

Avril 2011

# Recueil d'éléments pour aider à l'évaluation des dangers des substances vis-à-vis du risque pour la reproduction

## INTRODUCTION

Les usagers s'inquiètent depuis quelques années de l'impact sur la reproduction des produits chimiques. Les pouvoirs publics ont pris sérieusement en main ce sujet, notamment ceux en charge des risques professionnels, avec la parution du décret n° 2001-97 du 1<sup>er</sup> février 2001 établissant les règles particulières de prévention des risques cancérogènes, mutagènes ou toxiques pour la reproduction. La communauté européenne avait édicté une directive dans ce sens quelques années auparavant et la réglementation sur les produits chimiques prend également en compte ce phénomène.

Malgré cela, les données sur la toxicité sur le développement des produits chimiques sont difficiles à trouver pour les non spécialistes. Elles sont très souvent dispersées, difficiles d'accès, d'interprétation délicate notamment pour extrapoler des données de l'animal à l'homme. De plus, elles sont absentes pour de nombreux produits. Pour illustration, plus de 95 % des substances chimiques nouvellement mises sur le marché en France ne contiennent aucune donnée sur les effets du produit vis-à-vis de la reproduction.

Evaluer le risque d'un produit chimique vis-à-vis de la reproduction s'avère donc un processus difficile, notamment pour connaître le danger des substances. L'évaluation du risque ne diffère pas de la démarche entreprise pour les autres effets toxiques : recueil des informations sur la substance, étude des postes de travail afin de connaître les conditions réelles d'exposition (voies d'exposition, dose, durée...), détermination de la relation dose-effet et caractérisation du risque. Seule la détermination des dangers toxicologiques sera abordée dans les pages suivantes.

## DÉFINITION

Il est important de rappeler la définition de la toxicité pour la reproduction.

Elle comprend en effet l'altération des fonctions ou de la capacité de reproduction chez l'homme ou la femme et l'induction d'effets néfastes non héréditaires sur la descendance.

Elle peut être classée sous deux rubriques principales :

1. *Effets sur la fertilité masculine ou féminine* : cette catégorie comprend les effets néfastes sur la libido, le comportement sexuel, les différents aspects de la spermatogenèse ou de l'ovogenèse ou sur l'activité hormonale ou la réponse physiologique qui perturberaient la capacité de fécondation, la fécondation elle-même ou le développement de l'ovule fécondé jusqu'à et y compris l'implantation.
2. *Toxicité pour le développement* : elle est considérée dans son sens le plus large, comprenant tout effet perturbant le développement normal, aussi bien avant qu'après la naissance. Elle englobe tant les effets qui sont induits ou se manifestent avant la naissance que ceux qui se manifestent après la naissance. Cela comprend les effets embryotoxiques/fœtotoxiques tels que la réduction du poids corporel, le retard de croissance et de développement, la toxicité pour les organes, la mort, l'avortement, les anomalies structurelles (effets tératogènes), les anomalies fonctionnelles, les anomalies péri- ou postnatales ainsi que l'altération du développement mental ou physique après la naissance, jusqu'à et y compris le développement pubertaire normal.

## ÉVALUATION DU DANGER DES SUBSTANCES CHIMIQUES VIS-A-VIS DE LA REPRODUCTION

L'évaluation du danger des substances chimiques vis-à-vis de la reproduction est une démarche délicate qui nécessite généralement d'extrapoler des effets observés chez l'animal à l'homme. L'interprétation des données observées chez l'animal est elle-même difficile. Plusieurs raisons peuvent l'expliquer :

- les effets observés chez les embryons suite à une exposition à un produit chimique surviennent également spontanément, plus ou moins fréquemment selon les lignées animales utilisées. Il est donc nécessaire de montrer une différence statistique entre des animaux témoins et ceux exposés et de bien connaître l'historique des lignées ;
- une pathologie intercurrente, due par exemple à une pathologie directe sur la mère, peut entraîner des effets sur l'embryon ou le fœtus sans qu'ils soient dus à une toxicité directe du produit ;
- observer des effets sur des embryons de souris ou de rat est difficile du fait de la taille des organismes. L'expérience du laboratoire et des opérateurs est capitale pour assurer une étude de qualité. Il est malheureusement difficile de pouvoir évaluer cette donnée à la lecture des articles ;
- pour être toxique vis-à-vis du conceptus, il est nécessaire que la substance puisse atteindre l'embryon ou le fœtus. Cette donnée est rarement connue.

Pour essayer de mieux comprendre l'évaluation du danger reprotoxique, il peut être utile de se reporter aux méthodes utilisées pour la classification européenne des substances chimiques. D'une part ce sont des méthodes officielles utilisées pour classer les substances, d'autres part elles sont explicites et didactiques.

## CLASSIFICATION EUROPÉENNE DES SUBSTANCES CHIMIQUES [1, 2, 3]

Les critères de classification des substances toxiques pour la reproduction sont définis à l'annexe VI de la directive 67/548/CEE modifiée relative à la classification, l'emballage et l'étiquetage des substances dangereuses (transposée en droit français par l'annexe VI de l'arrêté du 20 avril 1994 modifié). Depuis 2009, le règlement CLP (Classification, Labelling and Packaging) s'applique progressivement en Europe ; classification et étiquetage sont ainsi modifiés.

### Directive 67/548/CEE modifiée relative à la classification, l'emballage et l'étiquetage des substances dangereuses

Trois catégories de toxicité sont définies :

- **Catégorie 1** : la classification dans la catégorie 1 repose sur des données épidémiologiques. Elle peut concerner soit les effets sur la fertilité, soit les effets sur le développement. Les définitions sont les suivantes :
  - *Substance connue pour altérer la fertilité dans l'espèce humaine* : on dispose de suffisamment d'éléments pour établir l'existence d'une relation de cause à effet entre l'exposition de l'homme à la substance et une altération de la fertilité.
  - *Substance connue pour provoquer des effets toxiques sur le développement dans l'espèce humaine* : on dispose de suffisamment d'éléments pour établir l'existence d'une relation de cause à effet entre l'exposition de l'homme à la substance et des effets toxiques ultérieurs sur le développement de la descendance.
- **Catégorie 2** :
  - *Substance devant être assimilée à une substance altérant la fertilité dans l'espèce humaine* : on dispose de suffisamment d'éléments pour justifier une forte présomption que l'exposition de l'homme à une telle substance peut altérer la fertilité. Cette présomption se fonde sur :
    - la mise en évidence nette, dans des études sur l'animal, d'une altération de la fertilité intervenant soit en l'absence d'effets toxiques, soit à des niveaux de doses proches des doses toxiques, mais qui n'est pas un effet non spécifique secondaire des effets toxiques,
    - d'autres informations pertinentes.
  - *Substance devant être assimilée à une substance causant des effets toxiques sur le développement dans l'espèce humaine* : on dispose de suffisamment d'éléments pour justifier une forte présomption que l'exposition de l'homme à de telles substances peut entraîner des effets toxiques sur le développement. Cette présomption se fonde sur :
    - la mise en évidence nette, dans des études appropriées sur l'animal, d'effets observés en l'absence de signe de toxicité maternelle marquée, soit à des niveaux de doses proches des doses toxiques, mais qui ne sont pas un effet non spécifique secondaire des effets toxiques,
    - d'autres informations pertinentes.
- **Catégorie 3** :
  - *Substance préoccupante pour la fertilité dans l'espèce humaine* : ceci est édité généralement sur la base :
    - de résultats d'études appropriées sur l'animal qui fournissent suffisamment d'éléments pour entraîner une forte suspicion d'une altération de la fertilité intervenant soit en l'absence d'effet toxique, soit à des niveaux de doses proches des doses toxiques, mais qui n'est pas un effet non spécifique secondaire aux effets

- toxiques, ces preuves étant toutefois insuffisantes pour classer la substance en catégorie 2,
  - d'autres informations pertinentes.
- *Substance préoccupante pour l'homme en raison d'effets toxiques possibles sur le développement* : cette présomption est généralement fondée sur :
- les résultats d'études appropriées sur l'animal qui fournissent suffisamment d'éléments pour entraîner une forte suspicion de toxicité sur le développement soit en l'absence de signe de toxicité maternelle marquée, soit à des niveaux de doses proches des doses toxiques, mais qui n'est pas un effet non spécifique secondaire aux effets toxiques, ces preuves étant toutefois insuffisantes pour classer la substance en catégorie 2,
  - d'autres informations appropriées.

## COMMENTAIRES

*La classification dans la catégorie 1* : elle s'effectue à partir d'études chez l'homme. Peu de produits sont concernés car les données provenant d'études chez l'homme sont rarement disponibles du fait des difficultés des études épidémiologiques dans ce domaine. Un ensemble de raisons concourt à ce fait : terme malformation non strictement défini, grande prévalence des malformations à la naissance (environ 2 % de malformations détectées en période néonatale qui impliquent la mort, un handicap sévère ou un traitement chirurgical significatif), très nombreuses fausses couches (10 à 15 % de fausses couches sur des grossesses diagnostiquées), origine multifactorielle avec une probable interaction entre le patrimoine génétique de l'individu et l'environnement. Pour être conclusive une étude épidémiologique devrait donc concerner des populations nombreuses, exposées à la même substance, sans autres biais (autre produit, tabac, médicaments, pathologies intercurrentes...) et pour les effets sur le développement, concerner des femmes enceintes. De telles conditions sont rarement réunies.

Des études de cas peuvent servir d'alerte et engendrer des recherches complémentaires chez l'animal.

*La classification dans les catégories 2 et 3* : elle s'effectue en fonction des effets constatés lors de l'expérimentation animale. Les données d'études *in vitro* ou d'études sur des œufs aviens sont considérées comme des preuves complémentaires et ne peuvent qu'exceptionnellement autoriser une classification en l'absence de donnée *in vivo* ; ceci pouvant évoluer dans les années à venir.

Il est actuellement admis que les substances toxiques pour la reproduction ne manifestent une toxicité qu'au dessus d'un certain seuil sous lequel les effets néfastes ne sont pas observés.

Même lorsque des effets nets ont été démontrés dans des études sur l'animal, l'extrapolation à l'homme peut être incertaine du fait des doses administrées, que les toxicocinétiques sont nettement différentes ou que la voie d'administration n'est pas appropriée pour l'évaluation du risque. Dans ce cas, il se peut que la classification dans la catégorie 3, voire l'absence de classification soit justifiée.

L'annexe V de la directive 67/548/CEE prévoit un essai limite dans le cas des substances de faible toxicité. Si une dose d'au moins 1 000 mg/kg par voie orale ne produit aucun signe de toxicité pour la reproduction, les études à d'autres doses peuvent être considérées comme inutiles. Dans des circonstances normales, on considère que les effets constatés uniquement à des doses supérieures à la dose limite n'entraînent pas nécessairement une classification comme toxique pour la reproduction.

Concernant la fertilité, pour être classé en catégorie 2, des preuves manifestes sur une espèce animale doivent normalement exister ainsi que des preuves complémentaires, soit par le mécanisme d'action, une analogie avec des agents connus ayant cette toxicité certaine, soit d'autres informations chez l'homme qui permettent de conclure que ces effets seraient susceptibles d'être observés chez l'homme. Lorsqu'il existe des études sur une seule espèce, sans autre preuve complémentaire appropriée, la classification dans la catégorie 3 peut être utilisée. Il est notamment nécessaire que l'altération de la fertilité ne soit pas due à un mécanisme non spécifique ou secondaire à une toxicité générale sévère.

Pour le développement, une classification en catégorie 2 ne peut être appliquée que s'il existe des preuves manifestes d'effets néfastes dans des études correctement menées sur une ou plusieurs espèces. Comme les effets néfastes survenus pendant la grossesse ou en période postnatale peuvent être une conséquence secondaire de la toxicité pour la mère, il importe que les effets observés interviennent dans des études correctement menées et à des doses non associées à une toxicité maternelle marquée. La voie d'exposition est également importante. Lorsque le protocole expérimental présente des défauts qui rendent les conclusions moins convaincantes ou lorsqu'il est impossible d'exclure que les effets puissent être dus à des facteurs non spécifiques tels que la toxicité générale, une classification dans la catégorie 3 est retenue.

### Règlement CLP

Les critères de classification des substances chimiques toxiques pour la reproduction selon le règlement CLP sont relativement proches de ceux existants actuellement. Les définitions et les critères de classification sont semblables. Le texte est reproduit ci-dessous.

Les catégories de danger sont au nombre de 2 : catégorie 1 et 2, avec une sous-catégorie 1A et 1B pour la première. La catégorie 1A correspond à la catégorie 1 précédente, la 1B à la 2 et la 2 à la 3.

#### ➤ *Catégorie 1 : Substances avérées ou présumées toxiques pour la reproduction humaine*

Une substance est classée dans la catégorie 1 quand il est avéré qu'elle a des effets néfastes sur la fonction sexuelle et la fertilité ou le développement des êtres humains ou s'il existe des données provenant d'études animales, éventuellement étayées par d'autres informations, donnant fortement à penser que la substance est capable d'interférer avec la reproduction humaine. Il est possible de faire une distinction supplémentaire, selon que les données ayant servi à la classification de la substance proviennent surtout d'études humaines (catégorie 1A) ou d'études animales (catégorie 1B).

#### ➤ *Catégorie 1A : Substances dont la toxicité pour la reproduction humaine est avérée*

La classification d'une substance dans la catégorie 1A s'appuie largement sur des études humaines.

#### ➤ *Catégorie 1B : Substances présumées toxiques pour la reproduction humaine*

La classification d'une substance dans la catégorie 1B s'appuie largement sur des données provenant d'études animales. Ces données doivent démontrer clairement un effet néfaste sur la fonction sexuelle et la fertilité ou sur le développement en l'absence d'autres effets toxiques, ou, si d'autres effets toxiques sont observés, que l'effet toxique sur la reproduction n'est pas considéré comme une conséquence secondaire non spécifique à ces autres effets toxiques. Toutefois, s'il existe des informations relatives au mécanisme des effets et mettant en doute la pertinence de l'effet pour l'être humain, une classification dans la catégorie 2 peut être plus appropriée.

#### ➤ *Catégorie 2 : Substances suspectées d'être toxiques pour la reproduction humaine*

Une substance est classée dans la catégorie 2 quand des études humaines ou animales ont donné des résultats - éventuellement étayés par d'autres informations - qui ne sont pas suffisamment probants pour justifier une classification de la substance dans la catégorie 1, mais qui font apparaître un effet indésirable sur la fonction sexuelle et la fertilité ou sur le développement. Une étude peut comporter

certaines failles rendant les résultats moins probants, auquel cas une classification dans la catégorie 2 pourrait être préférable. Ces effets doivent avoir été observés en l'absence d'autres effets toxiques ou, si d'autres effets toxiques sont observés, il est considéré que l'effet toxique sur la reproduction n'est pas une conséquence secondaire non spécifique à ces autres effets toxiques.

## LES ÉTUDES EXPÉRIMENTALES UTILISÉES POUR L'ÉVALUATION DES DANGERS

L'évaluation du danger des substances est donc essentiellement basée sur les résultats d'études expérimentales. La majorité provient d'études *in vivo*, quelques unes peuvent être effectuées *in vitro*.

### Méthodes *in vivo*

#### Introduction

De très nombreux tests ont été développés par les laboratoires de recherche. Il est souvent difficile pour des non spécialistes d'évaluer la pertinence d'un test, sa validité et donc de l'interpréter. Depuis quelques années des structures internationales ont validé des tests selon des méthodes éprouvées et reconnues et proposé des stratégies d'utilisation de ces tests. Dans le domaine du médicament, l'ICH (International Conference on Harmonisation) a développé et publié une stratégie très détaillée. Dans le domaine du risque chimique, l'OCDE (Organisation de Coopération pour le Développement Economique) a fait de même. Un certain nombre de tests ont été validés. Ils font l'objet d'un consensus très large et sont préconisés par les réglementations officielles européennes ou françaises.

Seuls ces derniers seront donc présentés.

#### Généralités

##### *But*

Le but de ces tests est de détecter un éventuel effet sur la reproduction. Pour cela, il est nécessaire d'étudier la toxicité de la substance à tous les stades du développement : de la conception à la maturation sexuelle.

##### *Choix des animaux*

Puisque plusieurs études sont nécessaires, les animaux doivent être sélectionnés en fonction de leur âge, poids, maturité sexuelle. Ainsi la comparaison inter-études sera possible. Les études doivent être réalisées sur des mammifères. L'utilisation du rat est préférable pour les raisons suivantes :

- espèce prédominante chez les rongeurs ;
- comparaison possible avec d'autres études ;
- données pré-existantes nombreuses sur cette espèce.

Pour les études d'embryotoxicité, une deuxième espèce « non rongeurs » est nécessaire. L'utilisation du lapin est préférable pour les raisons suivantes :

- données pré-existantes nombreuses sur cette espèce ;
- espèce facilement disponible et pratique.

##### *Dosage*

Il est nécessaire de choisir trois doses distinctes.

La plus forte dose doit être déterminée au vu de précédentes études toxicologiques (pharmacologie, toxicité aiguë ou chronique, études de cinétique). Elle doit entraîner une légère toxicité chez la mère, si possible sans mortalité. On tolère cependant jusqu'à 10 % de mortalité.

Les deux autres doses sont calculées à partir de la dose forte et en fonction des données cinétiques.

#### *Voie et fréquence d'administration*

La voie d'administration doit être similaire à celle observée ou envisagée chez l'homme. Généralement, la substance doit être administrée quotidiennement.

#### *Cinétique*

Il est préférable d'avoir des données cinétiques avant de commencer les études sur la reproduction, pour déterminer l'espèce animale, le protocole expérimental et les doses administrées.

#### *Groupe témoin*

Un groupe témoin doit être défini. Les animaux témoins doivent recevoir un placebo par la même voie d'administration que les animaux traités.

Si ce traitement placebo provoque des effets ou inhibe les effets de la substance à tester, il est nécessaire de définir un deuxième groupe témoin non traité.

#### *Indices pouvant être calculés pendant les études de toxicité de la reproduction*

- Indice d'accouplement = Nombre de mâles et femelles accouplés  $\times 100$  / Nombre de mâles et femelles mis en cohabitation.
- Indice de fertilité = Nombre de femelles gestantes  $\times 100$  / Nombre de couples mis en cohabitation.
- Indice de gestation = Nombre de femelles qui mettent bas  $\times 100$  / Nombre de femelles gestantes.
- Indice de viabilité des nouveau-nés = Nombre de nouveau-nés vivants  $\times 100$  / Nombre de nouveau-nés totaux.
- Rapport des sexes = Nombre de nouveau-nés mâles / Nombre de nouveau-nés femelles.
- Indice de viabilité 4 jours = Nombre de nouveau-nés vivants après 4j de lactation  $\times 100$  / Nombre de nouveau-nés totaux.
- Indice de lactation = Nombre de nouveau-nés vivant après 21j de lactation  $\times 100$  / Nombre de nouveau-nés total.
- Indice de sevrage = Nombre de nouveau-nés total – Nombre de nouveau-nés sevrés  $\times 100$  / Nombre de nouveau-nés total.

#### *Paramètres spécifiques pour évaluer la toxicité de la reproduction chez le mâle*

- *poids des organes* : testicules, épидидymes, vésicules séminales, prostate, hypophyse ;
- *examen visuel et histologique* : testicules, épидидymes, vésicules séminales, prostate, hypophyse ;
- *examen des spermatozoïdes* : nombre et qualité (morphologie, mobilité) ;
- *comportement sexuel* : accouplement, intromission, éjaculation ;
- *taux d'hormones* : testostérone ;
- *effets sur le développement* : descente des testicules, production de spermatozoïdes, distance ano-génitale, structure des organes génitaux.

#### *Paramètres spécifiques pour évaluer la toxicité de la reproduction chez la femelle*

- *poids des organes* : ovaires, utérus, vagin, hypophyse ;
- *examen visuel et histologique* : ovaires, utérus, vagin, hypophyse, oviducte, glandes mammaires ;
- *cycle menstruel* : frottis vaginal ;
- *comportement sexuel* : temps d'accouplement ;
- *taux d'hormones* : LH, FSH, œstrogène, progestérone, prolactine ;

- *lactation* : croissance des nouveau-nés, quantité et qualité du lait ;
- *effets sur le développement* : structure des organes génitaux, ouverture du vagin, frottis vaginal, menstruations ;
- *vieillesse* : frottis vaginal, ménopause.

#### *Paramètres spécifiques pour évaluer la toxicité chez la femelle*

- *mortalité* ;
- *indice d'accouplement* ;
- *indice de fertilité* ;
- *temps de gestation* ;
- *poids* : j0, pendant la gestation, sacrifice ;
- *modification du poids* : pendant la gestation, pendant le traitement, après le traitement ;
- *poids des organes* : absolu, relatif au poids corporel ou relatif au poids du cerveau ;
- *consommation d'eau et de nourriture* ;
- *évaluations cliniques* : type, incidence, degré et durée des signes cliniques, marqueurs enzymatiques ;
- *examen histopathologique*.

#### *Paramètres spécifiques pour évaluer la toxicité sur le développement*

- Portées avec implantations
  - nombre de sites d'implantation/mère ;
  - nombre de corps jaunes/mère ;
  - % de perte pré-implantatoire =  $(\text{nombre corps jaunes} - \text{nombre sites implantation}) \times 100 / \text{nombre corps jaunes}$  ;
  - nombre et % de descendants/portée ;
  - nombre et % de résorptions/portée ;
  - nombre et % de portées avec résorptions ;
  - nombre et % de fœtus morts/portée ;
  - nombre et % d'implants non viables (fœtus morts + résorptions)/portée ;
  - nombre et % de portées avec implants non viables ;
  - nombre et % d'implants atteints (implants non viables + malformés)/portée ;
  - nombre et % de portées avec des implants atteints ;
  - nombre et % de portées avec des résorptions totales ;
  - nombre et % de naissances/portée ;
  - nombre et % de portées avec des nouveaux nés vivants.
- Portées avec des nouveaux-nés vivants
  - nombre et % de nouveau-nés vivants/portée ;
  - viabilité des nouveau-nés ;
  - rapport de sexe/portée ;
  - poids moyen des nouveau-nés/portée ;
  - moyenne de mâles et femelles/portée ;
  - nombre et % de nouveau-nés malformés (externes, viscères ou squelette)/portée ;
  - nombre et % de portées avec des nouveau-nés malformés ;
  - nombre et % de mâles et femelles malformés/portée ;
  - nombre et % de nouveau-nés avec anomalies (externes, viscères ou squelette)/portée ;
  - nombre et % de portées avec des nouveau-nés anormaux ;
  - type et incidence des malformations ;
  - type et incidence des anomalies ;
  - signes cliniques ;

- examen histopathologique.

### *Interprétation des résultats*

Deux notions importantes sont utilisées pour interpréter les résultats des tests :

- d'une part, les tests standards permettent de dépister un effet sans que l'on sache à quel moment il survient, la substance étant administrée durant toute la phase de développement. Pour certains effets spécifiques d'un stade de développement précis, cette remarque n'est pas valable ;
- d'autre part, les malformations observées chez l'animal ne sont généralement pas prédictives d'un type d'effet chez l'homme. Par principe, on considère qu'un produit qui entraîne une malformation chez l'animal est susceptible d'entraîner, sauf preuve du contraire, une malformation chez l'homme, sans qu'on puisse prédire laquelle.

### Méthodes OCDE pour l'étude de la toxicité de la reproduction

Elles sont au nombre de six.

- Ligne directrice 414 : Etude de toxicité pour le développement pré-natal.
- Ligne directrice 415 : Étude de toxicité pour la reproduction sur une génération.
- Ligne directrice 416 : Étude de toxicité pour la reproduction sur deux générations.
- Ligne directrice 421 : Essai de dépistage de la toxicité pour la reproduction et le développement.
- Ligne directrice 422 : Étude combinée de toxicité à doses répétées et de dépistage de la toxicité pour la reproduction et le développement.
- Ligne directrice 426 : Étude de la toxicité sur le développement neurologique (non décrite ci-après).

### *OCDE 414 : Etude de toxicité pour le développement pré-natal*

#### *But*

L'objectif est de mesurer le potentiel toxique vis-à-vis du développement prénatal du produit testé, c'est-à-dire les effets sur la mère, la mortalité fœtale, les anomalies structurelles ou les altérations de croissance du fœtus.

#### *Animaux*

Au moins deux espèces (rongeurs et non rongeurs), généralement le rat et le lapin.

Il est conseillé d'utiliser assez d'animaux pour qu'on puisse autopsier environ 20 femelles présentant un point d'implantation.

#### *Procédure*

Le traitement doit être appliqué pendant la période d'organogenèse : de l'implantation jusqu'à un jour avant la parturition.

La mère est sacrifiée environ 1 jour avant la parturition. Les fœtus sont extraits par césarienne pour éviter une sélection naturelle de la mère (élimination des nouveau-nés malformés ou morts nés).

#### *Observations*

- 1) pendant l'étude :
  - signes de toxicité, mortalité ;
  - poids ;
  - consommation de nourriture.
- 2) examen terminal de la mère :
  - autopsie ;

- évaluation macroscopique de tous les organes ;
  - examen de l'utérus : nombre de corps jaunes, sites d'implantations, résorptions, poids de l'*uterus* gravide ;
  - examen du placenta.
- 3) examen terminal des fœtus :
- nombre de fœtus vivants et morts ;
  - sexe des fœtus ;
  - poids des fœtus ;
  - malformations, anomalies du squelette et des tissus.

### *Rapport et données*

Les résultats doivent être évalués en fonction des effets observés, des doses auxquelles on observe des effets et doivent permettre de déterminer la dose sans effet.

### *OCDE 415 : Etude de toxicité de la reproduction sur une génération*

#### *But*

L'objectif est de tester les effets toxiques sur les performances de reproduction des mâles et des femelles (gonades, cycle, accouplement, gestation, parturition et lactation).

#### *Animaux*

Au moins une espèce, généralement le rat. Il est conseillé d'utiliser assez d'animaux pour obtenir 20 portées.

#### *Procédure*

Le traitement doit être appliqué en phase de gamétogenèse, avant l'accouplement : 3 semaines pour la femelle et 10 semaines pour le mâle.

Les animaux sont identifiés et accouplés selon un rapport 1 : 1 ou 1 : 2.

Le traitement se poursuit pendant l'accouplement, puis jusqu'au sevrage des nouveau-nés pour la femelle.

Les mâles sont sacrifiés après l'accouplement et les femelles après le sevrage.

#### *Observations*

- 1) pendant l'étude :
  - signes de toxicité, mortalité ;
  - comportement pendant la gestation ;
  - poids ;
  - consommation de nourriture (avant et pendant l'accouplement, pendant la gestation et la lactation) ;
  - durée de gestation ;
  - parturition.
- 2) après la naissance :
  - mortalité à la naissance ;
  - nombre et sexe des petits ;
  - poids à la naissance, à J4 puis toutes les semaines ;
  - développement physique, malformations ou anomalies ;
  - fonctions sensorielles et réflexes ;
  - survie jusqu'à 1 semaine.
- 3) examen terminal :

- examen macroscopique des adultes et des nouveau-nés ;
- examens histologiques des organes de la reproduction des adultes (testicules, épидидymes, vésicules séminales, prostate, ovaires, utérus, vagin, hypophyse...) ;
- isolement des autres organes pour examen histologique éventuel.

### *Rapport et données*

Les résultats doivent être évalués en fonction des effets observés, de doses auxquelles on observe des effets (anomalies, fertilité, modification de poids, mortalité) et doivent permettre de déterminer la dose sans effet. Ces données doivent permettre d'évaluer les effets sur la reproduction, la parturition, la lactation et la croissance postnatale des nouveau-nés.

### *OCDE 416 : Etude de toxicité de la reproduction sur deux générations*

#### *But*

L'objectif est de tester les effets d'une substance sur l'intégrité et le fonctionnement des appareils reproducteurs mâles et femelles, notamment la fonction gonadique, le cycle oestral, le comportement à l'égard de l'accouplement, la conception, la gravité, la mise-bas, la lactation, le sevrage ainsi que la croissance et le développement de la descendance. L'étude peut aussi montrer les effets de la substance sur la morbidité et la mortalité néonatales, fournir des données préliminaires sur la toxicité prénatale et postnatale pour le développement.

#### *Animaux*

Au moins une espèce, généralement le rat. Il est conseillé d'utiliser assez d'animaux pour obtenir 20 portées.

#### *Procédure*

Le traitement doit être appliqué en phase de gamétogenèse, avant l'accouplement : plusieurs cycles oestral pour la femelle et un cycle spermatogène complet pour le mâle (70 jours chez le rat ; 56 jours chez la souris).

Les animaux sont identifiés et accouplés selon un rapport 1 : 1 ou 1 : 2.

Le traitement se poursuit pendant l'accouplement, puis jusqu'au sevrage des nouveau-nés pour la femelle.

Les nouveau-nés sont eux aussi traités puis accouplés entre eux (mâle et femelle de portées différentes). La procédure est identique à la précédente (1<sup>ère</sup> génération).

#### *Observations*

##### 1) pendant l'étude :

- signes de toxicité, mortalité ;
- comportement pendant la gestation ;
- poids ;
- consommation de nourriture (avant et pendant l'accouplement, pendant la gestation et la lactation) ;
- durée de gestation ;
- parturition.

##### 2) après la naissance :

- mortalité à la naissance ;
- nombre et sexe des nouveau-nés ;
- poids à la naissance à J4, puis chaque semaine jusqu'à la fin de l'allaitement ;

- développement physique, malformations ou anomalies ;
  - fonctions sensorielles et réflexes ;
  - survie jusqu'à 1 semaine.
- 3) examen terminal :
- examen macroscopique des adultes et des nouveau-nés ;
  - examens histologiques des organes de la reproduction des adultes (testicules, épидидymes, prostate, ovaires, utérus, vagin, hypophyse...) ;
  - isolement des autres organes pour examen histologique éventuel.

### *Rapport et données*

Les résultats doivent être évalués en fonction des effets observés, de doses auxquelles on observe des effets (anomalies, fertilité, modification de poids, mortalité). Ils permettent de déterminer la dose sans effet. Ainsi on peut évaluer les effets sur la reproduction, la parturition, la lactation et la croissance postnatale des nouveau-nés de la deuxième génération.

### *OCDE 421 : Essai de dépistage de la toxicité pour la reproduction et le développement*

#### *But*

L'objectif est d'obtenir une première série d'informations sur les effets possibles d'une substance sur le fonctionnement de la reproduction chez le mâle et la femelle, notamment la fonction gonadique, le comportement lors de l'accouplement, la conception, le développement de l'embryon et la parturition.

Cette directive ne vient pas en remplacement des fiches 414, 415 et 416 ; elle ne fournit pas toute l'évidence nécessaire à l'étayage d'une conclusion définitive quant à une absence d'effet.

#### *Animaux*

Au moins une espèce, généralement le rat. Pour les rongeurs, il faut environ 10 animaux de chaque sexe, pour obtenir au moins 8 femelles gestantes/dose.

#### *Mode d'administration*

Le traitement doit être appliqué à la fois aux mâles et aux femelles.

Les mâles sont traités pendant 4 semaines : 2 semaines avant l'accouplement et 2 semaines après l'accouplement.

Les femelles sont traitées pendant 2 semaines avant l'accouplement, pendant la gestation et pendant 4 jours après la parturition.

4 groupes sont réalisés : 3 doses et 1 témoin.

#### *Procédure*

Les animaux sont accouplés selon un rapport 1 : 1. Ils sont observés avant et pendant l'accouplement et la femelle est observée pendant la gestation et la lactation.

Le mâle est sacrifié après l'accouplement et la femelle après la lactation.

Les nouveau-nés qui survivent, sont sacrifiés le 4<sup>ème</sup> jour post-partum.

#### *Observations*

- 1) pendant l'étude :
- symptômes, mortalité ;
  - poids ;

- consommation de nourriture ;
  - durée de gestation ;
  - parturition ;
  - mortalité à la naissance ;
  - nombre et sexe des nouveau-nés ;
  - poids à la naissance à J1 et J4 post-partum ;
  - développement physique, malformations ou anomalies ;
  - fonctions sensorielles et réflexes ;
  - survie jusqu'à 1 semaine.
- 2) après sacrifice :
- autopsie ;
  - évaluation histologique de tous les organes (testicules, ovaires, utérus) ;
  - implantations ;
  - malformations.

### *Rapport et données*

Les résultats doivent être évalués en fonction des effets observés, des doses auxquelles on observe des effets (anomalies, fertilité, modification de poids, mortalité) et doivent permettre de déterminer la dose sans effet. Ces données doivent rendre possible l'évaluation des effets sur la reproduction, la parturition, la lactation et la croissance postnatale des nouveau-nés.

### *OCDE 422 : Etude combinée de toxicité à doses répétées et de dépistage de la toxicité pour la reproduction et le développement*

#### *But*

L'objectif est d'obtenir des informations initiales sur les effets possibles affectant les capacités reproductrices (fonction gonadique, accouplement, conception, développement de l'embryon, parturition) et sur d'éventuels effets neurologiques (observations cliniques minutieuses) et immunotoxicité.

Cette directive ne fournit pas une information exhaustive sur tous les aspects de la reproduction et du développement.

#### *Animaux*

Au moins une espèce, généralement le rat. Pour les rongeurs, il faut environ 10 animaux de chaque sexe, pour obtenir au moins 8 femelles gestantes/dose.

#### *Mode d'administration*

Le traitement doit être appliqué à la fois aux mâles et aux femelles.

Les mâles sont traités pendant 4 semaines : 2 semaines avant l'accouplement et 2 semaines après l'accouplement.

Les femelles sont traitées pendant 2 semaines avant l'accouplement, pendant la gestation et pendant 4 jours après la parturition.

#### *Procédure*

Les animaux sont accouplés selon un rapport 1 : 1. Ils sont observés avant et pendant l'accouplement et la femelle est observée pendant la gestation et la lactation.

Le mâle est sacrifié après l'accouplement et la femelle après la lactation.

Les nouveau-nés qui survivent sont sacrifiés le 4<sup>ème</sup> jour post-partum.

### Observations

- 1) pendant l'étude :
  - symptômes, mortalité ;
  - examen clinique minutieux (réflexes, stimuli, comportements, etc.) ;
  - hématologie et biochimie clinique ;
  - poids ;
  - consommation de nourriture ;
  - durée de gestation ;
  - parturition ;
  - mortalité à la naissance ;
  - nombre et sexe des petits ;
  - poids à la naissance à J1 et J4 post-partum;
  - développement physique, malformations ou anomalies ;
  - fonctions sensorielles et réflexes ;
  - survie jusqu'à 1 semaine.
- 2) après sacrifice :
  - autopsie générale ;
  - évaluation histologique de tous les organes (testicules, ovaires, utérus...) ;
  - implantations ;
  - malformations.

### Méthodes *in vitro* pour l'étude de la toxicité de la reproduction

Actuellement il n'existe pas de test *in vitro* validé par des instances internationales. Il n'est pas possible pour l'instant d'en utiliser en routine dans le cadre de stratégies consensuelles et réglementaires. L'ECVAM (European Center of the Validation of Alternative Methods) a répertorié un certain nombre de tests. Trois ont été validés selon ses critères. Le lecteur pourra retrouver des renseignements complémentaires sur le site Internet de l'ECVAM (<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu/>).

### STRATÉGIE PROPOSÉE PAR LA COMMISSION EUROPÉENNE

Un certain nombre de stratégies d'utilisation de ces tests ont été proposées par diverses instances.

Aux Etats-Unis, l'EPA (Environmental Protection Agency) a publié un guide pour l'évaluation des risques des substances vis-à-vis de la reprotoxicité (Guidelines for reproductive toxicity risk assessment, téléchargeable sur <http://www.epa.gov/raf/publications/pdfs/REPRO51.PDF>).

L'OCDE propose un document de synthèse sur l'évaluation du risque toxique sur la reproduction. Il est disponible sur son site Internet (Series on testing and assessment, number 43, Guidance document on reproductive toxicity testing and assessment, juillet 2008 in [http://www.oecd.org/document/30/0,3746,en\\_2649\\_34377\\_1916638\\_1\\_1\\_1\\_1,00.html](http://www.oecd.org/document/30/0,3746,en_2649_34377_1916638_1_1_1_1,00.html)).

L'Union européenne a également publié des recommandations dans le document « Guidance on information requirements and chemical safety assessment. Chapter R.7a : endpoint specific guidance de Mai 2008 – ECHA – Guidance for the implementation of Reach » (téléchargeable sur [http://guidance.echa.europa.eu/docs/guidance\\_document/information\\_requirements\\_en.htm](http://guidance.echa.europa.eu/docs/guidance_document/information_requirements_en.htm)). C'est ce document qui fait référence en Europe pour la réglementation.

La stratégie proposée par l'Union européenne propose des tests dont les objectifs généraux des tests sont de montrer si :

- l'exposition humaine à une substance est associée à une toxicité sur la reproduction, c'est-à-dire des effets anormaux sur les fonctions sexuelles et la fertilité des adultes hommes ou femmes, une toxicité sur le développement de la descendance ou des effets sur ou médiés par la lactation et/ou ;
- si, sur la base d'informations autres que les données humaines, il peut être prédit que la substance sera toxique sur la reproduction chez l'être humain ;
- si la femme enceinte est potentiellement plus sensible à une toxicité générale ;
- d'établir des relations doses-réponses pour n'importe quel type d'effets sur la reproduction.

Les substances entraînant des effets sur la reproduction sont toujours d'un intérêt potentiel, mais il est important de distinguer, si possible, les effets dus à une propriété intrinsèque de la substance et ceux dus à une conséquence d'une toxicité générale.

Afin de pouvoir correctement évaluer les propriétés dangereuses d'une substance, un dossier standard est composé au minimum de trois études :

- un test de screening concernant la toxicité sur la reproduction ou le développement (OCDE 421 ou 422) ;
- une étude de toxicité sur le développement prénatal (tératogénicité) sur une espèce (EU annexe V B 31 ou OCDE 414) ; une étude sur une deuxième espèce peut être envisagée ;
- une étude de deux générations (EU annexe V B 35 ou OCDE 416).

Ces études peuvent être réduites si l'on dispose de données justifiant ce fait. La stratégie des tests doit être basée sur une approche étape par étape.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Produits chimiques cancérigènes, mutagènes, toxiques pour la reproduction. Classification réglementaire. Aide-mémoire technique. Edition INRS ED 976. Paris : INRS ; 2006 : 63 p.
- [2] Mardirossian A - Déclaration des produits chimiques. Informations à transmettre à l'INRS. Textes réglementaires. Edition INRS ED 980. Paris : INRS ; 2006 : 19 p.
- [3] Arrêté du 20 avril 1994 relatif à la déclaration, la classification, l'emballage et l'étiquetage des substances. *J Off Répub Fr.* 1994, 8 mai 1994 : 6753-83.