

Les enjeux de la recherche en toxicologie et écotoxicologie dans le cadre de la mise en œuvre de REACH

Éric Thybaud est responsable du pôle danger et impact sur l'environnement à l'INERIS¹

1 Présentation du contexte

Le règlement REACH² a pour objectif en particulier d'**améliorer les connaissances** sur

les substances, pour assurer un niveau élevé de protection pour la santé et l'environnement tout en **limitant le recours à l'expérimentation animale**, autant que faire se peut, ce qui représente un changement de pratiques important en toxicologie.

Bien que les dossiers demandés par le règlement REACH aux producteurs et importateurs de substances chimiques (voir les *Chapitres de J.-C. Boutonnet et C. Lusson* dans *Chimie et expertise, santé et environnement*, EDP Sciences, 2016) soient exigeants et complets, ils ne permettent pas de prendre en compte la complexité des situations réelles.

Plus précisément, des recherches approfondies sont nécessaires sur les trois types de facteurs suivants, déterminant la toxicité ou l'écotoxicité :

– d'abord l'**effet « multi-stress »** (parfois appelé « effet

1. INERIS (Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques) : l'INERIS a pour mission d'évaluer et de prévenir les risques accidentels ou chroniques pour l'homme et l'environnement, liés aux installations industrielles, aux substances chimiques et aux exploitations souterraines. Site : www.ineris.fr.

2. REACH (Registration, Evaluation and Authorization (and Restriction) of Chemicals) : règlement de l'Union européenne sur l'enregistrement, l'évaluation, l'autorisation et les restrictions des substances chimiques, entré en vigueur le 1^{er} juin 2007, qui rationalise et améliore l'ancien cadre réglementaire sur les produits chimiques. Voir le *Chapitre d'I. Rico-Lattes* dans cet ouvrage *Chimie et expertise, santé et environnement*, coordonné par M.-T. Dinh-Audouin, D. Olivier et P. Rigny, EDP Sciences, 2016.

cocktail »), qui désigne le fait que la toxicité d'un mélange de molécules n'est pas simplement l'addition de celles des molécules présentes : une synergie peut intervenir et éventuellement être à l'origine d'effets beaucoup plus importants que l'addition de ceux des molécules séparées ;

- ensuite, il faut prendre en compte les **conditions environnementales réelles**, qui ne sont pas neutres sur la toxicité des substances : en fonction des conditions de milieu, la toxicité peut s'exprimer de façon différente. Mais ces conditions sont variables et multiparamètres ; il faut des méthodes spécialisées pour en tenir compte ;

- enfin, l'effet de molécules toxiques sur les organismes ne se limite pas à la première génération de sujets affectés, mais peut créer des perturbations qui se manifestent dans les générations suivantes. Ces **effets transgénérationnels** ne sont pas évalués à travers les essais habituellement pratiqués.

D'un autre côté, la demande de REACH de limiter le recours aux expérimentations

animales conduit à étudier des méthodes alternatives de détermination des toxicités, par exemple en développant des méthodes de chimie théorique et en établissant des corrélations propriétés-structures moléculaires.

2 Les enjeux de la recherche

La mise en œuvre du règlement REACH fait changer de dimension le travail des toxicologues (*Figure 1*). Un nombre considérable de substances devront être caractérisés, et ces nouveaux besoins quantitatifs réclament une simplification et une systématisation des essais pour qu'ils puissent être effectivement mis en œuvre.

En conséquence, les essais de base et leur mise en œuvre doivent être optimisés, qu'il s'agisse d'essais *in vivo*, *in vitro* ou *in silico* (*in silico* : au moyen de modèles informatiques). Parallèlement, les stratégies des essais doivent être redéfinies et sélectionnées pour donner un maximum d'informations. Également, l'interprétation des résultats doit être affinée, intégrant les données des différents outils pour étayer les conclusions de la meilleure façon possible.

2.1. Optimisation des outils de base

La *Figure 2* esquisse les types d'études qu'il faut conduire pour l'évaluation complète de la toxicité d'une substance jusqu'au niveau écologique. À chaque étape, des outils spécifiques sont employés. Le changement du nombre

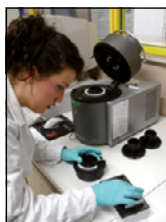


Figure 1

La mise en œuvre du règlement REACH fait changer de dimension le travail des toxicologues, avec de nouveaux besoins quantitatifs.

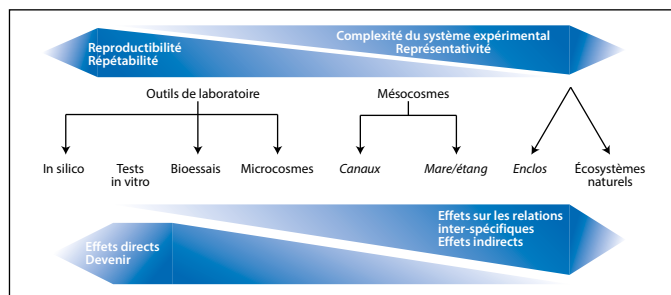


Figure 2

Les différentes étapes d'une étude d'écotoxicologie.

des études appelé par le règlement REACH impose une optimisation de ces outils de mesure et de diagnostic pour rationaliser les efforts.

2.1.1. Les recherches méthodologiques pour limiter l'expérimentation animale in vivo

Pour limiter le recours aux expériences sur les animaux, la démarche est d'optimiser les protocoles d'essais. On peut par exemple optimiser le nombre de doses utilisées pour évaluer la toxicité d'une substance, ou son écotoxicité en cherchant à diminuer le nombre d'animaux soumis à l'expérimentation. Plus généralement, on doit chercher à optimiser les protocoles, c'est-à-dire les choix de doses et la façon de les administrer, pour obtenir le plus de résultats significatifs possibles. On peut définir les conditions pour, dans une même série d'expériences, travailler sur plusieurs cibles (plusieurs organes) ou employer plusieurs critères pour caractériser la toxicité ou l'écotoxicité – par exemple ne pas se contenter du critère LC50³ pour évaluer les risques. En bref, la

3. LC50 (Concentration Létale 50 %) : concentration qui tue 50 % des individus en un temps donné.

démarche consiste à obtenir un maximum de données utiles, non pas en multipliant le nombre des essais mais en les rendant plus « intelligents », plus productifs.

Aujourd'hui un grand nombre de tests et d'informations concerne la toxicité aiguë, mais ce n'est plus la plus pertinente pour préserver la santé et l'environnement car les conditions d'utilisation des substances ne conduisent que très rarement à ce type d'effet. En revanche, on doit se préoccuper de la toxicité à faible dose ou aux effets à long terme (voir aussi le **Chapitre de P. Hubert**, dans *Chimie et expertise, santé et environnement*) : la recherche se tourne ainsi vers les effets subchroniques ou sublétaux⁴, amenant par exemple à considérer la possibilité d'effets transgénérationnels.

Dans un autre ordre de préoccupations, il faut s'imposer que les recherches se fassent sur des milieux représentatifs des conditions réelles (ou aussi représentatifs que

4. Effet subchronique : effet situé entre un effet aigu (qui évolue rapidement) et un effet chronique (qui évolue lentement et se prolonge). Sublétaux : caractérise la dose d'une substance toxique, la plus proche de celle qui provoque la mort.

possible) pour que des évaluations tirées des mesures soient les plus pertinentes. Les milieux employés dans les études ne remplissent pas toujours cette condition : le classique test des poissons (voir le **Chapitre de J.-C. Boutonnet** dans *Chimie et expertise, santé et environnement*) utilise une eau reconstituée adoptée par tous les laboratoires, mais elle est proche de l'eau des aquariums. C'est une eau qui n'existe nulle part ailleurs.

La demande du règlement REACH de tenir compte du bien-être des animaux induit également des questions de recherche. Dans ce contexte, l'imagerie du petit animal, qui permet d'établir des diagnostics sans imposer de souffrance, est tout à fait prometteuse.

2.1.2. Les besoins de recherche pour l'utilisation des modèles animaux *in vitro*

La toxicité d'une substance peut également être évaluée au moyen de méthodes *in-vitro*, approche dans laquelle on isole un organe, une partie d'organe ou une culture cellulaire que l'on soumet aux stress chimiques. Ces expériences sont souvent suffisamment validées pour apparaître dans des dossiers réglementaires.

La conduite des tests *in vitro* doit être déterminée par l'objectif final des études qui reste, en dernier ressort, de prévoir les atteintes à la santé humaine ou à l'environnement. Les tests doivent chercher à être prédictifs, permettant d'évaluer les impacts en conditions réelles. La

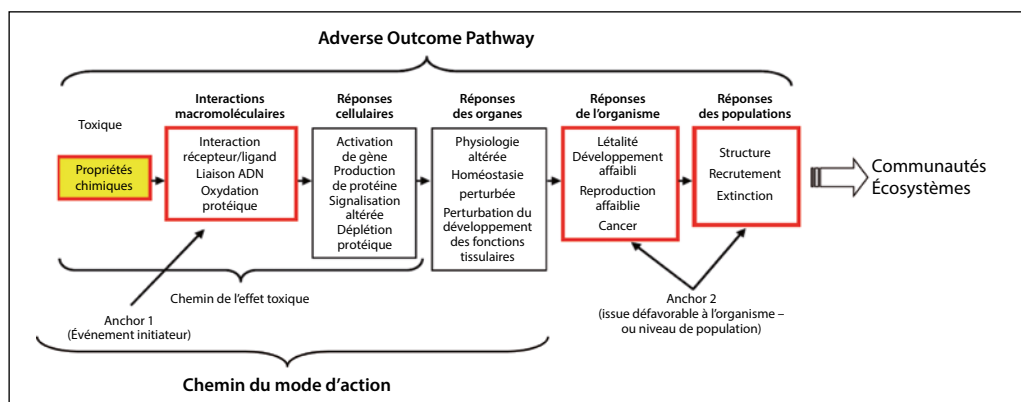
prédiction de la toxicité à partir de tels outils nécessite le plus souvent le recours à des batteries d'essais. La sélection des tests peut être basée sur l'étude des mécanismes d'action des molécules sur le vivant. Cela permet de sélectionner des tests prédictifs à partir d'effets précoces de manière à permettre les diagnostics les plus efficaces ; ces recherches se font dans le cadre conceptuel des AOP (« *Adverse Outcome Pathways* »⁵, **Figure 3**).

L'exemple de la sensibilisation cutanée illustre cette démarche. Le chemin de l'effet toxique, depuis l'absorption cutanée jusqu'à la prolifération des lymphocytes et l'apparition des rougeurs, est connu. On peut développer des essais représentatifs de chacune des étapes, comme par exemple la liaison substance-protéine, qui mesure un potentiel de sensibilisation local. L'étude complète permet d'évaluer le potentiel de sensibilisation ou le potentiel toxique de la substance étudiée.

2.1.3. Les besoins de recherche pour l'utilisation des modèles *in silico*

Les méthodes théoriques bénéficient des gros progrès de la chimie théorique, de la modélisation, ainsi que des progrès dans les technologies informatiques (d'où leur dénomination *in silico*). Elles sont encore en développement mais ont déjà un degré

5. AOP : cadre conceptuel qui présente le lien entre un événement biologique et un effet négatif à un niveau pertinent pour l'évaluation du risque.



de maturité qui leur permet d'apporter des éléments significatifs aux dossiers. Leur facilité de mise en œuvre, bien entendu, est la principale motivation des efforts de perfectionnement et de mise au point en cours dans de nombreux laboratoires.

Dans ce domaine, le recours au **QSAR** (« *quantitative structure-activity relationships* »)⁶ est relativement courant. Ainsi ces méthodes sont classiques pour évaluer la bioaccumulation⁷ de substances chimiques par exemple. Des recherches sont en cours pour en élargir les domaines d'application,

6. QSAR (relation quantitative structure-activité) : procédé par lequel une structure chimique est en relation avec un effet bien déterminé (par exemple, l'activité biologique peut être exprimée de manière quantitative, comme pour la concentration de substance nécessaire pour obtenir une certaine réponse biologique). Voir le **Chapitre de P. Toulhoat** dans *Chimie et expertise, sécurité des biens et des personnes*, coordonné par M.-T. Dinh-Audouin, D. Olivier et P. Rigny, EDP Sciences, 2015.

7. Bioaccumulation : processus par lequel une substance du milieu est absorbée et stockée dans un organisme d'un être vivant.

diversifier les critères d'évaluation et préciser les limites de leur utilisation. L'utilisation de telles méthodes nécessite de respecter leur domaine d'utilisation faute de quoi les conclusions ont un fort risque d'être erronées.

Au-delà de ces aspects méthodologiques, les recherches en chimie théorique concernent le traitement des molécules ou éléments inorganiques encore peu renseignés et le développement de stratégies de modèles qui vont impliquer à la fois des descripteurs moléculaires et des résultats biologiques.

2.2. Optimisation de la mise en œuvre des outils de base

Les progrès dans l'efficacité des caractérisations toxicologiques viennent, dans une large mesure, de l'adaptation des stratégies de mise en œuvre (les protocoles d'essais), simultanée ou successive, des outils de base. On remplace progressivement la stratégie systématique construite sur des listes prédéfinies par des démarches plus « raisonnées » (**Tableau**).

Figure 3

Le cadre conceptuel des AOP (« Adverse Outcome Pathways »).
Source : d'après Ankley et coll. (2010), *Environmental Toxicology and Chemistry*, **29** : 730-741.

Tableau

Comparaison des démarches d'essais dans les stratégies « sur liste prédéfinie » ou « raisonnées »

Liste prédéfinie	Stratégie raisonnée
<ul style="list-style-type: none"> - Inhibition de la croissance des algues vertes unicellulaires - Inhibition de la mobilité de <i>Daphnia magna</i> - Test de toxicité aiguë poisson (mortalité) 	<ul style="list-style-type: none"> - Inhibition de la croissance des algues vertes unicellulaires - Inhibition de la mobilité de <i>Daphnia magna</i>
Détermination de CI ou CL 50 %	Détermination de LC 50 % Détermination seuil de toxicité (= plus faible EC50) Réalisation d'un test de toxicité aiguë poisson au seuil de toxicité ou à 100 mg/l Réalisation du test de toxicité aiguë poisson complet uniquement si observation de mortalité dans le test limite

Examinons l'exemple de l'évaluation de la toxicité vis-à-vis des organismes aquatiques : la méthode classique par liste prédéfinie consiste à faire un test algues⁸, suivi d'un test Daphnie⁹, puis d'un test poisson¹⁰, et de retenir le résultat le plus faible des trois essais pour définir le seuil de toxicité. Dans le souci d'éviter des tests superflus et de diminuer le recours aux animaux, l'Organisation de Coopération et de

Développement Économiques (OCDE¹¹) a défini une stratégie raisonnée qui consiste à ne réaliser les tests poisson qu'en fonction des résultats des essais algues et sur Daphnie.

2.3. Optimisation de l'interprétation des résultats

Les essais sont réalisés dans des conditions environnementales de laboratoire alors que les conclusions qui doivent être tirées correspondent aux environnements naturels réels et doivent avoir un caractère de prévisibilité pour tenir compte de l'évolution du milieu au cours du temps.

8. Test algues : ce test vise à évaluer la toxicité chronique du produit testé pour la flore aquatique.

9. Test Daphnie (ou *Daphnia magna*) : ce test a pour objectif d'évaluer la toxicité aiguë du produit testé pour la faune aquatique (micro-crustacés). Les tests utilisant des daphnies sont les plus utilisés en écotoxicologie, du fait notamment, de leur facilité d'utilisation.

10. Test poisson : ce test vise à évaluer la toxicité aiguë de produits sur une espèce de poisson d'eau douce.

11. OCDE : organisation internationale constituée de 34 pays membres à travers le monde, sa mission est de promouvoir les politiques qui amélioreront le bien-être économique et social partout dans le monde.

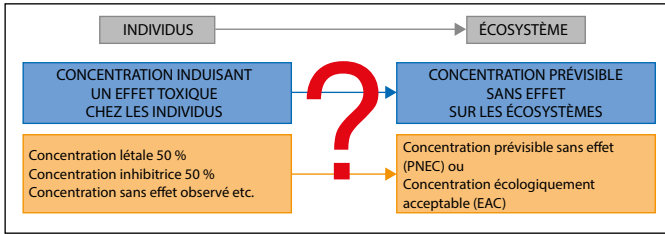


Figure 4

Des mesures individuelles à la caractérisation de l'écosystème.

Le passage de l'un à l'autre, avec les extrapolations que cela implique, nécessitent des techniques d'interprétation qui doivent être validées par de nombreuses études portant sur des variétés de situations. La mise au point des techniques d'interprétation est un axe de recherche actuellement très actif (Figure 4).

La toxicité ou l'écotoxicité est estimée par des grandeurs caractérisant des effets sur des populations ou des individus : CL50, DL50¹² par exemple. Pour les écosystèmes, ce qui est pertinent c'est de définir une concentration seuil en deçà de laquelle des effets sur la structure et le fonctionnement du système ne sont pas à craindre. Passer d'une CL50, d'un test sur un poisson, à une concentration sans effet sur un écosystème nécessite une extrapolation entre niveaux d'organisation, qui ne peut être faite de façon fiable qu'à partir de modèles suffisamment validés et présentant un caractère prédictif. Ce sont les objectifs des programmes de recherche actuels autour de la modélisation pour le changement d'échelle qui permet de passer d'un niveau

d'organisation biologique à un autre (Encart : « La modélisation pour le changement d'échelle »).

LA MODÉLISATION POUR LE CHANGEMENT D'ÉCHELLE

La modélisation permet d'établir un lien entre différentes échelles :

- l'échelle de mesure (individu) ;
- l'échelle de pertinence protectrice (population) ;
- l'échelle de pertinence toxicologique ;
- l'échelle des effets biologiques.

Apports de la modélisation par rapport aux méthodes descriptives et/ou strictement statistiques :

- tester différents scénarios et hypothèses ;
- prédire les conséquences des effets dans différents états écologiques ;
- identifier les variables biologiques les plus pertinentes.

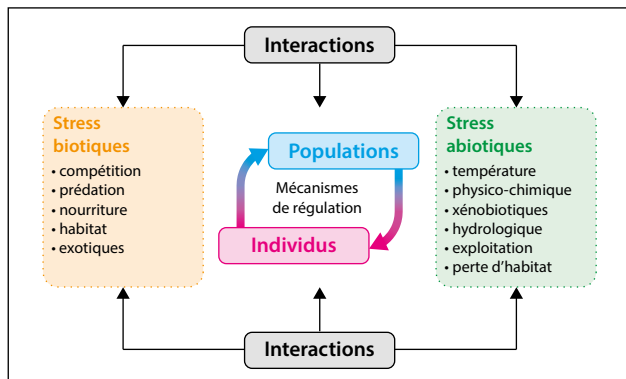


Figure 5

Modélisation pour traiter le changement d'échelle.

Source : Adams S.M., Biological indicator of aquatic ecosystem stress. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland.

12. DL50 (Dose Létale 50 %) : correspond à la quantité de substance qui produit la mort de la moitié de la population.

Toxicologie et écotoxicologie : au-delà de la question scientifique...

Il y a lieu de rappeler le statut des recherches en toxicologie et en écotoxicologie abordées ici du point de vue de l'éthique. L'amélioration des outils de prévision ne doit pas être séparée de la réflexion sur les enjeux de la protection. Quand on parle d'environnement, qu'est-ce qu'on veut protéger ? S'agit-il des individus, de populations, de la structure ou du fonctionnement d'un écosystème ?

Le règlement REACH stipule qu'« *il faut protéger l'environnement* », mais ne définit pas réellement ce que l'on veut réellement protéger. Chacun peut y mettre un peu ce qu'il veut car le concept d'environnement est complexe, ne désigne pas une réalité figée mais évoluant avec le temps. Les enjeux semblent donc porter sur quelque chose qui n'est pas stable. À côté des recherches techniques, une réflexion éthique est indispensable.