométrique
UF	UF global UF _A = UF _H = UF _{B/L} = UF _S = UF _D =
Référence	

Modèle de tableau de synthèse des VTR sans seuil existantes

	Type de VTR
Organisme	
Année	
VTR	
Valeur VTR	
Effet critique	
Espèce	
Voie d'exposition	
Type d'exposition	
Point de départ	
Ajustements	
Extrapolation aux faibles doses	
Référence	

Annexe 10 : Synthèse des positions des différents organismes sur l'applicabilité des VTR aux enfants

Dans le cadre du présent rapport, on considère, pour des raisons pragmatiques, comme « enfants » les populations entre de 0 à 16 ans.

- **Sensibilité potentielle des enfants aux substances chimiques par rapport aux adultes**

De nombreuses différences physiologiques ou toxicocinétiques existent entre les adultes et les enfants et peuvent affecter les niveaux réels d'exposition aux substances chimiques et pour certains polluants environnementaux, leur cinétique et leurs interactions avec le corps humain. Les enfants pourraient être plus fortement exposés que les adultes à certaines substances chimiques du fait notamment d'une plus grande quantité d'air inhalé, d'eau et d'aliments ingérés³¹ et de comportements spécifiques (par exemple contact main-bouche, etc.).

Par ailleurs, une substance chimique peut entraîner des effets néfastes chez des enfants à des doses plus faibles que celles induisant des effets similaires chez les adultes ou des effets différents de ceux apparaissant chez les adultes (ex : plomb). En particulier, la question de l'influence des substances chimiques sur les organes en développement se pose. En effet, des perturbations de la prolifération, la différenciation, la migration et la maturation cellulaire pourraient avoir des conséquences importantes et irréversibles. Ainsi, les enfants peuvent être plus sensibles que les adultes aux effets des substances chimiques.

En 1993, dans son rapport intitulé « Pesticides in diet of infants and children », le NRC a recommandé l'élaboration d'une nouvelle approche d'évaluation des risques tenant compte de la spécificité des enfants lors de l'évaluation des impacts potentiels de leurs expositions aux contaminants environnementaux (NRC, 1993b). De nombreux organismes ont depuis analysé les différences entre les enfants et les adultes et leurs implications dans les évaluations de risques sanitaires et, en particulier, sur la construction de VTR (à seuil et sans seuil).

³¹ Relativement à leur masse.

- **Différence de sensibilité des enfants aux substances chimiques par rapport aux adultes**

Selon l'OMS, plusieurs stades d'évolution peuvent être distingués sous le terme « enfants », au cours desquels la toxicocinétique ou les voies d'exposition permettent de modifier la sensibilité aux xénobiotiques (OMS, 2006 ; ECETOC, 2005) :

- Les prématurés (24-37 semaines de grossesse),
- Les bébés à terme (entre 40 ± 2 semaines de grossesse),
- Les nouveau-nés (entre 0 et 27 jours),
- Les nourrissons (entre 28 jours et 23 mois),
- Les enfants (2 – 11 ans) :
 - o Très jeunes enfants (2 - 4 ans),
 - o enfants (4 à 11 ans),
- Les adolescents : à l'apparition des caractéristiques sexuelles secondaires (habituellement entre 12 et 18 ans)

Dans le cadre du présent rapport, on considère, pour des raisons pragmatiques, comme « enfants » les populations entre de 0 à 16 ans.

La physiologie des enfants se distingue de celle des adultes. Ces différences peuvent affecter les niveaux d'exposition, la toxicocinétique et la toxicodynamie d'une substance chimique. Les différences de toxicocinétique entre le jeune enfant et l'adulte sont résumées dans le tableau ci-dessous :

Tableau 11 : Principales différences toxicocinétiques entre l'enfant et l'adulte (Danish EPA, 2001 ; RIVM, 2002 ; KEMI, 2003 ; ECETOC, 2005 ; OMS, 2006 ; OEHHA, 2008 ; INERIS, 2010)

ABSORPTION	
Tractus gastro-intestinal	<p>Par voie orale, les enfants sont plus exposés que les adultes car ils consomment plus d'eau³² (consommation environ 2-5 fois plus importante chez le nourrisson en fonction du poids corporel) et d'aliments² (besoins énergétiques et consommation alimentaire relative 3-4 fois plus importants chez les nourrissons que chez les adultes) et l'ingestion de sols est plus importante (comportement main-bouche). Des facteurs spécifiques aux enfants peuvent influencer l'absorption des substances telles que :</p> <ul style="list-style-type: none"> - le pH gastrique : pH gastrique plus élevé à la naissance (presque neutre à la naissance du à la présence de liquide amniotique) qui diminue rapidement à un pH comparable à celui chez l'adulte → Différences d'ionisation des toxiques observées chez les nouveau-nés pouvant modifier l'absorption intestinale ; - une vidange gastrique retardée (taux de vidange gastrique irrégulier à la naissance jusqu'à l'âge de 6-8 mois) → Le temps de vidange gastrique influence la fraction de la dose qui passe dans la circulation systémique et la vitesse de passage ; - une motilité gastro-intestinale réduite et plus irrégulière par rapport aux

³² Relativement par rapport à leur masse.

	<p>adultes</p> <ul style="list-style-type: none"> - l'activité des enzymes digestives : la concentration des enzymes digestives est plus faible à la naissance et augmente progressivement pendant la première année de vie ; - la paroi intestinale est plus perméable aux macromolécules chez les nouveau-nés ; - la flore bactérienne intestinale est mise en place rapidement après la naissance mais change de composition au fil du temps ; - la composition de la bile et du flux biliaire.
Pulmonaire	<p>Volume d'air inhalé/kg pc/min environ 3 fois plus important chez les nouveau-nés que chez les adultes.</p> <p>Demande calorique plus importante chez les enfants et en conséquence une activité respiratoire augmentée → absorption de substances présentes dans l'air sur une certaine période de temps devrait être augmentée chez les enfants en fonction du poids corporel.</p> <p>Poumons structurellement immatures à la naissance et continue leur maturation pendant l'enfance avec :</p> <ul style="list-style-type: none"> - une augmentation du nombre d'alvéoles jusqu'à environ 8 ans (10 millions à la naissance, 300 millions vers 8 ans) suivi par une augmentation de leur taille ; - une augmentation de la surface alvéolaire importante pendant les 2 premières années de vie (3 m² à la naissance, 75 m² à l'âge adulte) ; - une augmentation de la taille des poumons : la croissance pulmonaire continue pendant l'enfance jusqu'au début de l'âge adulte où elle atteint un plateau puis diminue avec l'âge (surface pulmonaire augmente de plus de 20 fois entre la naissance et l'âge de 8 ans) ; - la vascularisation pulmonaire est moins étendue chez les nouveau-nés par rapport aux adultes. <p>Dépôt de particules inhalées plus important chez l'enfant (plus petit diamètre des voies respiratoires)</p>
Cutanée	<p>Peau plus fine chez l'enfant / adultes.</p> <p><i>Stratum corneum</i> mature chez les nouveau-nés avec des propriétés de barrière similaires à l'adulte.</p> <p>Hydratation de l'épiderme plus importante chez le nouveau-né par rapport à l'enfant suggérant une absorption plus importante des composés hydrophiles.</p> <p>Perméabilité plus importante chez les nouveau-nés par rapport aux adultes due à une faible kératinisation (en particulier les prématurés).</p> <p>Plus grande surface cutanée par rapport au poids corporel chez les enfants en comparaison des adultes (ratio surface corporelle/poids corporel est environ 2,5 fois plus important chez les nouveau-nés par rapport aux adultes).</p>
DISTRIBUTION	
Masse hydrique totale	Proportionnellement plus importante chez les nouveau-nés et les enfants (environ 75% chez les nouveau-nés, 40-60% chez les adultes).
Masse corporelle grasse totale	Augmente chez le fœtus tout au long de la grossesse pour atteindre environ 11-16% à la naissance. Atteint un pic vers 6-9 mois (25%) puis diminue vers 6-7 ans à des valeurs « adultes » (environ 20%) → distribution différente des substances toxiques lipophiles et hydrophiles dans l'organisme entre les adultes et les enfants. Par exemple, chez l'enfant, la majorité des substances hydrosolubles ont proportionnellement un plus grand volume de distribution et une clairance moins rapide que chez l'adulte.
Taux de perfusion des organes	Spécifique aux besoins de chaque organe (ex. taux de perfusion plus important du cerveau entre 3 et 6 ans car fort besoin d'apport lors de sa phase de développement)
Protéines plasmatiques	Concentration des protéines plasmatiques et capacités de liaison réduites à la naissance et n'atteignent leur valeur « adulte » que vers 1 an → Puisque la fraction non liée dans le sang détermine le degré de distribution dans les tissus, une

	diminution de la fraction de la substance liée aux protéines plasmatiques pourrait augmenter sa distribution tissulaire et donc son potentiel toxique. En revanche, une faible liaison aux protéines plasmatiques pourrait aussi augmenter l'élimination (en particulier rénale) d'une substance et par conséquent son potentiel toxique.
Poids relatifs des organes	Poids relatif du foie varie considérablement au cours de la vie (chez le nouveau-né 37g.kg ⁻¹ et chez l'adulte 25 g/kg ⁻¹). Taille relative du cerveau plus importante chez l'enfant (10,8% de la masse d'un nouveau-né vs 2 % chez l'adulte) mais composition différente (moins de myéline, flux cérébral augmenté chez les nouveau-nés et enfants). Masse musculaire relative plus faible chez les enfants.
Barrière hémato-encéphalique	Capacité adulte entre 3 et 6 mois.
METABOLISME	
Métabolisme hépatique	La capacité hépatique est environ 1/3 de la capacité adulte 3 mois après la naissance et atteint la capacité adulte vers 2 ans. Les enzymes de biotransformation sont fonctionnels à différents moments. Les niveaux de Cytochrome P450 (CYP P450) (phase I) sont plus faibles chez les nouveaux nés et les adultes : <ul style="list-style-type: none"> - la maturation du CYP2D6 se fait au cours des premières heures, celle du CYP3A4 dans les premiers jours, du CYP1A2 dans les premiers mois ; - les concentrations du CYP 2E1 augmentent graduellement après la naissance pour atteindre 1/3 du niveau adulte à 1 an et le niveau adulte vers 10 ans ; - faible niveau hépatique de CYP 2D6 chez le fœtus puis augmente après la naissance à l'environ les 2/3 du niveau adulte entre 1 mois et 5 ans. - Les CYP 2C9 et 2C19, les plus abondants des CYP 2 dans le foie adulte, apparaissent dans la première semaine après la naissance (environ 30% des niveaux adultes jusqu'à 1 an) ; - Le CYP 1A2 apparait entre 1 et 3 mois et atteint 50% du niveau adulte à 1 an. L'activité des enzymes de la phase II est généralement réduite à la naissance ce qui pourrait entraîner une plus faible détoxification et élimination chez les enfants : <ul style="list-style-type: none"> - capacités de glucuronidation très faibles chez les nouveau-nés (activité 2,5 fois plus faible à la naissance/adulte) qui atteignent le niveau adulte vers 3-4 ans, - acétylation et sulfatation plus importantes que la glucuronidation chez les nouveau-nés atteignent rapidement le niveau adulte ; - activité estérase 2 à 10 fois plus faible chez les nouveau-nés / adultes ; - maturation complexe des capacités métaboliques du glutathion : les iso-enzymes mûrent à différents moments ; → Au niveau hépatique, le taux de détoxification (ou activation) pourrait être moins efficace et les temps de demi-vie des xénobiotiques allongés chez les nouveau-nés.
Métabolisme au niveau pulmonaire	Système enzymatique se développe encore après la naissance (CYP P450 mono-oxygénase, glutathion S-transférase, hydrolases époxyde, superoxyde dismutase, glutathion peroxydase).
ELIMINATION	
Reins	La capacité rénale du jeune enfant atteint la capacité rénale adulte vers 1 an. Le débit sanguin rénal et le taux de filtration glomérulaire sont faibles à la naissance et atteignent les niveaux adultes respectivement à environ 3-5 mois et 7-12 mois. La sécrétion tubulaire est faible chez le nouveau-né et atteint des niveaux adultes vers 1 an. Allongement du temps de demi-vie des xénobiotiques ou de leurs métabolites dans le plasma sanguin (jusqu'à 3 fois) qui atteint sa valeur « adulte » entre 2 et 6 mois après la naissance.
Voies biliaires	Capacité à éliminer les substances chimiques dans la bile chez les nouveau-nés diminuée. La sécrétion des acides biliaires est faible chez les nouveau-nés et atteint des niveaux adultes vers 6 mois.
Poumons	Débit respiratoire proportionnellement augmentée chez l'enfant à cause d'une demande calorique importante entraînant d'une part une augmentation de l'absorption par inhalation des xénobiotiques volatils ou sous forme d'aérosol et d'autre part, une augmentation du potentiel pour éliminer ces toxiques ou leurs métabolites par expiration.

D'un point de vue toxicodynamique, les enfants présentent des différences par rapport aux adultes. L'organisme en développement subit de nombreux événements complexes de régulation de la croissance, de différenciation cellulaire et de morphogénèse. L'interférence avec ces événements, de mutations ou altérations des divisions cellulaires, des activités hormonales ou enzymatiques par exemple, peut entraîner des impacts négatifs significatifs sur le développement. De nombreux facteurs environnementaux, incluant les substances chimiques, peuvent avoir un impact sur le développement. En général, la sensibilité des effets dépend de la substance chimique, de l'effet toxique observé et de la période de développement pendant laquelle l'exposition a lieu.

Jusqu'à l'adolescence, certains organes et tissus continuent de se développer et arrivent à maturité à différents moments :

- Le système nerveux central : maturation à l'adolescence ;
- Le système pulmonaire : maturation alvéolaire vers 2 ans ;
- Le système immunitaire : développement terminé à 12 ans ;
- Les reins : pleinement fonctionnels vers 1 an ;
- Le squelette : en développement jusqu'à l'âge adulte ;
- Les organes et/ou systèmes impliqués dans l'absorption et le métabolisme : système gastro-intestinal : mature vers 1 an ;
- Les organes reproducteurs : fonctionnels à l'adolescence.

Les phases de développement et de croissance rapide lors de l'enfance (prolifération, différenciation, migration et maturation cellulaire) constituent des fenêtres de sensibilité aux substances chimiques pouvant entraîner une perturbation de certains systèmes ou organes non matures à la naissance.

Ainsi, les enfants pourraient être plus sensibles aux effets pouvant être induits par des substances chimiques que les adultes dans certains cas et moins sensibles dans d'autres cas.

- **Synthèse des positions des différents organismes**

VTR à seuil de dose

Selon les différents organismes, plusieurs écoles de pensée s'affrontent. Certains considèrent que les VTR protègent l'ensemble de la population, y compris les populations sensibles telles que les enfants. *A contrario*, d'autres organismes considèrent qu'il est nécessaire d'adapter les VTR existantes pour protéger les populations les plus sensibles (application d'un facteur d'incertitude supplémentaire) ou de construire des VTR spécifiques aux enfants.

Les VTR élaborées protègent toute la population

Certains organismes, tels que l'US EPA, l'ATSDR et Santé Canada, considèrent que les VTR à seuil protègent l'ensemble de la population, y compris les populations sensibles (US EPA, 2002 et 2009 ; Santé Canada, 1994 ; Chou *et al.*, 1998 ; Pohl et Abadin, 1995). Un des facteurs d'incertitude appliqué à la dose critique, le facteur d'incertitude interindividuel UF_H , a pour objectif de tenir compte des populations sensibles (enfants, personnes âgées, femmes enceintes, etc.) et

des différences de réponses toxicocinétiques (polymorphismes dans les enzymes du métabolisme par exemple) ou toxicodynamiques (sensibilités différentes au niveau de la cible, par exemple différence de nombre de récepteurs), sans pour autant viser les sujets les plus sensibles (notion de sujets hypersensibles). Ainsi, il prend en compte la variation de sensibilité dans l'ensemble de la population humaine alors que l'étude clé a été réalisée sur un groupe restreint (ex. étude réalisée en milieu professionnel) ou sur des animaux de laboratoire, dont la variabilité interindividuelle est réduite en raison d'échantillons de petite taille et à la représentativité limitée. En effet, l'homogénéité génétique, la stabilité des conditions de vie et l'absence de maladie particulière chez les animaux de laboratoire ne reflètent qu'une très faible variation d'effets d'un individu à l'autre par rapport à ce qui se passe chez l'Homme (hétérogénéité génétique, modes de vie très différents d'une sous population à l'autre, facteurs de risque associés, présence de pathologies particulières, états hormonaux hétérogènes, présence de sous groupes sensibles, etc.). Ainsi, l'US EPA, l'ATSDR et Santé Canada préconisent l'application d'un facteur d'incertitude de 10 par défaut pour prendre en compte cette variabilité interindividuelle et protéger toute la population, y compris les populations les plus vulnérables. Ce facteur peut être diminué et fixé à 3 ou 1 si on dispose de données suffisantes chez des populations sensibles et pour des périodes d'exposition particulières.

Concernant l'applicabilité de l'approche Threshold of Toxicological Concern (TTC)³³ aux enfants, le Scientific Committee on Food (SCF) considère que les différences de toxicocinétique entre les nourrissons et les enfants/ adultes sont transitoires et généralement ne dépassent pas un facteur de 5. Cela implique qu'aux faibles expositions, les nouveau-nés, dès les premières semaines de vie, sont capables de métaboliser et éliminer les substances. De ce fait, l'EFSA considère que l'approche TTC s'applique à l'ensemble de la population, y compris les nourrissons et les enfants mais qu'il est nécessaire de convertir les valeurs en prenant en compte le poids corporel (EFSA, 2012) (Figure 7). En effet, les valeurs de l'approche TTC sont exprimées en $\mu\text{g}/\text{personne}/\text{j}$ pour une personne de 60 kg et pourraient donc ne pas être protectrices pour les nourrissons et les enfants. Cette approche pourrait s'appliquer aux nourrissons de moins de 6 mois pour lesquels le métabolisme et les processus d'élimination ne sont pas encore matures si l'exposition estimée est comprise dans l'intervalle des valeurs TTC.

³³ Outil d'évaluation des risques basé sur le principe d'établir un seuil d'exposition humaine pour les substances chimiques en dessous duquel il y a une très faible probabilité d'effets néfastes pour la santé humaine. Il permet d'identifier un niveau de sécurité d'exposition basé sur la structure chimique et la toxicologie connue des substances chimiques qui partagent des caractéristiques structurales similaires.

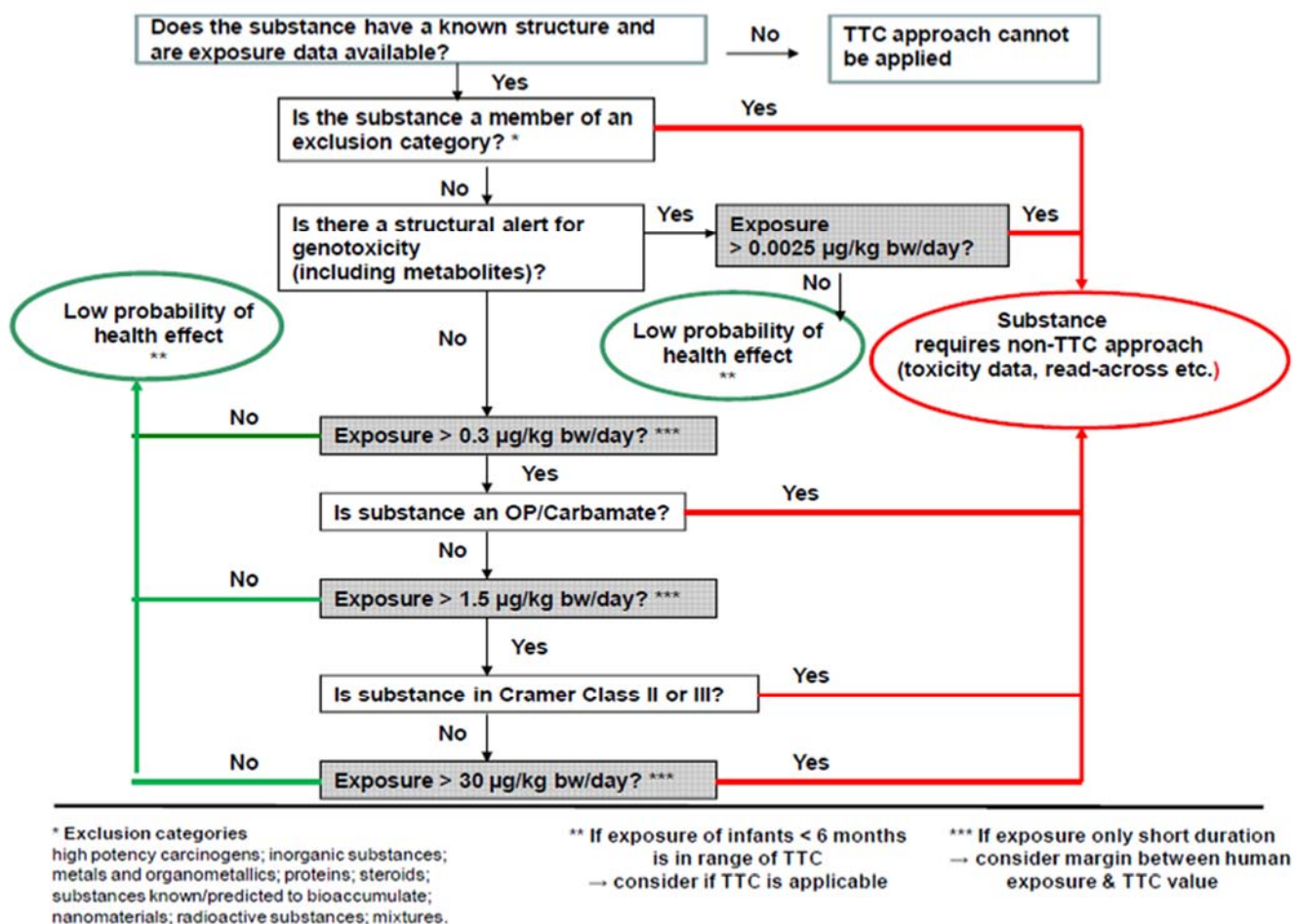


Figure 7 : Schéma global de l'approche TTC appliquée par l'EFSA (EFSA, 2012)

- **Les VTR existantes ne protègent pas les populations les plus sensibles, dont les enfants**

Certains organismes, tels que le Danish EPA, le KEMI, le RIVM, l'OEHHA et l'ECHA, considèrent que les VTR élaborées ne protègent pas les populations les plus sensibles, dont les enfants. Cette position repose notamment sur le fait que les paramètres physiologiques (masse, taille) et enzymatiques sont différents. En effet, certains paramètres peuvent affecter la susceptibilité des enfants aux substances chimiques tels qu'une surface corporelle plus importante en rapport au poids, un taux métabolique plus important, une consommation en oxygène plus importante, etc. Des organes tels que le foie et les reins ne sont pas complètement fonctionnels pour métaboliser correctement les substances chimiques et les excréter ce qui peut entraîner des accumulations et des effets supplémentaires. Enfin, certains systèmes (immunitaires ou neurologiques) ne sont pas complètement développés et sont des cibles faciles pour les substances chimiques. Les enfants constituent donc une sous-population sensible aux substances chimiques. De ce fait, certains organismes considèrent que les VTR élaborées ne protègent pas les populations les plus sensibles telles que les enfants et préconisent :

- soit l'application d'un facteur de sécurité supplémentaire,

- soit l'application de la VTR à partir d'un certain âge,
- soit la construction de VTR spécifiques.

Facteur additionnel pour protéger les populations sensibles dont les enfants

Le premier organisme à préconiser l'application d'un facteur de sécurité supplémentaire a été le NRC en 1993. Dans son rapport intitulé « Pesticides in diet of infants and children », le NRC recommande l'élaboration d'une nouvelle approche d'évaluation des risques tenant compte de la spécificité des enfants lors de l'évaluation des impacts potentiels de leurs expositions aux contaminants environnementaux (NRC, 1993b). Le NRC reconnaît que les organes et systèmes en cours de maturation des enfants pourraient être plus susceptibles aux effets des substances chimiques. Du fait de différences physiologiques entre les enfants et les adultes, le NRC recommande que les différences de susceptibilité des individus matures ou immatures soient étudiées systématiquement lors des études de toxicité. En attendant que cette recommandation soit largement suivie, le NRC préconise l'application d'un facteur d'incertitude supplémentaire de 10 si des preuves d'une toxicité développementale existent ou si les études de toxicité ayant trait aux enfants semblent incomplètes. Cette recommandation du NRC a été intégrée dans l'US Food Quality Protection Act (1996) afin que les normes ayant trait aux résidus de pesticides dans les aliments soient fixées de telle manière à être suffisamment sévères pour protéger la santé des enfants. Dans l'interprétation de la loi, l'US EPA (1999) a considéré que le facteur d'incertitude interindividuel par défaut de 10 protège dans la majorité des cas la santé des enfants quand les données sur la toxicité sur le développement sont disponibles. Cependant, lorsque des données spécifiques sur la santé des enfants ne sont pas disponibles ou inadapté pour un pesticide en particulier, l'application d'un facteur d'incertitude supplémentaire est recommandée pour prendre en compte la possibilité que les enfants soient significativement plus sensibles que les adultes. En pratique, un facteur additionnel de 3 ou 10 peut être appliqué. Dans des documents produits par l'Office of Prevention Pesticides and Toxic Substances (OPPTS) dans le cadre du processus de détermination d'éligibilité de ré-homologation des pesticides organophosphorés, un facteur de sécurité de 10 a été ajouté lors de l'élaboration de la VTR afin de prendre en compte la toxicité prénatale et postnatale de ces pesticides ou lorsque les données toxicologiques et celles liées à l'exposition sont jugées incomplètes (Danish EPA, 2001 ; KEMI, 2003 ; INSPQ, 2007).

Renwick a étudié la variabilité toxicocinétique et la variabilité toxicodynamique de manière séparée, à l'aide de plusieurs études réalisées chez l'adulte sain et a montré que les différences toxicocinétiques étaient généralement plus importantes que les différences toxicodynamiques et qu'un facteur de 4 était suffisant pour prendre en compte la variabilité toxicocinétique de 99 % des individus adultes sains pour 80 % des substances étudiées. D'autres études (Renwick *et al.* 2000a, 2000b ; Dorne *et al.* 2001, 2002 ; Walton *et al.* 2001 cité dans Afset, 2007) ont ensuite évalué la validité du facteur de 3,16 proposé par l'OMS pour les différences toxicocinétiques (UF_{H-TK}), en utilisant des données humaines sur la cinétique de certains médicaments métabolisés par le CYP 1A2. Leurs conclusions étaient que si 99 % de la population adulte saine était couverte par ce facteur, il ne s'appliquait pas aux femmes enceintes, aux personnes âgées, aux enfants ou

encore aux patients atteints de maladies hépatiques. Par ailleurs, il était totalement inadapté pour les nouveau-nés (99 à 100 % des individus non couverts) et pour les femmes enceintes à terme (50 % des individus non couverts). Les auteurs proposaient l'application d'un facteur supplémentaire pour les substances substrats du CYP 1A2 lorsque les populations cibles étaient les nouveau-nés. De même pour les substances métabolisées par le CYP 2D6, ils précisait que pour couvrir 95 à 99 % des individus métaboliseurs rapides, métaboliseurs lents, des personnes âgées et des enfants, les facteurs variaient respectivement de 2,6 à 4,1, de 15 à 18, de 5 à 8,4 et de 22 à 45. Enfin, les analyses effectuées sur les variations dans la glucuronidation ont montré des différences moindres, puisque le facteur 3,16 couvrirait 99 % de la population générale, excepté les nouveau-nés et les individus atteints de pathologies hépatiques ou rénales (Afsset, 2007).

En 2001, le **Danish EPA** a recommandé fortement la conduite d'une évaluation de risque spécifique aux enfants, y compris les enfants à naître, pour les substances présentes dans des produits destinés aux enfants (ex. jouets, cosmétiques, puériculture, additifs alimentaires, etc.). Dans le cas où les données seraient insuffisantes pour évaluer la susceptibilité des enfants, il recommande de prendre des mesures de sécurité supplémentaire dans la fixation de VTR (choix d'un facteur d'incertitude supplémentaire) pour des substances présentes dans des produits destinées aux enfants (Danish EPA, 2001).

En Suède, le **KEMI** a identifié en 2003 une série de facteurs reflétant les différences de sensibilité d'un individu à l'autre : l'âge, le polymorphisme génétique, le sexe, les pathologies et le mode de vie influent de manière significative sur les individus. Pour tenir compte de la variabilité de sensibilité dans la population adulte saine, le KEMI propose l'application d'un facteur d'incertitude inter-espèce UF_H de 3 à 5 pour la composante toxicocinétique et de 3,2 (3,16) pour la composante toxicodynamique en l'absence de connaissances suffisantes pour proposer une alternative solide à cette valeur. Le KEMI propose ainsi l'application d'un facteur UF_H de 10 à 16 pour la construction d'une VTR à seuil, en précisant qu'il ne couvre pas l'ensemble des sous-groupes de population identifiés comme étant à risque. Aucune tentative n'a été faite par le KEMI pour proposer un facteur d'incertitude couvrant l'ensemble de la population, y compris les populations sensibles. Les différences de sensibilité dues à des polymorphismes génétiques varient beaucoup selon les individus et dans la plupart des cas, on ne dispose pas de données suffisantes sur la toxicocinétique/dynamique et sur les effets induits chez les populations sensibles pour déterminer l'importance de facteurs influant sur les différences de sensibilités. La diversité des possibilités ne permet pas non plus de proposer un facteur particulier pour prendre en compte les différentes pathologies ou modes de vie. Le KEMI préconise de se baser sur le jugement d'experts au cas par cas en fonction des substances, des effets mis en évidence, des mécanismes d'action et des expositions. En effet, le moment de l'exposition à une substance peut être un facteur important au vue des périodes critiques d'exposition où la susceptibilité des individus peut être exacerbée, à savoir au moment de la conception, pendant les périodes pré- et post-natales, l'enfance et l'adolescence, ainsi que pendant la grossesse. Certains organes ou systèmes sont particulièrement vulnérables aux substances chimiques pendant leur développement (systèmes nerveux, immunitaire, reproduction et endocrine). Le KEMI recommande d'essayer de réaliser une

évaluation de risque sanitaire pour le fœtus, l'enfant, l'adolescent pour les substances chimiques et les produits auxquels ils pourraient être exposés. Une batterie complète de tests incluant une évaluation des effets sur la reproduction, le développement et la neurotoxicité chez des animaux adultes doit être complétée par des études sur des animaux jeunes. Dans le cas où les données sont insuffisantes pour évaluer la susceptibilité des enfants (dont les enfants à naître), le KEMI suggère l'application d'un facteur d'incertitude supplémentaire de 1 à 10 pour prendre en compte le manque de donnée (KEMI, 2003).

Sans remettre en cause l'application d'un facteur d'incertitude interindividuel UF_H qui protégerait les enfants, le RIVM considère important de garder à l'esprit l'existence de sous-groupes de population plus sensibles (telles que les enfants) à prendre en compte dans les évaluations des risques. Ainsi, il recommande de vérifier systématiquement que les enfants sont suffisamment protégés par les facteurs d'incertitude par défaut et le cas échéant d'utiliser au cas par cas un facteur additionnel pour protéger des populations sensibles dont les enfants (RIVM, 2002 et 2007). Le RIVM propose un arbre de décision afin de déterminer si un facteur d'incertitude supplémentaire est nécessaire pour protéger les enfants des effets adverses d'une substance chimique (Figure 8).

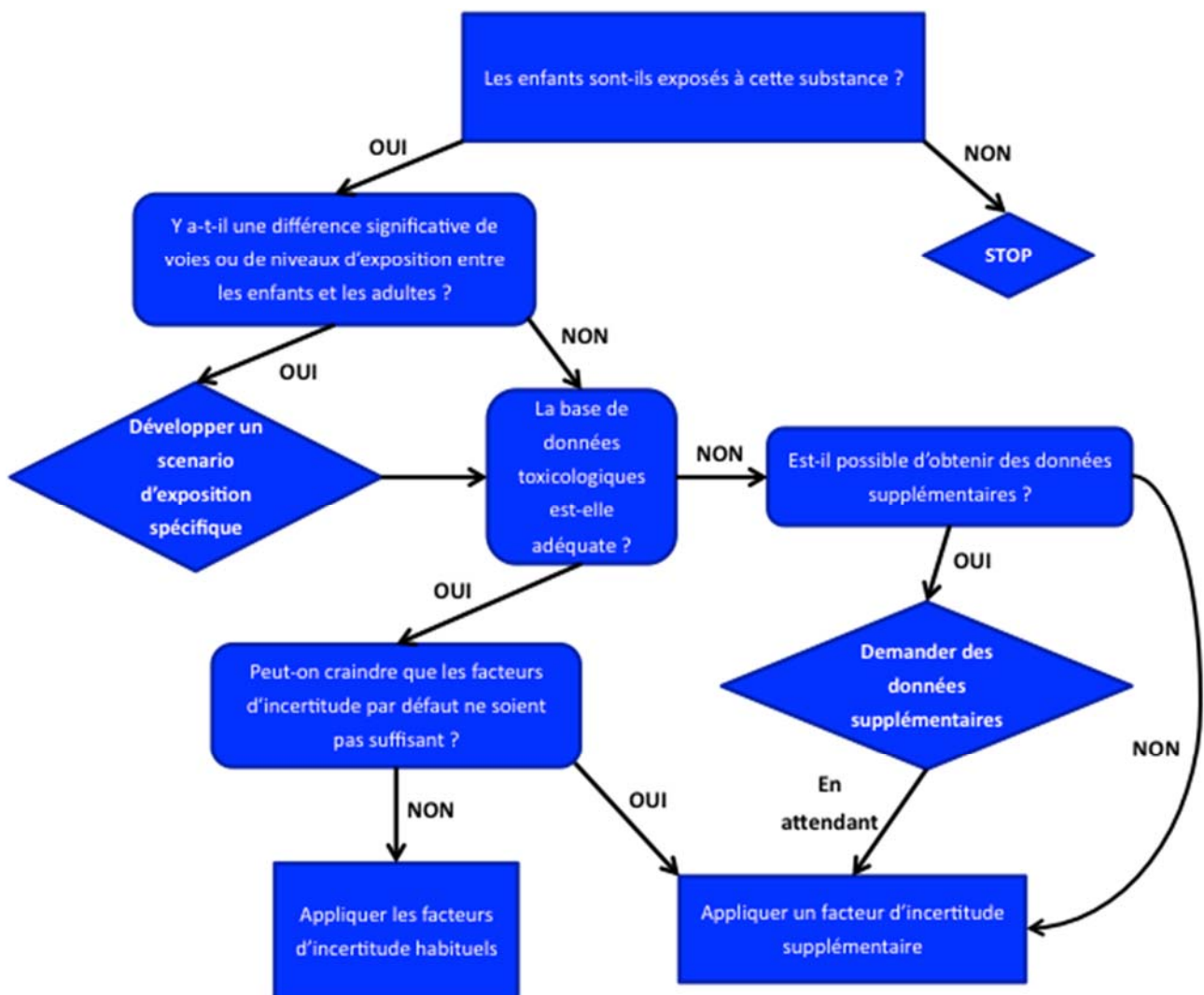


Figure 8 Erreur ! Source du renvoi introuvable. : **Arbre de décision pour évaluer les risques chez les enfants (RIVM, 2007)**

En 2008 dans son guide méthodologique pour dériver des REL par inhalation pour des effets non cancérogènes, l'OEHHA indique que les REL construites protègent tous les individus y compris les populations à risque (OEHHA, 2008). A cause de la très forte variabilité présente chez l'Homme, il est possible que les REL élaborées ne protègent pas les individus hypersensibles (*i.e.* ceux présentant une réponse extrêmement rare ou idiosyncrasique qui ne peut pas être prédite par des études toxicologiques ou épidémiologiques de taille raisonnable). Cependant, l'OEHHA essaye dans la mesure du possible d'identifier à partir de la littérature les différentes sous-populations vulnérables pour chaque substance et de les prendre en compte dans la construction des REL. Pour ce faire, quand des données sont disponibles pour une population vulnérable, l'OEHHA recommande de les intégrer dans un modèle PBPK ou d'adapter la valeur du facteur d'incertitude interindividuel UF_H pour protéger cette population sensible. Classiquement, quand les données sont insuffisantes pour développer un modèle PBPK fiable, un facteur d'incertitude interindividuel est appliqué pour prendre en compte la variabilité dans la population humaine, y compris les susceptibilités aux substances chimiques des sous-populations sensibles (enfants, femmes enceintes et fœtus, personnes âgées, personnes malades, etc.). Afin de protéger les nouveau-nés et les enfants des potentiels effets néfastes des toxiques respiratoires, l'OEHHA considère qu'il est approprié d'augmenter la composante toxicocinétique du facteur d'incertitude UF_H (UF_{H-TK}) (valeur par défaut égale à $\sqrt{10}$). Dans le cas de gaz agissant au niveau systémique et les particules qui induisent une exposition systémique par dissolution ou absorption au niveau pulmonaire ou par le tractus gastro-intestinal, l'OEHHA applique un facteur UF_{H-TK} supplémentaire de 10 par défaut aboutissant à un UF_{H-TK} total de 30. Pour ce qui concerne les gaz agissant au niveau du site d'entrée sans activation métabolique ou processus cinétique complexe, l'OEHHA préconise l'application d'un UF_{H-TK} de $\sqrt{10}$. Ces facteurs additionnels ne sont pas appliqués au cas où les niveaux d'exposition sont estimés à partir d'une étude incluant l'évaluation d'un sous-groupe de population sensible ; un UF_{H-TK} de 1 par défaut est alors jugé approprié. En ce qui concerne la composante toxicodynamique, l'OEHHA propose d'appliquer un UF_{H-TD} supérieur à la valeur par défaut de $\sqrt{10}$ car les différences entre les enfants et les adultes pourraient être importantes pour certains effets (neurotoxicité, exacerbation de l'asthme, etc.).

Application de la VTR à partir d'un certain âge

Selon la méthode d'origine définie par le JECFA et le SCF, les doses journalières admissibles (DJA) doivent couvrir l'ensemble de la population. Pour ce faire, elles sont établies pour protéger la sous-groupe de population la plus sensible en se basant sur l'effet le plus sensible. Les facteurs d'incertitude utilisés pour dériver une DJA couvrent entre autre les différences inter-espèces et intra-espèce (grossesse, âge, ...) (OMS, 2009a).

Cependant, l'effet le plus sensible n'est pas toujours le plus pertinent pour certains sous-groupes de population. Par exemple, il est nécessaire de s'assurer que la DJA permet de protéger l'embryon /fœtus de possible effets *in utero*. Si la DJA a été construite sur la base d'une toxicité développementale (foeto/embryotoxicité) ou d'autres effets spécifiques d'une sous-population pour

une substance ne présentant pas de NOAEL pour d'autres effets, il pourrait être conseillé de fixer une seconde DJA moins conservatrice pour le reste de la population, c'est-à-dire pour les hommes et les femmes hors âge de procréer (OMS, 2009a).

Les conclusions du colloque ILSI Europe (Clayton, 1998) sur l'applicabilité des DJA aux nourrissons et jeunes enfants indiquaient que les DJA ne s'appliquaient pas aux nouveau-nés et nourrissons de moins de 12 semaines (période de maturation des processus d'élimination et des enzymes métabolisant les xénobiotiques) (OMS, 2009).

Construction de VTR spécifiques aux enfants

Dans le cadre du règlement REACH, des DNEL peuvent être dérivés pour différentes populations (population générale et population professionnelle) (ECHA, 2012). Dans de rares cas, il peut être pertinent d'élaborer une DNEL pour certaines sous-populations plus sensibles. Les différences toxicocinétiques et toxicodynamiques entre les adultes et les enfants peuvent rendre les enfants plus ou moins sensibles aux effets toxiques d'une substance. Une autre raison pour établir une **DNEL spécifique d'un sous-groupe de population** est l'existence d'une exposition spécifique nécessitant une évaluation de risque sanitaire pour cette sous-population (ex. exposition des enfants *via* les jouets). Afin de prendre en compte cette sensibilité particulière des enfants lors de la construction de DNEL, un facteur d'incertitude supérieur au facteur intra-espèce de 10 par défaut devrait être envisagé quand les deux critères suivants sont remplis :

- Il existe des effets sur des organes ou des fonctions sensibles lors du développement et de la maturation au début de la vie (en particulier les systèmes nerveux, reproducteur, endocrinien ou immunitaire et les voies métaboliques) mis en évidence, par exemple, dans des études chez des animaux adultes, des études épidémiologiques, des études *in vitro* et/ou des SARs (relation structure activité) ;
- Il manque des données chez des animaux juvéniles.

Ces critères s'appliquent aussi pour l'enfant à naître.

L'OEHHA a été mandaté pour établir des valeurs guides sanitaires (Health Guidance Value = HGV) spécifiques aux enfants. Le Health and Safety Code a demandé à l'OEHHA d'identifier les contaminants chimiques fréquemment trouvés dans les écoles (sol) et de déterminer les substances les plus problématiques pour lesquelles il existe des sensibilités physiologiques spécifiques aux enfants. Avant que ne soient listées les substances les plus préoccupantes, l'OEHHA a dû également évaluer et publier des HGV pour 5 substances : cadmium, chlordane, heptachlor/heptachlor époxyde, méthoxychlor et nickel. Les HGV établies seront utilisées dans les évaluations de risques dans les écoles californiennes existantes ou en projet.

L'OEHHA s'est focalisé dans un premier temps sur l'évaluation des effets non cancérogènes des substances identifiées en attendant d'avoir une méthode pour développer des HGV spécifiques aux enfants pour les effets cancérogènes. Ces valeurs spécifiques aux enfants sont nommées « **child-specific reference dose** » (**chRD**) pour la voie orale et « **child-specific reference concentration** » (**chRC**) pour la voie inhalée. Ces ChRD ont pour objectif de protéger les écoliers, de la maternelle jusqu'à 18 ans, ainsi que les jeunes enfants gardés en crèches ou garderies situées dans une école.

Afin d'évaluer ou de développer ces chRD, l'OEHHA a suivi la méthode suivante :

- Choix de l'étude clé : L'OEHHA propose de retenir les études sur les espèces les plus sensibles et mettant en évidence les effets les plus sensibles.

Du fait des fenêtres d'exposition au cours desquelles une prolifération et une différenciation cellulaire ont lieu dans des organes spécifiques pendant l'enfance, l'OEHHA s'efforce de se baser sur des études réalisées chez des animaux juvéniles (ou chez des enfants) plutôt qu'une étude chez l'adulte (animal ou Homme), même quand celles-ci présentent un plus grand nombre de doses ou un nombre plus important d'animaux. L'OEHHA souligne que les données empiriques chez les jeunes animaux peuvent être complexes à évaluer. La sensibilité des enfants dépend souvent de l'organe en question et de son stade de développement. Il existe des périodes de développement structurel et fonctionnel pendant les périodes pré- et postnatale jusqu'à l'adolescence. Pendant ces périodes critiques, une structure ou une fonction particulière est plus sensible à la perturbation due aux interactions entre une substance chimique et l'organe/tissu cible. De plus, les lésions peuvent ne pas être évidentes jusqu'à un stade de développement ultérieur. Dans de rares cas, les données issues d'études chez des adultes peuvent être utilisées si elles sont de très bonne qualité et si les données permettent de conclure sur la vulnérabilité du développement chez de jeunes animaux. Il est également possible d'intégrer des études réalisées chez des adultes pour documenter le mécanisme biologique expliquant une plus forte sensibilité de l'enfant et pour justifier l'application d'un facteur de sécurité approprié s'il n'existe pas d'étude réalisée dans une population jeune.

L'OEHHA se laisse la possibilité d'utiliser comme étude clé les études sur le développement s'il est raisonnable de considérer que les effets sur l'organe cible observé chez les animaux juvéniles peuvent apparaître sur le même organe en développement après la naissance chez l'Homme. En effet, il n'existe quasiment pas d'étude comparant un même effet observé chez des animaux juvéniles et chez des animaux adultes. Si des études *in utero* ou pendant la lactation existent, l'OEHHA se laisse la possibilité de les retenir également comme étude clé si l'organe cible continue de se développer pendant l'enfance.

- Choix de la dose critique la plus faible si plusieurs études évaluent le même effet avec différents tests ;
- Facteurs d'incertitude : Possibilité d'ajouter un facteur d'incertitude en cas de manque des données sur les effets les plus sensibles.

Jusqu'à la mise en place de ce programme, les VTR existantes pour les effets non cancérogènes, construites pour la plupart à partir de données humaines ou animales chez l'adulte, étaient utilisées par l'OEHHA. Entre 2003 et 2004, l'OEHHA a sélectionné 19 substances chimiques : endosulfan, manganèse, pentachlorophénol, toluène, plomb, arsenic, aldrine, atrazine, DDE, DDT, dieldrine, endrine, hexachlorobenzène, lindane, malathion, perchloroéthylène, perméthrine, sélénium et trichloroéthylène. Les ChRD élaborées à ce jour sont rapportées dans le Tableau 12.

Tableau 12 : Tableau des Child-specific References Dose (ChRD) établies par l'OEHHA³⁴

Substances	ChRD (mg/kg/j)	Date
Atrazine	$6,0 \cdot 10^{-3}$	Octobre 2007
Cadmium	$1,1 \cdot 10^{-5}$	Décembre 2005
Chlordane	$3,3 \cdot 10^{-5}$	Décembre 2005
Chlorpyrifos	$1,0 \cdot 10^{-4}$	Juin 2010
Deltaméthrine	$1,0 \cdot 10^{-4}$	Octobre 2007
Dieldrine	Pas de construction de Child-RfD Recommandation de la RfD de l'US EPA ou de la MRL de l'ATSDR = $5 \cdot 10^{-5}$	Novembre 2007
Endosulfan	$3,3 \cdot 10^{-4}$	Mars 2006 (final draft)
Heptachlor	$3,0 \cdot 10^{-5}$	Décembre 2005
Heptachlor époxyde	$1,3 \cdot 10^{-5}$	Décembre 2005
Malathion	Non construction de child-RfD (manque donnée)	Novembre 2007
Manganèse	$3 \cdot 10^{-2}$	Juin 2006
Méthoxychlor	$2,0 \cdot 10^{-5}$	Décembre 2005
Nickel	$1,1 \cdot 10^{-2}$	Décembre 2005
Paraquat	$7 \cdot 10^{-5}$	Août 2010 (draft)
Pentachlorophenol	1×10^{-3}	Juin 2006

³⁴ Mis à jour 16 mai 2017 : http://oehha.ca.gov/public_info/public/kids/chrds.html

Tableau 13 : Synthèse des méthodes de construction des VTR à seuil applicables aux enfants

Organismes	Méthode de prise en compte des enfants dans la construction de VTR à seuil	Remarques	Référence	
US EPA (USA)	Les VTR élaborées protègent toute la population (UF _H)		US EPA, 2002 et 2009	
ATSDR (USA)			Chou <i>et al.</i> , 1998 ; Pohl et Abadin, 1995	
Santé Canada (Canada)			Santé Canada, 1994	
NRC (USA)	Les VTR existantes ne protègent pas les populations les plus sensibles → Facteur additionnel pour protéger les populations sensibles dont les enfants	Facteur d'incertitude supplémentaire de 10 si des preuves d'une toxicité développementale existent ou si les études de toxicité ayant trait aux enfants semblent incomplètes.	NRC, 1993	
Danish EPA (Danemark)		Recommandation de prendre des mesures de sécurité supplémentaire dans la fixation de VTR comme le choix d'un facteur d'incertitude supplémentaire, si données insuffisantes pour évaluer la susceptibilité des enfants.	Danish EPA, 2001	
KEMI (Suède)		Suggestion d'appliquer un facteur d'incertitude supplémentaire de 1 à 10 pour prendre en compte le manque de donnée pour évaluer la susceptibilité des enfants (dont les enfants à naître)	KEMI, 2003	
RIVM (Pays-Bas)		Recommandation de vérifier systématiquement que les enfants sont suffisamment protégés par le facteur d'incertitude par défaut UF _H et le cas échéant d'utiliser au cas par cas un facteur additionnel pour protéger des populations sensibles dont les enfants (arbre de décision).	RIVM, 2002 et 2007	
OEHHA (USA)		Pour les VTR par inhalation : adapter l'UF _H pour protéger les populations sensibles en \nearrow de la composante toxicocinétique de l'UF _H (UF _{H-TK}) (valeur par défaut égale à $\sqrt{10}$) :	Ces facteurs additionnels non appliqués si les niveaux d'exposition sont estimés à partir	OEHHA, 2008
		- pour les gaz agissant au niveau systémique et les particules qui induisent une exposition systémique par dissolution ou absorption au niveau pulmonaire ou par le tractus gastro-intestinal : facteur UF _{H-TK} supplémentaire de 10 par défaut aboutissant à un UF _{H-TK} = 30 ; - pour les gaz agissant au niveau du site d'entrée sans activation métabolique ou processus cinétique complexe, UF _{H-TK} de $\sqrt{10}$.		

		d'une étude incluant l'évaluation d'une sous population sensible ($UF_{H-TK} = 1$ par défaut). ↗ de la composante toxicodynamique : application d'un $UF_{H-TD} > \sqrt{10}$ (valeur par défaut)	
JECFA – FAO/OMS	Les VTR existantes ne protègent pas les populations les plus sensibles → Application de la VTR à partir d'un certain âge	Les DJA ne s'appliquent pas aux nouveau-nés et nourrissons de moins de 12 semaines (période de maturation des processus d'élimination et des enzymes métabolisant les xénobiotiques).	OMS, 2009
ECHA (Union Européenne)	Les VTR existantes ne protègent pas les populations les plus sensibles → Construction de VTR spécifiques aux enfants	Dans le cadre de REACH, possibilité de construire des DNEL spécifiques d'une sous-population, dont les enfants. Ajout d'un facteur d'incertitude supérieur au facteur UF_H de 10 par défaut quand les 2 critères suivants sont remplis : - existence d'effets sur des organes ou des fonctions sensibles lors du développement et de la maturation au début de la vie mis en évidence, par exemple, dans des études chez des animaux adultes, des études épidémiologiques, des études <i>in vitro</i> et/ou des SARs, - manque des données chez des animaux juvéniles.	ECHA, 2010
OEHHA (USA)		Child-reference dose ou concentration – objectif de protéger les écoliers, de la maternelle jusqu'à 18 ans, ainsi que les jeunes enfants gardés en crèches ou garderies situées dans une école (VTR sites et sols pollués)	OEHHA, 2005

VTR sans seuil de dose

Le risque de cancer, suite à une exposition entre la période de conception et la puberté à des polluants environnementaux cancérigènes, peut être différent du risque suite à une exposition à l'âge adulte. L'exposition à des cancérigènes tôt dans la vie pourrait entraîner un risque plus important de cancer vie entière pour plusieurs raisons :

- Le cancer est un processus multi-étapes et l'occurrence des premières étapes pendant l'enfance augmente les chances que le processus entier ait lieu et qu'un cancer apparaisse au cours de la vie.
- Les tissus en développement ou subissant une croissance rapide pourraient être particulièrement vulnérables aux agents cancérigènes. Pendant ces périodes de prolifération cellulaire, il existe un rapide renouvellement de l'ADN et un risque accru de mauvaises réparations des lésions (i.e. cassure de l'ADN, liaisons transversales, adduits) ou des altérations entraînant des modifications permanentes de l'ADN (i.e. mutation, altération de la méthylation de l'ADN).
- Pendant le développement, une forte proportion de cellules sont des cellules souches indifférenciées et donc représente une population cible de cellules somatiques capables de transmettre les modifications de l'ADN lors de futures divisions cellulaires.
- Une plus grande sensibilité aux cancérigènes hormonaux pourrait être attendue lors d'une exposition pendant l'enfance puisque le développement d'un grand nombre d'organes/systèmes est sous contrôle hormonal.
- D'autres facteurs pourraient jouer un rôle sur l'augmentation du risque de cancer suite à une exposition pendant une période de développement tels que des altérations de l'immunité, des différences dans l'absorption intestinale, l'excrétion biliaire et rénale, la distribution dans le sang et les graisses ou l'activité de systèmes enzymatiques pouvant activer ou détoxifier les cancérigènes.

Des données chez l'Homme et chez l'animal sur plusieurs cancérigènes (ex : diéthylstilbestrol, radiations ionisantes) suggèrent que des expositions au début de la vie pourraient entraîner un plus grand risque de cancer par rapport à des expositions plus tard dans la vie. Plusieurs organismes, le bureau fédéral de l'environnement allemand (UBA, 2001), l'US EPA (US EPA, 2005b) et l'OEHHA (OEHHA, 2009), ont évalué de manière quantitative les effets de périodes d'exposition à des cancérigènes sur la réponse cancérigène dans des études expérimentales chez l'animal. Ces organismes proposent une méthode pour prendre en compte cette sensibilité particulière des enfants dans les évaluations de risques sanitaires.

L'approche de l'**Umwelt Bundesamt** (UBA), bureau fédéral de l'environnement allemand, concernant la sensibilité renforcée des enfants se base surtout sur le fait qu'en cas de mutagénicité et de cancérigénèse prouvée, l'impact d'une exposition sur les enfants est supérieur par rapport aux adultes du fait d'une division cellulaire plus rapide pendant la croissance (UBA, 2001).

Cette approche visant à prendre en compte les populations sensibles (par exemple des enfants) date des années 1980 et notamment des études identifiant une plus forte sensibilité du chlorure de vinyle chez de jeunes animaux présentant des effets cancérigènes. Entre 1999 et 2001, l'UBA a voulu clarifier la question de la plus forte sensibilité des enfants concernant les effets cancérigènes. Dans ce cadre, les expériences basées notamment sur les expositions aux

radiations, chlorure de vinyle, nitrosamines, nitroamides, Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), 2-acétylamino-fluorène, benzidine, aflatoxine B1, cycasine, saccharine, uréthane, nickel, etc. ont été prises en compte.

Le taux de divisions cellulaires est significativement augmenté dans les organes des individus juvéniles exposés aux substances chimiques cancérigènes par rapport à des individus adultes. La fixation des dommages d'ADN pré-mutagènes et une plus forte division cellulaire renforcent la cancérogenèse de manière synergique. L'exposition à des substances chimiques cancérigènes pendant la division cellulaire entraîne une plus forte sensibilité du matériel génétique pendant le doublement des chromosomes, une fixation des dommages de l'ADN et d'autres incidents pré-mutagènes comme une mutation permanente et une prolifération des cellules initiées et mutantes, ce qui rend les enfants pendant leur croissance plus sensibles aux effets des substances cancérigènes pour lesquelles la mutagenité est prouvée. Ainsi, l'UBA conclut que la synergie d'un fort taux de division cellulaire des organes d'un organisme en pleine croissance (enfants) et l'exposition aux produits chimiques cancérigènes et mutagènes entraîne une plus forte incidence de tumeurs.

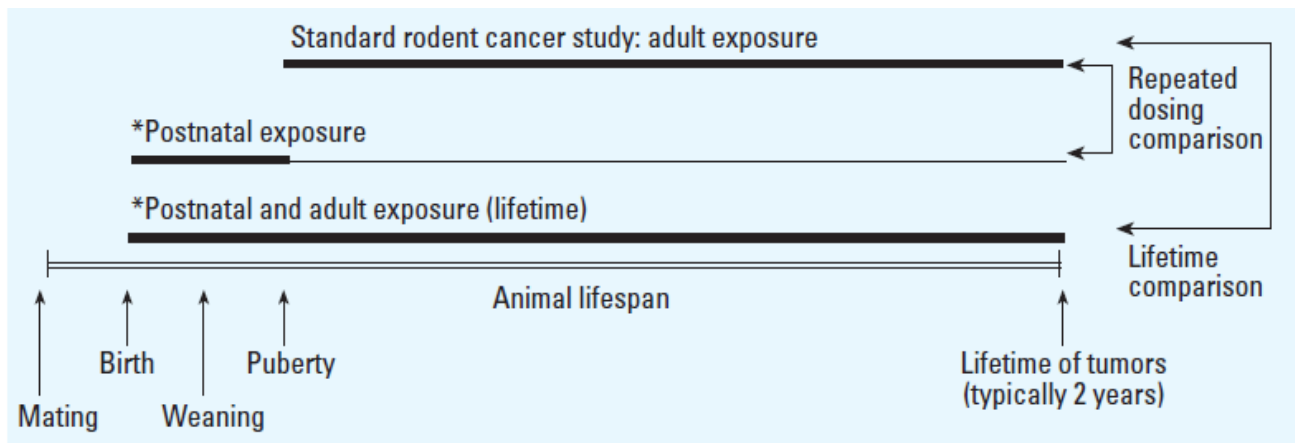
L'UBA recommande de considérer un risque de cancer accru chez les enfants exposés à des substances cancérigènes et mutagènes. La VTR applicable (ERU ou « Unit Risk » ou « Slope factor ») est alors à multiplier par un facteur de 10 pour les enfants âgés de 0 à 5 ans ou d'un facteur de 2 pour les enfants de 6 ans à l'âge d'adulte.

En 1994, le NRC a recommandé à l'**US EPA** de réaliser une évaluation de risque sanitaire pour les enfants quand le risque pouvait être supérieur à celui chez les adultes (NRC, 1994). Pour l'estimation du risque cancérogène, l'US EPA recommande d'intégrer des valeurs spécifiques à la classe d'âge, que ce soit pour l'exposition et la toxicité quand des données étaient disponibles et appropriées. En 2005, l'US EPA a proposé une nouvelle méthode de construction de VTR pour les substances cancérigènes (US EPA, 2005a), accompagnée d'un document traitant de la prise en compte d'une éventuelle plus grande sensibilité aux substances cancérigènes si l'exposition se produit pendant les premières années de la vie (US EPA, 2005b).

L'US EPA a réalisé une revue de la littérature scientifique afin d'évaluer s'il était nécessaire ou non d'ajuster les excès de risque unitaire élaborés sur la base d'études chez l'adulte pour évaluer les risques cancérogènes associés à une exposition précoce. Parmi plusieurs centaines d'études de cancérogenèse animale, 67 substances cancérigènes ont été identifiées mais seules 18 d'entre elles ont été sélectionnées pour intégrer l'analyse quantitative.

Ces études de cancérogenèse ont été triées selon différents scénarios d'exposition (Figure 9) :

- « Exposition répétée » (« Repeated exposure ») : comparaison d'une exposition répétée en période post-natale précoce jusqu'à la période juvénile avec une exposition uniquement à l'âge adulte,
- « Exposition vie entière » (« Lifetime exposure ») : comparaison d'une exposition vie entière (allant d'une exposition post-natale précoce, parfois périnatale, à une exposition à l'âge adulte) comparé à une exposition à l'âge adulte,
- « Exposition aiguë » : comparaison d'une exposition aiguë en début vie et à une exposition aiguë à l'âge adulte (dose unique en sous-cutanée ou intra-péritonéale).



The standard rodent bioassay begins after puberty, and exposures continue for about 2 years. Repeated-dosing studies typically dose during the postnatal period, with observations for tumors at approximately 2 years. Lifetime studies combine postnatal and adult exposures, sometimes beginning with *in utero* exposure. Acute studies (not shown) generally involve one or a few exposure during the *in utero*, preweaning, prepubertal, and adult periods. The adult tumors were often evaluated much earlier than 2 years.

*Can also include prenatal exposure.

Figure 9 : Représentation schématique des différents protocoles d'étude de cancérogénèse rapportés dans la revue de la littérature (Barton *et al.*, 2005)

Plusieurs espèces ou souches ont pu être testées dans une même étude. De même, certaines études présentaient des résultats pour plusieurs tissus.

Neuf substances étaient associées à des expositions répétées en post-natale précoce et à l'âge adulte (« repeated dosing comparison »), huit substances à des expositions vie entière et à l'âge adulte (« lifetime comparison ») et huit substances à des expositions aiguës.

Pour chacune des 18 substances présentant des données quantitatives, une évaluation du mode d'action selon une approche évolution du niveau de preuve (« weight of evidence ») a été réalisée. De nombreux modes d'action ont été identifiés. Six de ces substances agissaient selon un mode d'action non mutagène et 12 selon un mode d'action mutagène (Tableau 14). Sur les 12 substances mutagènes, des études répétées et vie entière étaient identifiées pour 6 substances et des études aiguës pour 8 substances. L'ensemble de ces substances sauf l'éthylnitrosourée (ENU) et la N-méthylnitrosourée (MNU) nécessitait une activation métabolique pour former la substance active cancérogène.

Tableau 14 : Liste des substances considérées dans l'analyse quantitative pour lesquelles des expositions chez des animaux juvéniles et à l'âge adulte sont rapportées dans une même expérience

Chemical	References	Study type	Mutagenic mode of action
Amitrole	Vesselinovitch 1983	Repeat dosing	
Benzidine	Vesselinovitch et al. 1975b	Repeat dosing	X
Benzo[a]pyrene	Vesselinovitch et al. 1975a	Acute exposure	X
Dibenzanthracene	Law 1940	Acute exposure	X
Dichlorodiphenyltrichloroethane	Vesselinovitch et al. 1979a	Repeat dosing Lifetime exposure	
Dieldrin	Vesselinovitch et al. 1979a	Repeat dosing Lifetime exposure	
Diethylnitrosamine	Peto et al. 1984 Vesselinovitch et al. 1984	Lifetime exposure Acute exposure	X
Dimethylbenz[a]anthracene	Meranze et al. 1969 Pietra et al. 1961 Walters 1966	Acute exposure Acute exposure Acute exposure	X
Dimethylnitrosamine	Hard 1979	Acute exposure	X
Diphenylhydantoin, 5,5-	Chhabra et al. 1993b	Repeat dosing Lifetime exposure	
Ethylnitrosourea	Naito et al. 1981 Vesselinovitch et al. 1974 Vesselinovitch 1983	Acute exposure Acute exposure Acute exposure	X
Ethylene thiourea	Chhabra et al. 1992	Repeat dosing Lifetime exposure	
3-Methylcholanthrene ^a	Klein 1959	Repeat dosing	X
N-Methylnitrosourea	Terracini and Testa 1970 Terracini et al. 1976	Acute exposure Acute exposure	X
Polybrominated biphenyls	Chhabra et al. 1993a	Repeat dosing Lifetime exposure	
Safrole	Vesselinovitch et al. 1979a	Repeat dosing Lifetime exposure	X
Urethane	Chiéco-Bianchi et al. 1963 Choudari Kommineni et al. 1970 De Benedictis et al. 1962 Fiore-Donati et al. 1962 Klein 1966 Liebelt et al. 1964 Rogers 1951	Acute exposure Acute exposure Acute exposure Acute exposure Acute exposure Acute exposure Acute exposure	X
Vinyl chloride	Maltoni et al. 1984	Repeat dosing	X

X, chemicals with a mutagenic mode of action. The chemicals listed here are from the list of more than 50 chemicals found to have carcinogenic effects from prenatal or postnatal exposures in animals [Supplementary Table S1]

L'analyse quantitative a été réalisée selon une comparaison des incidences de tumeurs chez des animaux juvéniles et adultes pour estimer la différence potentielle de sensibilité entre une exposition à une substance cancérogène au début de la vie et à l'âge adulte. Il a ainsi été calculé, pour chaque substance, chaque type de tumeurs et pour les deux sexes, un ratio moyen en comparant les risques cancérogènes suite à une exposition juvénile et ceux suite à une exposition à l'âge adulte (Tableau 15). Si ce ratio est supérieur à 1, l'animal juvénile est considéré comme plus sensible aux cancérogènes que l'adulte et inversement si le ratio est inférieur à 1.

Tableau 15 : Résumé des estimations quantitatives des ratios des risques de cancer chez l'enfant par rapport aux adultes (US EPA, 2005b)

Dose	Tissue	Number of chemicals	Inverse-weighted geometric mean ratio	Unweighted Minimum	Unweighted Maximum	Number of ratios	Percentage >1
Chemicals with mutagenic mode of action							
Repeated		4	10.5	0.12	111	45	42
Lifetime		3	8.7	0.18	79	6	67
	Combined repeated and lifetime	6	10.4	0.12	111	51	45
Acute	Combined	11	1.5	0.01	178	268	55
	Forestomach	3	0.076	0.01	1.9	32	16
	Harderian	2	0.48	0.06	0.8	20	0.0
	Kidney	2	1.6	0.17	7.1	18	78
	Leukemia	1	5.9	5.1	6.7	2	100
	Liver	5	8.1	0.10	40	70	77
	Lung	7	1.1	0.04	178	77	56
	Lymph	2	1.8	1.1	2.7	3	100
	Mammary (wk 5 vs wk 26)	1	7.1	NA	NA	1	100
	Mammary (wk 2 vs wk 5-8 or 26)	1	0.071	NA	NA	2	0
	Nerve	2	2.3	0.24	64	8	75
	Nerve (Day 1 comparison)	2	10	0.24	64	3	67
	Ovarian	1	0.033	0.01	0.13	3	0
	Reticular tissue	1	6.5	1.96	8.6	2	100
	Thymic lymphoma	1	2.8	1.01	7.9	6	100
	Thyroid	1	0.05	0.03	0.08	2	0
Uterine/vaginal	1	1.6	0.03	8.6	3	67	
Day 1		7	1.7	0.01	178	127	55
Day 15		3	1.5	0.06	52	74	65
Chemicals with nonmutagenic mode of action							
Repeated		6	2.2	0.06	13	22	27
Lifetime		5	3.4	0.15	36	38	21

L'US EPA a utilisé une approche bayésienne. Une distribution *a priori* a été attribuée à chacun des paramètres permettant de calculer les différents ratios.

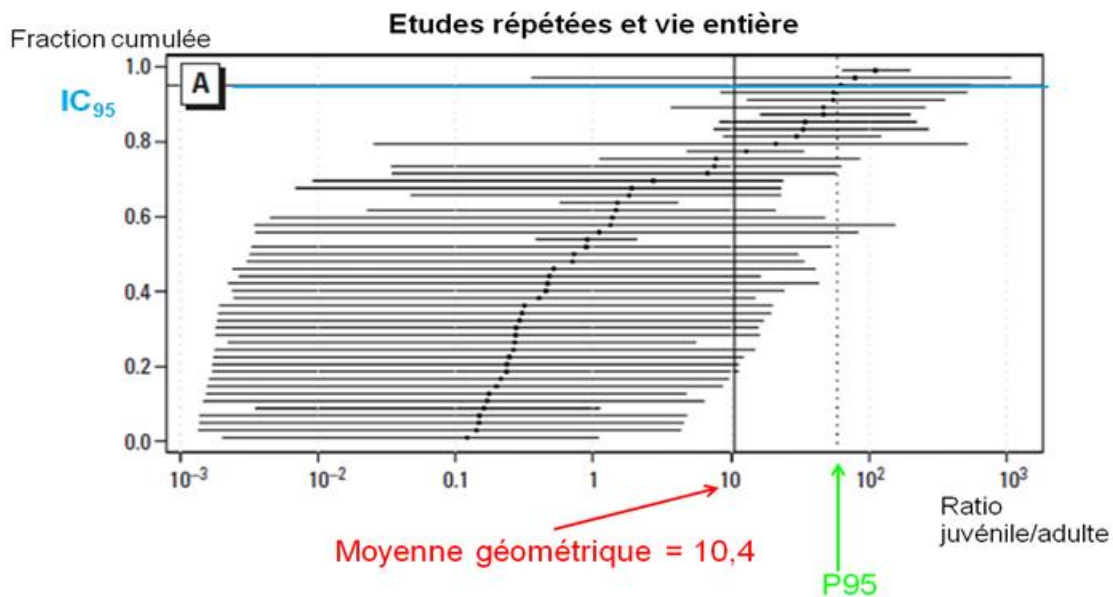
Pour ce qui concerne les substances non mutagènes :

- La moyenne géométrique des ratios calculés à partir des études répétées étaient de 2,2 (IC_{95%} = 0,06-13).
- La moyenne géométrique des ratios calculés à partir des études vie entière étaient de 3,4 (IC_{95%} = 0,15-36).

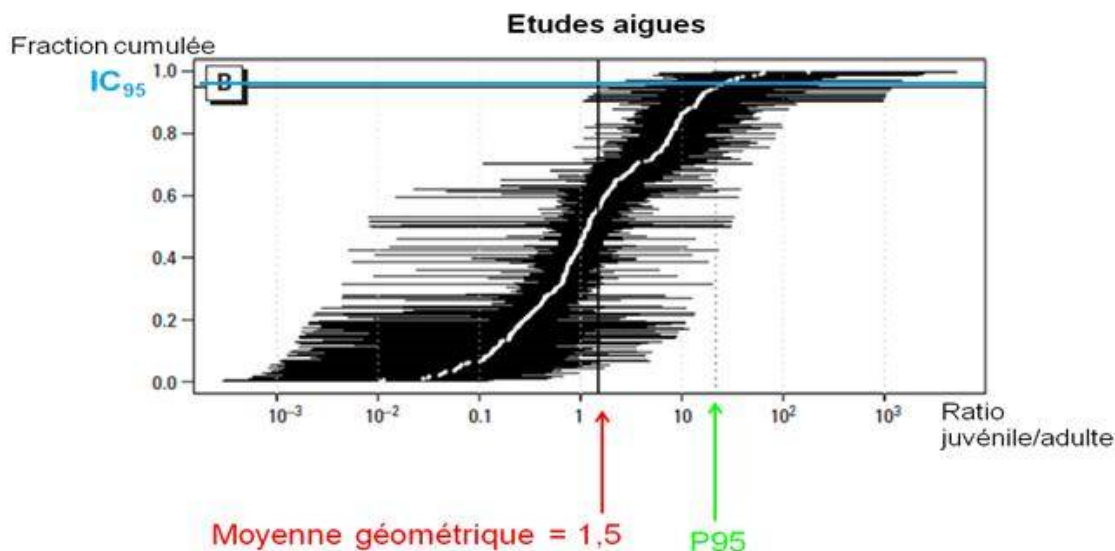
Ces résultats indiquent qu'une exposition pendant l'enfance à des cancérogènes non mutagènes pourrait entraîner une augmentation de l'incidence de tumeurs par rapport à une exposition à l'âge adulte. Cependant, les études sur l'éthylène thiourée qui agit *via* une perturbation thyroïdienne, indique que ce n'est pas le cas pour tous les modes d'action.

Pour ce qui concerne les substances mutagènes (Figure 10) :

- La moyenne géométrique des ratios calculés à partir des études répétées et vie entière étaient de 10,4 (IC_{95%} = 0,12-111). 42% des ratios calculés étaient supérieurs à 1,
- La moyenne géométrique des ratios calculés à partir des études aiguës étaient de 1,5 (IC_{95%} = 0,011-178).



Moyenne géométrique point noir



Moyenne géométrique en blanc

Figure 10 : Représentation graphique des ratios des risques cancérigènes chez l'enfant par rapport aux adultes (moyenne géométrique et 95^{ème} percentile) calculés pour des substances cancérigènes mutagènes (A – études répétées et vie entière, B- études aiguës) (Barton et al., 2005)

Les études répétées et aiguës étayent l'hypothèse qu'une exposition pendant l'enfance à des cancérigènes mutagènes pourrait entraîner une augmentation de l'incidence de tumeurs par rapport à une exposition à l'âge adulte.

Cependant, les études aiguës n'ont pas été prises en compte par l'US EPA pour effectuer un ajustement du risque de cancer car celles-ci présentent un certain nombre de limites. La majorité des études aiguës utilisées mettent en évidence des tumeurs pulmonaires chez presque tous les animaux, à toutes les doses et à tous les âges. De ce fait, le ratio médian du risque cancérigène d'une exposition juvénile par rapport à une exposition à l'âge adulte serait significativement biaisé : il tendrait vers 1 (l'enfant serait aussi sensible que l'adulte). De plus, l'estimation du risque

cancérogène est habituellement dérivée à partir d'expositions chroniques. La plupart des expositions prises en compte par l'US EPA sont des expositions chroniques ou répétées plutôt que des expositions aiguës. Enfin, un certain nombre d'études aiguës sont réalisées par voie intrapéritonéale qui ne correspond pas à la voie d'exposition habituelle pour l'évaluation des expositions environnementales. Par conséquent, l'US EPA considère que les études répétées et chroniques sont plus appropriées dans cette analyse.

Sur la base de cette analyse, l'US EPA préconise l'application d'un facteur d'ajustement pour calculer les risques cancérogènes chez les enfants, intitulé « **Age Dependent Adjustments factors** » (**ADAF**) s'appliquant uniquement aux substances cancérogènes mutagènes³⁵. Cependant, ce guide ne rend pas obligatoire l'application de ces ADAF par l'US EPA ou par d'autres entités. L'US EPA a décidé d'appliquer un ADAF de 10 pour les 2 premières années de vie. Cette classe d'âge a été sélectionnée car l'enfant, au cours de ces 2 premières années, semble plus vulnérable à cause du taux de divisions cellulaires rapide et car les différences toxicocinétiques et toxicodynamiques entre les très jeunes enfants et les adultes sont très importantes. Pour les enfants plus âgés, l'US EPA a retenu une valeur de 3 par défaut (absence de donnée), correspondant à la moitié de la différence entre 1 et 10 à l'échelle logarithmique. Cette valeur de 3 s'applique jusqu'à 16 ans, correspondant au milieu de l'adolescence après une période de changements rapides à la puberté et aux conclusions sur l'augmentation de la taille dans l'enquête NHANES (National Health and Nutrition Examination Survey).

Ainsi, les valeurs par défaut selon les classes d'âge sont les suivantes :

- 10 pour les enfants de moins de 2 ans,
- 3 pour les enfants de 2 ans à 15 ans,
- 1 à partir de 16 ans.

Les valeurs par défaut s'appliquent lors du calcul de risque (et non sur la VTR cancérogène elle-même). Cette démarche constitue une approche pragmatique en l'absence de données. Quand les données sont disponibles pour une substance chimique, les valeurs par défaut des ADAF ne s'appliquent pas. Les données disponibles doivent être utilisées directement pour évaluer les risques cancérogènes pour cette substance et cette période de la vie selon une approche au cas par cas (ex : chlorure de vinyle).

Ainsi, pour évaluer les risques cancérogènes, l'US EPA préconise d'utiliser des données spécifiques à l'âge aussi bien à l'étape d'évaluation de l'exposition qu'aux étapes d'identification des dangers et de caractérisation de la relation dose-réponse, quand de telles données sont disponibles et appropriées. Il propose un arbre décisionnel pour savoir quand appliquer les ADAF (Figure 11).

³⁵ Pour les substances cancérogènes non mutagènes, l'US EPA considère les données trop limitées et les modes d'actions trop différents pour proposer des valeurs d'ADAF par défaut.

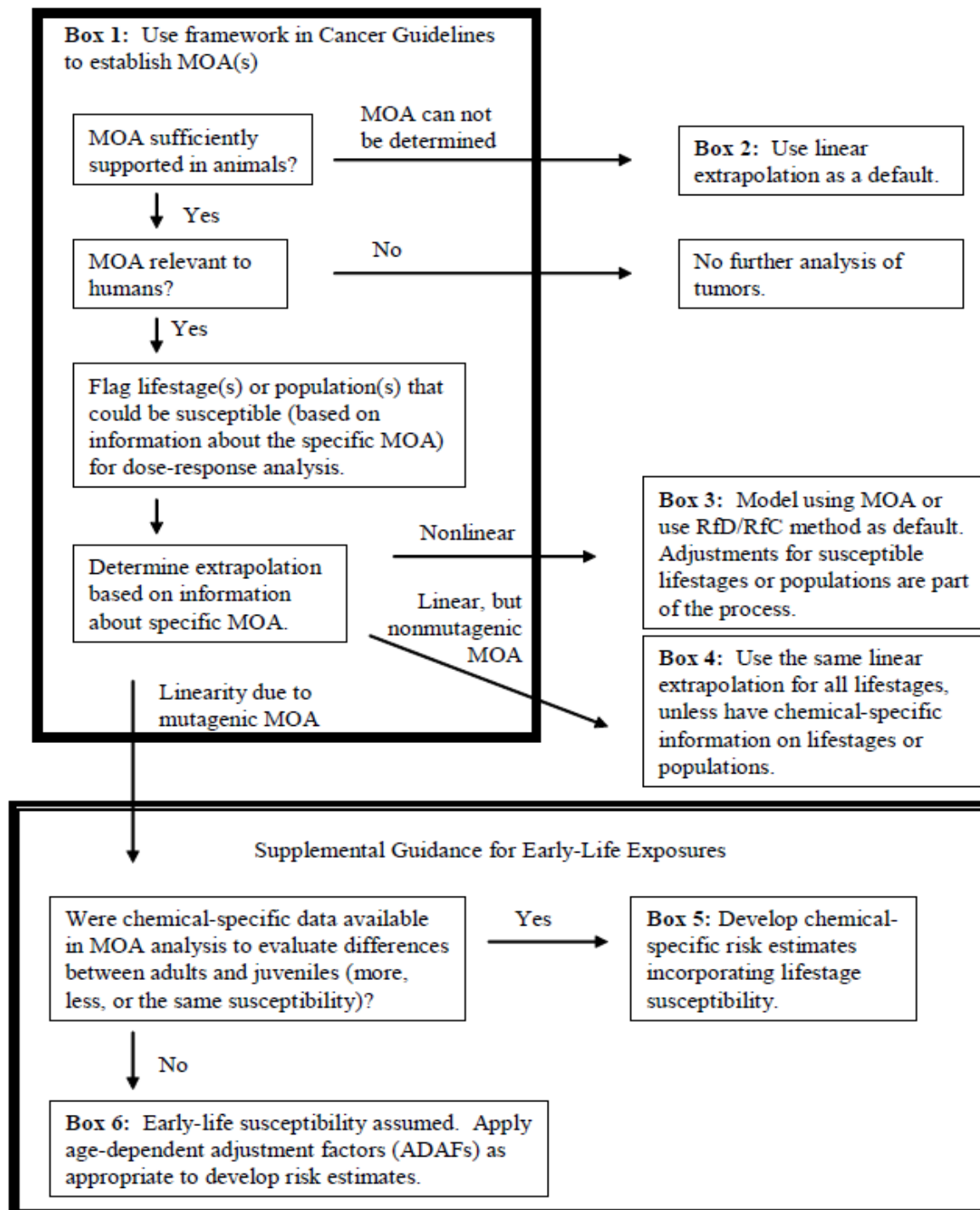


Figure 11 : Arbre décisionnel pour l'évaluation des risques chez l'enfant utilisant l'approche mode d'action (US EPA, 2005b)

Les études sur le mode d'action peuvent être une source de données sur les différences quantitatives entre les enfants et les adultes (cf. « Box 1 » de la Figure 11).

Quand le mode d'action ne peut pas être établi, l'approche d'extrapolation linéaire aux faibles doses est utilisée par défaut, sans ajustement supplémentaire, pour évaluer le risque cancérigène (cf. « Box 2 » de la Figure 11).

Si un mode d'action autre que mutagène est établi, qu'il soit linéaire (cf. « Box 3 » de la Figure 11) ou non linéaire (cf. « Box 4 » de la Figure 11), aucun ajustement spécifique n'est préconisé.

Si un mode d'action mutagène est mis en évidence, les études disponibles indiquent un risque cancérigène accru lors d'une exposition dans l'enfance par rapport à une exposition à l'âge adulte. Si des données sont disponibles spécifiques à une substance, notamment des études épidémiologiques mettant en évidence des effets pendant l'enfance ou des études animales en lien avec une exposition au début de vie, ces études doivent être analysées pour développer un ERU (ex : chlorure de vinyle) (cf. « Box 5 » de la Figure 11). En l'absence de données, une extrapolation linéaire aux faibles doses doit être appliquée avec l'application d'ADAF (cf. « Box 6 » de la Figure 11).

En 2009, l'**OEHHA** a proposé une approche similaire, à savoir l'application d'un facteur supplémentaire **par défaut** pour les enfants en absence de données spécifiques sur une substance pour prendre en compte l'augmentation de sensibilité aux substances cancérigènes pendant l'enfance (OEHHA, 2009). Ce facteur est intitulé facteur de sensibilité lié à l'âge ou « **Age-sensitivity factor** » (**ASF**).

Afin de déterminer des valeurs par défaut pour cet ASF, l'OEHHA a appliqué une méthode similaire à l'US EPA. Une recherche bibliographique a été réalisée en considérant les études de cancérogénèses animales mettant en évidence une susceptibilité liée à l'âge³⁶. Cent quarante cinq publications ont été recensées correspondant à 84 substances chimiques. En suivant les critères d'inclusion des études établis par l'OEHHA³⁷, 36 études ont été sélectionnées puis classées selon différents scénarios d'exposition :

- les études présentant au moins 2 groupes exposés pendant différentes périodes de la vie (1 groupe pendant la période prénatale³⁸, post-natale³⁹ ou juvénile⁴⁰ et 1 groupe à l'âge adulte) (« multi-lifestage exposure studies »), 23 substances cancérigènes présentent ce type d'étude ;
- les études présentant des expositions pendant une période de vie (« single-lifestage exposure studies »). Ces études concernaient uniquement 2 substances, la éthyl-N-

³⁶ Medline, topline, compilation d'études « Survey of compounds which have been tested for carcinogenic activity », bibliographie à partir de publications pertinentes et d'une base de données développées par Calabrese et Blain, 1999

³⁷ Critères de sélection : Groupes exposés à une seule substance chimique ou un seul mélange de cancérogènes, groupe d'études non compris par une forte toxicité non cancérogène liée au traitement, durée d'exposition + période d'observation escède 40 jour sauf si des animaux décèdent suite à des tumeurs, description de l'âge au début du traitement et au moment du sacrifice et l'incidence des tumeurs site-spécifique, présence d'un groupe témoin approprié à chaque période de la vie ou un témoin historique pour les tumeurs rares, étude chez des mammifères, au moins 10 animaux/groupe à moins que le design et la conduite de l'étude soit bien réalisé sur d'autres aspects (temps d'étude suffisamment long pour observer tumeurs liées au traitement) et que l'incidence des tumeurs soit assez élevée dans le groupe des animaux exposés et faible dans le groupe témoin, information sur le site des tumeurs, administration par alimentation, eau, gavage, intra-péritonéale, IV ou SC, préférence pour les études avec un examen histopathologique des tumeurs, non exclusion des études observant seulement un ensemble choisi d'organes/tissus si les sites examinés sont connus pour être les seuls tissus cible.

³⁸ Prénatale : conception à naissance

³⁹ Post-natale : naissance au sevrage (PND21)

⁴⁰ Juvénile : sevrage à la maturité sexuelle (PND22-49)

nitrosamine (DEN) et la N-éthyl-N-nitrosourée (ENU), retenues spécifiquement car présentant beaucoup de données.

L'OEHHA définit comme « expériences » des composantes d'une étude comprenant un groupe témoin et un ou plusieurs groupe(s) traité(s) exposés pendant au même moment de la vie et suivant un même protocole expérimental. Plusieurs « expériences » peuvent être réalisées dans une même étude.

Une analyse du mode d'action génotoxique a été réalisée. Parmi les 23 cancérogènes identifiés, 3 étaient considérés comme non génotoxiques et 20 comme génotoxiques dont 15 avec une activation métabolique et 5 sans activation métabolique. L'ENU et le DEN étaient considérés comme des substances génotoxiques (Figure 12).

<p>Cancérogènes génotoxiques nécessitant une activation métabolique</p> <p>Benzidine Benzo[a]pyrène Dibutylnitrosamine Diéthylnitrosamine (DEN) 7,12-Diméthylbenz[a]anthracène (DMBA) Diméthylnitrosamine (DMN) Di-n-propylnitrosamine (DPN) 1-éthyl-nitrosobiuret 2-hydroxypropylnitrosamine 3-hydroxynitrosamine 3-hydroxyxanthine 3-méthylcholanthrène (3-MC) 4-(méthylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) Safrole Uréthane Chlorure de vinyle</p> <p>Cancérogènes génotoxiques ne nécessitant pas d'activation métabolique</p> <p>Butylnitrosurée 1,2-Diméthylhydrazine Ethylnitrosourée (ENU) Méthylnitrosourée (MUN) β-propiolactone</p> <p>Cancérogènes non génotoxiques</p> <p>1,1-bis(p-chlorophénol)-2,2,2-trichloroéthane (DDT) Diéthylstilbestrol (DES) 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine (TCDD)</p>

Figure 12 : Liste des 23 substances cancérogènes classées selon leur mécanisme d'action génotoxique (OEHHA, 2009)

14 cancérogènes dont un non génotoxique disposaient d'études prénatales, 18 dont 2 génotoxiques d'études post-natales et 5 des études sur des animaux juvéniles. Pour le DEN, 3 études prénatales, 7 post-natales et 2 juvéniles ont été sélectionnées. Pour l'ENU, 5 études prénatales, 8 post-natales et 3 juvéniles ont été sélectionnées.

Afin de réaliser l'analyse quantitative, l'OEHHA a calculé, sous forme d'une distribution, un ERU (méthode LMS) pour chaque « expérience » et chaque site ou type de tumeurs (modélisation

Monte Carlo avec 100 000 itérations par expérience). L'OEHHA réalise un ratio des distributions des ERU enfance/adulte et obtient des « Lifestage potency (LP) ratios » :

- 22 ratios pour les études prénatales (14 cancérigènes),
- 55 ratios pour les études post-natales (18 cancérigènes),
- 7 ratios pour les études juvéniles (5 cancérigènes).

Le LP ratio caractérise la sensibilité inhérente aux premiers âges de la vie aux cancérigènes en comparant le potentiel cancérigène d'individus suivis sur des périodes de temps similaires et exposés de la même façon mais à des âges différents.

L'OEHHA a alors combiné les « LP ratios » pour chaque substance cancérigène et chaque période de la vie pour obtenir une distribution « LP ratio mixture distribution ».

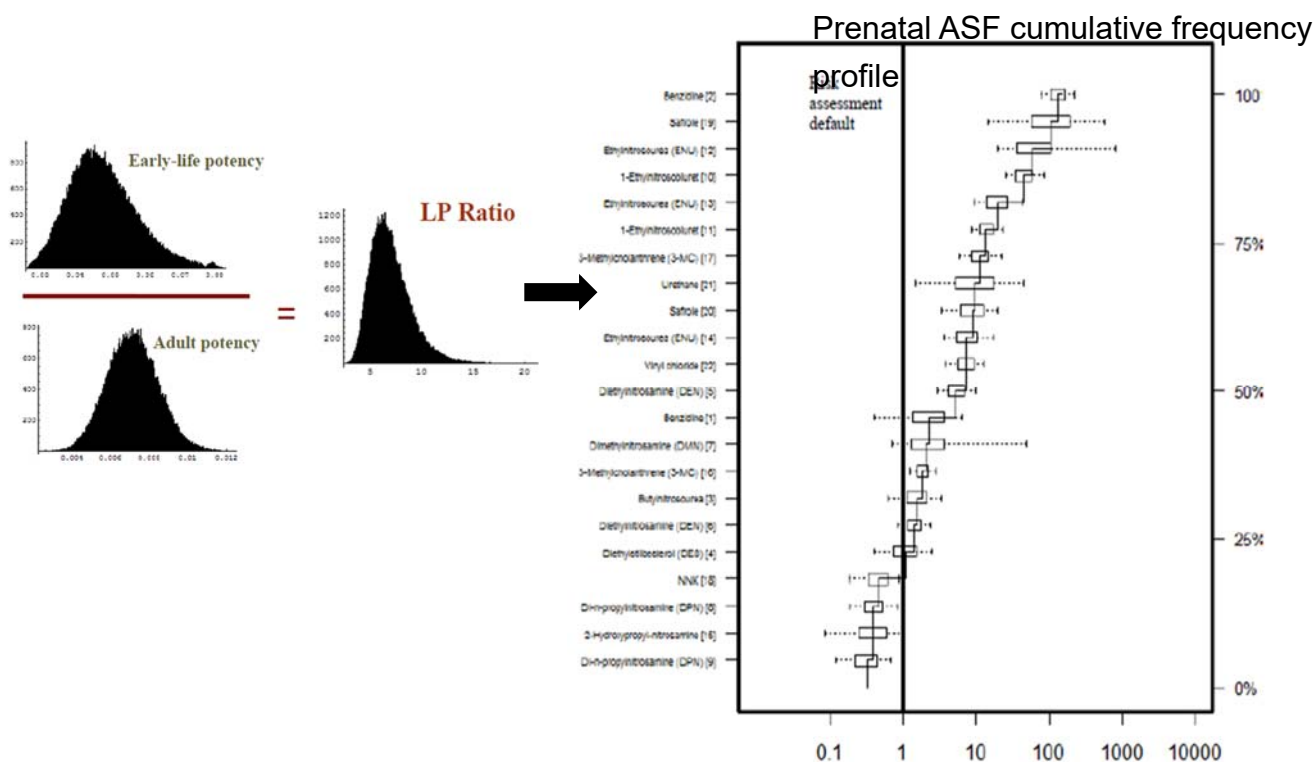


Figure 13 : « LP ratio mixture distribution » pour les études prénatales (OEHHA, 2009)

L'ajustement sur l'âge des ERU doit prendre en compte le temps d'apparition du cancer après une exposition pendant l'enfance. Les données empiriques chez l'animal et l'Homme montrent que le risque de cancer augmente avec l'âge et/ou le temps depuis la 1^{ère} exposition. Bien que l'incidence de certains cancers augmente avec l'âge à la puissance 6, l'approche suivie par le NTP (analyse des incidences de tumeurs dans les études chroniques) considère que le risque de cancer augmente avec l'âge à la puissance 3. Afin de prendre en compte le délai d'apparition du cancer, l'OEHHA a multiplié les LP ratio par un facteur prenatal en compte le moment d'administration égal à 3 pour le LP ratio prénatale, 2,9 pour le LP ratio post-natale et 2,7 pour le LP ratio juvénile (Figure 10).

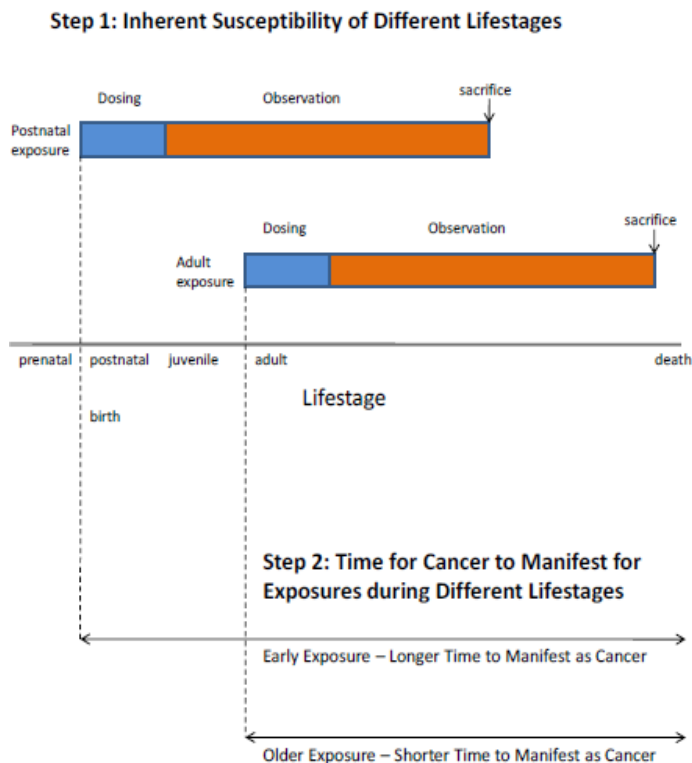


Figure 14 : Dependance à l'âge de la survenue de cancer (OEHHA, 2009)

Ainsi, des ASF ont été obtenus pour chaque « expérience » en calculant d'abord un LP Ratio prenant en compte la susceptibilité au plus jeune âge par rapport à l'âge adulte puis en considérant l'effet des années nécessaires pour développer une tumeur après l'exposition à un cancérigène (Figure 15).

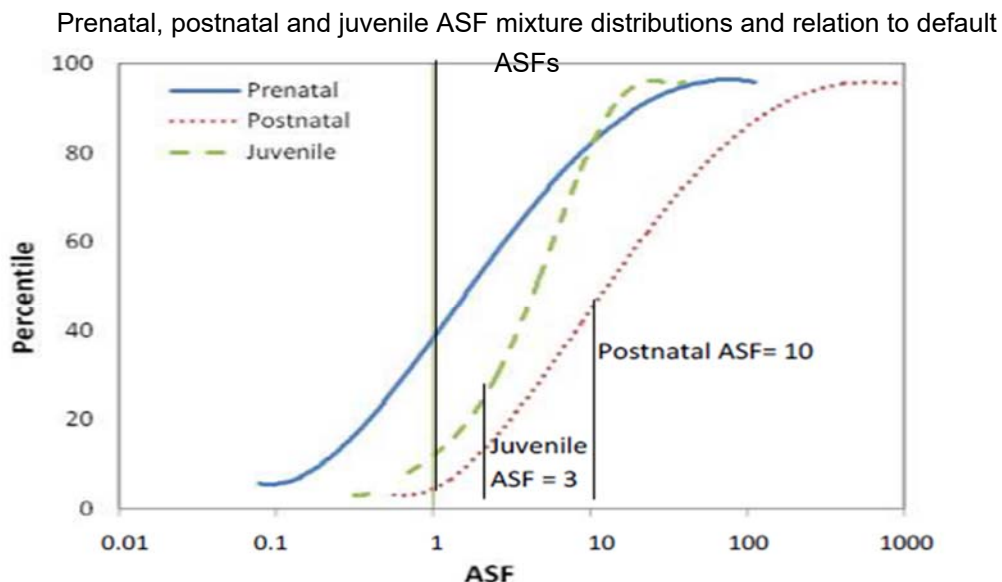


Figure 15 : Distributions des « ASF mixture distributions » pour les études prénatales, post-natales et juvéniles (OEHHA, 2009)

Si la distribution de l'ASF dépasse 1, alors l'exposition pendant l'enfance à des cancérogènes entraîne une réponse cancérogène plus forte en comparaison à une exposition à l'âge adulte et inversement si la distribution s'étend en dessous de 1. La médiane de « ASF mixture distribution » est de 2,9 pour les études prénatales, de 13,5 pour les études post-natales et de 4,5 pour les études juvéniles.

Au vu de la faible quantité de données disponibles dans cette analyse (études et substances chimiques) et l'étendue des distributions pour les différentes substances, il est très difficile de proposer un facteur par défaut pour des expositions prénatales, post-natales et juvéniles. De plus, pour les mêmes raisons, l'OEHHA ne trouve pas raisonnable de proposer des valeurs par défaut d'ASF avec une plus grande précision que la moitié d'une unité logarithmique (1, 3, 10, 30, etc.). De plus, les rongeurs naissent à un stade de maturité qui correspond au 3^{ème} trimestre de grossesse chez Homme. Ainsi, l'OEHHA propose comme valeurs par défaut :

- 10 du 3^{ème} trimestre de grossesse à moins de 2 ans (10 étant juste en-dessous de la médiane estimée des ASF pour les études post-natales, il existe une forte sensibilité aux cancérogènes lors d'une exposition post-natale avec des divisions cellulaires rapides et une différenciation de différents organes),
- 3 pour les enfants de 2 ans à 15 ans (proche de la médiane estimée des ASF pour les études juvéniles et cohérent avec l'écart des estimations dérivées à partir des études d'expositions à différentes étapes de la vie),
- 1 à partir de 16 ans.

L'OEHHA applique ces ASF à tous les cancérogènes quel que soit leur mode d'action contrairement à ce que propose l'US EPA. Selon l'OEHHA, l'enfance constitue une période de sensibilité aux cancérogènes non mutagènes (ex : diéthylstilbestrol). De plus, il peut être difficile de définir un mode d'action mutagène. Enfin, les cancérogènes pourraient avoir plusieurs modes d'action et un mode d'action pourrait être prédominant à une période donnée de la vie. Ainsi, la complexité de la cancérogénèse est contraire à une restriction d'application des ASF aux seuls composés cancérogènes mutagènes.

Ces ASF s'appliquent lors du calcul du risque et non sur l'excès de risque unitaire lui-même.

L'OEHHA ne propose pas d'ASF par défaut pour les 2 premiers trimestres de grossesse du fait de la variabilité importante des données pour les différents cancérogènes et du peu de données pour faire l'analyse. Il recommande cependant une évaluation au cas par cas si des données sont disponibles.

L'OEHHA peut recommander l'application d'ASF spécifique à la puberté pour les cancérogènes induisant des cancers des organes reproducteurs et les organes annexes ou agissant selon un mode d'action hormonal qui subissent pendant cette période une croissance impliquant des divisions cellulaires rapides et une différenciation des cellules.

Annexe 11 : Questions incluses dans ToxRTool pour l'évaluation de la qualité des études *in vivo*

Titre de l'étude et référence bibliographique	
Critères en rouge : le score maximal est nécessaire pour ces critères afin d'atteindre les catégories 1 ou 2	
Critères	
No.	Groupe de critères I : identification de la substance testée
1	La substance testée a-t-elle été identifiée ?
2	La pureté de la substance est-elle renseignée ?
3	Des informations sur la source/l'origine de la substance sont-elles renseignées ?
4	Toutes les informations sur la nature et/ou les propriétés physico-chimiques de la substance à tester (que vous estimez <u>indispensables</u> pour juger les données) sont-elles fournies ?
No.	Groupe de critères II: caractérisation de l'organisme testé
5	L'espèce est-elle renseignée ?
6	Le sexe de l'organisme testé est-il renseigné ?
7	Des informations sur la souche de l'animal testé sont-elles fournies et d'autres spécifications, si elles sont considérées comme nécessaires pour juger l'étude, sont-elles fournies ?
8	L'âge et le poids corporel des organismes testés au démarrage de l'étude sont-ils renseignés ?
9	<u>Pour les études de toxicité répétée</u> uniquement : des informations concernant les conditions d'alimentation et d'encagement sont-elles fournies ?
No.	Groupe de critères III: description du protocole de l'étude
10	La voie d'administration est-elle renseignée ?
11	Les doses ou concentrations administrées dans le véhicule sont-elles renseignées ?
12	La fréquence et la durée de l'exposition ainsi que le moment de l'observation sont-ils expliqués ?
13	Des contrôles négatifs (lorsque requis) et positifs (lorsque requis) sont-ils inclus ?
14	Le nombre d'animaux (dans le cas d'études chez l'Homme : nombre de personnes testées) par groupe est-il renseigné ?
15	Les détails fournis sur le mode d'administration sont-ils suffisants pour juger l'étude ?
16	<u>Pour les études par inhalation et les études de toxicité à doses répétées</u> uniquement : les concentrations atteintes sont-elles vérifiées analytiquement, ou la stabilité de la substance testée vérifiée autrement ou rendue plausible ?
No.	Groupe de critères IV: documentation des résultats de l'étude
17	Le(s) effet(s) étudié(s) de l'étude et leur(s) méthode(s) de détermination sont-ils

	clairement décrits ?
18	La description des résultats et de tous les effets étudiés investigués dans l'étude est-elle transparente et complète ?
19	Les méthodes statistiques appliquées pour l'analyse des données sont-elles renseignées et appliquées de façon transparente ?
No.	Groupe de critères V : plausibilité du protocole de l'étude et des résultats
20	Le protocole de l'étude est-il approprié pour obtenir les données spécifiques de la substance ?
21	Les résultats de l'étude <u>quantitatifs</u> sont-ils fiables ?
Documentation optionnelle d'observations importantes pour la pertinence (ne fait pas partie de l'évaluation de la fiabilité)	
Quel est le but de cette évaluation de la qualité (documentation pour utilisation sous REACH, activités de validation ECVAM, autres) ?	
L'étude est-elle conduite selon des lignes directrices OCDE ou UE récentes (ou d'autres lignes directrices, telles que des lignes directrices nationales) ?	
(S'il ne s'agit pas d'une étude suivant des lignes directrices) : Existe-t-il des lignes directrices pour les effets critiques étudiés dans l'étude ?	
Avez-vous connaissance de déviations des lignes directrices dans l'étude évaluée ? Si oui, lesquelles ?	
Avez-vous fait des observations importantes pour l'utilisation réglementaire des données (par exemple qu'une étude avec exposition en corps entier a été réalisée, alors que la substance testée présente une absorption percutanée profonde, ce qui conduit à un apport percutané substantiel en plus de l'apport par inhalation) ?	

Annexe 12 : Revue des méthodes de construction des VTR cancérigènes sans seuil

Deux exemples seront détaillés ci-dessous afin de présenter les notions et définitions des différents critères appliqués lors de la construction d'une VTR cancérigène, et d'illustrer plus précisément les différences méthodologiques entre un organisme de référence dans la production de VTR cancérigènes, l'US EPA, et un organisme d'autorité européenne ayant publié récemment une prise de position sur ce sujet, l'EFSA.

• US EPA

L'agence américaine pour la protection de l'environnement (US EPA) possède une solide expérience en matière d'élaboration de VTR pour les substances cancérigènes puisque le premier document méthodologique relatif à ce sujet date de 1986 et que plusieurs centaines de VTR pour des substances cancérigènes ont été construites et sont accessibles sur la base de donnée IRIS (US EPA, 1986). Ce cadre méthodologique a été révisé en 1999 et plus récemment en 2003 dans un souci d'intégration des avancées scientifiques relatives à la compréhension des mécanismes de cancérogénèse et de commentaires issus de l'expérience (US EPA, 1996a, 1999, 2005a et b). La méthode adoptée en 1986 proposait de retenir des études épidémiologiques ou animales comme étude clé pour dériver la VTR. Le cancer était reconnu comme un effet sans seuil. Il était demandé d'employer le modèle LMS ou un modèle *time-to-tumor* si les informations sur la durée d'apparition des tumeurs étaient disponibles. Par défaut, ce même modèle était ensuite appliqué pour extrapoler la relation dose-effet vers les très faibles doses jusqu'au niveau de risque de cancer considéré comme acceptable (10^{-6} pour l'US EPA).

La méthode adoptée en 1999 est considérablement plus détaillée (Science advisory board, 1997 ; US EPA, 1996a et 1999). Une place centrale est accordée au mode d'action cancérogène. De nombreux choix méthodologiques dans l'élaboration de la relation dose-réponse sont conditionnés par ce mode d'action et des critères pour apprécier sa qualité sont proposés.

Dans cette méthode, à l'inverse de la précédente, **l'étape d'interpolation⁴¹ des données expérimentales et celle d'extrapolation vers les faibles doses sont clairement séparées** et utilisent des modèles différents. Pour l'interpolation des données expérimentales de la courbe dose-réponse, tous les modèles existants sont utilisables (ex : modèle multi-étapes linéarisé, modèle Weibull etc.). Le choix est davantage fondé sur la qualité de l'ajustement aux données expérimentales que sur la plausibilité biologique du mode d'action. Ce modèle, retenu pour l'interpolation, permet de choisir le **POD** de l'extrapolation aux faibles doses, c'est-à-dire un point de la courbe dose-réponse modélisée, peu éloigné des données expérimentales pour conserver une certaine confiance dans sa validité. Les POD utilisables par défaut sont respectivement, la limite inférieure de l'intervalle de confiance de la dose produisant 10 % d'augmentation de

⁴¹ Détermination approchée d'une donnée manquante à partir d'informations disponibles encadrant cette donnée

l'incidence tumorale estimée par le modèle (BMD_{10L}) et le niveau de risque correspondant au LOAEL ou au NOAEL.

L'étape d'extrapolation aux faibles doses repose sur l'extrapolation linéaire à l'origine à partir du POD, réputée plus protectrice pour la santé publique (US EPA, 2005a et b). Cette extrapolation linéaire est utilisée par défaut.

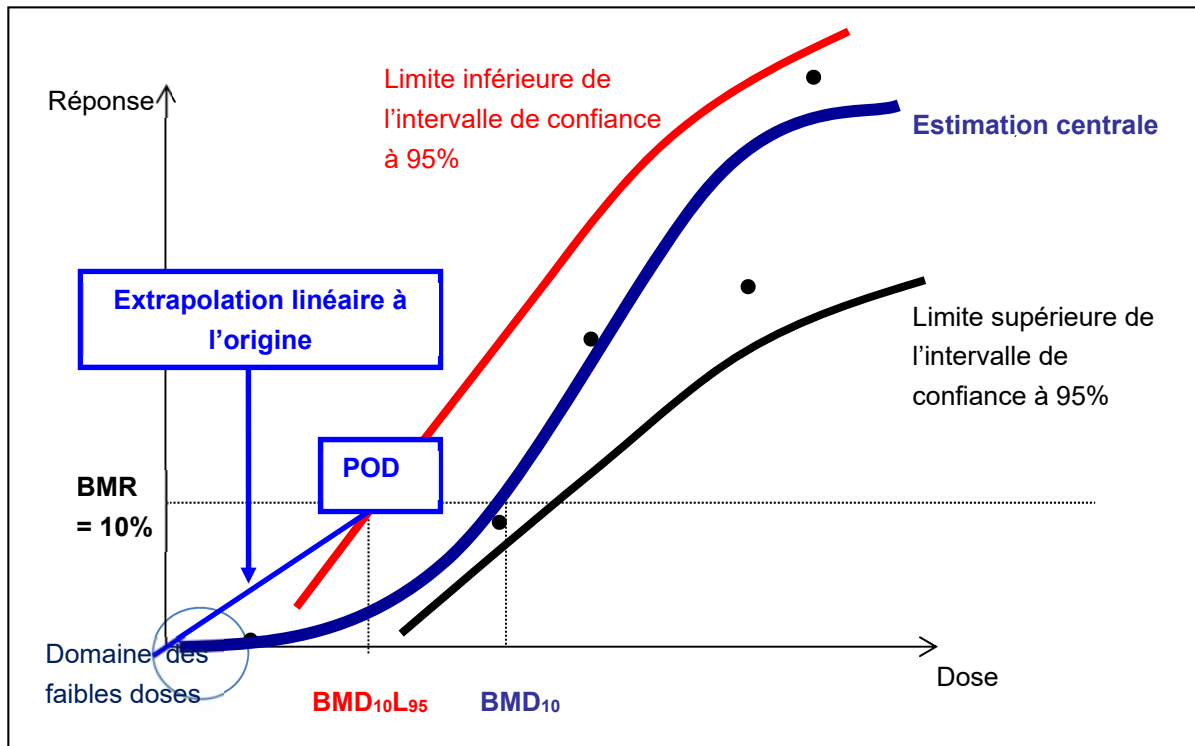


Figure 16 : Détermination du POD et extrapolation linéaire aux faibles doses

En 2005, l'US EPA a proposé une nouvelle méthode de construction de VTR pour les substances cancérigènes (US EPA, 2005a), accompagnée d'un document traitant de la prise en compte d'une éventuelle hypersensibilité aux substances cancérigènes si l'exposition se produit pendant les premières années de la vie (US EPA, 2005b). Les principales différences avec la méthode précédente sont :

- le renforcement de l'utilisation des données sur le mode d'action pour réduire les incertitudes de la démarche ;
- la clarification des conditions permettant le recours aux hypothèses par défaut, cohérentes avec d'autres méthodes et concepts comme par exemple le principe de précaution ;
- la prise en compte des susceptibilités individuelles qu'elles soient liées à l'âge, au mode de vie ou génétiques avec une préoccupation particulière pour les enfants.

- **EFSA**

En 2005, l'autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) a publié un rapport sur l'évaluation des risques associés à l'exposition alimentaire à des substances cancérigènes génotoxiques (EFSA, 2005). Jusqu'alors, le seul éclairage scientifique donné sur cette question au gestionnaire des risques était de réduire l'exposition à des niveaux aussi faibles que possible (principe ALARA⁴²).

Dans ce rapport, faute de données scientifiques suffisantes, il est admis par défaut l'hypothèse d'absence de seuil pour les substances cancérigènes génotoxiques. Les modèles permettant habituellement le calcul de cet excès de risque sont jugés trop éloignés de toute réalité biologique, et il est proposé d'appliquer une méthode par calcul d'une marge d'exposition (MOE). Le point de départ de cette méthode, dérivé des observations expérimentales, peut être : soit la limite inférieure de l'intervalle de confiance à 95 % de la BMD associée à 10 % d'effet, soit la T25 si le calcul de cette BMD n'est pas possible. La T25 est déterminée sans prendre en compte l'ensemble de la relation dose-réponse et correspond à la dose/concentration pour laquelle une augmentation de l'incidence tumorale par rapport au groupe témoin est de 25%.

Le calcul de la marge d'exposition à partir de ce point est présenté comme une méthode permettant ainsi de hiérarchiser les risques et il est rappelé que seul le gestionnaire peut décider de l'acceptabilité de tel ou tel risque pris individuellement. Toutefois, le comité scientifique propose une marge d'exposition de référence intégrant des facteurs prenant en compte les différences inter-espèces (10), interindividuelle (10), la nature de l'effet cancérigène (10) et le fait que la BMD ne soit pas une dose sans effet (10). Au final, une marge d'exposition de référence de 10 000 (25 000 si la T25 est utilisée) est proposée comme seuil pour considérer qu'une priorité d'action est « faible » (et non qu'un risque est négligeable).

Cette prise de position constitue une approche intéressante, proche des méthodes de Santé Canada, du NHMRC et de la prise de position de l'ECETOC. Toutefois, elle est surtout présentée par ses auteurs comme une méthode pour définir des priorités de gestion, hiérarchiser des risques, et non pour construire une VTR cancérigène.

⁴² ALARA : *As low as reasonably achievable*

Annexe 13 : Méthodes de fixation des niveaux de confiance des VTR proposées par les différents organismes nationaux et internationaux

- **US EPA**

Pour ce qui concerne les **VTR à seuil de dose** (RfC et RfD), le niveau de confiance est basé sur deux critères : l'étude clé et l'ensemble des données. Pour chacun de ces critères, un niveau fort, moyen ou faible est fixé. En fonction de ces 2 critères, un niveau de confiance global de la VTR est défini comme fort, moyen ou faible.

En 1993, l'US EPA a fixé des critères permettant de choisir le niveau de confiance à appliquer à une RfD (US EPA, 1993). Ainsi, un niveau de confiance élevé est préconisé lorsque la VTR est basée sur des données humaines (pas d'extrapolation inter-espèce), lorsque le recueil de données est robuste (données épidémiologiques et/ou toxicologiques couvrant de nombreux effets des durées d'exposition variées, les différentes périodes de la vie, des sous-groupes de population différents, etc.), lorsqu'il existe des preuves d'un mécanisme d'action toxique transposable à l'Homme et lorsqu'il est peu probable que la VTR sera révisée dans le futur. A l'inverse, un niveau de confiance faible est donné lorsque la quantité et la qualité des données est limitée, lorsque le recueil de données est « minimal » (pas de données humaines, données de toxicité limitées, pas d'effet grave observé) et/ou lorsque des données supplémentaires sont susceptibles d'entraîner une révision de la VTR.

La méthode de construction de VTR à seuil pour la voie inhalée (US EPA, 1994b) indique que le niveau de confiance est fonction de la confiance dans la qualité de l'étude et dans la quantité de données disponibles. Ainsi, un niveau de confiance élevé est recommandé quand l'ensemble des données comprend l'étude d'une large gamme d'effets toxiques, quand la VTR est établie à partir d'études chroniques chez des espèces de mammifères variées établissant un $NOAEL_{HEC}$ (*NOAEL équivalent humain*) explicite, ou quand il est peu probable que le niveau de la RfC changerait si plus de données étaient disponibles.

En 2002, l'US EPA a publié une revue des approches existantes pour les VTR à seuil pour les voies orales et inhalées (US EPA, 2002). L'US EPA recommande une approche descriptive plutôt que de fixer un niveau de confiance fort, moyen ou faible. Cette approche narrative est préconisée pour mettre l'accent sur l'ensemble de données disponibles mais également sur les recherches nécessaires pour combler le manque/l'absence de données qui pourraient améliorer la construction de VTR. De plus, l'US EPA recommande l'utilisation du plus grand nombre de données possible pour construire une VTR en prenant en compte les différentes périodes de la vie, les fenêtres d'exposition, la durée et la voie d'exposition, la réversibilité des effets, etc. Afin de caractériser l'ensemble des données, l'US EPA a développé une classification, dite « minimale » ou « robuste », afin de décrire l'ensemble des données utilisables pour construire une VTR. Ainsi, le minimum de données permettant de fixer un niveau de confiance faible peut correspondre à une seule étude subchronique disponible. A l'inverse, un niveau élevé de confiance peut être attribué dans le cas où l'on dispose, dans le cas d'une VTR basée sur un effet reprotoxique, au minimum d'une étude chronique sur deux espèces, d'une étude reprotoxique sur deux générations et d'une étude sur le développement sur trois espèces pour la voie d'exposition appropriée. L'US EPA

insiste sur l'importance du jugement d'experts dans le résumé des données disponibles mais aussi sur les forces et les limites de cette approche.

Pour ce qui concerne les **VTR sans seuil de dose**, l'US EPA recommande de discuter des forces et des limites de l'évaluation dose-réponse en soulignant les problèmes rencontrés dans la construction de la VTR (US EPA, 2005a). Le document guide pour l'évaluation des risques cancérigènes (2005) consacre un chapitre aux incertitudes de la relation dose-réponse. En revanche, il ne précise pas de critères permettant de fixer un niveau de confiance.

En résumé, l'US EPA recommande, pour les VTR à seuil et sans seuil, une approche descriptive décrivant les forces et les limites de la construction de la VTR et dans le cas des VTR à seuil de fixer un niveau de confiance global. Un chapitre spécifique nommé « Discussion of confidence » est présent dans le résumé IRIS pour chaque VTR à seuil et sans seuil.

- **OEHHA (Cal-EPA)**

L'OEHHA produit plusieurs types de VTR que ce soit pour une exposition aiguë ou chronique :

- pour les effets à seuil, les VTR sont appelées « Reference exposure Level »,
- pour les effets sans seuil, les VTR sont nommées « Cancer slope factor » pour une exposition par ingestion et « Unit Risk Factor » pour une exposition par inhalation.

Dans le cas des VTR chroniques, le résumé toxicologique comprend une partie consacrée aux forces et aux limites de la construction de la VTR (« *Data Strengths and Limitations for Development of the REL* »). En ce qui concerne les VTR aiguës, aucune description du niveau de confiance de la VTR n'est proposée. Enfin, pour 6 substances dont les VTR ont été construites à partir de la dernière méthode de construction (OEHHA, 2008), la construction de la VTR est décrite en expliquant les différents choix (étude clé, effet critique, dose critique, facteurs d'incertitude) et est suivie par une description des atouts (par exemple, la qualité de l'étude clé, la durée d'exposition, l'utilisation de données épidémiologiques, la convergence des études, etc.) et des limites de la VTR (par exemple, absence ou manque de données, absence de NOAEL dans l'étude clé, etc.). Cette nouvelle méthode préconise une analyse descriptive des forces et des incertitudes de chaque construction de VTR.

En ce qui concerne les VTR sans seuil, aucune information concernant les niveaux de confiance n'a été trouvée.

- **ATSDR**

L'ATSDR ne fixe pas de niveau de confiance à proprement parler pour ses VTR (MRL ou Minimum risk level) et considère que la confiance des MRLs se traduit par les différents facteurs d'incertitudes choisis et leur valeur numérique, ainsi que par la confiance dans les données disponibles. Chaque choix de construction est expliqué et justifié permettant ainsi aux lecteurs de comprendre la construction des VTR et ses incertitudes.

- **Santé Canada**

Santé Canada fixe des niveaux de confiance aux VTR qu'il construit. Il existe trois niveaux de confiance : « élevé », « modéré » et « faible », qu'il est possible de combiner (par exemple, faible à modéré ou modéré à fort). Pour chaque substance appartenant à la deuxième Liste des substances d'intérêt prioritaire (LSIP2) et ayant fait l'objet d'une évaluation, une partie est consacrée aux incertitudes et aux niveaux de confiance. Ce chapitre, nommé « Incertitudes et degré de confiance dans la caractérisation du risque pour la santé humaine », traite entre autres du degré de confiance des VTR construites par Santé Canada.

- **RIVM**

Dans son rapport de 2001 (RIVM, 2001 et 2009), le RIVM indique que le niveau de confiance des VTR à seuil et sans seuil (« reliability ») dépend de la quantité et de la qualité des données. La fiabilité de la VTR (MPR ou Maximum Permissible Risk) est qualifiée de haute, moyenne ou faible et résulte d'un jugement d'experts basé sur :

La durée de l'étude : une VTR est spécifique d'une durée d'exposition. Les études à partir desquelles une VTR est dérivée doit être, de préférence, une étude chronique. Ainsi, si des études chroniques ou subchroniques ne sont pas disponibles, le niveau de confiance de la VTR sera alors faible ou, au mieux, moyen.

La quantité de données : la toxicité d'une substance est mieux caractérisée s'il existe des études différentes chez plusieurs espèces, avec des protocoles variés, et réalisées par diverses équipes. En revanche, si l'on dispose seulement d'études sur la même espèce ou d'un petit nombre d'études, le niveau de confiance de la VTR sera, au mieux, moyen.

L'étude clé : le protocole de l'étude clé doit permettre d'établir la significativité d'un effet toxique et d'établir une relation dose-réponse. Dans la mesure du possible, l'effet toxique doit être étayé par des données histopathologiques, des observations microscopiques, des études sur le mécanisme moléculaire, etc.

Une VTR est qualifiée de bonne qualité lorsqu'elle résulte de l'évaluation par un comité d'experts de renommée internationale et qu'il existe un consensus international sur la nature et la sévérité d'un effet toxique.

Le RIVM précise dans son rapport de 2001 que la qualification des niveaux de confiance est de nature approximative due à la méthode de construction elle-même.

- **OMS/IPCS**

L'OMS/IPCS consacre un chapitre aux incertitudes de l'évaluation des risques dans les rapports CICAD (Concise International Chemical Assessment Document) dans lequel est discuté entre autres le niveau de confiance dans les VTR construites. Ainsi, de façon non systématique, un niveau de confiance haut, moyen ou faible est fixé et justifié pour chaque critère tel que le choix de l'effet critique, sa transposition à l'Homme, la qualité et la quantité des données disponibles, etc. Cependant, un niveau de confiance global n'est pas déterminé (OMS, 1999).

Annexe 14 : Outil de fixation des niveaux de confiance

Grille pour les VTR à seuil

		Outil d'analyse des incertitudes lors de l'élaboration d'une VTR à seuil			
		ÉVALUATEUR 1		ÉVALUATEUR 2	
		Nom de l'évaluateur	Date de l'évaluation	Nom de l'évaluateur	Date de l'évaluation
		Niveau de confiance (1 à 5)	Argumentation de l'évaluateur	Niveau de confiance (1 à 5)	Argumentation de l'évaluateur
Substance					
N° CAS					
Type de VTR construite : durée d'application, voie					
Statut REACH					
Tonnage					
Classification harmonisée					
Autre classification (CIRC, Perturbateur endocrinien, etc.)					
Corpus de données	Quantité et qualité	Choisir		Choisir	
Choix de l'effet critique Type d'effet :	Nature de l'effet	Choisir		Choisir	
	Convergence des études	Choisir		Choisir	
	MOA (chez l'animal et chez l'Homme)	Choisir		Choisir	
	Transposabilité animal --> Homme	Choisir		Choisir	
	Confiance pour le critère "choix de l'effet critique"	0,0		0,0	
Hypothèse de construction	À seuil par défaut				
Choix de l'étude (ou des études) clé Référence(s) :	Qualité de l'étude	Choisir		Choisir	
	Durée	Choisir		Choisir	
	Confiance pour le critère "choix de l'étude clé"	#VALEUR!		#VALEUR!	
	Suivi de principes scientifiques tels que : BPL, lignes directrices (OCDE, EPA, etc.), ...				
Choix de la dose critique	BMD/BMDL, NOAEL/LOAEL, NOAEL seul ou LOAEL seul	Choisir un paramètre -		Choisir un paramètre -	
Ajustements	Temporel				
	Allométrique	Choisir un paramètre ajustement allométrique FAUX		Choisir un paramètre -	
Choix UF	UF _A				
	UF _H	Choisir		Choisir	
	UF _L				
	UF _S				
	UF _D				
Extrapolation voie à voie	Présence et justification	Choisir		Choisir	
Niveaux de confiance	Niveau de confiance global	#VALEUR!		#VALEUR!	
	Niveau de confiance final (argumentation obligatoire si différent de la valeur attribuée automatiquement ; à valider en CES)				

Grille pour les VTR cancérrogènes à seuil

		Outil d'analyse des incertitudes lors de l'élaboration d'une VTR cancérrogène à seuil			
		ÉVALUATEUR 1		ÉVALUATEUR 2	
		Nom de l'évaluateur	Date de l'évaluation	Nom de l'évaluateur	Date de l'évaluation
		Niveau de confiance (1 à 5)	Argumentation de l'évaluateur	Niveau de confiance (1 à 5)	Argumentation de l'évaluateur
Substance					
N° CAS					
Type de VTR construite : durée d'application, voie					
Statut REACH					
Tonnage					
Classification harmonisée REACH					
Autre classification (CIRC, EPA, CLP, Perturbateur endocrinien, etc.) (Par exemple "CIRC 2A")					
Corpus de données	Quantité et qualité	Choisir		Choisir	
Hypothèse de construction	Avec seuil	Choisir		Choisir	
Choix de l'effet critique Type d'effet :	Convergence des études	Choisir		Choisir	
	MoA (chez l'animal et chez l'Homme)	Choisir		Choisir	
	Transposabilité animal --> Homme	Choisir		Choisir	
	Confiance pour le critère "choix de l'effet critique"	0,0		0,0	
Choix de l'étude (ou des études) clé Référence(s) :	Qualité de l'étude	Choisir		Choisir	
	Suivi de principes scientifiques tels que : BPL, lignes directrices (OCDE, EPA, etc.), ...				
Choix de la dose critique	BMD/BMDL, NOAEL/LOAEL, NOAEL seul ou LOAEL seul	Choisir un paramètre -		Choisir un paramètre -	
Ajustements	Temporel				
	Allométrique	Choisir un paramètre ajustement allométrique FAUX		Choisir un paramètre -	
Choix UF	UF _A				
	UF _w	Choisir		Choisir	
	UF _L				
	UF _S				
	UF _D				
Extrapolation voie à voie	Présence et qualité	Choisir		Choisir	
Niveaux de confiance	Niveau de confiance global	#VALEUR!		#VALEUR!	
	Niveau de confiance final (argumentation obligatoire si différent de la valeur attribuée automatiquement ; à valider en CES)				

Grille pour les VTR cancérogènes sans seuil

		Outil d'analyse des incertitudes lors de l'élaboration d'une VTR basée sur des effets cancérogènes sans seuil			
		ÉVALUATEUR 1		ÉVALUATEUR 2	
		Nom de l'évaluateur	Date de l'évaluation	Nom de l'évaluateur	Date de l'évaluation
		Niveau de confiance (1 à 5)	Argumentation de l'évaluateur	Niveau de confiance (1 à 5)	Argumentation de l'évaluateur
Substance					
N° CAS					
Type de VTR construite : durée d'application, voie					
Statut REACH					
Tonnage					
Classification harmonisée REACH					
Autre classification (CIRC, EPA, CLP, Perturbateur endocrinien, etc.) (Par exemple "CIRC 2A")					
Corpus de données	Quantité et qualité	Choisir		Choisir	
Hypothèse de construction	Sans seuil	Choisir		Choisir	
Choix de l'effet critique Type d'effet :	Convergence des études	Choisir		Choisir	
	MoA (chez l'animal et chez l'Homme)	Choisir		Choisir	
	Transposabilité animal --> Homme	Choisir		Choisir	
	Confiance pour le critère "choix de l'effet critique"	0,0		0,0	
Choix de l'étude (ou des études) clé Référence(s) :	Qualité	Choisir		Choisir	
	Suivi de principes scientifiques tels que : BPL, lignes directrices (OCDE, EPA, etc.), ...				
Choix de la dose critique	BMD/BMDL, NOAEL/LOAEL, NOAEL seul ou LOAEL seul	Choisir un paramètre -		Choisir un paramètre -	
Ajustements	Temporel				
	Allométrique	Choisir un paramètre ajustement allométrique FAUX		Choisir un paramètre -	
Extrapolation voie à voie	Présence et qualité	Choisir		Choisir	
Extrapolation à l'origine					
Niveaux de confiance	Niveau de confiance global	#VALEUR!		#VALEUR!	
	Niveau de confiance final (argumentation obligatoire si différent de la valeur attribuée automatiquement ; à valider en CES)				

Afin de tenir compte des incertitudes inhérentes à la caractérisation des dangers, un outil a été construit, permettant d'attribuer de manière harmonisée un niveau de confiance aux VTR élaborées ou choisies.

- **Principe**

Chaque étape de la construction d'une VTR pouvant être source d'incertitude (ECHA, 2012), il a été décidé de baser l'outil sur ces étapes. Cet outil ayant pour but d'être utilisé par les agents et les experts de l'Anses, il a été construit en s'appuyant sur le guide d'élaboration de VTR de l'Anses. Cet outil se fonde sur la méthode actuellement appliquée à l'Agence pour traiter les incertitudes. Il s'agit de fixer un niveau de confiance pour différents critères, puis de combiner ces niveaux pour déterminer un niveau de confiance global pour la VTR. Dans l'outil, ces critères correspondent aux étapes d'élaboration des VTR. Les niveaux de confiance traitent ici à la fois la variabilité et les incertitudes inhérentes à l'évaluation.

Un **niveau de confiance de 1 à 5** doit être affecté à chacune des sources d'incertitude listées dans l'outil. Le niveau de confiance global, automatiquement calculé par l'outil, peut prendre cinq valeurs (Figure 17) :

- le niveau 1 qui correspond à une confiance faible,
- les niveaux 2 et 3 à une confiance moyenne,
- les niveaux 4 et 5 à une confiance élevée.



Figure 17 : Représentation schématique de la division du continuum de confiance en cinq niveaux et terminologie qualitative correspondante

Aucune combinaison de ces différents niveaux ne pouvant être proposée, l'attribution des niveaux de confiance se fait *via* des menus déroulants. Dans un souci de clarté, une décimale est indiquée dans l'outil pour le niveau de confiance calculé pour chaque critère, ainsi que pour le niveau de confiance global. En revanche, il a été décidé que le niveau global final, validé en CES, devait être un nombre entier puisqu'il a été choisi d'approximer le continuum de confiance en 5 niveaux entiers discontinus.

Les **critères potentiellement source d'incertitude** ont été listés dans l'outil et cités ci-après. Certains ont été divisés en plusieurs sous-critères afin que l'évaluateur tienne compte de tous les aspects qui les caractérisent (Tableau 16).

Tableau 16: Critères correspondant aux différentes étapes de construction d'une VTR et leur subdivision en sous-critères (ou détails du critère)

Critères	Sous-critères (ou détails du critère)
Corpus de données	Quantité et qualité
Hypothèse de construction	Avec ou sans seuil
Choix de l'effet critique	Nature de l'effet (cas des VTR non cancérogènes)
	Convergence des études
	Mode d'action
	Transposabilité de l'animal à l'Homme
Choix de l'étude clé	Qualité de l'étude
	Durée de l'étude (cas des VTR non cancérogènes)
Choix de la dose critique	LOAEL seul ou NOAEL seul, couples LOAEL/NOAEL ou BMD/BMDL
Ajustements	Ajustement temporel
	Ajustement allométrique
Choix des facteurs d'incertitude (cas de VTR basées sur des effets à seuil)	UF _A
	UF _H
	UF _L
	UF _S
	UF _D
Extrapolation voie-à-voie	Présence et qualité
Extrapolation aux faibles doses (cas de VTR basées sur des effets cancérogènes sans seuil)	Extrapolation linéaire à l'origine

Certains paramètres ou critères ont été grisés. Cela signifie qu'aucun niveau de confiance ne leur est attribué, soit car ils ont été considérés comme n'étant pas source d'incertitude, soit car bien qu'étant à l'origine d'incertitudes, celles-ci ont été prises en compte dans les autres critères. Néanmoins, ils ont été indiqués car ils correspondaient à l'une des étapes de la construction des VTR.

À chaque critère ou sous-critère doit être attribué un niveau de confiance. Dans les cas où plusieurs sous-critères caractérisent un critère (cas des critères « choix de l'effet critique » et « choix de l'étude clé »), l'évaluateur doit attribuer un niveau de confiance à chaque sous-critère. L'algorithme présent dans l'outil calcule alors automatiquement le niveau de confiance entre 1 et 5 associé au critère, en réalisant une moyenne des niveaux de confiance de ces sous-critères. Si le critère n'est pas divisé en plusieurs sous-critères, l'évaluateur attribue le niveau de confiance directement au critère.

Une fois un niveau attribué à chaque critère, **le niveau de confiance global** (encadré en rouge) **est établi automatiquement** en réalisant une moyenne pondérée des niveaux de chaque critère. Un même poids est attribué à chacun, à l'exception du critère « choix de l'effet critique », auquel est attribué un poids double. En effet, ce critère a une importance majeure dans la détermination du niveau de confiance. L'effet est le point central de la construction de la VTR car il a un véritable sens biologique. C'est sur cet effet que se base la construction.

La figure 4 présente le mode de calcul de ces niveaux de confiance.

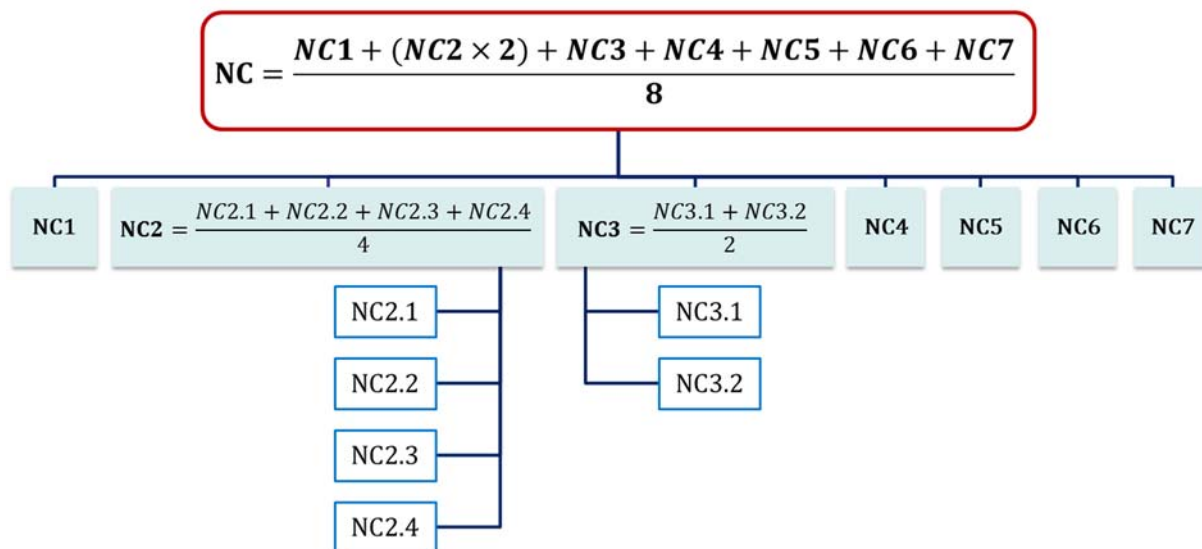


Figure 18 : Représentation du calcul du niveau de confiance associé aux VTR basées sur des effets non cancérogènes

Dans le cas des VTR basées sur des effets non cancérogènes, NC7 correspond au niveau de confiance associé à l'application des facteurs d'incertitude.

En transposant cette figure aux VTR basées sur des effets cancérogènes, il n'y a pas de sous-critère NC2.1 (« nature de l'effet »). Le dénominateur du NC2 vaut donc 3.

Dans le cas des effets cancérogènes sans seuil, NC7 correspond à l'hypothèse de construction.

Dans le cas des effets cancérogènes à seuil, un facteur NC8 doit être rajouté dans le calcul du NC. Ainsi les incertitudes liées à l'hypothèse de construction (NC7 par exemple) et celles liées à l'application des facteurs d'incertitude (NC8) sont prises en compte. Le dénominateur du calcul du NC vaut alors 9.

• Structure de l'outil et mode d'emploi

L'outil comprend plusieurs feuilles Excel, **une feuille pour chaque type d'effet** :

- Une pour les VTR basées sur des effets non cancérogènes (à seuil),
- Une pour les VTR basées sur les effets cancérogènes à seuil,
- Une pour les VTR basées sur des effets cancérogènes sans seuil.

Sur chaque feuille, un encart a été prévu pour identifier la substance (nom et numéro CAS) et le type de VTR pour lequel est fixé le niveau de confiance (durée d'application, voie d'exposition, population d'intérêt). Afin d'avoir une vision plus complète de la substance, ont également été indiqués le statut dans REACH, le tonnage, l'existence ou non de classification européenne harmonisée (CLP, pour *Classification, Labelling and Packaging*) et d'autres classifications telles que celles du CIRC.

Cet outil doit être utilisé par **trois évaluateurs** au minimum, dont l'un des évaluateurs en charge du dossier de la substance et un évaluateur dit « naïf », n'étant pas en charge du dossier mais ayant suivi les débats. Pour remplir l'outil, chaque évaluateur doit relire le profil toxicologique et le

rapport décrivant la construction de la VTR. Les évaluateurs remplissent l'outil de façon indépendante. Les résultats sont ensuite comparés et discutés. Le fait d'avoir trois évaluateurs permet de confronter leurs avis et d'identifier les points de désaccord. Le fait d'avoir un évaluateur « naïf » permet de s'assurer d'une relecture détaillée du rapport et de vérifier que le rapport explique de façon claire et transparente les différents choix de construction de la VTR. Le choix final du niveau de confiance doit ensuite être discuté puis validé en CES.

Cette approche a pour but **d'harmoniser** l'analyse des incertitudes, en cotant les paramètres de façon la plus homogène possible d'un évaluateur à l'autre et d'une substance à une autre. C'est pourquoi des **indications** permettant de fixer des niveaux de confiance pour chacun des critères ont été proposées. Ceci constitue une aide pour l'évaluateur qui peut cependant attribuer des niveaux différents s'il le juge pertinent. Il doit argumenter de façon systématique ses choix dans la colonne « argumentation », que les niveaux de confiance qu'il attribue soient en accord ou non avec les propositions de l'outil. Cela permet à l'analyse d'être transparente et reproductible. Chaque justification doit être compréhensible sans avoir besoin de se référer au dossier de construction de la VTR.

Malgré cette recherche d'harmonisation, le **jugement des experts** intervient dans l'évaluation de nombreux critères (corpus de données, hypothèse de construction, nature de l'effet, convergence des études, qualité de l'étude, durée de l'étude, choix de la dose critique et choix de l'UF_H). En effet, il a été difficile de proposer des exemples d'attribution des niveaux pour certains paramètres, généralement du fait d'un nombre très important de cas possibles pour ces (sous-)critères.

- **Étapes de construction et aspects à étudier pour chaque critère**

- Analyse des données disponibles : critère « corpus initial de données »

Avant de dériver une VTR, il est nécessaire d'établir un profil toxicologique de la substance étudiée. L'attribution d'un niveau de confiance au critère « corpus de données » s'appuie sur ces informations. Deux aspects sont appréciés :

- la qualité du corpus : sont évaluées à la fois la qualité globale du corpus et la qualité des études de ce corpus (« les études sont-elles bien menées ? »),
- la quantité d'études disponibles (« y a-t-il des études qui manquent pour caractériser l'effet ? »).

Ce niveau de confiance est fixé en fonction du type de VTR à construire. Ainsi, si le but est de déterminer la confiance associée à une VTR définie pour une exposition aiguë, alors l'absence d'études chroniques n'entraînera pas un faible niveau de confiance. Cela signifie que ce critère devra être évalué pour chaque type de VTR et donc chaque type d'effet, chaque voie et chaque durée d'exposition. Il ne s'agit pas d'une évaluation globale qui serait valable pour toutes les VTR d'une même substance.

Si le but est de construire une VTR par voie orale mais que seules sont disponibles des études par inhalation, le niveau de confiance sera minimal. Cependant, il sera possible de construire une VTR par voie orale grâce à une transposition voie-à-voie.

L'évaluation du corpus de données se fait sur la base du jugement d'experts. En effet, il existe un nombre très important de situations différentes. Il n'est donc pas possible d'en faire une liste exhaustive. Il serait cependant utile de faire des propositions pour ce paramètre, par exemple pour les cas le plus souvent rencontrés. Les requis de REACH peuvent aider à l'évaluation de la qualité du corpus.

o Choix de l'effet critique

La confiance associée au choix de l'effet critique est fonction de :

- la nature de l'effet,
- la convergence des études sur cet effet,
- la connaissance du mode d'action (MoA, pour *Mode of Action*) chez l'animal et/ou l'Homme,
- la transposabilité de cet effet entre les deux espèces (dans le cas où l'effet a été déterminé chez l'animal).

Le tableau suivant présente les propositions de fixation des niveaux de confiance pour ces sous-critères.

Tableau 17 : Niveaux de confiance pour les sous-critères du critère "choix de l'effet critique" dans le cas de VTR basées sur des effets non cancérogènes

Sous-critère	Exemples d'informations pour ce sous-critère	Niveau associé
Nature de l'effet (Jugement d'experts)	Modification d'un paramètre biologique (d'une enzyme ou d'une concentration hormonale par exemple)	1 ou 2
	Effet fonctionnel	3 ou 4
	Lésion histologique	5
Convergence des études	Jugement d'experts	1 à 5
Mode d'action (chez l'animal et chez l'Homme)	Mode d'action inconnu	3
	Connaissance incomplète du mode d'action chez l'animal et/ou chez l'Homme	4
	Mode d'action connu chez l'animal et/ou connu (partiellement ou pas) chez l'Homme	5
Transposabilité de l'animal à l'Homme	Transposition par défaut, mais doute quant à la pertinence de cette transposition	1
	Transposition par défaut	2
	Données chez l'animal et pas chez l'Homme, mais effet plausible	3
	Similarité des effets et de la toxico-cinétique qualitativement entre l'animal et l'Homme mais pas quantitativement	4
	Toxico-cinétique et effets identiques chez l'Homme et l'animal	5

Dans le cas de VTR basées sur des effets cancérogènes, seuls les sous-critères « convergence des études », « mode d'action » et « transposabilité » sont évalués.

Les propositions pour les critères « mode d'action » et « transposabilité » ne sont valables que dans le cas d'un effet défini chez l'animal. Lorsqu'il est déterminé chez l'Homme :

- seule la connaissance du mode d'action chez l'Homme est étudiée,

- le niveau maximal est attribué à la transposabilité.

Il a été proposé trois « degrés » pour le paramètre « **nature de l'effet** » correspondant à une gradation de l'effet. Le premier grade consiste en une modification de paramètres biologiques sans que cela entraîne de modification de la ou des fonctions associées. Il peut s'agir par exemple de la modification de la concentration d'une molécule endogène, ou de la modification du poids du corps ou d'un organe. Le deuxième grade est l'effet fonctionnel. Un organe par exemple fonctionne moins bien, voire plus du tout, mais sans que cela soit associé à une lésion de tissu. Enfin, le troisième degré consiste en une lésion histologique : un tissu est endommagé.

Cette gradation diffère de la sévérité de l'effet puisqu'une perturbation fonctionnelle peut avoir un impact plus grave qu'une lésion histologique. Par exemple, un problème de la fonction respiratoire pourra être rapidement létal, tandis qu'une lésion du tissu oculaire ne le sera pas. Néanmoins, une lésion tissulaire entraînera souvent une altération de la fonction associée au tissu et l'altération d'une fonction provoquera souvent la modification d'un paramètre biologique associé. Ainsi, une atteinte des tissus respiratoires provoquera, selon sa sévérité, une atteinte de la fonction respiratoire. Une lésion histologique aura donc le plus souvent un impact sanitaire plus important qu'un effet fonctionnel, celui-ci étant lui-même généralement plus impactant que la modification d'un paramètre biologique. C'est pourquoi le niveau 1 est associé à la modification d'un paramètre biologique. En effet, si celui-ci n'entraîne pas de modification fonctionnelle, son impact sur la santé est généralement assez faible. Un niveau de 2 ou 3 est proposé pour les effets fonctionnels et 4 ou 5 pour les lésions histologiques. Le choix entre 2 ou 3 et 4 ou 5 se fera sur la base de jugement d'experts.

L'existence d'un consensus international sur la nature des effets et du mode d'action n'a pas été utilisée ici, car la **convergence des études** est jugée plus impactante. Cependant, de nombreux cas différents pouvant être rencontrés, il n'a pas été fait de proposition pour ce paramètre.

Tableau 18 : Niveaux de confiance pour la convergence des études

Exemples d'informations disponibles pour le sous-critère « convergence des études »	Niveau de confiance associé
Une seule étude mettant en évidence l'effet critique. Les autres études, alors qu'elles sont conçues pour pouvoir détecter cet effet, ne le mettent pas en évidence	1
Quantité adéquate mais quelques limites	2 ou 3
Plusieurs études convergent	4 ou 5

Concernant le critère « convergence des études », il semble approprié de se pencher sur toutes les études disponibles, quelle que soit la voie d'exposition : si un effet est observé pour des études par voie orale et par inhalation, cela renforce sa pertinence. Cependant, le corpus de données est évalué au regard de la VTR à construire. En effet, en pratique, pour construire une VTR par voie respiratoire, seules les études pour cette voie sont considérées. Les études existantes par voie orale ne sont regardées que s'il n'a pas été possible de construire une VTR à partir des études par voie respiratoire. Ainsi, par souci de cohérence, il a été décidé de ne considérer que les études pour la voie d'exposition pour laquelle une VTR doit être construite. Cependant, si des données

montrent une cohérence du choix de l'effet critique quelle que soit la voie d'exposition, cela renforce la confiance.

Il est important de bien distinguer les paramètres « mode d'action » et « transposabilité ». Le premier s'intéresse uniquement à la connaissance du mode d'action et pas à sa similitude entre l'animal et l'Homme. C'est le paramètre de transposition de l'animal à l'Homme qui s'intéresse à cette similitude ou dissimilitude du mode d'action entre les deux espèces.

Un niveau 3 par défaut a été attribué au **mode d'action** s'il n'est pas connu. En effet, celui-ci étant rarement entièrement déterminé, il a été choisi de ne pas pénaliser ce manque de connaissances car cette ignorance n'est pas un facteur limitant l'élaboration d'une VTR. Un niveau de confiance de 4 ou 5 peut être fixé lorsque des connaissances sur le mode d'action sont disponibles chez l'animal et/ou chez l'Homme. En effet, si le mode d'action est connu, l'évaluateur peut dire que la substance entraîne l'effet observé (chez l'animal et/ou l'Homme).

La **transposition de l'effet de l'animal à l'Homme** est à considérer lorsque l'effet critique a été déterminé chez l'animal. Lorsqu'elle est faite alors qu'un doute existe quant à sa pertinence, le niveau de confiance le plus faible lui est associé. Par exemple, une VTR peut être élaborée en se basant sur des effets sur un organe n'existant pas chez l'Homme, telle que la glande de Harder. L'effet critique n'est donc pas transposable à l'Homme, mais est retenu si aucun autre effet suffisamment pertinent n'est disponible et qu'il est nécessaire de proposer une VTR. De plus, cela est protecteur pour la santé.

En absence d'information, il est considéré, par défaut, que l'effet observé chez l'animal est transposable à l'Homme. Un niveau 2 est alors attribué. Cette hypothèse par défaut est protectrice, c'est pourquoi le niveau minimal n'y est pas associé. Cependant, puisqu'il est possible que l'effet ne soit pas transposable à l'Homme et donc que l'effet ne soit pas pertinent pour l'élaboration de la VTR, il a été choisi de ne pas lui attribuer un niveau plus élevé. Le niveau de confiance augmente avec les informations appuyant cette transposition.

Dans le cas où l'effet est déterminé chez l'Homme, le niveau de confiance 5 est attribué.

Il a été choisi de se concentrer sur la pertinence de l'effet (*i.e.* est-on sûr de cet effet ?) en étudiant les quatre sous-critères cités précédemment, plutôt que sur sa sévérité. Si l'évaluateur considère l'effet critique comme pertinent, qu'il soit « sévère » ou non, le niveau de confiance attribué sera élevé. Par exemple, si un effet cancérigène est retenu comme effet critique mais qu'il n'est pas certain que son apparition soit liée à l'exposition à la substance, alors le niveau de confiance associé au choix de cet effet sera faible. *A contrario*, si un effet précurseur du développement tumoral est retenu, alors un niveau plus élevé sera associé à ce choix. Par exemple, l'effet critique retenu pour le choix d'une VTR pour le formaldéhyde était une irritation locale (Afsset, 2008). Les évaluateurs ont choisi cet effet grâce à la connaissance du mode d'action. Ils ont en effet pu déterminer que cette irritation correspondait à des effets précurseurs de l'induction de tumeurs.

- Hypothèse de construction

La connaissance du mode d'action de la substance permet de s'orienter vers une construction de la VTR avec ou sans seuil. Cela est important puisque la VTR a une signification différente selon

qu'elle est construite pour un toxique à seuil ou sans seuil. C'est le mécanisme d'action génotoxique qui est étudié dans le cas des effets cancérigènes. L'Afsset a proposé en 2010 un arbre décisionnel permettant de savoir quelle hypothèse de construction retenir pour les effets cancérigènes en fonction de leur potentiel. Les propositions d'attribution des niveaux de confiance pour les VTR cancérigènes sont basées sur les informations de ce schéma.

Tableau 19 : Niveaux de confiance pour les deux hypothèses de construction dans le cas de VTR basées sur des effets cancérigènes (Afsset, 2010)

Hypothèse de construction	Exemples d'informations pour ce critère	Niveau de confiance associé
Sans seuil	Hypothèse par défaut (protecteur)	1
	Données limitées ou cas limites d'interprétation	2 ou 3
	Substance génotoxique directe ou indirecte : mutagène et altérations claires de l'ADN	4 ou 5
À seuil	Pas de niveau 1	-
	Données limitées ou cas limites d'interprétation	2 ou 3
	Substance non génotoxique avec données sur le mécanisme d'action prouvant un seuil, ou substance génotoxique entraînant des effets sur le fuseau mitotique ou sur les topoisomérases prouvant un mécanisme à seuil	4 ou 5

Un niveau 1 a été attribué à l'hypothèse par défaut selon laquelle l'effet est sans seuil, puisqu'aucune information ne permet de l'appuyer. Lorsque les données sont équivoques, l'évaluateur doit juger du niveau à attribuer.

Un critère « hypothèse de construction » a été inclus dans l'outil pour les VTR non cancérigènes. Par défaut, il est estimé que les effets non cancérigènes sont à seuil de dose. Ce critère a été grisé car il est considéré comme n'étant pas source d'incertitudes.

Il pourrait être pertinent d'attribuer également un niveau de confiance à ce critère pour les effets non cancérigènes. En effet, l'existence d'un seuil est remise en question pour certains types d'effets comme par exemple les effets immunologiques. Dans le cas des allergies, un seuil existe lors de la phase de sensibilisation. En revanche, une fois l'individu sensibilisé, il suffit d'une dose infime pour entraîner une réaction (exemple du toluène diisocyanate). L'existence d'un seuil pour ce type d'effet est alors discutable. Afin d'homogénéiser la méthode entre les différents types d'effet, il serait pertinent de faire évoluer l'outil afin qu'il ne présente que deux feuilles. La première correspondrait aux effets à seuil et la deuxième aux effets sans seuil, chaque effet pouvant être cancérigène ou non. Il faudrait alors associer un niveau de confiance au critère « hypothèse de construction » dans les deux cas. Dans le cas des VTR basées sur des effets cancérigènes, cette hypothèse se base sur le potentiel génotoxique de la substance. Dans le cas des effets non cancérigènes, cette hypothèse se base sur le mode d'action de la substance. Le traitement de ce critère devrait donc être différent selon le type d'effet (cancérigène ou non). Il ne devrait pas prendre en compte deux fois les incertitudes liées au mode d'action pour les substances non cancérigènes à seuil, pour lesquelles le mode d'action est déjà évalué dans le critère « choix de l'effet critique ». Pour les VTR basées sur des effets non cancérigènes, il aurait pu être fait les propositions indiquées dans le tableau ci-dessous.

Tableau 20 : Niveaux de confiance associés à l'hypothèse de construction, dans le cas des VTR basées sur des effets non cancérogènes

Type de substance	Données supportant l'hypothèse de construction	Niveau associé
Substance non cancérogène, à seuil	Hypothèse à seuil par défaut	3
	Données permettant de s'orienter vers un mécanisme à seuil	4
	Données prouvant un mécanisme à seuil	5
Substance non cancérogène, sans seuil	Pas de niveau par défaut	-
	Données permettant de s'orienter vers un mécanisme sans seuil	4
	Données prouvant un mécanisme sans seuil	5

L'hypothèse à seuil par défaut se verrait accorder un niveau de confiance de 3 car cela est protecteur. De plus, une telle hypothèse est presque systématique dans le cas des effets non cancérogènes. Lui affecter un niveau inférieur serait alors très pénalisant lors du calcul du niveau de confiance global. Cette proposition n'a pas été incluse dans l'outil, du fait d'un recoupement entre ces informations et celles étudiées dans le sous-critère « mode d'action ». Ce point devra être approfondi lors de l'utilisation de l'outil par le CES.

o Choix de l'étude clé

Afin d'identifier la relation dose-réponse nécessaire à l'élaboration de la VTR, une ou plusieurs études de bonne qualité scientifique doivent être choisies. Il peut s'agir d'études épidémiologiques ou toxicologiques. La confiance associée au choix de l'étude clé est fonction de la qualité de l'étude et de sa durée au regard de la durée de validité de la VTR, cette dernière correspondant à la durée aiguë, subchronique ou chronique pour laquelle est construite la VTR.

Une correspondance entre la cotation de Klimisch et le niveau de confiance attribué au choix de l'étude clé est proposée dans le tableau ci-dessous.

Tableau 21 : Correspondance entre la cotation de Klimisch et le niveau de confiance associé à la qualité de l'étude clé

Cotation de Klimisch	Niveau de confiance associé à l'étude
3b ⁴³ ou 4d ⁴⁴	1
2	2 à 4 (jugement d'experts)
1	5

Il peut être indiqué pour information si l'étude suit les bonnes pratiques de laboratoire (BPL) et/ou des lignes directrices (OCDE, US EPA, etc.).

⁴³ La cotation 3b de Klimisch est attribuée aux études présentant des déficiences méthodologiques significatives.

⁴⁴ La cotation 4d de Klimisch est attribuée aux études rédigées dans un autre langage que le langage international.

Dans l'idéal, la VTR se base sur une étude dont la **durée** est similaire à la durée de validité de l'indice. Cependant, une telle étude n'est pas toujours disponible. Ainsi, certaines VTR valables pour des durées chroniques se basent sur des études subchroniques. Dans ce cas, le niveau de confiance associé à ce paramètre n'est généralement pas maximal. Lorsqu'une étude de durée identique est disponible, le niveau 5 est attribué. L'évaluation de la pertinence de la durée de l'étude pour l'élaboration de l'indice se fait par jugement d'experts, car de nombreux cas peuvent être rencontrés. Une liste exhaustive n'a pas été établie. Le tableau ci-dessous présente les propositions faites pour ce sous-critère.

Tableau 22 : Niveaux de confiance associé au sous-critère "durée de l'étude" dans le cas où la durée de l'étude diffère de celle de validité de la VTR

Exemples d'informations disponibles pour le sous-critère « durée de l'étude »	Niveau de confiance associé
Aucune étude de durée adaptée n'est disponible pour permettre de valider l'utilisation de cette étude de durée non adéquate	1
<u>Jugement d'experts.</u> Ces cas correspondent à l'application d'un UF _S de 3. - Présence d'informations montrant que la substance ne s'accumule pas, - que les effets ne sont pas dépendants de la durée, - que les effets n'apparaissent qu'à la suite de l'exposition lors d'une fenêtre de sensibilité de courte durée ; - Pertinence de l'utilisation de cette étude soutenue par des données d'extrapolation voie-à-voie sur la base d'études de durée adaptée ; - Données suggérant une progression limitée des effets en fonction du temps	2 à 4
Existence d'étude(s) de durée adaptée permettant de confirmer la pertinence de l'utilisation d'une étude de durée non adaptée	3 ou 4

Un exemple a été proposé pour la construction d'une VTR chronique.

Tableau 23 : Niveaux de confiance proposés pour le sous-critère « durée de l'étude », dans le cas de la construction d'une VTR chronique

Exemples d'études disponibles et leurs caractéristiques	Niveau de confiance associé
Étude clé de durée subchronique, aucune autre étude subchronique ni chronique disponible pour confirmer le choix de cette étude	1
Étude clé de durée intermédiaire (entre subchronique et chronique) ou étude clé de durée subchronique et effet irréversible	2 à 4
Étude clé de durée similaire (chronique)	5

Aucun consensus n'a pu être établi avec les experts. Il serait utile de relancer les discussions sur ce point afin de faire des suggestions de fixation de niveaux de confiance.

Les VTR basées sur des effets cancérogènes sont valables pour une exposition durant toute la durée de vie de l'individu. Aucun paramètre « durée de l'étude » n'a été proposé pour ces VTR : la durée de l'étude n'a pas d'importance dès lors que l'effet choisi est un effet tumoral ou précurseur de tumeur car il aboutira à un cancer à la dose à laquelle l'effet apparaît. Ainsi, il est possible de se baser sur des études de cancérogenèse, mais également sur des études de moins longue durée, en particulier lorsqu'il est retenu un effet précurseur de cancer.

○ Choix de la dose critique

Dans l'outil, un menu déroulant permet de choisir la dose critique disponible. Le niveau de confiance qui lui est associé s'affiche alors automatiquement. La confiance attribuée est fonction de la qualité de la relation dose-réponse. Lorsqu'un couple LOAEL/NOAEL ou BMD/BMDL est disponible, plus l'écart entre les deux représentants du couple est faible, plus la dose repère est précise et meilleur est le niveau de confiance.

Trois situations peuvent être rencontrées :

- Un couple BMD/BMDL a pu être modélisé. Un niveau de confiance de 4 ou 5 est alors attribué au critère. En effet, l'approche Benchmark Dose présente plusieurs avantages par rapport à l'approche LOAEL/NOAEL. Elle rend explicite certains choix et hypothèses qui sont implicites dans l'approche LOAEL/NOAEL, pénalise les protocoles de moins bonne qualité, prend en compte l'ensemble de la relation dose-réponse et une part de l'incertitude liée au protocole expérimental est prise en compte par l'utilisation de la BMDL (Bonvallot *et al.*, 2009). Selon la qualité de la relation dose-réponse, l'évaluateur jugera de l'application d'un niveau 4 ou 5 ;
- La modélisation BMD n'a pas été réalisée et l'évaluateur dispose d'un couple NOAEL/LOAEL. Un niveau 2 ou 3 est attribué au critère, sur la base du jugement d'experts et selon la qualité de la relation dose-réponse ;
- L'évaluateur dispose d'un NOAEL seul ou d'un LOAEL seul. Le niveau minimal est alors fixé.

Tableau 24 : Niveaux de confiance associés à la dose critique

Dose critique disponible	Niveau de confiance associé
LOAEL seul ou NOAEL seul	1
Couple LOAEL/NOAEL avec une faible confiance	2
Couple LOAEL/NOAEL avec une forte confiance	3
Couple BMD/BMDL avec une faible confiance	4
Couple BMD/BMDL avec une forte confiance	5

○ Ajustements

▪ Ajustement temporel

L'ajustement temporel étant toujours réalisé de cette façon, il a été considéré qu'il ne s'agissait pas d'une source d'incertitude. Aucun niveau de confiance n'est attribué au critère (grisé dans l'outil).

▪ Ajustement allométrique

Si la dose critique est déterminée d'après une étude chez l'animal, un ajustement allométrique peut être réalisé. Celui-ci peut se faire grâce aux équations décrites par l'US EPA (1994, 2006 et 2009) ou *via* des modèles PBPK lorsqu'ils sont disponibles et validés. Le tableau ci-dessous indique les propositions faites selon le type d'ajustement allométrique.

Tableau 25 : Niveaux de confiance associés à l'ajustement allométrique

Ajustement allométrique	Niveau de confiance associé
Ajustement allométrique nécessaire et réalisé avec les valeurs des coefficients par défaut (issues des guides de l'US EPA)	3
Ajustement allométrique nécessaire et réalisé avec des coefficients dont les valeurs sont basées sur des connaissances (formules de l'US EPA)	4
Ajustement nécessaire et réalisé par un modèle PBPK ou ajustement non nécessaire	5

Un ajustement réalisé avec des valeurs par défaut protège l'ensemble de la population. De plus, il conduit à une meilleure confiance que si aucun ajustement n'avait été réalisé alors que cela était nécessaire. C'est pourquoi le niveau 3 y est associé. Lorsque les formules de l'US EPA sont utilisées avec des valeurs plus spécifiques de l'espèce ou de la substance, le niveau 4 est fixé. Enfin, le niveau maximal est attribué lors de l'utilisation d'un modèle PBPK. En effet, il est considéré que les modèles actuels sont assez pertinents pour permettre un ajustement réaliste. Le niveau maximal est également attribué lorsqu'aucune extrapolation n'est nécessaire.

o VTR à seuil et facteurs d'incertitude

Dans le cas des VTR à seuil, des facteurs d'incertitude UF peuvent être appliqués à la dose potentiellement ajustée. Il existe des incertitudes résiduelles liées à l'utilisation d'éléments permettant de prendre en compte les incertitudes, tels que les facteurs d'incertitude (EFSA, 2016). Un niveau de confiance doit donc être attribué à certains de ces facteurs.

Les incertitudes liées à l'application des UF_L , UF_S et UF_D , sont prises en compte respectivement par les critères « choix de la dose critique », « durée de l'étude » et « corpus de données ». Aucun niveau de confiance n'a donc été associé à ces facteurs (grisés dans l'outil).

À l'origine, la transposition de l'espèce animale à l'Homme se faisait par l'attribution d'un UF_A de 1, 3 ou 10. Aujourd'hui, si l'effet est déterminé chez l'animal, cette transposition est généralement réalisée par un ajustement allométrique ou par un modèle PBPK. La partie toxicocinétique de l' UF_A (UF_{A-TK}) est prise en compte par l'ajustement, mais pas la partie toxicodynamique de l' UF_A (UF_{A-TD}). Ainsi, seul l' UF_{A-TD} est appliqué à la dose critique. Il vaut alors 2,5. Aucune incertitude n'est donc liée à l' UF_A et aucun niveau de confiance n'y a été associé (critère grisé).

Les incertitudes liées à l'application de l' UF_H ne sont pas prises en compte dans les autres critères de l'outil. C'est pourquoi un niveau de confiance doit être associé à ce facteur d'incertitude.

Tableau 26 : Niveaux de confiance associés à l' UF_H

Facteur d'incertitude (UF)	Exemples d'informations pour ce facteur	Niveau de confiance associé
UF_H	Valeurs par défaut (protecteur)	1
	Valeurs affinées (données de toxicocinétique et/ou toxicodynamique)	2 à 4
	Valeurs du facteur obtenu par modèle PBPK ; ou facteur non nécessaire ($UF_H = 1$)	5

La valeur par défaut de l' UF_H est associée au niveau de confiance 1, car cela est protecteur, mais assez approximatif. Lorsque la valeur de ce facteur est obtenue par modèle PBPK, un niveau maximal est appliqué car il est considéré que ce modèle permet bien de prendre en compte la variabilité toxicocinétique. Lorsque la construction se base sur une population sensible (tel que le sous-groupe des nouveau-nés)⁴⁵, la variabilité interspèce est prise en compte et l' UF_H vaut 1 avec un niveau de confiance associé de 5. Les niveaux 2 à 4 correspondent aux UF_H dont les valeurs sont affinées grâce à la disponibilité de données de toxicocinétique et/ou de toxicodynamique, mais sans utilisation d'un modèle PBPK.

○ Extrapolation voie-à-voie

Lorsque la voie d'exposition de l'étude clé est différente de la voie pour laquelle est construite la VTR, une extrapolation voie-à-voie doit être réalisée. Le niveau de confiance associé au critère correspondant est fonction de la présence d'une extrapolation et des données sur lesquelles elle s'appuie. Les propositions faites dans l'outil sont reportées dans le tableau ci-dessous.

Tableau 27 : Niveaux de confiance associés à l'extrapolation voie-à-voie

Présence et qualité de l'extrapolation	Niveau de confiance associé
Extrapolation réalisée sans donnée pour l'appuyer	1
Extrapolation réalisée avec des connaissances partielles pour l'appuyer	2
Extrapolation réalisée et bien justifiée (si l'étude est par inhalation pour une VTR par voie orale, mais que le corpus de données montre que les effets sont similaires pour ces deux voies et pour des doses proches)	3
Extrapolation réalisée avec des connaissances l'appuyant, pas de toxicité locale et utilisation d'un modèle PBPK	4
Pas d'extrapolation	5

Lorsqu'une extrapolation est réalisée « par défaut » mais qu'aucune donnée ne permet de la justifier, un niveau minimal est appliqué. Le niveau de confiance augmente avec les connaissances permettant d'appuyer cette extrapolation.

L'utilisation d'un modèle PBPK ne permet pas de fixer le niveau maximal de confiance. En effet, la confiance reste alors moins élevée que lorsqu'aucune extrapolation de voie à voie n'est réalisée (niveau 5), du fait du nombre de paramètres qui peuvent être influencés par une telle extrapolation. De plus, actuellement, la réalisation d'une extrapolation voie-à-voie entraîne à l'Anses l'attribution d'un niveau de confiance global faible. Afin d'être plus cohérent avec la méthode précédente et d'être plus précautionneux, un niveau de confiance non maximal mais relativement élevé (4) est

⁴⁵ L' UF_H peut prendre une valeur de 1 (et donc un niveau de confiance de 5). En effet, l'US EPA a appliqué un UF_H de 1 pour la RfC du béryllium, ou encore celle de la Fluorine et des nitrate et nitrite, car l'élaboration a été faite sur la base d'une population sensibilisée, d'enfants, ou même de nouveau-nés de 0 à 3 mois, considérés comme étant la sous-population la plus sensible.

fixé lors de l'utilisation d'un modèle PBPK. En effet, les modèles PBPK utilisés sont validés et permettent tout de même une bonne prédiction.

- VTR sans seuil et extrapolation aux faibles doses

Pour les toxiques sans seuil d'effet, une extrapolation aux faibles doses doit être réalisée à partir de la dose critique. Il s'agit, par défaut, d'une extrapolation linéaire à l'origine. Cette extrapolation n'est pas considérée comme source d'incertitude, car la même méthodologie est suivie dans chaque cas traité par l'Anses et cela est protecteur pour la santé publique (Afsset, 2010). Aucun niveau de confiance ne lui est associé.

Notes



Agence nationale de sécurité sanitaire
de l'alimentation, de l'environnement et du travail
14 rue Pierre et Marie Curie
94701 Maisons-Alfort Cedex
www.anses.fr / [@Anses_fr](https://twitter.com/Anses_fr)