

# Les méthodes d'études en toxicologie alimentaire

---

Jean Louis ROHAUT

## Table des matières

<b>LES MÉTHODES D'ÉTUDES EN TOXICOLOGIE ALIMENTAIRE</b>	<b>1</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES</b>	<b>1</b>
<b>1. LES TESTS TOXICOLOGIQUES</b>	<b>1</b>
1.1. ÉTUDES RELATIVES À LA TOXICITÉ AIGUË DU PRODUIT	1
1.2. ÉTUDES RELATIVES À LA TOXICITÉ À DOSES RÉPÉTÉES	2
1.3. ÉTUDES DE TOXICITÉ GÉNÉTIQUE OU MUTAGENÈSE	3
1.4. ÉTUDES DE CANCÉROGENÈSE	3
1.5. ÉTUDES DE LA FONCTION DE REPRODUCTION	4
1.6. LA LIMITE MAXIMALE DE RÉSIDUS OU LMR	4
<b>2. PROTOCOLE SUIVI</b>	<b>4</b>
2.1. IDENTIFICATION DES DANGERS	4
2.2. CARACTÉRISATION DES DANGERS	5
2.3. ÉVALUATION DU RISQUE	5
2.4. OPTIONS DE GESTION DU RISQUE	5
<b>ANNEXE : LISTE DES ABRÉVIATIONS</b>	<b>5</b>

## 1. Les tests toxicologiques

### 1.1. Études relatives à la toxicité aiguë du produit

#### ***Définition***

Pour déterminer la **toxicité aiguë**, des études qualitatives ou quantitatives montrant l'altération irréversible des fonctions vitales sont réalisées, après administration d'une dose unique de substance.

**Une substance engendrant une toxicité aiguë est donc capable d'altérer irréversiblement des fonctions vitales chez l'individu considéré.**

## Détermination

On évalue la DL 50 (dose létale 50) c'est-à-dire la dose unique qui détermine dans un délai de 14 jours la mort de 50 % des animaux traités.

La plupart des études entreprises en toxicologie alimentaire s'effectuent par voie orale. Cependant d'autres voies d'administration sont possibles : intra veineuse, intramusculaire, sous-cutanée, percutanée et par inhalation.

Cette étude a lieu sur deux à trois espèces animales. Dans un souci de réduire le nombre d'animaux testés on admet maintenant la notion de « test limite » qui est la suivante : si une dose de 2500 mg/kg de masse corporelle ne provoque pas de mortalité, la détermination de la DL 50 n'est pas utile.

La détermination de la DL 50 chez le rat permet une classification de la substance suivant sa dangerosité :

	Par voie orale (mg/kg)		Par voie dermique (mg/kg)	
	Solides	Liquides	Solides	Liquides
I <sub>a</sub> extrêmement dangereux	≤ 5	≤20	≤10	≤40
I <sub>b</sub> très dangereux	5 – 50	20 – 200	10 – 100	40 –400
II modérément dangereux	50 – 500	200 – 2000	100 – 1000	400 - 2500
III peu dangereux	> 500	> 2000	> 1000	> 2500

La DL 50 peut être remplacée par la CL 50 : concentration létale pour 50 % des animaux par intoxication par une voie autre que pulmonaire. Ici la voie pulmonaire ne peut pas être incluse car il s'agit de substances en solution et donc non volatiles.

## 1.2. Études relatives à la toxicité à doses répétées

### Toxicité chronique

La substance est administrée de façon répétée, quotidienne ou périodique. Les espèces choisies en fonction de résultats d'études antérieures, sont des rongeurs (rat ou souris) et d'autres mammifères (chiens ou primates).

La période d'administration de la substance étudiée s'étend jusqu'à dix-huit mois chez les rongeurs et parfois plus de 2 ans chez mammifères dont la durée de vie est plus longue (chiens, porcs, primates). En cas d'études plus courtes, inférieures à 90 jours, on parle de toxicité subaiguë ou sub-chronique.

Ces études permettent de déterminer un niveau de dose sans effet toxique et, pour les doses avec effets toxiques, la durée d'apparition de ceux-ci et leur réversibilité éventuelle.

### Mise en évidence

Les effets sur la croissance, le comportement et la mortalité de l'animal sont analysés. On procède à de nombreuses explorations biologiques. La réalisation d'autopsie permet divers examens anatomo-histo-pathologiques. Cette phase d'étude a pour but d'établir des relations entre la dose administrée et les effets toxiques observés, et donc d'estimer la dose sans effet qui servira à déterminer la quantité tolérable chez l'homme.

### La dose sans effet

Elle est déterminée à partir d'études sur les animaux quelquefois à partir de données humaines obtenues lors de catastrophes écologiques. Deux paramètres sont mesurés :

La dose maximale sans effet (NOAEL, *no observable adverse effect level*)

La dose minimale ayant entraîné un effet néfaste (LOAEL, *lowest observable adverse effect level*)

On en déduit la dose journalière tolérable et la dose journalière admissible.

### La dose journalière tolérable (DJT)

C'est la dose susceptible d'être absorbée en une journée par un individu sans entraîner d'effets toxiques, même si l'absorption a lieu quotidiennement pendant toute la vie. Elle est rapportée par kg de masse corporelle

Elle est utilisée pour les composés dont la présence dans l'alimentation n'est pas souhaitée, mais inévitable, notamment pour des raisons de contamination de l'environnement.

Cette dose est obtenue en divisant le NOAEL par un facteur arbitraire de sécurité de 100 (10 x 10) :

- 10 pour tenir compte de la différence de sensibilité entre espèces et de la synergie ou de l'antagonisme entre produits ;
- 10 pour tenir compte des variations individuelles : état physiologique, état de nutrition, état sanitaire.

Pour les substances considérées comme les plus toxiques, le facteur de 100 peut être augmenté jusqu'à 1000.

Pour les substances contaminantes à des teneurs très faibles (µg/g) comme les certains cations métalliques, on fait plutôt appel à la Dose Hebdomadaire Tolérable (DHT).

Ces évaluations sont conduites au niveau international sous l'égide de l'OMS et par l'AFSSA au niveau français.

## **La Dose Journalière Admissible (DJA)**

Elle concerne les molécules ajoutées intentionnellement dans les aliments pour obtenir un effet précis sur la conservation, la texture, la couleur, le goût... Leur autorisation nécessite de démontrer

la nécessité d'utilisation

l'efficacité pour le but recherché

l'absence de risque immédiat ou différé pour la santé.

L'autorisation est accordée pour une dose et une catégorie de produits définis (liste positive). Certains additifs particulièrement sûrs figurent sur une liste appelée "inventaire" et leur utilisation dans de nouveaux aliments ne nécessite pas d'autorisation particulière.

La dose utilisable est dite "*quantum satis*", dose nécessaire et suffisante pour obtenir l'effet recherché.

## **1.3. Études de toxicité génétique ou mutagenèse**

La mutagenèse regroupe les processus de transformations du patrimoine génétique transmissible à la descendance cellulaire.

Les possibilités du potentiel mutagène sont recherchées, par des techniques in vitro et in vivo :

Chez des bactéries (effet de mutations génétiques) ;

Dans des cellules de mammifères cultivées in vitro pour apprécier les dommages chromosomiques ;

Sur des animaux d'au moins deux espèces différentes, choisies généralement chez les rongeurs parce que leur temps de génération est court.

Lorsqu'il y a des dommages sur l'ADN ou une stimulation imprévue de synthèse d'ADN, responsables d'apparition de métabolites actifs ou de transformation cellulaire, la substance étudiée est considérée comme potentiellement cancérogène.

## **1.4. Études de cancérogenèse**

La cancérogenèse est un processus de mutagenèse auquel s'ajoute un pouvoir de malignité. Une cellule maligne possède les caractéristiques suivantes :

- Elle est devenue immortelle
- Elle n'obéit plus aux facteurs de régulation tissulaire
- Elle est capable d'aller coloniser d'autres tissus (métastases).

Les études de cancérogenèse ont pour but de mettre en évidence le processus par lequel les cellules se divisent à une fréquence accrue. Cette prolifération cellulaire excessive ou **hyperplasie** constitue un des stades précoces de la cancérisation. Ce processus peut conduire à l'apparition de tumeurs malignes qui envahissent les tissus voisins et qui peuvent migrer donnant des métastases.

Une substance cancérogène peut induire, seule ou en association avec un autre produit :

- Des tumeurs ;
- L'augmentation de la fréquence de certains types de tumeurs ;
- La diminution du temps de latence de tumeurs spontanées.

On classe les cancérogènes en trois catégories :

- **Les cancérogènes complets** qui, par leur seule action, induisent des tumeurs ;
- **Les cancérogènes incomplets** pour lesquels deux agents sont nécessaires, un initiateur et un promoteur. L'initiateur crée des lésions du matériel génétique dans des cellules qui deviennent alors "initiées". Ces lésions non décelables, peuvent se révéler au contact, surtout répétitif, d'un agent promoteur. L'effet cancérogène va alors se développer ;
- **Les co-cancérogènes** qui ont un effet additif ou amplificateur en association avec une autre substance cancérogène.

De plus un cancérogène sera dit **génotoxique** si l'on met en évidence que son pouvoir de malignité est lié à une altération de génome.

Les études de cancérogenèse se font à long terme, dix-huit mois au moins, sur des animaux des deux sexes pour prendre en compte les différences imputables aux hormones sexuelles. L'extrapolation à l'homme nécessite l'utilisation comparée de tous les résultats.

## 1.5. Études de la fonction de reproduction

Trois grands types d'études sont menés :

Les études de fertilité : accouplement, fécondation et blastogenèse

Les études d'embryogenèse : développement du fœtus et de l'embryon

Les études de péri-natalité : lactation et développement morphologique et sensoriel.

### Études de fertilité

Les mâles sont traités lors de la spermatogenèse, puis accouplés avec des femelles non traitées. Le traitement des femelles est réalisé de l'ovogenèse à la nidation et l'accouplement a lieu avec des mâles non traités. On réalise aussi des accouplements entre mâles et femelles traités.

### Tératogenèse

La tératogenèse est l'aptitude à provoquer des malformations de l'embryon ou du fœtus. Elles fournissent des informations sur l'augmentation possible, au cours des générations, de la sensibilité de l'organisme à la substance étudiée.

Un agent tératogène cause des dommages structurels et fonctionnels permanents au cours de l'embryogenèse, après les premiers clivages de l'embryon implanté. Deux espèces animales, choisies parmi souris, rat, lapin, hamster ou cobaye doivent servir à la détection de la tératogenèse.

### Études de péri-natalité

Elles ont pour but de déterminer si une substance administrée à des femelles lors de la gestation et/ou de la lactation peut perturber la croissance du fœtus, la parturition, la lactation et le développement du nouveau-né.

## 1.6. La limite maximale de résidus ou LMR

Elle concerne la quantité maximale tolérée dans un aliment précis ; elle découle des évaluations précédentes et dépend en partie du niveau de consommation du produit considéré. C'est la valeur qui est utilisée lors des contrôles, pour rejeter ou non les lots de produits.

Cette mesure est indispensable pour vérifier que le niveau de contamination d'une denrée alimentaire est compatible avec le respect de la DJT.

Les valeurs de LMR (limite maximale de résidus) sont répertoriées dans le *Codex Alimentarius* et généralement calculée de la façon suivante :

$$LMR = 1000 \times \frac{\text{Poids(en kg)}}{\text{consommation quotidienne moyenne (eng)}} \times DJT$$

La détermination de la consommation quotidienne moyenne qui dépend des habitudes alimentaires relève d'études statistiques de consommation.

## 2. Protocole suivi

### 2.1. Identification des dangers

Cette phase vise à établir la toxicité des composés étudiés en recueillant les données animales et humaines sur les effets néfastes induits par des expositions expérimentales (chez l'animal), environnementales ou accidentelles (chez l'homme).

#### Données animales

Des protocoles opératoires sont établis puis testés sur une population animale statistiquement représentative et dont les résultats sont extrapolables à l'espèce humaine.

#### Données chez l'homme

Les études épidémiologiques permettent de mettre en évidence des relations statistiques entre une substance et l'augmentation de fréquence de certaines pathologies.

Les catastrophes écologiques peuvent permettre aussi un recueil de données. La catastrophe de Minamata par exemple a beaucoup contribué à la connaissance des effets délétères des organo-mercuriels comme le méthylmercure par exemple.

## 2.2. Caractérisation des dangers

Dans cette étape, il s'agit d'établir les relations doses-réponses, en estimant dans la mesure du possible les plus petites doses induisant un effet néfaste (LOAEL) et/ou les doses n'induisant pas d'effet significatif (NOAEL). La faible disponibilité et le peu de représentativité des données chez l'homme conduisent habituellement à extrapoler les relations dose effet chez l'homme à partir de celles obtenues chez l'animal dans les conditions décrites ci-dessus. Pour ce qui concerne les effets non cancérogènes et les cancérogènes non génotoxiques, l'approche générale est l'application de facteurs de sécurité à partir des NOAEL pour établir des DJT. Pour les substances cancérogènes génotoxiques, on considère qu'il est impossible de calculer une dose tolérable et que la seule approche réaliste est de réduire l'exposition à un niveau aussi faible que possible (approche du JECFA et du CSAH).

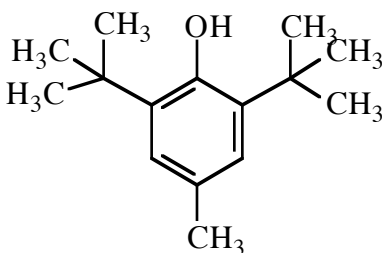
## 2.3. Évaluation du risque

Dans cette étape, il s'agit de situer les niveaux d'exposition de la population en France à partir des études de consommation et des données de contamination des denrées alimentaires. La connaissance de la LMR et de la quantité moyenne absorbée par jour est indispensable pour établir une comparaison avec la DJT.

## 2.4. Options de gestion du risque

En fonction de l'évaluation du risque, il s'agit maintenant de proposer des solutions pour que le consommateur ne soit pas exposé à des doses pouvant entraîner une certaine probabilité d'effets indésirables. En fonction du niveau de risque estimé, on pourra par exemple établir simplement une surveillance périodique du danger pour contrôler s'il n'y a pas une augmentation de son niveau. En cas de risque identifié pour une partie plus ou moins étendue de la population, on peut proposer des valeurs limites pour les principaux aliments vecteurs. Pour les composés cancérogènes génotoxiques, le risque nul n'existe pas et l'option de gestion proposée consiste à édicter des valeurs limites basées sur les meilleures possibilités techniques ou agricoles, en tenant compte par exemple des taux de présence naturelle du composé étudié, ce qui permet l'exclusion des lots fortement contaminés.

## Annexe : liste des abréviations

ADN ou DNA	Acide désoxyribonucléique
AFNOR	Association française de normalisation
ANM	Académie nationale de médecine
ASTM	<i>American Society for Testing and Materials</i>
BHA	Butylhydroxyanisole
BHT	Butylhydroxytoluène (2,6-di-tert-butyl-4-méthylphénol) 
BID	Bulletin d'information et de documentation (de la DGCCRF)
BRSA	Boisson rafraîchissante sans alcool
BS	British Standard
CCA	Commission du <i>Codex Alimentarius</i>
CCAAC	Comité du codex sur les additifs alimentaires et les contaminants
CCE	Commission des communautés européennes
CE ou EC	Communauté européenne
CFSAN	Center For Safety and Applied Nutrition
CSAH	Comité scientifique de l'alimentation humaine
CSHPF	Conseil supérieur d'hygiène publique de France
CTA	Commission de technologie alimentaire
DDCCRF	Direction départementale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes
DGAL	Direction générale de l'alimentation
DGIII	Direction générale du marché intérieur et des affaires industrielles de la CE.
DGCCRF	Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes

DGS	Direction générale de la santé
DIN	<i>Deutsches Institut für Normung</i>
DJA	Dose journalière admissible
DJAT	Dose journalière admissible temporaire
DLC	Date limite de consommation
DLUO	Date limite d'utilisation optimale
EC	Enzyme commission
EDTA	Ethylène Diamine tétra acétate (sel disodique)
FAO	<i>Food and Agricultural Organization of the United Nations</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GATT	<i>General Agreement on Tariffs and Trade</i>
GRAS	<i>Generally Recognized As Safe</i>
HFCS	<i>High Fructose Corn Syrup (sirop d'amidon à haute teneur en fructose)</i>
HPLC (=CLHP)	<i>High Pressure Liquid Chromatography</i>
IAA	Industrie agro-alimentaire
IR	Infrarouge
ISO	<i>International Standardisation Organization</i>
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
JECFA	<i>Joint Expert Committee for Food Additives</i>
JO	Journal Officiel
JOCE	Journal Officiel des communautés européennes
NDMA	Nitrosodiméthylamine
NOAEL	No Observable Adverse Effect Level
OMS	Organisation mondiale de la santé (WHO en anglais)
QS	<i>Quantum satis</i> (dose strictement nécessaire à l'effet recherché)
RMN	Résonance magnétique nucléaire
RX	Rayons X
SCF	<i>Scientific Committee on Foods</i>
SM	Spectrométrie de masse
SNIAA	Syndicat national des industries aromatiques alimentaires
SPS	<i>Sanitary and Phytosanitary</i>
TBHQ	Terbutylhydroquinone
TBT	Technical Barriers to Trade Agreement
UE	Union européenne
UV	Ultraviolet
WHO	World Health Organization