

# DOSES-RÉPONSES NON MONOTONES : UN ENJEU POUR L'ÉVALUATION DES RISQUES

Francelyne Marano\*

\* Université Paris-Diderot

Dans l'évaluation du danger des xénobiotiques<sup>1</sup>, la relation dose-réponse<sup>2</sup> linéaire avec ou sans seuil a longtemps été considérée comme universelle et a servi de fondement au développement de la toxicologie réglementaire depuis près de 60 ans. Cependant, si les valeurs toxicologiques de référence (VTR) de nombreux produits chimiques peuvent être calculées à partir de telles courbes, ces dernières années des recherches montrent que certaines molécules, dont les perturbateurs endocriniens (PE), se caractérisent par une relation dose-réponse non monotone beaucoup plus difficile à modéliser et souvent objet de controverses. Des publications récentes proposent une stratégie pour prendre en compte ces nouvelles données dans l'évaluation de risque.

## Contexte

Le concept de la relation dose-effet a été à la base de la toxicologie jusqu'à maintenant et est à l'origine des notions de seuil de toxicité dans les réglementations des produits chimiques. Il a permis l'élaboration d'une large base de données et des valeurs toxicologiques de référence (VTR) nécessaires à l'établissement des réglementations et des normes sanitaires [1]. Cependant, il a été récemment remis en cause par des observations sur des toxiques environnementaux où la relation entre dose et toxicité n'est pas simple, ou monotone, et où les effets toxiques chroniques peuvent se manifester à des doses faibles. Ils ne sont pas alors prévisibles par les études toxicologiques réglementaires classiques qui se font d'ordinaire à forte dose pour détecter une toxicité aiguë ou subaiguë et supposent une relation dose-effet linéaire avec ou sans seuil. Ces nouvelles données remettent en question les tests toxicologiques et les évaluations de risque réglementaires qui visent à vérifier l'innocuité d'un composé chimique, d'un médicament, d'un pesticide, d'un produit industriel.

La recherche d'une nouvelle approche prenant en compte les faibles doses a été proposée dans des publications récentes et est particulièrement cruciale pour l'évaluation des risques de la perturbation endocrinienne.

## Comment définir une faible dose

D'après les experts du National Toxicology Program aux États-Unis une faible dose devrait répondre aux critères suivants:

- 1 Un xénobiotique est une substance présente dans un organisme vivant mais qui lui est étrangère : il n'est ni produit par l'organisme lui-même, ni par son alimentation naturelle.
- 2 Il s'agit de la relation entre la dose d'une substance toxique et le risque d'apparition d'un effet indésirable.

- se trouver dans le champ habituel des expositions humaines, dans la gamme des concentrations pouvant être mesurées dans le sang de la population générale en excluant les expositions professionnelles.
- être située dans une gamme de concentrations inférieure à celles utilisées généralement en toxicologie sous la dose la plus faible testée dans le cadre des études réglementaires permettant de définir la LOAEL (dose la plus faible testée provoquant des effets adverses observés).

Dans une revue analysant plus de 800 publications, il apparaît clairement que les effets des faibles doses sont bien souvent associés aux relations dose-réponse non monotones [2]. Ce sont les études sur les PE et tout spécialement sur le bisphénol A qui ont le plus contribué à faire progresser une réflexion générale sur les faibles doses et leur signification en termes de prévention et d'évaluation des risques pour l'homme et l'environnement. Cependant, il faut constater que la toxicologie réglementaire a du mal à détecter de tels effets car elle utilise des critères toxicologiques (*endpoint*) généralement non adaptés à leur détection.

Les PE peuvent agir sur le système endocrine à des doses comparables à la gamme d'efficacité des hormones avec lesquelles ils entrent en compétition : 10-900 pg/mL pour l'oestradiol, 300-10 000 pg/mL pour la testostérone et 8-27 pg/mL pour la thyroxine (hormone thyroïdienne T4) [3]. Une raison pour laquelle les hormones peuvent agir à de si faibles concentrations est leur forte affinité pour les récepteurs spécifiques auxquels elles se lient et on observe souvent une relation non linéaire entre la concentration hormonale et la réponse biologique. C'est ce qu'on constate également dans les réponses aux perturbateurs endocriniens.

Dans une « position de consensus » (*consensus statement*) faisant suite à un séminaire international sur les PE (*expert meeting*, German Federal Institute for Risk Assessment, 11-12 avril 2016), 17 éminents spécialistes du domaine des PE ont proposé une liste de critères et de méthodes pour l'identification des PE afin de permettre leur meilleure prise en compte dans les réglementations [4]. Ils admettent que les courbes dose-réponse non monotones souvent induites par les PE sont difficiles à analyser dans le cadre de l'évaluation de risque et que c'est un des points de débat important dans la controverse actuelle sur les PE. Ils considèrent cependant que ce ne doit pas être un point de blocage de cette évaluation.

### **Comment expliquer et analyser les courbes dose-réponse non-monotones ?**

L'approche toxicologique classique vise à mettre en évidence une relation proportionnelle entre les doses et les effets. Les relations dose-réponse monotones sont faciles à modéliser et sont à la base de la détermination de variables quantitatives qui permettent de caractériser la toxicité de l'agent étudié sur un paramètre biologique. On détermine ainsi chez l'animal la DL50 (dose létale 50), l'IC50 (concentration inhibitrice 50), la LOAEL (*Low observable adverse effect level*), la NOAEL (*No observable adverse effect level*), concentrations indicatives de la toxicité qui permettent de déduire pour l'Homme une valeur toxicologique de référence et un classement du produit en fonction de sa toxicité.

L'étude des mécanismes d'action des PE permet de comprendre que la relation entre l'effet toxique et la dose n'est pas toujours monotone : un effet de type PE peut s'observer à des doses faibles et disparaître à forte dose pour laisser place à des effets toxiques non spécifiques. Or, dans les études réglementaires, les tests toxicologiques sont souvent réalisés à des concentrations élevées non réalistes des expositions réelles et risquent de masquer ces relations non monotones qu'il faut savoir actuellement rechercher.

Lagarde *et al.* [5]) à partir de l'analyse de 82 articles sélectionnés pour leur pertinence et la qualité des protocoles utilisés, décrivent les différentes situations qui conduisent à des relations dose-effet non monotones. Elles peuvent être très différentes, par exemple l'existence d'une pluralité de cibles cellulaires d'affinité variable pour la molécule étudiée (Fig. 1). Dans d'autres cas, il peut y avoir saturation des cibles biologiques par le xénobiotique et, en retour, une inhibition de son effet par rétrocontrôle (Fig. 2). Les xénobiotiques impliqués dans ces études sont essentiellement des PE : BPA, PCB, phtalates, alkylphénols, octylphénols, pesticides organochlorés, éthylestradiol, pregnénolone. Les effets observés portent pour la plupart sur les appareils reproducteurs mâle et femelle mais également sur la glande mammaire, le système cardiovasculaire, le foie, le système immunitaire avec des réponses non monotones *in vivo* et *in vitro* [5].

Les relations dose-réponse non monotones se caractérisent par des pentes variables dans la gamme de concentrations testées. Certaines peuvent se présenter sous la forme d'une courbe en U, les réponses maximales pouvant alors se trouver dans la gamme des doses les plus faibles et les plus fortes mais pas dans la gamme intermédiaire. D'autres sont en cloche ou en U inversé, les effets maximaux se trouvant alors dans la gamme des concentrations intermédiaires. Ces relations ne permettent pas d'établir de manière classique les valeurs de NOAEL et interdisent de fait le calcul d'une VTR. Ceci nécessite donc de nouvelles approches d'évaluation de la toxicité et des risques, différentes de celles qui sont actuellement en vigueur. Pour l'étude de ces réponses non monotones, il est important de choisir une gamme de concentrations suffisamment large. Les « lignes directrices » (*guidelines*) de l'Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE) préconisent généralement trois doses à tester, il faudrait donc y introduire l'obligation d'un test en dessous de la NOAEL, adapté par exemple à la recherche d'un effet PE. L'importance des fenêtres d'exposition<sup>3</sup> est également à prendre en compte en utilisant des tests permettant d'observer d'éventuels effets sur l'embryon ainsi que des effets trans-générationnels. Une stratégie a été développée pour calculer l'IC50 à partir de courbes non monotones par l'utilisation d'une approche mathématique non paramétrique [6]. Cette approche, qui permet de modéliser les courbes non monotones, doit pouvoir s'appliquer, selon les auteurs, à la pharmacologie comme à la toxicologie.

L'hormésis est une relation dose-réponse dans laquelle les effets à faibles doses sont inverses de ceux observés à forte dose. De sorte que les courbes hormétiques sont généralement biphasiques au lieu d'être monotones. Elles peuvent être des courbes en J ou en U renversés. Dans la réponse hormétique, des étapes d'adaptation au stress puis de toxicité selon la dose se traduisent, en fonction du critère biologique mesuré, par ces courbes biphasiques caractéristiques (Fig. 3). De nombreuses observations laissent penser que cette phase adaptative rend la cellule ou l'organisme capable de supporter des doses plus fortes dans des expositions ultérieures. Une publication récente [7] montre que les radiations ionisantes peuvent induire à faible dose une réponse adaptative permettant de résister à des doses plus fortes et qu'elles renforcent le système immunitaire, ce qui pourrait être utilisé en radiothérapie anticancéreuse.

L'article de Lagarde *et al.* [5], commenté dans ERS (septembre-octobre 2015), propose pour la première fois un arbre décisionnel pour la prise en compte des données de publications faisant état de relation dose-réponse non monotones :

- étape 1 : analyse de la qualité des données expérimentales par l'utilisation des critères de Klimist *et al.* [9] qui permet un classement des études en 3 catégories, catégorie 1 (utilisable sans restriction) catégorie 2 (utilisable avec restriction) catégorie 3 (à rejeter) ;
- étape 2 : nombre de doses testées en incluant le contrôle (entre 4 et 8 doses) ;
- étape 3 : qualité des données permettant une étude statistique ;
- étape 4 : critères de dose-réponse non monotone ;
- étape 5 : plausibilité biologique incluant la prise en compte des mécanismes d'action.

Les auteurs considèrent que l'application de cet arbre décisionnel devrait permettre d'intégrer des données généralement non prises en compte dans l'évaluation classique du risque, dont les doses-réponses non monotones. Ils soutiennent également une proposition d'un groupe d'experts [10] d'inclure dans les guidelines OCDE un nombre de doses testées plus important accompagné d'une possible réduction du nombre d'animaux par groupe dans les tests normalisés. Cette approche, si elle était acceptée par les instances réglementaires internationales, devrait permettre une meilleure appréciation d'effets biologiques qui peuvent apparaître hors du champ habituel des évaluations toxicologiques.

## Conclusion

Bien que les effets des faibles doses et des réponses biologiques non monotones qui y sont souvent associées aient été longtemps débattus, un consensus de plus en plus large conduit actuellement à vouloir les prendre en considération dans

3 Période pendant laquelle une exposition est plus susceptible de conduire à un effet sanitaire

les études réglementaires. Les très nombreuses publications qui en font état, après l'analyse critique de leur pertinence, ont conduit certains toxicologues et analyseurs de risque à souhaiter les intégrer dans leurs démarches. Il est certain qu'elles questionnent le concept de la relation dose-effet et la possibilité de déterminer des courbes dose-réponse avec ou sans seuil qui fournissent les bases de la démarche toxicologique depuis 50 ans. La découverte de la perturbation endocrinienne associée à de nombreux produits chimiques qui avaient été préalablement évalués selon les critères classiques impose de se poser la question d'un élargissement des procédures d'évaluation de la toxicité des nouvelles molécules avant leur mise sur le marché et de la réévaluation de certaines molécules anciennes suspectées d'être des PE. Une approche consisterait à élargir la gamme des concentrations testées vers les faibles doses dans les protocoles réglementaires d'évaluation toxicologique et de réviser les lignes directrices de l'OCDE. Il conviendrait également de prendre en compte qu'un effet biologique considéré comme mineur chez l'adulte peut se révéler sévère à des périodes spécifiques de la vie en particulier périnatale. Il est donc urgent, qu'au regard des connaissances produites ces dix dernières années, les stratégies d'évaluation toxicologique évoluent en considérant de manière spécifique les composés pour lesquels la relation entre la dose et l'effet n'est pas linéaire.

**Liens d'intérêt en rapport** avec le texte publié : **aucun**

### Références

1. Rapport de l'ANSES. Guide l'élaboration de VTR. Rapport d'expertise collective 2010 mise à jour septembre 2015. <https://www.anses.fr/fr/system/files/VTR2012SA0275Ra.pdf>
2. Vandenberg LN, Colborn T, Hayes T.B, Heindel JJ, et al. Hormones and Endocrine-Disrupting Chemicals: Low-Dose Effects and Nonmonotonic Dose Responses. *Endocr Rev* 2012 ; 33 : 378-455.
3. Jones KA (1996). Summation of basic endocrine data. In: Gass GH, Kaplan HM, editors. , eds. *Handbook of endocrinology*. 2<sup>nd</sup> ed New York: CRC Press, 1-42.
4. Solecki R, Kortenkamp A, Bergmann A, Chahoud I et al. Scientific principles for the identification of endocrine-disrupting chemicals : a consensus statement. *Arch Toxicol* 2017; 91 : 1001-6.
5. Lagarde F, Beausoleil C, Belcher SM, Belzunces LP, et al. Non-monotonic dose-response relationships and endocrine disruptors: a qualitative method of assessment. *Environ Health*, 2015 ; 14 : 13.
6. Zhang H, Holden-Wiltse J, Wang J, Liang H (2013) A strategy to model nonmonotonic dose-response curve and estimate IC50. *PLoS One* 2013 ; 8(8) : e69301.
7. Cui J, Yang G, Pan Z, Zhao Y, et al. Hormetic Response to low-dose radiation: Focus on the Immune System and Its Clinical Implications. *Int J Mol Sci* 2017; 18(2) pii: E280.
8. Hoffmann GR. A perspective on the scientific, philosophical, and policy dimensions of hormesis. *Dose Response* 2009 ; 7 : 1-519.
9. Klimisch HJ, Andreae M, Tilmann U. A systematic approach for evaluating the quality of experimental toxicological and ecotoxicological data. *Regul Toxicol Pharmacol* 1997 ; 25 : 1-5.
10. Beausoleil C, Ormsby J, Gies A, Heindel JJ et al. Dose effects and non monotonic dose-response of endocrine active chemicals: science to practice workshop: workshop summary. *Chemosphere* 2013 ; 93 : 847-56.

Figure 1. Mécanisme de réponses non monotones en fonction de la pluralité des récepteurs cellulaires et de leur affinité pour le xénobiotique testé (xe). À faible dose, xe se lie aux récepteurs A et induit une réponse. À forte dose, il se lie également aux récepteurs B qui provoquent un effet inverse. Ceci implique que xe est une affinité supérieure pour le récepteurs A que B. D'après [5].

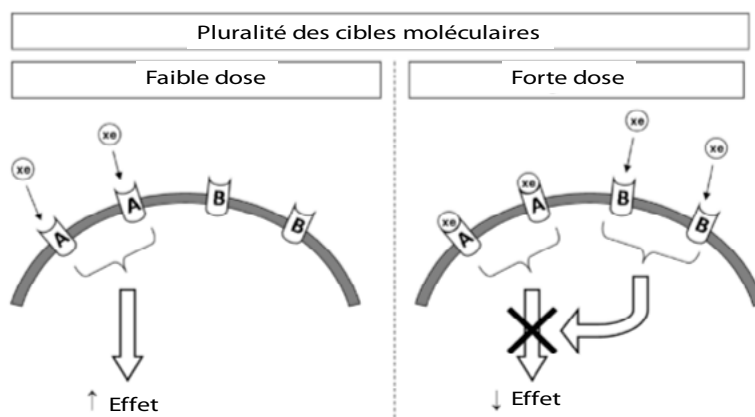


Figure 2. Mécanismes de réponses non monotones induits par la « désensibilisation des récepteurs ». À faibles doses, le xénobiotique (xe) se lie aux récepteurs et induit une réponse. À forte dose, tous les récepteurs sont liés ce qui peut conduire à un mécanisme d'inhibition par blocage de la synthèse du récepteur. D'après [5].

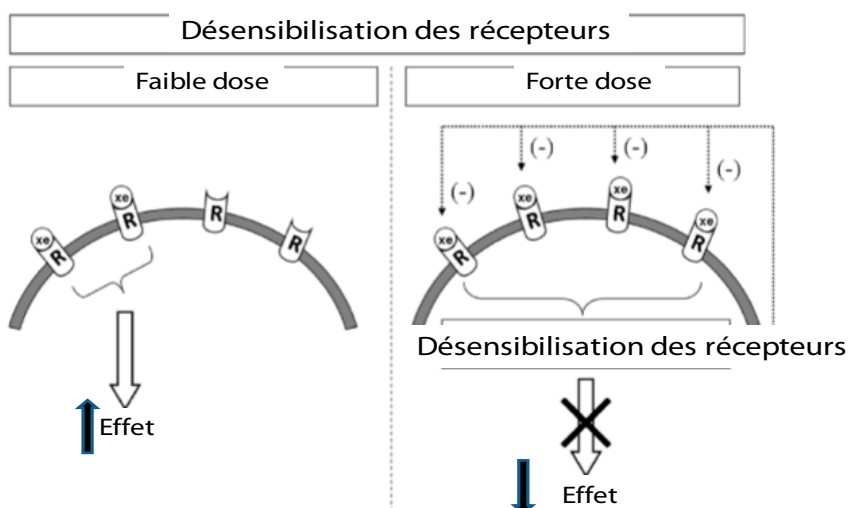


Figure 3. Modèles de trois types de courbes dose-réponse. A. Dose réponse à seuil. La NOAEL (concentration pour laquelle on n'observe pas d'effet adverse du produit sur la réponse biologique testée) peut être calculée. B. Dose réponse sans seuil, il n'y a pas de NOAEL calculable. C. Dose réponse hormétique. Le point ZEP (Zero Equivalent Point) détermine la dose à laquelle s'inverse la réponse biologique. D'après [8].

