

Procédures d'évaluation

Essais de toxicité aigue

La plupart de ces études sont programmées pour déterminer la dose létale 50 (DL50) du toxique, définie comme « l'estimation statistique d'une dose unique supposée tuer 50 % des animaux ». C'est aussi l'opportunité de déterminer l'effet toxique spécifique au produit, l'organe cible et de fournir des bases pour déterminer les doses à utiliser dans les études à long terme.

Dans certains cas, particulièrement pour des produits faiblement toxiques, il n'est pas toujours nécessaire de déterminer la DL50 avec précision, des valeurs approchées suffisent, comme le montrent les données du tableau 6.1 qui mettent en évidence des effets synergiques et antagonistes.

Quant l'exposition se fait par inhalation, la valeur retenue est soit la concentration létale 50 (CL50) pour une durée d'exposition déterminée, soit le temps léthal 50 (TL50) pour une concentration, déterminée du toxique dans l'air.

Sélection de l'espèce animale

Ce sont en général le rat et la souris qui sont sélectionnées pour déterminer la DL50 cette préférence tient à des raisons économiques, aux facilités d'obtention et de manipulation, et à l'abondance des données toxicologiques qui facilitent la comparaison de la toxicité entre molécules différentes.

Une espèce autre qu'un rongeur est quelquefois nécessaire particulièrement dans le cas où les valeurs pour le rat et la souris sont très différentes, ou quand on sait que le schéma métabolique est différent de celui observé chez l'homme.

La détermination de la DL50 est faite préférentiellement sur des animaux de deux sexes, jeunes et âgés, en raison de leurs différences de sensibilité bien connues.

Voie d'administration

En général, les toxiques devraient être administrés par la voie qui est celle de l'exposition humaine. L'administration cutanée et par les voies respiratoires est de plus en plus utilisée, non seulement pour les produits dont l'exposition humaine prévisible se fait par ces voies, mais aussi pour ceux qui posent des problèmes de toxicologie professionnelle.

La voie parentérale sert à tester la toxicité des médicaments par entériques. L'absorption par voie intraveineuse ou intra-péritonéale est souvent immédiate et complète ce qui amène à utiliser ses voies d'administration pour déterminer la vitesse et l'importance de l'absorption par les voies cutanées et orales.

Dose et nombre d'animaux

Pour déterminer correctement une DL50 il est indispensable de sélectionner une dose qui tuera environ la moitié des animaux une dose qui tuera plus de la moitié (mais de préférence plus de 10%) et une dose qui en tuera moins de la moitié (mais de préférence plus de 90%). quatre doses ou plus sont sélectionnées pour qu'au moins trois d'entre elle soient dans cette gamme.

En générale la précision de la DL50 est améliorée en augmentant le nombre d'animaux par dose et en diminuant le rapport entre deux doses successives la plupart des expérimentateurs utilisent 40 50 animaux pour un test de mortalité et des rapports de 1.2 à 1.5.

La détermination de la DL5 chez les gros animaux comme le chien se fait avec un nombre plus réduit d'individus.

Examens

Après l'administration du toxique aux animaux, l'heure de la mort et le nombre de la mort doivent être notés pour déterminer la DL50 il est très important que les signes de toxicité soient aussi notés. La période d'observation est généralement entre 7 et 14 jours, mais peut être plus longue

Des examens macroscopiques doivent être fait sur tous les animaux mort et au moins quelques survivant, tout spécialement sur ceux qui présentent des signes de morbidité à la fin des essais. L'autopsie est en mesure de fournir des informations utiles sur les organes cibles particulièrement quand la mort ne suit pas immédiatement l'administration. Des examens histo-pathologique d'organes sélectionnés peuvent compléter ces informations.

Interprétation des données

Relation dose réponse

Quant la mortalité ou la fréquence s'il s'agit d'autre effet est représentée graphiquement en fonction de logarithme de la dose on obtient une courbe en S. la portion centrale de la courbe (réponse entre 16 et 84 %) est suffisamment droite pour estimer la DL50 . cependant une portion beaucoup plus grande de la courbe peut être exploitée en représentant les pourcentage de mortalité sur la base de probit . la procédure est particulièrement utile pour estimer les extrémités de la courbe DL5 ET DL 95.

Les unités probit correspondant à des écarts réguliers constant autour de la moyenne par exemple +1, +2 +3 ,, et -1 -2 -3 la moyenne elle-même étant fixée à zéro pour éviter des nombres négatifs les unités probit sont obtenus en ajoutant 5 à ces valeurs de sorte que le système s'établit ainsi.

Pour améliorer la signification des DL50 il est recommandé de déterminer aussi les écarts type (ou les intervalles de confiance) et la pente des droites doses réponse : si les intervalles de confiances de deux DL50 se chevauchent, la substance dont la DL50 est la plus faible ne sera pas forcément la plus toxique. L'importance de la pente peut être facilement appréciée quand on compare deux substances avec des DL50 semblable : les droites avec une pente moins accentuée entraîneront une plus grande mortalité que les autres à des doses inférieures à la DL50.

Calcul de la DL50

Méthode de Karber et Behrens (méthode numérique)

$$DL50 = DL100 - \frac{\sum (a \times b)}{n}$$

a : différence entre deux doses successive.

b : moyenne des morts entre deux doses successives.

n : nombre moyen d'animaux par lot.

Méthode graphique (méthode tainter et Miller) :

Il s'agit de tracer une droite sur un papier semi logarithmique en portant les réponses en ordonnée et les doses (mg/kg) sur l'abscisse.

Comme les probits des pourcentages de 0 et 100 % tendent vers l'infini(∞) ceux-ci sont remplacés par des valeurs corrigées

Correction de 0%, $Y_0 = 50/n$; Correction de 100%, $Y_{100} = n' - 0.5/n$

n : nombre d'animaux qui donne 0% dans les lots ; n' : nombre d'animaux qui donne 100% dans les lots

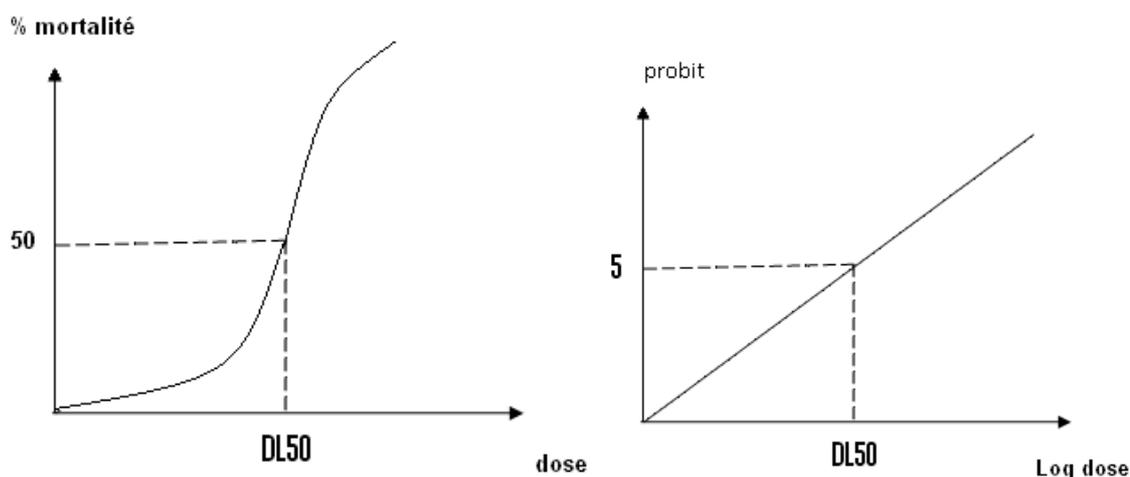


Table 3.2 Transformation of percentages to probits

%	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	—	2.67	2.95	3.12	3.25	3.36	3.45	3.52	3.59	3.66
10	3.72	3.77	3.82	3.87	3.92	3.96	4.01	4.05	4.08	4.12
20	4.16	4.19	4.23	4.26	4.29	4.33	4.36	4.39	4.42	4.45
30	4.48	4.50	4.53	4.56	4.59	4.61	4.64	4.67	4.69	4.72
40	4.75	4.77	4.80	4.82	4.85	4.87	4.90	4.92	4.95	4.97
50	5.00	5.03	5.05	5.08	5.10	5.13	5.15	5.18	5.20	5.23
60	5.25	5.28	5.31	5.33	5.36	5.39	5.41	5.44	5.47	5.50
70	5.52	5.55	5.58	5.61	5.64	5.67	5.71	5.74	5.77	5.81
80	5.84	5.88	5.92	5.95	5.99	6.04	6.08	6.13	6.18	6.23
90	6.28	6.34	6.41	6.48	6.55	6.64	6.75	6.88	7.05	7.33
—	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
99	7.33	7.37	7.41	7.46	7.51	7.58	7.65	7.75	7.88	8.09

Exemple : Déterminer la DL50 de sulfate de strychnine injecté par voie sous cutané chez des souris de 20g. Par la méthode graphique (méthode de Miller et Tinter), 2- Par la méthode de Karber et Behrens.

Dose mg / kg	Nombre d'animaux	Nombre de morts	% de mort
0.7	20	0	0
0.9	20	1	5
1.2	20	8	40
1.5	20	10	50
2	20	14	70
2.6	20	18	90
2.8	20	20	100

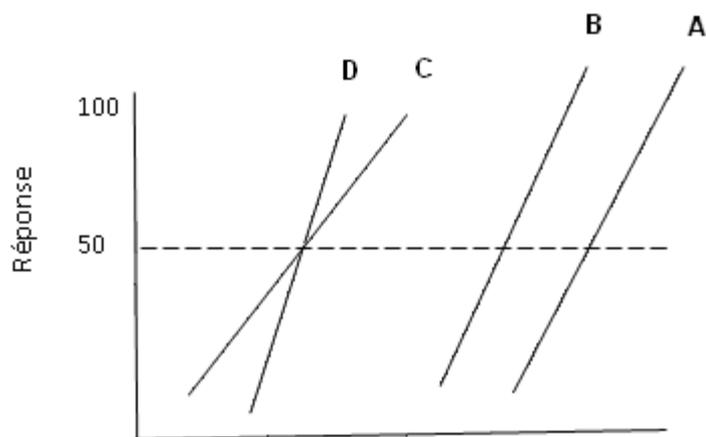


Figure droite représente la relation dose-réponse (mortalité) pour 4 produits et doses létale 50(DL50). Le produit A est moins toxique que les autres produits à une dose égale à la DL50 le produit C est aussi toxique que le produit D à la DL50 mais il est plus toxique à des doses plus faibles et moins toxique à des doses plus fortes enfin le produit B est moins toxique que le produit D à une dose égale à la DL50 mais il peut être plus à des doses inférieures.

Utilisation des DL50 et des signes de toxicité

Ces données sont utilisées à plusieurs fins

- 1) Classification des produits chimiques selon leurs toxicités relatives. la classification suivante en est un exemple classique :
- 2) De très nombreuses applications : évaluation de danger en cas de surdosage ; programmation des études de toxicité subaiguë et chronique chez les animaux ; apport des informations sur a) les mécanismes de toxicité , b) l'influence de l'âge , de sexe , de facteurs de l'hôte et environnementaux les variations dans la réponse chez différentes espèces animales et différentes souches ; information sur la sensibilité d'une population animale particulière , contribution à l'information générale nécessaire pour programmer des essais thérapeutiques chez l'homme , contrôle de qualité des produits chimiques pour détecter des impuretés et des modifications qui affectent la biodisponibilité

Étude de toxicité à long terme

Animaux espèce et nombre : Une ou plusieurs espèces d'animaux sont utilisées, sauf contre indication, le rat est l'animal de choix, suivi du chien et des primates, les souris sont moins recommandées en raison de leur petite taille, bien que souvent utilisées pour les études de cancérogenèses

Chaque lot expérimental est le lot témoin comprennent un nombre identique de mâles et de femelles généralement 40 à 100 individus pour les rats et un nombre plus faible de chiens et de primates est admis

Voie d'administration, dose et durée : La voie d'administration est la même que dans les études à court terme et les critères pour la sélection

Deux espèces d'animaux , ou plus sont nécessaires , l'idéal serait que les espèces choisies bio transforment le toxique de la même façon que l'homme mais en fait pour des raisons pratiques les espèces choisies sont souvent le rat et le chien cette préférence est basée sur leur taille raisonnable , leur disponibilité et l'abondance des données toxicologiques disponibles .pour obtenir des données exploitables statistiquement , on doit utiliser un nombre égal d'animaux de chaque sexe pour chaque concentration et pour le témoin en général 10 à 30 rats . On admet un nombre plus réduit de chien (4 à 8 par groupe) pour des raisons de

cout et d'encombrement, mais aussi parce qu'il est possible de faire un plus grand nombre d'observation individuelles

Voie d'administration : Le produit chimique devrait être administré par la voie préférentielle d'exposition chez l'homme ; pour la plus part des produits, la voie habituelle est la voie orale, par incorporation dans la nourriture ou dans ou dans l'eau potable si le composé risque de réagir un constituant de la nourriture. Si le produit est chimiquement réactif volatil ou d'un gout désagréable il est administré par gavage ou dans une capsule de gélatine, procédure couramment pratiqué chez le chien

L'application cutanées l'exposition par inhalation et l'administration par les voies parentérales correspondant a des applications particulière: produits industriels et a usage agricole et certains médicaments.

Dose et durée : L'objectif de ces études étant de déterminer la nature et le site des effets ainsi que la dose sans effets observe il est recommande de sélectionne trois doses : une dose suffisamment élevée pour produire des signes caractéristiques de toxicité, mais insuffisante pour tuer tous les animaux une dose faible sans effets toxique prévisible et une dose intermédiaire. Une ou plusieurs doses supplémentaire, un lot témoin est nécessaire auquel on administrera le véhicule de produit administré.

Les doses sont sélectionnées sur la base des résultats des études de toxicité aigue (DL50 et pente de la droite dose réponse) les autres informations sur le produit, en particulier le métabolisme et l'existence ou mon de phénomène de bioaccumulation doivent être aussi prises en considération

La durée de ces études est en général de 90 jours chez le rat, et jusqu'à 6 mois voire 1 ou 2 ans chez le chien

Examens poids du corps et consommation alimentaire

Ils doivent être administrés sur une base hebdomadaire la diminution du poids corporel est un indice simple, mais sensible d'effet toxiques. La consommation alimentaire est aussi un indicateur utile, il faut insister sur le fait qu'une alimentation réduite entraine des symptômes ressemblant à ceux d'une intoxication et peut aussi potentialiser les effets d'un toxique

Observation générales : Elles comprennent l'aspect, le comportement et toutes les anomalies visibles, les animaux morts ou moribond sont soumis a des examens macroscopique et microscopique. Une surveillance assidue est nécessaire pour éviter des phénomènes de cannibalisme

Examen de laboratoire : Les examens hématologiques comprennent généralement l'hématocrite, le taux d'hémoglobine et la numération globulaire (érythrocyte et leucocytes). Chez le chien, des prises de sang sont faites au début de traitement une semaine et un mois après et à la fin de traitement. Étant donne le

faible volume sanguin des rats le prélèvement se font seulement sur la moitié des individus a différent intervalles et sur l'autre moitié a la fin de l'essai. Les tests biochimiques sanguin comprennent le taux de glucose après un jeûne forcé, les activités sériques glutamate-oxaloacetate transaminase (SGOT) et glutamate pyruvate transaminase (SGPT), La phosphatase alcaline, les protéines totales, l'albumine les globulines, l'urée et des électrolytes comme le sodium, le potassium et le calcium et le chlore

L'analyse des urines comprend la couleur la densité le pH la présence des protéines, du glucose, de cétones

Examens post mortem : Tous les animaux mort ou mourants doivent être soumis a des autopsies sommaires. Si l'état des tissus l'autorise, des examens histologiques peuvent être faits, les poids de nombreux organes en valeurs absolues ou rapportés au poids du corps sont utilisés comme indicateur de toxicité les organes susceptibles d'être pesés sont : le foie les reins, la cour le cerveau la thyroïde les testicules ou les ovaires

Evaluation les études de toxicité fournira des informations sur la toxicité de produit, les organes cibles, la relation dose réponse. Les données quantitatives de toutes ces études ont été proposées pour déterminer la dose sans effet toxique observé (no observed effect level ; NOEL)

Si la toxicité n'est pas trop grave par nature et qu'une dose sans effets observés a été déterminée, une dose journalière admissible peut être extrapolée à partir des données animales généralement par application d'un facteur de sécurité tenant en compte à la fois des différences de sensibilité individuelle dans l'espèce humaine et en fin le nombre d'animaux testés est faible comparés à la taille de la population humaine susceptible d'être exposés .

Un facteur de sécurité de 100 est recommandé depuis longtemps par l'organisation mondiale de santé et largement accepté.

La Mutagénèse

Le phénomène de mutagénèse peut résulter d'interaction entre des agents mutagènes et le matériel génétique des organismes

Effets sur la santé : les effets éventuels de l'exposition d'individus à des substances mutagènes ne peuvent être prédits à ce jour. Toutefois une partie des fausses couches spontanées des naissances avant termes et des maladies héréditaires sont liées à des changements dans les molécules d'ADN et à des aberrations chromosomiques

Type de mutagénèse et tests correspondants : Il est bien connu que l'ADN joue un rôle clé en génétique tout d'abord il transmet l'information génétique d'une génération de cellule à la suivante par autoréplication. Cette réplication est réalisée par séparation des deux brins de la molécule d'ADN et synthèse de nouveau brin. Deuxièmement l'information génétique codée dans l'ADN est exprimée par le biais de la transcription d'un ARN complémentaire à l'ADN qui sert de modèle et de la traduction ultérieure de l'information à partir de cet ARN vers les acides aminés des protéines. Chaque séquence de 3 bases, le codon est spécifique d'un acide aminé un changement de la séquence des bases peut dès lors modifier les teneurs en acide aminé de la protéine synthétisée

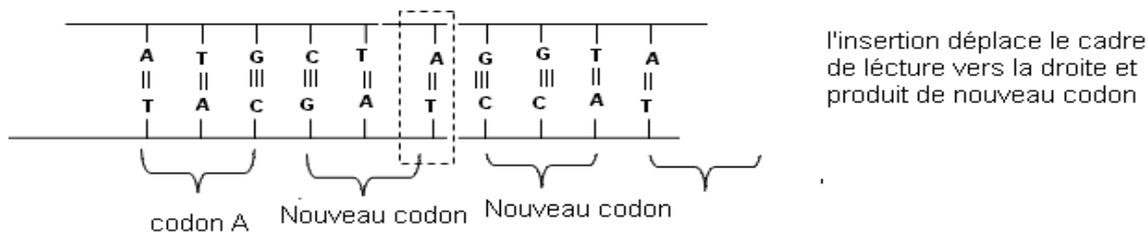
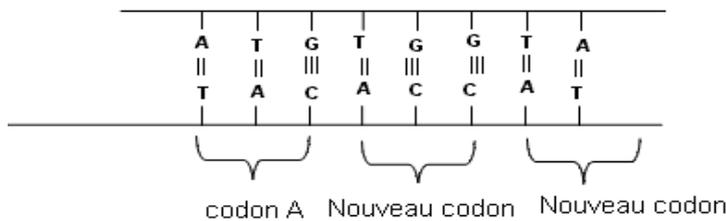
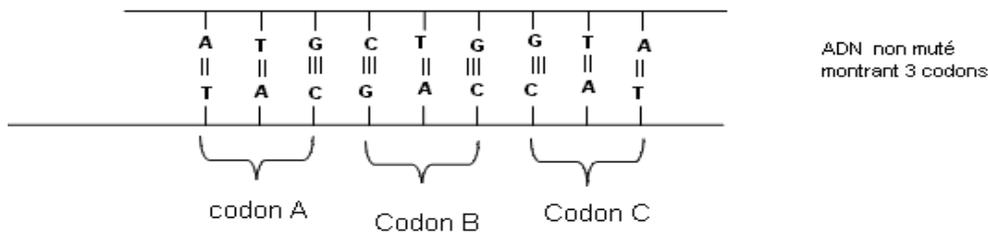
À ce jour il y a plus d'une centaine de systèmes de tests. Les tests principaux

La mutation génique les effets chromosomiques la réparation de la recombinaison de l'ADN

Mutation géniques : Les mutations au niveau du gène comprennent l'addition ou la perte de paire de base ou la substitution d'une paire erronée dans les molécules d'ADN.

Les substitutions incluent les transitions et les transversions. Dans le premier cas il peut y avoir remplacement d'une purine par une autre (adénine, guanine) ou une pyrimidine (cytosine, thymine) par une autre. Lors de transversions, une purine peut remplacer une pyrimidine ou vice-versa.

Quand le nombre de paires ajoutées ou perdues n'est pas multiple de trois la séquence en acides aminés de la protéine codée au niveau de l'addition ou de la délétion sera altérée. Ce phénomène est appelé mutation par décalage de cadre de lecture (frame shift mutation) et est susceptible d'altérer les propriétés biologiques de la protéine



Un composé mutagène peut aussi être incorporé dans la molécule d'ADN, et être la cause d'un nucléotide modifié. Ces modifications dans la protéine synthétisée ou modifier la séquence des acides aminés. Un codon terminal de fin de synthèse peut être formé, conduisant à une protéine raccourcie. Si le premier type d'effet n'a pas obligatoirement de répercussion sur la propriété de la protéine, ce sera presque toujours de cas pour les deux derniers

Tests in vitro utilisant des organismes inférieurs

Ils utilisent des microorganismes qui peuvent être soit des procaryotes, soit des eucaryotes

Procaryotes : Ces microorganismes comprennent différentes souches de bactéries. Pour la détermination des mutations ponctuelles. Les bactéries les plus utilisées sont *Salmonella typhimurium* et *Escherichia coli*. La plupart des systèmes test bactériens sont orientés vers la détection de mutation réverse. Le test d'Ames (Ames, 1971) mesure la réversion de mutation Histidine-dépendants de *S. typhimurium* vers le type sauvage qui est Histidine indépendant. Les mutants sont incubés dans un milieu ne contenant pas suffisamment d'Histidine pour assurer la croissance. Si la molécule toxique ajoutée ou milieu est capable d'induire des mutations reverses, on voit apparaître des bactéries Histidine indépendantes susceptibles de croître dans le milieu pauvre en histidine. Il est usuel d'utiliser plusieurs souches possédant des caractéristiques spécifiques. La mutation reverse peut se faire soit par « frame shift ». Soit par substitution, d'autre part un agent mutagène peut-être actif sur une souche et pas sur les autres.

Des souches de *S. typhimurium* ont été rendues plus sensibles à l'effet des mutagènes par altération de leur paroi cellulaire (défiance en lipopolysaccharides) par la modification de leur capacité de réparation de l'ADN après excision (à l'aide d'une délétion spécifique sur la molécule d'ADN) ou par l'addition d'un facteur de résistance à l'ampicilline

De nombreux mutagènes sont inactifs par défaut de bioactivation. Le test peut être réalisé avec un système de bioactivation inclus dans les procédures *in vitro*. Ce système est habituellement la fraction microsomale de foie contenant les oxydases multifonctionnelles et provenant des rats ou d'autres animaux, parfois l'homme. L'activité de cette fraction microsomale est souvent augmentée par un prétraitement des animaux à l'aide d'indicateur comme 3-méthylcholanthrene, le phénobarbital ou les biphenyles polychlorés. Des cofacteurs sont aussi ajoutés préalablement dans le milieu d'incubation.

Des souches d'*E. Coli* plus ou moins déficientes dans leur capacité de réparation de l'ADN sont aussi utilisées dans les tests de mutagenèses. Le type sauvage résiste mieux au effet mutagène de fait de sa capacité de réparation que les mutants qui en sont dépourvus bien que la plus part des tests utilisent des microorganismes visent à détecter des mutations directes, comme la résistance au 5-méthyltryptophane

Eucaryotes

Un certain nombre de souches de *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Neurospora* et *Aspergillus* ont été développées principalement pour la détection de mutations reverses et dans certains cas pour la détection de mutations directes. Comme pour le système bactérien, ces systèmes incluent des enzymes de bioactivation et des cofacteurs. Un mutant de *saccharomyces cerviciae* est adénine dépendant pour l'adénine et se développe en colonies colorées en rouge :

le type sauvage est non dépendant pour l'adénine et se développe en colonies blanches. La mutation reverse peut dès lors être appréciée par la prévalence des colonies blanches.

Cancérogenèse

Le cancer est la principale cause de mortalité dans de nombreux pays. certain mode de vie comme le fait de fumer des cigarettes, boire des boissons alcooliques, mais aussi l'exposition à des produits chimiques présent sur le lieu de travail et dans l'environnement quotidien, et la prise de médicament serait à l'origine de certains cancers.

Les tentatives pour réduire l'incidence de cancer se sont concentrées sur la modification des modes de vie à risque et l'identification des cancérogènes chimiques dans l'espoir de supprimer ou du moins de diminuer l'exposition humains.

L'amélioration des méthodes existante d'identification rapides et sûre des cancérogènes chimiques et la découverte des méthodes nouvelles sont des objectifs de recherche importants en cancérogénèse.

Cancérogénèse chimique : le terme Cancérogénèse chimique s'applique à l'induction ou à l'augmentation de la formation des lésions néoplasiques par des produits chimiques. l'étymologie stricte restreint le sens à la formation de carcinomes, mais on l'applique aussi à la tumorigénèse c'est-à-dire aux tumeurs malignes et bénignes.

Preuves du caractère cancérogénèse

Les preuves de cancérogénèse se trouvent dans des données animales et humaines. cependant, en raison des différences interspécifiques dans la réponse aux produits chimiques, des données humaines solidement établies ont un poids beaucoup plus grand .

Sur la base de ses principes les produits chimiques sont classés dans les 5 catégories suivantes

Groupe A cancérogénèse humaine : des données chez l'homme sont une preuve suffisante

Groupe B cancérogénèse humaine probable : quelques données humaines ou pas de preuve chez l'homme, mais des données chez l'animal

Groupe C cancérogénèse humaine possible : données limitées chez l'animal et absence de données chez l'homme.

Groupe D cancérogénèse humaine non établie ; critères inadéquats ou absence des données

Groupe E absence de cancérogénèse humaine établie : démonstration négative chez au moins chez deux espèces.

Les données humaines proviennent généralement des milieux professionnels par exemple l'existence de cancer de la vessie chez certaines catégories professionnelles après exposition au 4-aminobiphényle cette donnée a été confirmée chez la souris, le lapin et le chien de la même façon l'amiante induit des tumeurs du poumon et de la plèvre qui ont été reproduites chez plusieurs espèces animales.

Mode d'action

La cancérogénèse chimique est un processus en plusieurs étapes. Les produits chimiques cancérogènes initient des changements génétiques dans une cellule amorçant la formation de néoplasmes ou convertissant un néoplasme en cancer

Un produit génotoxique généralement après bioactivation réagit avec une macromolécule support de l'information génétique pour former un adduit ou pour induire d'autres altérations chimiques de l'ADN. La cellule atteinte meurt ou revient à son état initial après réparation de l'ADN. Si aucun de ces événements ne se produit le processus d'initiation devient irréversible une fois que la cellule entre en phase de multiplication. Le processus peut aussi impliquer la conversion d'un protooncogène en oncogène transformant une cellule normale en cellule cancéreuse, des oncogènes peuvent être transportés dans ces cellules par des rétrovirus

La cellule tumorale initiée avec un génotype et un phénotype altérés peut rester quiescente pendant une période prolongée avant de devenir une tumeur à la suite de prolifération cellulaire en présence de promoteurs. Ce retard est probablement le résultat d'une répression par les cellules normales voisines par un processus de communication cellulaire

Principaux cancérogènes : Les cancérogènes peuvent être classés selon leur mode d'action en produits génotoxiques et épigénétiques (non génotoxiques)

Cancérogènes génotoxiques : Les cancérogènes génotoxiques initient des tumeurs en provoquant des lésions de l'ADN et appartiennent à deux catégories principales.

Les cancérogènes à action directe (dénommés aussi cancérogènes ultimes) sont des électrophiles et peuvent se lier à l'ADN et à d'autres macromolécules : les époxydes d'alkyle et d'aryle, les lactones, les esters sulfates, les nitrosamines, les nitroso-urées et les amines chélatant le platine en sont quelques exemples. Leur forte réactivité rend ces molécules souvent plus actives *in vitro* qu'*in vivo*.

Le pré Cancérogènes (ou pro Cancérogènes) nécessitent une bioactivation pour devenir des cancérogènes ultimes. La plupart des cancérogènes connus appartiennent à cette classe : hydrocarbures aromatiques polycycliques (PAH), amine aromatique, hydrocarbures halogénés, nitrosamines, cycasine, aflatoxine B1, alcaloïdes pyrrolizidiniques, safroles et thio-amides.

Cancérogènes épigénétiques : Ces substances n'altèrent pas l'ADN, mais favorisent la croissance des tumeurs induites par les cancérogènes génotoxiques selon différents mécanismes d'action :

Les co-cancérogènes aggravent les effets des cancérogènes génotoxiques en cas d'administration simultanée ; ils peuvent agir par augmentation de la concentration de l'initiateur (augmentation de l'absorption de cancérogène dans le tube digestif ou par une élimination diminuée de l'initiateur par

inhibition des enzymes de détoxifications ou par déplétion des substances endogènes impliquées dans les réactions de la phase II. Les co-cancérogènes peuvent aussi perturber la fidélité de la réparation de l'ADN ou aggraver la conversion des lésions de l'ADN en altération permanentes.

Etude de la cancérogenèse a long terme

Ces études sont planifiées pour fournir des données concluantes sur les effets cancérogènes des produits chimiques sur les espèces testes

Animaux : espèce, souche, sexe et nombre

Le rat et la souris sont les espèces de choix en raison de de leur petite taille , de leur durée de vie courte , de leur disponibilité facile et de l'abondance de données sur leurs réponse a d'autres cancérogènes ; les hamster sont aussi utilisés surtout dans les études de cancer de la vessie, du sein, de l'appareil digestif et de l'appareil respiratoire. les chien et les primates sont quelquefois utilisés. leur utilisation est limitée par leur grande taille et une durée de vie relativement longue , nécessitant 7 à 10 ans d'exposition pour tester un seul produit

Les caractéristiques de la meilleure souche sont (1) une sensibilité connue aux produits de structure chimique voisine ; (2) une faible incidence de tumeurs spontanées et (3) une ressemblance des voies de biotransformation avec celle de l'homme

Les deux sexes peuvent être inclus dans ces études, car des différences de réponse aux molécules cancérogènes ont déjà été mises en évidence.

Pour obtenir un nombre suffisant d'animaux survivant jusqu'à l'apparition des tumeurs il est habituel de commencer les tests avec des lots de 50 animaux de chaque sexe par dose, y compris le témoin.

Mise en route et déroulement : les essais débutent généralement peu de temps après le sevrage des animaux pour que l'étude la plus longue possible. des études sur plusieurs générations et l'utilisation de la femelle gestante pour exposer l'embryon et le fœtus. la durée de ses études généralement 24 mois chez le rat et de 18 mois chez la souris.

Voie d'administration : Le produit à tester doit être donné à l'animal par la voie de l'exposition chez l'homme ; ce principe s'applique. Quand le produit à tester est donné par voie orale il est mélangé à la nourriture soit à l'eau potable ou donné par gavage.

Doses : on prévoit généralement deux ou trois doses et des lots témoins ces doses sont sélectionnées sur la base des études à court terme et des études métaboliques , avec l'objectif de sélectionner des doses dont la plus forte produira des signes mineurs de toxicité sans réduire significativement la durée de vie des animaux les deux doses inférieures sont généralement des fractions de la dose la plus forte (par exemple 1

/2 et 1/4) et seront censées permettre à l'animal de survivre en bonne santé jusqu'à l'apparition des tumeurs. La dose la plus forte sera la dose maximale tolérée (DMT) dérivée des études à 90 jours est définie comme la dose qui ne produit pas de toxicité apparente

Témoins : Un lot témoin non traité et forme d'un nombre d'animaux équivalent ou supérieur à celui des lots traités en plus de son contrôle négatif il faut prévoir un autre groupe d'animaux auquel il est administré un cancérogène connu à une dose dont on sait qu'elle donnera une réponse positive un témoin positif augmente la crédibilité des résultats du produit testé et en assurant la validité des procédures propres de laboratoire dans lequel se fait l'essai

Observation et examen

Poids du corps et consommation alimentaire : Le poids du corps et la consommation alimentaire permettent le calcul de la quantité absorbée sur la base de milligramme par kilogramme de poids corporel. Le poids du corps est un indicateur sensible de l'état de santé de l'animal et devra être déterminé chaque semaine

Observation générale : Les animaux doivent être examinés chaque jour pour les signes de morbidité ou pour la mortalité les animaux morts ou moribonds doivent être retirés des cages pour des autopsies et des examens histo-pathologiques

Examen post mortem : Tous les animaux morts ou mourant doivent être autopsiés. Les survivants à la fin de l'étude doivent être sacrifiés examinés et les organes pesés (foie rein cœur testicules cerveau etc)

Des échantillons de tous les tissus seront préservés pour des examens histologiques

Description des tumeurs

la cancérogenèse se manifestant sous des formes très différentes, il est nécessaire de noter les aspects suivants

- 1- Le nombre des différentes catégories de tumeurs (maligne et bénigne)
- 2- Le nombre d'animaux portant des tumeurs
- 3- Le nombre de tumeurs pour chaque animal
- 4- La date d'apparition des tumeurs si possible

Tératogénèse

La tératogénèse est l'apparition de malformations congénitales. Ce type de pathologies connu depuis très longtemps, est une cause de mortalité importante parmi les nouveaux nés. Murphy en 1928a étudie 320 grossesses humaines et a trouvé 14 cas de la tête réduites et des retards mentaux. leurs mères avaient été expose a des radiation à usage thérapeutique tres tôt durant la grossesse.

Une relation directe entre malformations congénitales et produits chimiques n'était pas suspectée dans la mesure où il y avait une tendance parmi les toxicologues à croire que les mécanismes protecteurs naturels, comme la détoxification, l'élimination et la barrière placentaire, étaient suffisants pour faire écran entre l'embryon et l'exposition maternelle à des molécules toxiques. Cependant, il était admis que le mécanisme de défense naturelle était impuissant vis-à-vis des radiations ionisantes, des virus et carences nutritionnelles.

Une nouvelle ère pour tératologie est apparue à la suite de l'utilisation clinique d'un sédatif connu sous le non thalidomide. Ce médicament introduit pour la première fois à la fin des années 50 en Allemagne avait semblé relativement non toxique lors de l'expérimentation animale et des essais cliniques chez l'homme. de plus, alors que la dose thérapeutique était de 100 mg, l'ingestion de 14g lors d'une tentative de suicide ne provoqua pas la mort. Les premiers cas de phocomélie sont rapportes en 1960(la phocomélie est une malformation congénitale caractérisée par un raccourcissement des membres ou leurs absence

Embryologie : Après sa fécondation, l'œuf suit une séquence précise de prolifération, de différenciation cellulaire puis d'organogénèse. L'embryon va alors subir un cycle de métamorphoses et une période de développement foetal avant la naissance.

Etape de prédifférenciation : Durant cette période, l'embryon n'est pas sensible aux agents tératogènes. Les agents pouvant ultérieurement provoquer la mort de l'embryon en en tuant tout ou partie cellules n'ont pas d'effets apparents à l'exception de quelques effets que cellules survivantes sont en mesure de compenser. Cette période de résistance varie de 5à 9 jours en fonction de l'espèce.

Etape embryonnaire : Pendant cette période, les cellules se di différencient, se mobilisent et s'organisent. La majeure partie de l'organogénèse se déroule à ce moment (fig.9.1).c'est pendant cette période, qui s'achève entre le 10ème et le 14ème jour chez les rongeurs et pendant la 14ème semaine de grossesse dans l'espèce humain que l'embryon est le plus sensible aux agents tératogènes. Néanmoins, tous les organes ne sont pas sensibles au même moment de la grossesse. La figure 9.2 montre que la plupart des organes sont très sensibles entre le 8ème et le 12ème jour chez le rat, plus tardivement pour le palais et les organes uro-génitaux.

Etape fœtale : Elle est caractérisée par la croissance et la maturation fonctionnelle. Les tératogènes n'ont donc que peu d'effets pendant cette étape ou l'on pourra tout fois induire des anomalies fonctionnelles. Si les modifications morphologiques sont en général rapidement diagnostiquées à la naissance ou dans les jours qui suivent, les défauts fonctionnels comme les déficiences au niveau du système nerveux central ne pourront être diagnostiqués que plus tardivement après la naissance.

Procédure d'évaluation

Animaux : Rats, lapins, souris, et hamsters sont les animaux les plus utilisés de fait de leur disponibilité d'une manipulation aisée de nombreuses portées et d'un temps de gestation court. Les porcs sont quelquefois

Les animaux doivent être jeunes matures et en bonne santé, les femelles en première gestation sont préférables

Dans le cas des rats, au moins 20 femelles sont utilisées pour une dose, avec les lapins on se limite à 12. Des nombres plus faibles sont employés pour des animaux de taille plus importante comme le chien et les primates.

Doses : Trois doses au moins sont utilisées. La dose la plus forte peut induire des phénomènes de toxicité pour la mère ou le fœtus, une diminution du poids corporel par exemple. La dose la plus faible ne doit provoquer aucun symptôme observable. Une ou plusieurs autres doses graduées doivent être intercalées entre ces deux doses

Parallèlement, deux lots témoins sont pris en expérimentation. L'un de ces deux lots réservera la substance véhicule de l'administration, le second une substance connue pour ces effets tératogènes. Ces lots d'animaux donneront des informations sur l'incidence de malformation spontanées et la sensibilité du lot d'animaux testés dans les conditions expérimentales de l'essai. Les résultats des essais sur les animaux témoins d'autres expérimentations sont à prendre en considération

Voie et période d'administration : La molécule à tester est administrée par la voie la plus représentative de l'exposition chez l'homme. Pour les additifs et les contaminants, la molécule est généralement incorporée à la nourriture. Les médicaments à prise orale sont administrés par gavage

Le moment de l'administration est crucial comme le démontre l'expérience de Tuchman-Duplessis (1955) avec le 6-mercaptopurine, qui produit des lésions nerveuses et oculaires ou des anomalies squelettiques selon la période d'administration. Toutefois dans les études de routine il est habituel de donner la molécule pendant la période entière correspondant à l'organogenèse période durant laquelle l'embryon est le plus sensible. Cette période varie selon l'espèce

Examens

Femelles gestantes

Les animaux sont examinés quotidiennement afin de détecter les signes graves de toxicité. Chaque femelle présentant des signes d'avortement imminent ou de parturition prématurée

Fœtus

Les fœtus sont habituellement extraits de la mère par voie chirurgicale environ 1 jour avant la date prévue de la mise basse. On évite de cette manière le cannibalisme et on peut compter les sites de résorption ainsi que les fœtus mort

Les observations suivantes sont faites et enregistrées

- Nombre de corps jaunes,
- Nombres d'implantations,
- Nombre de résorptions,
- Nombre de fœtus morts,
- Nombre de fœtus vivant,
- Sexe de fœtus vivant,
- Taille de chaque fœtus vivant,
- Anomalies de chaque fœtus