

Annexe 1. Point de référence de la relation dose-réponse pour l'antraquinone

Il faut choisir un point de référence de la relation dose-réponse qui puisse servir de base à une MOE. L'option TTC est possible mais pas nécessaire si des tests génotoxiques et cancérigènes sont disponibles. L'option TD50 est possible, à condition qu'elle soit dérivée de manière transparente.

L'étude du NTP (2005) indique clairement que l'antraquinone (AQ) est cancérigène, que ce soit par un mécanisme génotoxique ou non, peut-être en raison de la présence d'une impureté, le 9-nitroanthracène (9-NA) et/ou de ses métabolites, la 2-hydroxyantraquinone (2-OH-AQ) ou la 1-hydroxyantraquinone (1-OH-AQ).

Il a été suggéré que la méthode de production pourrait déterminer le caractère génotoxique-cancérigène de l'AQ, mais cela n'a pas été démontré de manière concluante, étant donné qu'un seul étude de cancérogenèse (étude NTP), qui comporte un essai sur des souris et un autre sur des rats, est disponible. Le Comité estime que, pour l'instant, l'AQ doit être considérée comme un cancérigène génotoxique, indépendamment du type de synthèse de cette substance.

Dans le rapport d'évaluation établi à la suite de l'inscription de l'AQ à l'annexe I de la Directive 91/414/CEE (Règlement (CE) n° 1107/2009), il a été décidé ce qui suit (Belgique, 2009)¹⁰ :

« No NOAEL can be proposed in these studies.

The final reports of the 2 carcinogenicity studies, conducted by the NTP USA, with anthraquinone in rats and mice are still under discussion. According to the published data by Butterworth (2004), the presence of 9-nitroanthracene used in the NTP cancer bioassays was responsible for the carcinogenic effects as a result of its genotoxic activity; the evidence for this is only indirect.

*Although the genotoxic activity was demonstrated, the carcinogenicity of 9-nitroanthracene was not demonstrated or published. The positive results reported with *S. typhimurium* does not mean that the chemical possess carcinogenic activity as only a correlation exists between the results of genotoxicity assays and rodent carcinogenicity for some chemicals, but not for all chemicals. **It is also not known whether the relatively low levels of 9-nitroanthracene measured in the NTP material, if this compound is carcinogenic, would be potent enough to cause the reported tumours.** »*

Dans la dernière révision du NTP (NTP, 2005), les résultats sont multiples, car des incidences accrues liées à l'AQ ont été très clairement observées dans différents organes et tissus. Cependant, l'établissement de rapports est également assez complexe, étant donné le poids attribué aux différentes tumeurs. Dans la formulation standard du NTP, ce poids est ventilé entre « CLEAR evidence » (++++), « SOME evidence » (+++), « WERE related to » (++) et « MAY be related to... » (+). Sur la base des données dose-réponse du NTP, on a cherché à savoir si une approche MOE pouvait être utilisée sur la base de la BMDL₁₀ comme descripteur de dose. Le logiciel PROAST (version 69.0), tel que proposé sur une plate-forme de l'EFSA, a été utilisé. Différents calculs ont été effectués pour tous les points-finaux, mais aucun n'a fourni une estimation fiable de la BMD (Tableau 1). Des détails sont présentés pour les deux types de tumeurs pour lesquels le NTP a conclu à des **preuves évidentes**, à savoir le rein (rat ♀) et le foie (souris ♂ + souris ♀). Les incidences des tumeurs du rein et du foie étaient plus élevées que les valeurs d'incidence historique spontanée. Le logiciel calcule une estimation

¹⁰ Belgium (2009). Evaluation report on the review of the existing EU MRLs for anthraquinone prepared by the rapporteur Member State Belgium in the framework of Article 12 of Regulation (EC) No 396/2005, November 2009.

pour différents modèles, et génère également un paramètre BMD moyen. Les valeurs BMDL calculées dans les différents modèles pour les principales incidences de tumeurs observées dans l'étude NTP (NTP, 2005) sont indiquées dans le Tableau 2 (en jaune dans Tableau 1).

Le rapport BMDU/BMDL (limite supérieure et inférieure de l'intervalle de confiance) est au moins d'un ordre de grandeur pour chacun des modèles, ce qui rend la valeur moyenne trop incertaine pour être utilisée. Les graphiques (Tableau 1) montrent toujours le modèle pour lequel la BMD théorique était proche de celle de la valeur moyenne (le modèle en ligne ne permet pas de construire la courbe « moyenne », ce qui ne serait pas non plus utile étant donné les grandes différences entre certains modèles proposés). Les modèles qui ne répondent pas aux critères de fiabilité prédéfinis sont exclus des calculs de moyenne.

Chaque modèle suppose un BMR de 10 %, c.-à-d. une augmentation de 10 % du risque, ce qui est courant pour les ensembles de données non continues telles que les résultats cancérogènes.

Il est clair que la nature de la courbe dose-réponse ne permet en aucun cas une estimation fiable de la BMD, et surtout pas pour les tumeurs où la dose maximale présente une trop forte diminution de l'incidence par rapport à la dose faible et moyenne. La cause possible de ces diminutions n'a pas été donnée mais a été abordée dans le rapport du NTP. La substance a un métabolisme assez complexe (la substance induit son propre métabolisme), mais un tel effet de dose maximale ne s'explique pas de manière adéquate par une éventuelle saturation métabolique ou une mortalité accrue qui masquerait les résultats des tests (une mortalité accrue a été observée chez la souris ♂, mais pas chez le rat ♂). D'autre part, les augmentations observées sont statistiquement significatives et ne peuvent être ignorées en raison de l'effet anormal de la dose maximale.

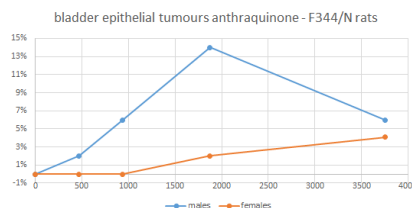
Il convient toutefois de noter que pour les tumeurs caractérisées comme « preuves évidentes » (et pour lesquelles une relation dose-réponse non linéaire a été observée), il n'est pas non plus possible d'effectuer une estimation très fiable de la BMDL. Ceci est généralement considéré comme typique dans la modélisation BMDL par PROAST, où il est admis que de très faibles valeurs BMDL sont souvent générées à des courbes dose-réponse supralinéaires. Pour les tumeurs énumérées ci-dessus, les valeurs BMDL correspondent à :

- Rein : 9,33 ppm ~0,49 mg/kg pc/j (rat ♀)
- Foie : 0,001540 ppm ~0,15 µg/kg pc/j (souris ♀) et 55,4 ppm ~5,98 mg/kg pc/j (souris ♂)

Tableau 1. Aperçu des tumeurs observées et de la modélisation de la BMD ('benchmark dose') à partir des données dose-réponse des études du NTP (NTP, 2005)

Espèce ♂,♀	Poids (*)	Organe	néoplasme	Dose (ppm, axe X)-réponse (% ,axe Y) (♂,♀)	BMDL ♂	BMDL ♀
Rat, ♀	++++	Rein	néoplasme tubulaire (adénome+ carcinome)			
Souris ♂,♀	++++	Foie	néoplasme (adénome+ carcinome+ hépatoblastome)			
Rat, ♂	+++	Rein	adénome tubulaire			
Rat, ♂	+++	Rein/ vessie	papillome épithélial transitoire			

Rat, ♀ ++ Vessie adénome de l'épithélium transitionnel + carcinome



Rat, ♀ ++ Foie Adénome hépatocellulaire
 Rat, ♂ + Foie néoplasie (général)
 Rat, + Thyroid Néoplasie folliculaire
 ♂♀

(*) "CLEAR evidence" (++++), "SOME evidence" (+++), "WERE related to" (++) , "MAY be related to..." (+)

Tableau 2. Valeurs calculées de la BMDL dans les différents modèles pour les 3 principales incidences de tumeurs observées dans l'étude NTP de 2004 (NTP, 2005), à savoir les tumeurs du rein (rat ♀) et du foie (souris ♂♀).

** Les détails pertinents sont indiqués pour les deux types de tumeurs pour lesquels le NTP a conclu à l'existence de preuves évidentes (en jaune le modèle présenté au Tableau 1)

(i) Rein (rat ♀)

Dose (ppm)	Response (%)	N	model	No.par	loglik	AIC	accepted	BMDL (ppm)	BMDU (ppm)	BMD (ppm)	conv
0	0	50	null	1	-1.5236e+02	3.0672e+02		NA	NA	NA	NA
469	12	50	full	5	-1.2470e+02	2.5940e+02		NA	NA	NA	NA
938	18	50	two.stage	3	-1.3050e+02	2.6700e+02	no	NA	NA	3.59e+02	yes
1875	16	50	log.logist	3	-1.2635e+02	2.5870e+02	yes	6.52	263	9.92	yes
3750	29	49	Weibull	3	-1.2623e+02	2.5846e+02	yes	4.23	236	8.00	yes
			log.prob	3	-1.2637e+02	2.5874e+02	yes	9.33	285	117	yes
			gamma	3	-1.2615e+02	2.5830e+02	yes	2.17	223	6.42	yes
			logistic	2	-1.5229e+02	3.0858e+02	no	NA	NA	2.64e+05	yes
			probit	2	-1.0000e+10	2.0000e+10	no	NA	NA	2.63e+08	yes
			LVM: Expon. m3-	3	-1.2695e+02	2.5990e+02	yes	54.40	269	127	yes
			LVM: Hill m3-	3	-1.2650e+02	2.5900e+02	yes	41.40	273	114	yes
			AVERAGE					9.23	305		

(ii) Foie (souris ♀)

Dose (ppm)	Response (%)	N	model	No.par	loglik	AIC	accepted	BMDL (ppm)	BMDU (ppm)	BMD (ppm)	conv
0	6	49	null	1	-1.3660e+02	2.7520e+02		NA	NA	NA	NA
833	30	50	full	4	-1.0733e+02	2.2266e+02		NA	NA	NA	NA
2500	30	50	two.stage	3	-1.1472e+02	2.3544e+02	no	NA	NA	408	yes
7500	41	49	log.logist	3	-1.0861e+02	2.2322e+02	yes	0.001540	138.0	16.5	yes
			Weibull	3	-1.0841e+02	2.2282e+02	yes	0.000136	77.0	5.34	yes
			log.prob	3	-1.0857e+02	2.2314e+02	yes	0.003780	157.0	21.0	yes
			gamma	3	-1.0825e+02	2.2250e+02	yes	0.000000	47.5	0.91	yes
			logistic	2	-1.1773e+02	2.3946e+02	no	NA	NA	812	yes
			probit	2	-1.0000e+10	2.0000e+10	no	NA	NA	6.12e+08	yes
			LVM: Expon. m3-	3	-1.0846e+02	2.2292e+02	yes	2.86	47.0	5.63	yes
			LVM: Hill m3-	3	-1.0840e+02	2.2280e+02	yes	1.49	57.1	2.98	yes
			AVERAGE					0.03	98.8		

(iii) Foie (souris ♂)

Dose (ppm)	Response (%)	N	model	No.par	loglik	AIC	accepted	BMDL (ppm)	BMDU (ppm)	BMD (ppm)	conv
0	26	50	null	1	-1.0878e+02	2.1956e+02		NA	NA	NA	NA
833	35	50	full	4	-9.0290e+01	1.8858e+02		NA	NA	NA	NA
2500	43	50	two.stage	3	-9.0410e+01	1.8682e+02	yes	159.00	354	229	yes
7500	48	49	log.logist	3	-9.0440e+01	1.8688e+02	yes	55.40	1010	315	yes
			Weibull	3	-9.0290e+01	1.8658e+02	yes	12.50	612	146	yes
			log.prob	3	-9.0360e+01	1.8672e+02	yes	57.00	925	315	yes
			gamma	3	-9.0290e+01	1.8658e+02	yes	1.90	709	126	yes
			logistic	2	-9.0780e+01	1.8556e+02	yes	232.00	460	317	yes
			probit	2	-1.0000e+10	2.0000e+10	no	NA	NA	5.21e+08	yes
			LVM: Expon. m3-	3	-9.0310e+01	1.8662e+02	yes	4.68	491	90.4	yes
			LVM: Hill m3-	3	-9.0290e+01	1.8658e+02	yes	8.19	556	119	Yes
			AVERAGE					50.2	922		

L'utilisation d'une TD50 (Butterworth, 2001) contraste fortement avec toute autre approche (TTC ou BMDL) car les valeurs varient de 310 à 940 mg/kg pc par jour. Cependant, la publication ne fournit pas beaucoup de détails pour ce calcul.

Pour une substance ayant un effet incontestable sur les organes cibles que sont le foie et le rein (également apparent dans les essais subaigus directionnels et les points-finaux non néoplasiques dans les essais chroniques, sans NOAEL), il faut s'appuyer non seulement sur un paramètre qui tient compte de la latence de la tumeur (ce qu'est clairement la TD50) mais aussi sur l'incidence de la tumeur en soi, surtout si l'on soupçonne un mécanisme d'action génotoxique.

Une autre raison de ne pas choisir cette méthode réside dans le choix qui a été fait pour la détermination de la TD50 dans certains organes. On trouve la valeur TD50 la plus basse (310 mg/kg pc par jour) dans l'incidence accrue des tumeurs de la vessie (adénome épithélial transitoire + carcinome) chez les rats ♀, qui a été caractérisée par le NTP comme *pouvant être liée* à l'exposition à l'AQ («*may be related to...*», ++) (cependant, seulement chez les rats ♂ !). La dose-réponse se caractérise par une plage de doses dans laquelle aucun effet histopathologique n'a été constaté jusqu'à 1.000 ppm (c.-à-d. un effet de seuil), avec une évolution plutôt plate de l'incidence à la dose la plus élevée, alors qu'au contraire, une forte augmentation est observée chez les rats ♂ à partir de la dose la plus faible.

Les auteurs estiment manifestement que l'étude sur le cancer n'est pas fiable en raison de la 'confusion' avec l'impureté, et que seule cette impureté serait responsable du résultat positif. Ils concluent qu'en l'absence d'une étude fiable sur le cancer de l'AQ « pure », qui ne serait pas un mutagène en soi, aucune conclusion ferme ne peut être tirée concernant le potentiel cancérigène de l'AQ. Si tel était le cas, il nous semble que la méthode TD50 proposée, qui conduit clairement à un point de référence moins critique, ne devrait logiquement pas non plus être privilégiée pour une approche MOE.

Conclusion

Étant donné qu'en raison de la nature de la courbe dose-réponse, la méthode BMDL ne conduit pas nécessairement à un RP plus réaliste, nous considérons que, dans ce cas, la LOAEL la plus basse (20 mg/kg pc par jour) doit être utilisée. Comme MOE au-dessus de laquelle l'exposition n'est pas immédiatement préoccupante, la valeur par défaut de 10.000 est proposée, multipliée par un facteur d'incertitude supplémentaire de 3 pour l'utilisation d'une LOAEL comme point de référence.