

Chapitre III : Méthodes d'étude de la toxicité

1. Formes de toxicité

On distingue généralement 3 types de toxicité selon la fréquence et la durée de l'exposition : la toxicité aiguë, la toxicité à court terme (subaiguë ou subchronique) et la toxicité à long terme (ou chronique).

Tableau 01. Formes d'intoxications

<i>Forme de toxicité</i>	<i>Fréquence d'administration</i>	<i>Durée de l'exposition</i>
Aiguë	Unique (ou plusieurs fois)	< 24 heures
Subaiguë	Répétée	< 1 mois
Subchronique	répétée	De 1 à 3 mois
Chronique	Répétée	> 3 mois

2. Méthodes de l'évaluation de la toxicité aiguë

Définition : la toxicité aiguë se manifeste suite à l'administration unique du toxique ou en plusieurs fois dans délais ne dépassant 24 heures. L'apparition de la toxicité est de courte durée (ne dépassant pas 14 jours)

2.1. Tests de toxicité in vivo

A. La dose létale 50 (DL50)

Une façon pratique de caractériser la toxicité d'une substance consiste à déterminer sa dose létale 50 (DL50). Elle correspond à la dose d'une substance pouvant causer la mort de 50% d'une population animale dans des conditions d'expérimentation précises.

La DL50 doit être déterminée sur deux espèces animales différentes, deux sexes différents avec deux voies d'administration différentes. Le produit à tester est administré à des rats ou à des souris répartis en plusieurs groupes, et ce à des doses croissantes suffisantes pour obtenir un pourcentage de mortalité s'échelonnant entre 0 et 100%. La DL50 s'exprime en mg de produit par Kg de poids corporel.

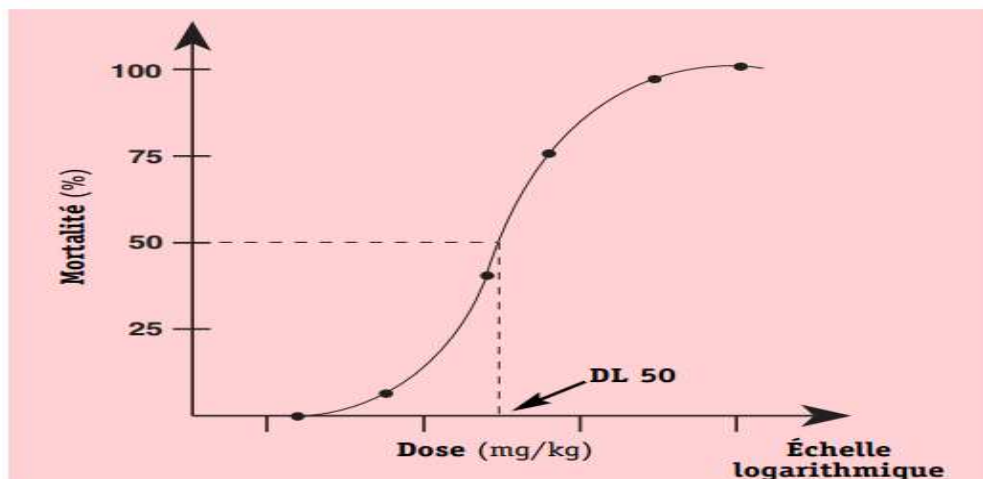


Figure 01. Détermination de la dose létale 50

Remarque :

- lorsqu'il s'agit d'un toxique qui est inhalé, on parle de concentration létale 50.
- Il est aussi important de savoir que la valeur réelle de la DL50 peut être différente pour un produit chimique donné, selon la voie d'exposition (p. ex. orale, cutanée, inhalation).

Tableau 01. Classification de la toxicité

DL 50	Nature du produit
DL50 < 5 mg/Kg	extrêmement toxique
DL50 Comprise entre 5 et 50 mg/Kg	Très toxique
DL50 Comprise entre 50 et 500 mg/Kg	Toxique
DL50 Comprise entre 0,5 et 5 g/Kg	Peu toxique
DL50 > 5g/Kg	Non toxique (ou l'est très peu)

B. Test de tolérance cutanée

Le test de tolérance cutanée mesure le résultat d'un contact direct de la substance avec la peau. Les effets résultants de l'analyse sont relevés 24 heures à 48 heures après. Ceux-ci peuvent aller d'une légère rougeur à des atteintes plus sévères (ulcérations, nécroses, corrosion)

C. Test de tolérance ophtalmique

La substance à tester est appliquée directement sur la surface antérieure de l'œil droit, L'autre œil, non traité, servira de contrôle, puis on compte le nombre de fermeture de l'œil par minute. Le test est considéré positif si le nombre de fermeture de l'œil droit est significativement supérieur à celui de l'œil gauche.

D. Test de pyrogènes

L'essai des pyrogènes est destiné à la détection des endotoxines produites par les bactéries Gram-négatives. Les pyrogènes sont des substances qui peuvent déclencher chez l'homme (ou l'animal) de la fièvre. L'activité pyrogène des endotoxines bactériennes est plus élevée que celle de la plupart des autres substances pyrogènes. Deux types de tests existent pour l'évaluation de l'activité pyrogène d'une substance : un test in vivo sur le lapin et un test in vitro (le test LAL, Limulus Amoebocyte Lysat, VOIR SECTION TESTS DE TOXICITE IN VITRO).

➤ Test in vivo sur le lapin

Ce test est un essai de recherche des pyrogènes chez le lapin. Il s'agit d'injecter les substances à tester dans la veine de l'oreille marginale du lapin.

Pour chaque substance à tester, il faut prévoir un lot de trois lapins. La température rectale de ces trois lapins est mesurée avant et après l'injection de la substance. Le test est considéré positif si la somme des écarts de températures des trois lapins avant et après l'injection dépasse 1,45°C.

2.2. Tests de toxicité in vitro

La toxicité d'une substance, dans un test *in vitro*, est exprimée par la concentration de produit entraînant une inhibition de 50% d'un processus cellulaire (CL50). La toxicité est évaluée par la détermination de plusieurs paramètres (par exemple la capacité d'absorption du rouge neutre, le test au MTT (3[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényltétrazolium bromure, un colorant de type tétrazolium), mesure de l'activité de LDH (lactico-déshydrogénase)). Ces tests ne concernent que la cytotoxicité et ne donnent pas d'informations sur les mécanismes d'action de ces toxiques. Vue leur simplicité et leur coût relativement faible, ces tests *in vitro* sont employés pour la détection de substances toxiques et/ou de confirmer l'absence de ces substances dans les premiers stades de développement de nouvelles substances telles que les médicaments, les produits phytosanitaires, les additifs alimentaires, etc.

La mesure de l'activité de la lactico-déshydrogénase (LDH) est également très utilisée pour étudier la cytotoxicité. Cette enzyme, normalement présente dans le cytoplasme des cellules vivantes, est libérée dans le milieu de culture lorsque les membranes cellulaires sont lésées par un agent toxique. Des prélèvements de petites quantités de milieu de culture effectués à différents moments après le traitement chimique des cellules permettent de mesurer la quantité de LDH libérée dans le milieu et de suivre le déroulement de la toxicité en fonction du temps. Bien que la libération de LDH constitue une évaluation très générale de la cytotoxicité, elle n'en est pas moins utile parce qu'elle est facile à réaliser, et ce en temps réel.

Test de pyrogènes *IN VITRO* (test LAL)

Ce test sert aussi à détecter la présence d'endotoxines dans les substances injectables. Le réactif LAL est préparé par hémolyse des amœbocytes (cellules sanguines) de *Limule* (crabe marin). Le sang de *limule* est extrêmement sensible à la présence de bactéries Gram négatif, de sorte que la coagulation du sang se produit au contact de très faibles quantités d'endotoxines libérées. Pour réaliser ce test il faut ajouter deux gouttes du réactif LAL à deux gouttes de la solution à tester. Le test est positif s'il y a agglutination dans le milieu.

3. Méthodes de l'évaluation des toxicités par doses répétées : subaiguë/subchronique et chronique

Pour l'évaluation de la toxicité par doses répétées, les deux sexes doivent être employés. Pour des rongeurs, chaque groupe de traitement contient au moins 20 animaux de chaque sexe, tandis que pour des non-rongeurs, un minimum de 4 animaux de chaque sexe par groupe est recommandé. Normalement, la fréquence de l'exposition est quotidienne, mais elle peut varier selon la voie choisie (orale, cutanée ou inhalation). La durée de la période d'exposition varie selon le type de toxicité étudiée. Les toxicités subaiguë/subchronique résultent d'expositions répétées ou prolongées des animaux d'expérience pendant des périodes ne dépassant pas 28 jours et 3 mois (90 jours) respectivement. Tandis que la toxicité chronique est le résultat de l'exposition répétée de ces animaux à des substances toxiques pendant des périodes dépassant les 3 mois.

Pour chacune de ces trois types de toxicité par doses répétées, au moins trois niveaux de dose doivent être employés en plus du groupe témoin. Les résultats des études incluent des mesures de poids corporel et de consommation de nourriture/d'eau, des observations quotidiennes détaillées (examen ophtalmologique, hématologie, biochimie clinique et analyse d'urine), chaque jour de préférence au même moment, de même qu'une autopsie générale et de l'histopathologie.

Une étude de toxicité par dose répétée permet normalement de déterminer une dose sans effet toxique (NOAEL : No Observed Adverse Effect Level). C'est la dose qui à la suite d'une administration répétée pendant une longue période (28 jours à 2 ans) ne provoque pas absolument aucune manifestation anormale

qu'elle soit biochimique, microscopique, macroscopique, ou clinique chez deux espèces de mammifères pendant la période d'administration du produit. La dose sans effet s'exprime en mg/Kg/j.