

Note « Méthodes et outils émergents d'évaluation des dangers »

Contribution au programme	Macrothème VIVA: Évaluer la toxicité et l'écotoxicité des substances et agents physiques. Évaluer et surveiller leur impact sur le vivant.
	Titre du programme : Outils méthodologiques d'évaluation des dangers des substances chimiques
	Dossier suivi par : Adrien TROISE Responsable du programme : Adrien TROISE (DRC/VIVA/ETES ; adrien.troise@ineris.fr)

L'ECHA a récemment publié une version projet des annexes VII et VIII de REACH relatives aux exigences en matière d'information standard pour les substances fabriquées ou importées en quantités égales ou supérieures à 1 et 10 tonnes respectivement. Cette version intègre les approches intégrées en matière d'essai et d'évaluation et les parcours de l'effet adverse pour la sensibilisation cutanée ce qui donne désormais la possibilité d'évaluer le potentiel sensibilisant d'une substance via l'utilisation de méthodes alternatives et non pas uniquement par la réalisation de tests *in vivo* comme c'était le cas auparavant.

Compte-tenu de l'évolution rapide et de la multiplicité des concepts, méthodes et outils émergents pour l'évaluation des dangers qui sont le mode d'action (MoA), les parcours de l'effet adverse (ou Adverse Outcome Pathway (AOP)), les stratégies de test intégrées (ITS) et les approches intégrées en matière d'essai et d'évaluation (ou Integrated Approaches on Testing and Assessment (IATA)), il nous a parut essentiel de bien clarifier ces approches et leur rôle. La présente note a donc pour objectif de définir chacun de ces concepts ainsi que de préciser l'utilité de chacune des approches dans la démarche d'évaluation des dangers.

	Rédaction	Vérification	Approbation
NOM	Adrien TROISE	Sandrine ANDRES	Éric THYBAUD
Qualité	Ingénieur à l'Unité d'Expertise en Toxicologie/Ecotoxicologie des Substances chimiques	Responsable de l'Unité d'Expertise en Toxicologie/Ecotoxicologie des Substances chimiques	Responsable du Pôle Dangers et Impact sur le Vivant
Visa			

Destinataires : Pierre DE FRANCLIEU

Copies : SAN, ETh, PHu, ETES

1. INTRODUCTION

De nombreux contextes nécessitent une évaluation des propriétés de danger des substances chimiques. Ainsi, les règlements européens REACH, phytosanitaires, biocides ou CLP pour ce qui concerne les substances chimiques, ainsi que la directive cadre sur l'eau (DCE) pour ce qui concerne les milieux, imposent de déterminer les caractéristiques toxicologiques et écotoxicologiques des substances concernées. Ces propriétés sont essentiellement déterminées par une série de tests de laboratoire réalisés sur un panel d'organismes et prenant en compte un ensemble de critères d'effet.

Devant la multiplicité des substances chimiques à évaluer, la nécessité de limiter le recours à l'expérimentation animale et les développements des méthodes d'évaluation (approches *in silico*, *in vitro*) le constat a été fait du besoin de faire évoluer les concepts méthodologiques.

La toxicologie s'oriente donc désormais vers la caractérisation détaillée des voies de toxicité conduisant à des effets néfastes. Mieux connaître les mécanismes biologiques et leurs étapes successives vers la survenue d'une pathologie permettra d'anticiper les éventuelles perturbations liées à des expositions aux substances chimiques. La caractérisation du danger pourra alors se baser non plus sur l'identification d'un effet néfaste observé chez l'animal à des niveaux de dose élevés mais à partir de l'étude de ces voies biologiques sur des modèles expérimentaux *in silico* et *in vitro*.

Afin de répondre à ces problématiques, différents outils et méthodes ont été développés et ont évolués afin d'être replacés dans un cadre conceptuel : le mode d'action (MoA), les chemins de l'effet adverse (AOP), les stratégies de test intégrées (ITS) et les approches intégrées en matière d'essai et d'évaluation (IATA). Le mode d'action et les chemins de l'effet adverse sont des concepts élaborés afin d'améliorer la compréhension de la toxicité des substances chimiques. Les stratégies de test intégrées et les approches intégrées en matière d'essai et d'évaluation sont quant à elles des méthodes destinées à être mise en œuvre en pratique afin de guider l'évaluateur sur la stratégie à appliquer pour évaluer une substance chimique.

Face à la multiplicité des méthodes, une certaine confusion dans le rôle de ces outils peut s'installer et ainsi rendre leur compréhension délicate. Ainsi, la présente note a pour objectif de définir chacun de ces concepts ainsi que de clarifier l'utilité de chacune des approches dans la démarche d'évaluation des dangers.

2. CADRES CONCEPTUELS

2.1 MODE D'ACTION (MOA)

2.1.1 Définition

Le mode d'action est défini comme étant une séquence d'étapes clés, à commencer par l'interaction d'une substance chimique avec une cellule cible, qui entraînent des modifications fonctionnelles et/ou anatomiques, et résultent en l'apparition d'une toxicité chez l'individu. Une étape clé correspond à un événement précurseur empiriquement observable qui est une étape nécessaire du mode d'action ou qui est un marqueur biologique de cette étape (Boobis *et al.*, 2006).

La figure 1 ci-dessous montre un exemple de représentation du mode d'action pour les différents niveaux d'organisation biologique.

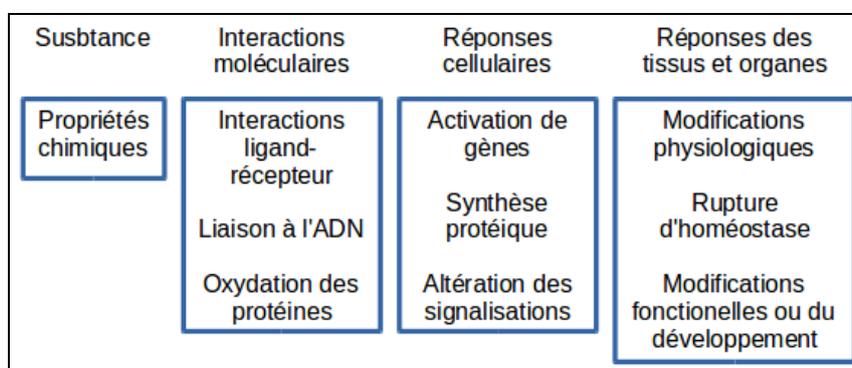


Figure 1 : Exemple de représentation du mode d'action (d'après Ankley *et al.*, 2010)

2.1.2 Objectifs

Il permet de favoriser l'utilisation des approches prédictives en toxicologie grâce à une meilleure structuration et intégration des données *in vivo*, *in vitro* ou *in silico* des substances chimiques et ainsi, il renforce l'évaluation des risques des substances chimiques. Par ailleurs, il constitue aujourd'hui une voie essentielle pour l'étude de la toxicité des mélanges, à la fois pour estimer l'additivité des effets de substances partageant un même mode d'action ou bien pour identifier les interactions métaboliques.

Selon le règlement REACH, le mode d'action d'une substance doit être défini lorsqu'il est connu, mais cette étape n'est pas obligatoire. Toutefois, il est utile pour déterminer les valeurs toxicologiques de référence (cancérogène à seuil ou sans seuil), réaliser des read-across, utiliser des modèles structure/activité QSAR, mettre en place une stratégie d'essais intégrée, évaluer la toxicité de mélanges (additivité des effets ou interactions métaboliques),...

2.1.3 Evolution méthodologique

Historiquement, le concept du mode d'action est relativement ancien mais les principales applications de ce concept datent de 2001 où l'OMS (Sonich-Mullin *et al.*,

2001) publie une méthodologie pour l'évaluation du mode d'action cancérigène chez l'homme.

Le terme mécanisme d'action est également être utilisé. Toutefois, ce dernier est légèrement différent du mode d'action dans la mesure où ce premier inclut une compréhension et une description plus détaillée des évènements, le plus souvent au niveau moléculaire.

2.2 ADVERSE OUTCOME PATHWAY (AOP)

2.2.1 Définition

Un « Adverse Outcome Pathway » (AOP) (ou « chemins de l'effet adverse ») est une construction conceptuelle qui représente les connaissances disponibles concernant le lien entre un évènement déclencheur au niveau moléculaire (comme par exemple, une interaction moléculaire entre une substance chimique et une biomolécule spécifique) et un effet néfaste sur l'organisme. Les AOP sont généralement constitués d'une série d'évènements qui ont lieu à différents niveaux de l'organisation biologique (molécules, cellules, organes, population). Les relations entre ces différents niveaux peuvent être établies à partir d'observations causales, mécaniques, par déduction ou basées sur des corrélations. Les informations sur lesquelles elles sont fondées peuvent provenir de données *in vitro*, *in vivo* ou *in silico*. Un AOP décrit également les interactions moléculaires au niveau du site d'action et la cascade de réactions au niveau des cellules, des tissus, de l'organisme et de la population. La figure 2 ci-après présente les principales caractéristiques d'un AOP. Chaque AOP commence par un évènement moléculaire où une substance chimique interagit avec une cible biologique (ancrage 1). Cette interaction conduit à une série d'évènements à différents niveaux de l'organisation biologique puis à un effet néfaste (par exemple, un effet sur le développement ou la reproduction, ancrage 2). Les trois premières cases représentent la « voie de toxicité », c'est-à-dire, la réponse cellulaire qui, lorsqu'elle est suffisamment perturbée et que l'organisme n'est pas capable de s'adapter, induit une toxicité et/ou une pathologie (INERIS, 2012).

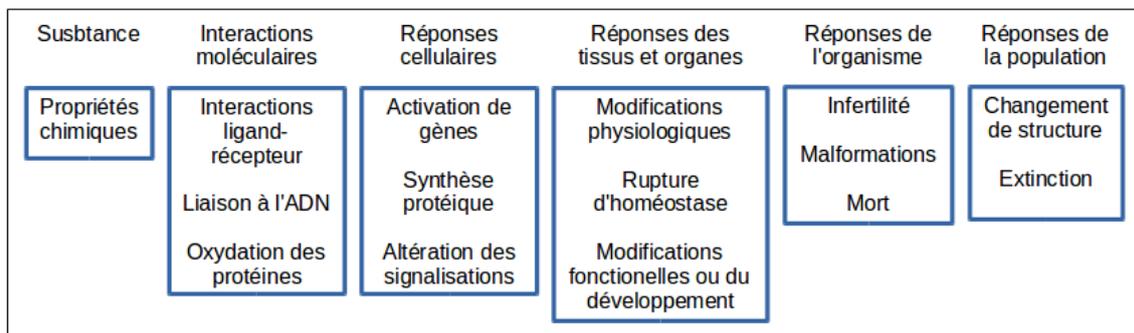


Figure 2 : Schéma conceptuel des principales caractéristiques d'un AOP (d'après, Ankley et al., 2010)

2.2.2 Objectifs

Les objectifs et les intérêts des AOP sont comparables à ceux des modes d'action. Les AOP permettent :

- de structurer et d'intégrer les informations sur les substances chimiques depuis l'évènement initiateur au niveau moléculaire jusqu'à l'effet néfaste observé (qu'elles soient issues de données *in vivo*, *in vitro* ou *in silico*) et de favoriser les approches prédictives dans l'évaluation des dangers,
- d'orienter la réalisation de stratégies de tests (ITS, IATA) afin de développer, de prioriser, et de justifier des tests ciblés,
- d'établir les liens de causalité avec les effets toxiques observés,
- de faciliter l'intégration de ces différentes données, ainsi que d'identifier les incertitudes et les besoins de compléments d'informations,
- de développer une approche par catégories de substances chimiques,
- d'identifier les similitudes et les différences entre les espèces des évènements initiateur afin d'affiner les facteurs d'évaluation et de mettre en place une stratégie de tests intégrée (ITS) ou une approche intégrée en matière d'essai et d'évaluation (IATA).

2.2.3 Evolution méthodologique

Par rapport au mode d'action qui prend uniquement en compte les effets sur les individus au niveau des tissus et des organes, un AOP permet d'évaluer l'impact d'une substance chimique sur l'organisme et la population. Les objectifs et les intérêts des AOP sont comparables à ceux des modes d'action. Le développement d'un AOP peut être *a priori* car il peut être établi à partir d'observations causales, mécaniques, mais aussi par déduction ou basées sur des corrélations.

Par ailleurs, contrairement aux modes d'action, les AOP sont accompagnés d'outils qui disposent d'une interface conviviale et open-source (AOP wiki¹) permettant un partage facilité des connaissances ainsi qu'une dissémination rapide des informations. Un programme de travail a également été initié à l'OCDE en 2012 afin de collecter les informations et à terme de valider les AOP pour une trentaine d'effets néfastes et de voies de toxicité. A ce jour, seul l'AOP sur la sensibilisation cutanée induit par liaison covalente aux protéines a été validé par l'OCDE (cf. figure 5 en annexe).

3. STRATEGIES D'ESSAI

3.1 STRATÉGIE DE TESTS INTÉGRÉE (ITS)

3.1.1 Définition

Une stratégie de tests intégrée est une méthode qui intègre les informations sur l'évaluation des dangers issues de plus d'une source et qui permet ainsi de faciliter la prise de décision. Elle doit être construite en tenant compte du principe des trois R (réduction, raffinement et remplacement). Cette stratégie d'évaluation itérative permet d'orienter l'évaluateur sur la nécessité de réaliser des tests supplémentaires et le cas échéant de le guider sur le choix des essais.

¹ https://aopwiki.org/wiki/index.php/Main_Page

Un exemple d'ITS développé en 2004 pour l'irritation/corrosion cutanée et oculaire est présenté dans la figure 3 ci-dessous.

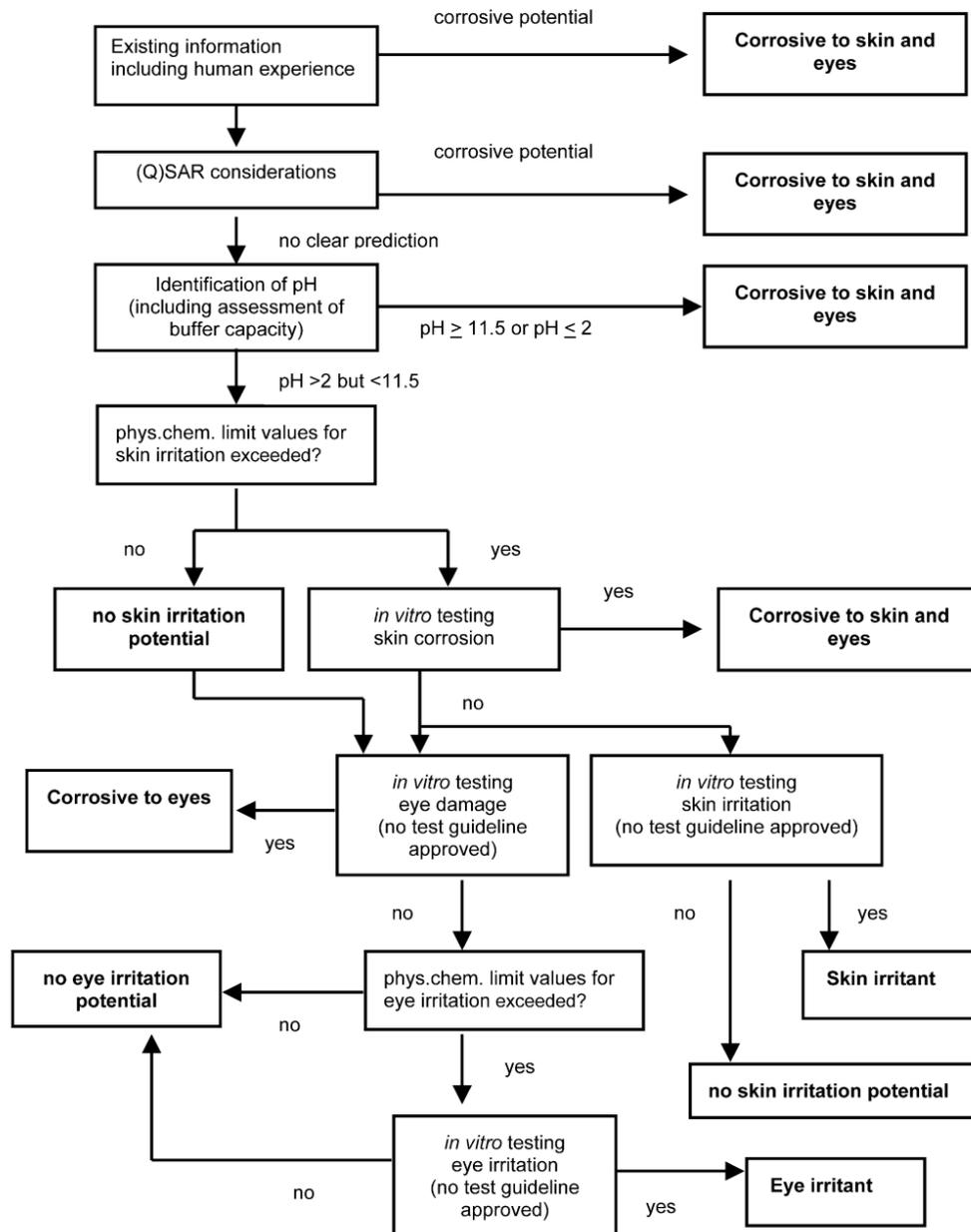


Figure 3 : Exemple de stratégie de tests intégrée (Hofer, 2004)

3.1.2 Objectifs

Les ITS ont pour principal objectif de favoriser l'utilisation des données issues de méthodes alternatives *in vitro*, *in silico* ou *in chemico* et ainsi de réduire la nécessité de l'expérimentation animale. Ils décrivent des procédures opérationnelles qui guident une évaluation transparente et scientifiquement rationnelle des dangers des substances chimiques.

3.1.3 Evolution méthodologique

Les principaux travaux sur les ITS ont été initiés par l'ECVAM et l'OCDE pour la corrosion/irritation oculaire puis dans le cadre du projet européen OSIRIS (2007-2011). Ce projet avait pour but de développer les méthodes alternatives et notamment les ITS afin de répondre aux exigences et principes du règlement REACH. Les ITS ont donc par la suite été intégrées dans le règlement REACH et plus particulièrement décrits dans le guide « R7, Endpoint specific guidance » (ECHA,2015). De même, les travaux sur les ITS pour la mutagénicité ont débuté dans le début des années 2000 avec une première proposition dans le cadre du règlement REACH en 2006 (Grindon C. et al., 2006).

3.2 APPROCHES INTEGREES EN MATIERE D'ESSAIS ET D'EVALUATION (IATA)

3.2.1 Définition

Les approches intégrées en matière d'essai et d'évaluation (ou Integrated Approaches on Testing and Assessment (IATA)) sont un ensemble de méthodes de collecte de données, de tests et d'évaluations qui intègrent des données de différents types : *in vitro*, *in vivo*, *in chemico*, *in silico*, physico-chimiques,... Grâce aux IATA, les batteries de tests prédéfinies jusqu'alors utilisées pour évaluer la toxicité de substances pourraient être remplacées par une stratégie de tests ciblées adaptées au profil de toxicité et à l'utilisation prévue de chaque substance. Ces approches permettraient alors de réduire et/ou de remplacer l'utilisation d'animaux ainsi que de favoriser la compréhension des mécanismes d'action (INERIS, 2014).

Une stratégie IATA comporte plusieurs étapes. Dans un premier temps, les données disponibles sur la substance sont compilées. Si la force probante des données (Weight Of Evidence (WoE)), permet de conclure sur la toxicité de la substance, aucune donnée supplémentaire n'est alors requise. Dans le cas contraire, selon les lacunes, les méthodes d'essai les plus appropriées pour connaître le profil toxicologique précis de la substance sont déterminées en utilisant notamment les stratégies de tests intégrées (Integrated Testing Strategies (ITS)). En fonction des données acquises, une décision réglementaire peut ensuite être prise en s'appuyant sur l'ensemble de ces informations.

Un exemple de IATA pour la sensibilisation cutanée est présenté dans la figure 4. Un exemple plus complet est également présenté en annexe (cf. figure 6).

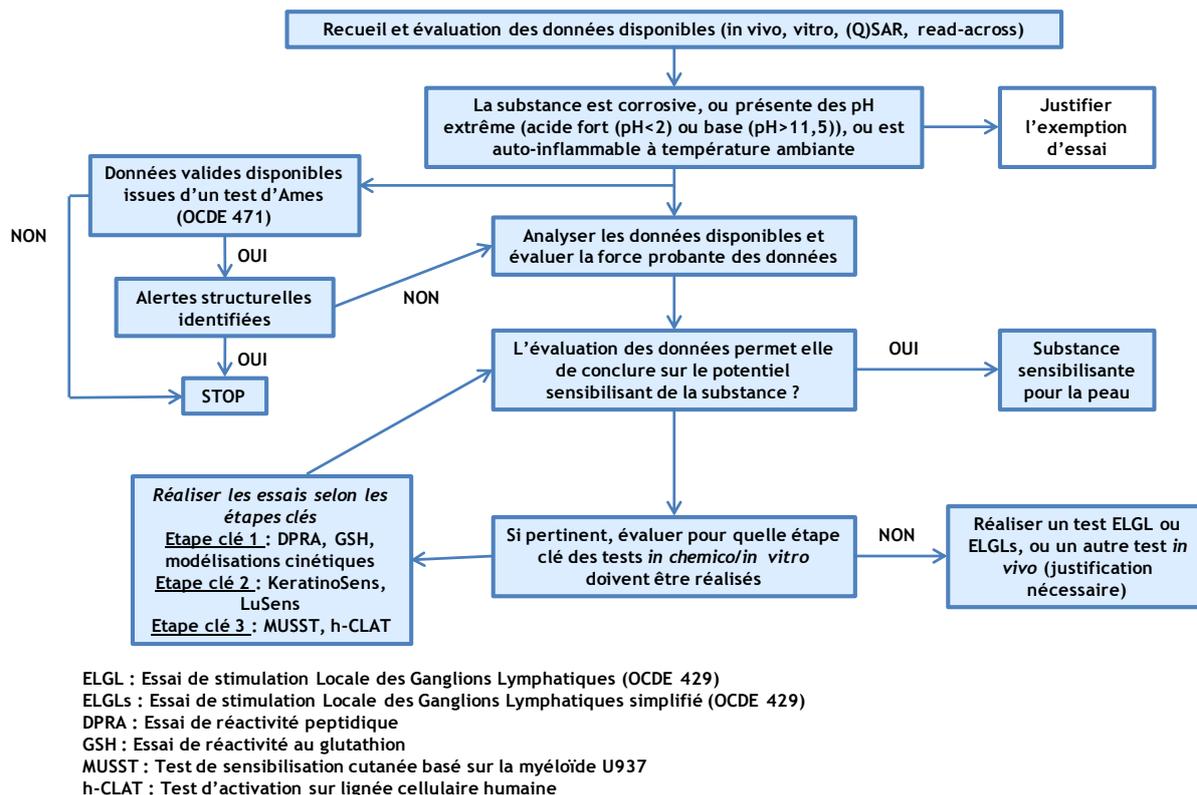


Figure 4 : Proposition de IATA pour la sensibilisation cutanée (OCDE, 2013)

3.2.2 Objectifs

Les objectifs des IATA sont comparables à ceux des concepts précédents dans la mesure où ils intègrent ces différents éléments. Les IATA permettent ainsi de renforcer l'évaluation des dangers des substances chimiques grâce à la considération de l'ensemble des outils et informations disponibles tout en respectant les principes du règlement REACH (tel que le principe des 3R).

3.2.3 Evolution méthodologique

Les IATA intègrent les outils cités précédemment tels que les modes d'action (MoA) et les parcours de l'effet adverse (ou Adverse Outcome Pathway (AOP)) (cf. rapport DRC-12-124809-12016A). Les résultats sont groupés par événement clé (key event) susceptible de conduire à l'expression d'une toxicité. L'objectif est de couvrir un maximum de niveaux de l'organisation biologique de l'AOP (cible moléculaire, réponse cellulaire, atteinte des tissus/organes,...). Pour chacun des principaux événements qui par définition doivent être mesurables, des essais servent à caractériser ces événements et à quantifier l'AOP.

Les IATA et les ITS sont des approches très proches. En effet, les IATA sont en réalité une évolution méthodologique du concept des ITS, qui permet de mieux cadrer leur application grâce à l'établissement de méthodologies détaillées et de renforcer leur pertinence grâce notamment à l'intégration du concept d'AOP et des nouvelles

évolutions concernant les méthodes *in silico*. Par ailleurs, la force probante des données est clairement discutée dans les méthodologies et un poids important lui est attribué par rapport aux ITS où la démarche consiste principalement à suivre une stratégie itérative d'essais *in vitro* jusqu'aux essais *in vivo*. Dans les IATA, l'ensemble des données est intégré dans un AOP et la force probante des données permet soit de conclure, soit d'identifier les lacunes et les essais supplémentaires nécessaires.

4. CONCLUSION

Les travaux engagés sur ces différents outils concourent aux efforts réalisés aujourd'hui pour promouvoir une approche holistique de l'évaluation des dangers en mutualisant les informations disponibles dans les domaines de la toxicité et de l'écotoxicité, aussi bien à des fins d'accroître la connaissance sur une substance que de limiter les essais.

Dans le cadre d'une évaluation des risques cumulés, ces outils devraient permettre de décrire finement et quantitativement les actions des substances individuelles ainsi que d'identifier et intégrer les interactions, compétitions ou synergies des substances entre elles. Ces évolutions sont attendues à plus long termes car elles nécessitent la génération et mutualisation de données ainsi qu'un effort de modélisation important pour autoriser de telles prédictions.

5. BIBLIOGRAPHIE

Boobis A.R., Cohen S.M., Dellarco V., McGregor D., Meek M.E., Vickers C., Willcocks D. and Farland W. (2006) - IPCS framework for analyzing the relevance of a cancer mode of action for humans. *Crit Rev Toxicol*, 36, 10, 781-792.

ECHA (2015) - Guidance on Information Requirements and Chemical Safety Assessment, Chapter R.7a: Endpoint specific guidance.

Grindon C., Combes R., Cronin M.T., Roberts D.W., Garrod J.F. (2006) - Integrated testing strategies for use in the EU REACH system. *Altern Lab Anim*. 34(4):407-27.

INERIS (2012) - Etat de l'art de la prise en compte des « modes d'action » dans l'évaluation des dangers liés aux substances chimiques. Rapport d'étude DRC-12-124809-12016A.

INERIS (2012) - Note de synthèse sur la prise en compte des modes d'action dans l'évaluation des dangers. Note DRC-12-124809-12151A.

INERIS (2014) - Approches intégrées en matière d'essai et d'évaluation pour la sensibilisation cutanée. Note DRC-14-142172-03185A.

OCDE (2012) - The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins - Part 1: Scientific Evidence.

OCDE (2013) - Guidance document on the evaluation and application of integrated approaches to testing and assessment (IATA) for skin sensitisation.

OCDE (2014) - New guidance document on an integrated approach on testing and assessment (IATA) for skin corrosion and irritation, ENV/JM/MONO(2014)19.

Sonich-Mullin C., Fielder R., Wiltse J., Baetcke K., Dempsey J., Fenner-Crisp P., Grant D., Hartley M., Knaap A., Kroese D., Mangelsdorf I., Meek E., Rice J., Younes M. IPCS Conceptual framework for evaluating a mode of action for chemical carcinogenesis. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 2001; 34: 146-152.

6. ANNEXES

6.1 AOP POUR LA SENSIBILISATION CUTANEE (OCDE, 2012)

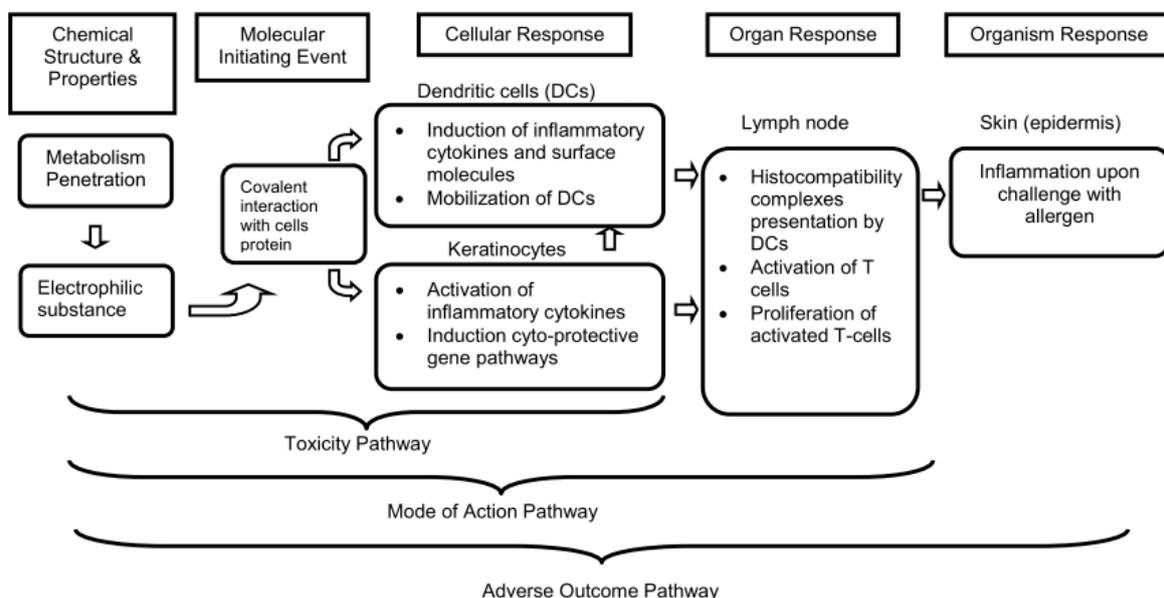


Figure 5 : AOP pour les substances sensibilisantes par voie cutanée (INERIS, 2012 ; OCDE, 2012)

6.2 IATA POUR LA CORROSION/IRRITATION OCULAIRE

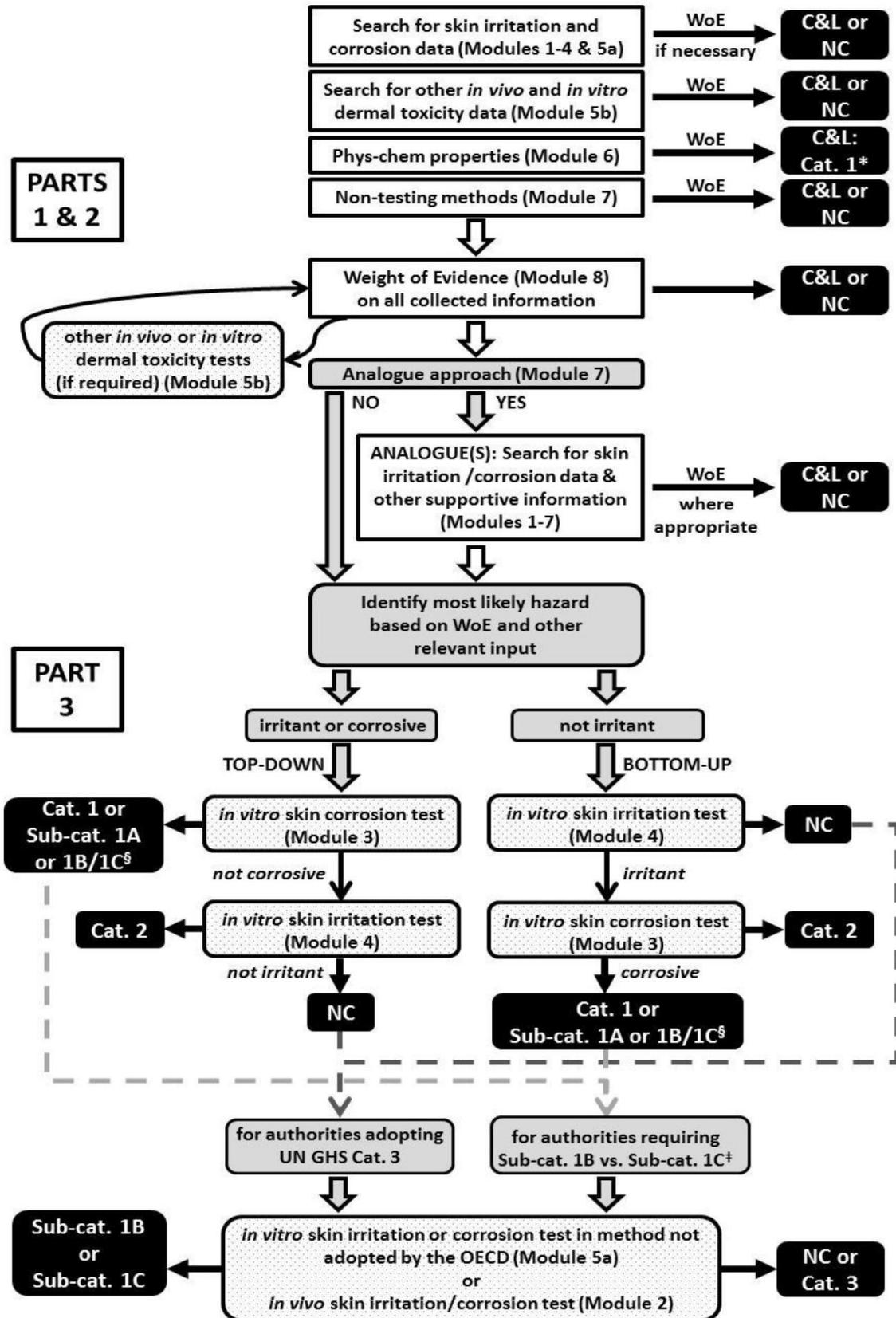


Figure 6 : IATA pour la corrosion/irritation oculaire (OCDE, 2014)