

## NOTE DE SYNTHÈSE

# L'utilisation des chemins de l'effet néfaste (AOP) dans le cadre de l'évaluation de la toxicité des substances chimiques

Août 2021

Lors de la dernière décennie, le concept des chemins de l'effet néfaste (« Adverse Outcome Pathway » en anglais, AOP) s'est imposé comme une idée unificatrice permettant une rationalisation mécanistique de l'information (éco)toxicologique. D'un point de vue conceptuel, les AOP relient des événements moléculaires initiateurs (EMI) avec un effet néfaste (EN) au niveau de l'individu ou d'une population, par l'intermédiaire d'événements-clés (EC) qui rassemblent les connaissances toxicologiques à chaque niveau d'organisation du vivant : interactions biomoléculaires, réponses cellulaires et effets au niveau des organes.

Le concept d'AOP a suscité beaucoup d'enthousiasme car il permet de rassembler toutes les parties prenantes concernées par une caractérisation du danger chimique autour de deux tendances (éco)toxicologiques actuelles : un remplacement de l'expérimentation *in vivo* par des méthodes *in vitro* et *in silico* et la possibilité de pouvoir baser des décisions sur des données reflétant les mécanismes par lesquels les substances chimiques induisent un EN. En parallèle, les AOPs commencent à se positionner à l'intersection entre épidémiologie et toxicologie pour la mise en relation des expositions aux substances chimiques, seules ou en mélanges, avec les effets sur la santé humaine.

Dans ce contexte marqué par un dialogue scientifique interdisciplinaire, cette note se propose de faire le point sur les travaux en cours sur les AOPs et leur encadrement réglementaire. Une liste des abréviations utilisées dans le cadre de cette note est reportée en note de bas de page<sup>1</sup>.

## Définition des AOPs

Le concept d'AOP a été décrit dans sa forme actuelle par Ankley en 2010 (Ankley et al., 2010) afin de proposer une approche pratique pour l'utilisation d'explications mécanistes de phénomènes biologiques lors de l'évaluation du risque écotoxicologique lié à la présence de substances chimiques dans l'environnement. Un AOP schématise l'enchaînement des relations de cause à effet qui, à partir d'un EMI, conduisent jusqu'à un EN chez un individu ou une population (Fig. 1). Il est composé d'une série d'ECs, essentiels à la survenue de l'EN, qui décrivent un effet expérimentalement mesurable à un niveau donné d'organisation biologique (au niveau des cellules, au niveau d'un organe ou d'un individu). Les relations de cause à effet qui relient entre eux les EC (Relations entre Evénements-Clés, REC) s'appuient à la fois sur des arguments scientifiques et sur des données empiriques qui permettent de déduire un changement d'état d'un EC en fonction de l'état d'un ou plusieurs ECs situés « en amont ».

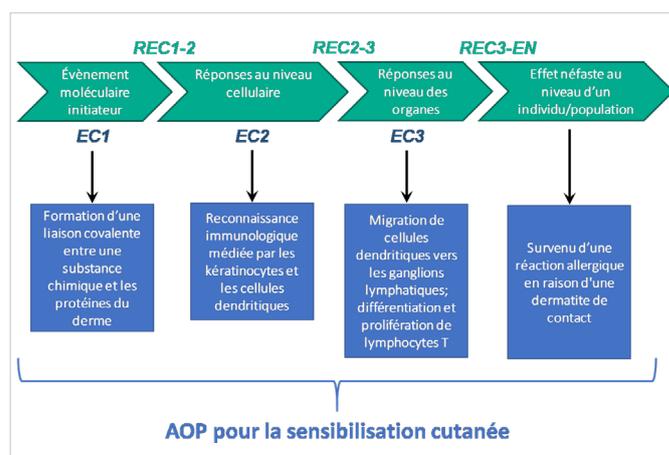


Figure 1 / Schématisation d'un chemin de l'effet néfaste (AOP) pour la sensibilisation cutanée (EC = événement-clé ; REC = Relation entre événements-clés ; EN = effet néfaste). Les AOPs rassemblent des événements-clés essentiels dont l'activation séquentielle conduit à la manifestation d'un EN au niveau d'un individu ou une population. Les encarts bleus donnent des exemples concrets d'EC de l'AOP pour la sensibilisation cutanée.

Compte tenu de la complexité des phénomènes biologiques sous-jacents, la formalisation d'un AOP nécessite une expertise scientifique multidisciplinaire allant de l'étude des phénomènes intracellulaires, à la caractérisation de l'EN d'intérêt au niveau d'un organisme ou d'une population. Cet aspect multidisciplinaire rend la validation d'un AOP complexe car elle repose sur l'analyse de données dont il faut établir la pertinence pour caractériser plusieurs phénomènes biologiques tout en assurant la cohérence entre les arguments proposés et les connaissances scientifiques existantes.

Les AOPs ne sont pas censés détailler de façon exhaustive les réactions moléculaires, les phénomènes cellulaires et tissulaires au sein d'un être vivant (Leist *et al.*, 2017). Ainsi, les AOPs décrivent une série d'états expérimentalement mesurables d'un système (les ECs) avec des renseignements sur la transition entre ces états (les REC). Pour des raisons d'ordre pratique, les ECs devraient être mesurables grâce à des méthodes relativement simples et accessibles (notamment les méthodes *in vitro* mais aussi *in silico* pour la prédiction d'EC), qui devraient pouvoir être facilement utilisées dans le cadre d'une démarche de toxicologie prédictive (Leist *et al.*, 2017).

D'un point de vue chronologique, il faut signaler que, depuis la publication d'Ankley *et al.* (2010), le concept d'AOP est de plus en plus évoqué et appliqué en (éco) toxicologie réglementaire grâce au rôle fédérateur et incitatif de l'OCDE. En effet, afin de promouvoir les AOPs, cette organisation a mis à disposition des guides techniques permettant leur développement harmonisé et un ensemble de bases de données répertoriant les informations mécanistiques utilisées lors de la définition des ECs (OECD, 2021).

## Les AOPs en toxicologie réglementaire

Les AOPs permettent de répondre de façon pragmatique au contexte opérationnel qui caractérise le travail des évaluateurs de risque toxicologique tout en permettant une discussion éclairée et factuelle des parties prenantes concernées par l'évaluation des risques chimiques. La littérature scientifique en matière de mécanismes toxicologiques a fortement augmenté ces dernières années (Fig. 2). Vis-à-vis de cette abondance d'informations, les AOPs permettent de rassembler et qualifier les faisceaux de preuves convergentes caractérisant des ECs impliqués dans la survenue d'un EN. Pour cette raison, les AOPs sont un outil particulièrement efficace pour le transfert de connaissances entre recherche fondamentale et besoins réglementaires.

Aujourd'hui la toxicologie se base de plus en plus sur l'utilisation de méthodes expérimentales et computationnelles alternatives à l'expérimentation animale. Les évaluateurs du risque chimique sont donc régulièrement confrontés à des informations issues de méthodes alternatives (ex. un résultat *in vitro* positif) dont ils doivent

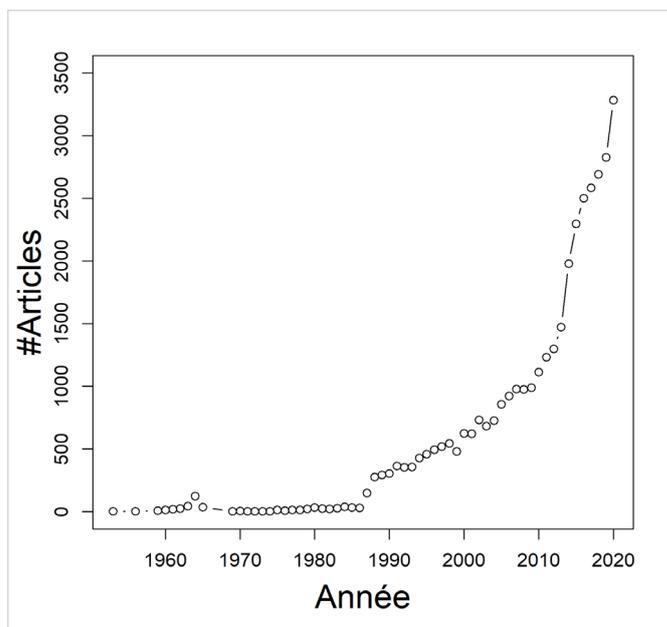


Figure 2 / Évolution chronologique du nombre d'articles identifiables par le moteur de recherche de données bibliographiques PubMed en fonction d'une requête comportant les mots-clés « Toxicology » et « Mechanisms ».

évaluer la pertinence. Dans ce contexte, la structuration des AOPs en ECs permet une analyse critique et ciblée de résultats issus de méthodes alternatives. En parallèle, un AOP approuvé par l'OCDE permet la mise en place et le déploiement opérationnel d'approches définies (AD) pour l'évaluation du danger, qui visent à interpréter univoquement et mutuellement recevable des résultats issus de méthodes alternatives prédéfinies et formalisées au sein d'un AOP (Casati *et al.*, 2018).

La qualification et l'approbation réglementaire des AOPs sont aujourd'hui formalisées par la procédure mise en place par l'OCDE avant leur publication :

- / un pays membre de l'OCDE ou un comité consultatif de cette organisation (ex. BIAC<sup>2</sup> et ICAPO<sup>3</sup>) peut présenter un projet de développement d'un AOP lors de la réunion annuelle du groupe consultatif élargi sur le screening moléculaire et la toxicogénomique (EAGMST) ;
- / si l'avis de l'EAGMST est positif, le projet d'AOP est formellement inclus dans le plan de travail<sup>4</sup> ;
- / une fois la formalisation de l'AOP terminée, les coordinateurs nationaux du programme des lignes directrices pour les essais sur les produits chimiques (WNT) nomment des experts qui vérifient les documents élaborés lors du développement de l'AOP ;
- / le point précédent donne lieu à un processus itératif de révisions pour aboutir au document final qui sera soumis au WNT et au groupe d'étude pour l'évaluation des dangers (TFHA) pour approbation ;

/ le document approuvé est rendu public avec, à la demande du WNT, la clause de non-responsabilité suivante qui doit être associée avec chaque AOP approuvé : « [...] en approuvant cet AOP, le WNT exprime sa confiance dans le processus d'examen scientifique auquel l'AOP a été soumis et accepte la recommandation de l'EAGMST de diffuser publiquement l'AOP. L'approbation ne signifie pas nécessairement que l'AOP doit être considéré comme un outil dont l'application réglementaire serait directe ».

La procédure mise en place par l'OCDE n'est pas encore complètement consolidée et elle nécessiterait une optimisation pour améliorer la priorisation des AOPs par rapport aux besoins réglementaires et un soutien renforcé des Etats Membres lors du processus de revue. Plus généralement, le lien entre les développeurs et les instances réglementaires et la communication parmi toutes les parties prenantes de l'OCDE (WNT, WPHA, EAGMST) devraient être rendus plus efficaces afin d'accélérer la mise en œuvre des AOPs développés.

Actuellement, sur 72 projets en cours<sup>5</sup>, l'OCDE a publié<sup>6</sup> 15 AOP formellement approuvés par le TFHA et le WNT (à la date de juin 2021). Ces AOPs doivent être considérés comme des « documents vivants » devant être revus dès que l'acquisition de nouvelles connaissances le nécessite.

Afin de centraliser, faciliter et harmoniser les échanges d'information sur les AOPs, l'OCDE a mis en place un portail web nommé « Adverse Outcome Pathway Knowledge Base<sup>7</sup> (AOP-KB) ». Ce portail web est constitué par les éléments suivants :

- / un moteur de recherche sur les AOPs répertoriés (381 AOP et 4918 EC en juin 2021) en fonction de mots-clés choisis par l'utilisateur ;
- / un AOP-Wiki (<https://aopwiki.org/>) permettant d'inspecter toutes les informations sur les travaux en cours (ou déjà approuvés) à l'OCDE. Ce wiki répertoriait 340 AOPs en juin 2021 et est l'outil de référence lors de la revue des AOPs encadrée par l'OCDE ;
- / le site Effectopedia (<https://effectopedia.org/>) qui répertorie des informations permettant le développement d'AOP quantitatifs<sup>8</sup> et des modèles pour ces derniers. Ce site est inactif depuis octobre 2020 ;
- / l'outil AOPXplorer (<http://apps.cytoscape.org/apps/aopxplorer>) permettant la visualisation de réseaux d'AOPs ;
- / la base de données AOP-DB (<https://aopdb.epa.gov/>) de l'EPA sur les AOPs. Le site web hébergeant cette base de données était inactif en juin 2021.

## AOPs et IATA<sup>9</sup>

Les approches intégrées en matière d'essai et d'évaluation (« Integrated Approaches to Testing and Assessment », IATA) sont des approches flexibles basées sur l'intégration et la traduction des données dérivées de plusieurs méthodes (notamment des méthodes alternatives à l'expérimentation animale) pour évaluer le danger et/ou risque chimique (OECD, 2020).

Les IATA s'appuient de plus en plus sur le concept d'AOP car elles se proposent de faciliter une intégration des informations générées par des tests *in silico*, *in chemico*<sup>10</sup> et *in vitro* ciblant les EC d'un AOP. En effet, les AOP offrent un référentiel pour caractériser la pertinence biologique des méthodes alternatives à l'expérimentation animale et tout en permettant de comprendre les relations de cause à effet qui existent entre ce qui est expérimentalement testé et l'EN d'intérêt.

Sur la base de la démarche préconisée par l'OCDE, un AOP permet de guider la génération de nouvelles données si le poids de la preuve associé avec l'information existante n'est pas suffisant pour permettre une décision éclairée (OECD, 2016). En effet, lors de l'application d'une IATA, toute information doit être évaluée par rapport à la plausibilité biologique et aux preuves empiriques qui sous-tendent les EC considérés (OECD, 2016).

Dans ce contexte, il est évident que le niveau de certitude associé avec l'utilisation d'un AOP sera aussi lié au niveau de validation ou de standardisation des essais expérimentaux caractérisant ses EC et les données générées par des essais faisant l'objet d'une ligne directrice auront un poids majeur lors d'une prise de décision (OECD, 2016).

Il est aussi important de remarquer que, a priori, les recommandations pour le développement d'une IATA n'excluent pas l'utilisation de plusieurs AOPs lorsque cela est jugé nécessaire pour pouvoir mieux prendre en compte la complexité biologique d'un EN donné.

Le programme de l'OCDE sur des études de cas pour les IATA lancé en 2015, a généré 22 études de cas recevables d'un point de vue réglementaire qui ont été publiées sur le site web de l'OCDE<sup>11</sup>.

## Les AOPs et l'évaluation de la toxicité des mélanges chimiques

Les substances chimiques composant un mélange peuvent exercer leurs effets selon des modes d'action semblables et/ou dissemblables. En présence de substances agissant selon le même mode d'action, la notion d'addition des concentrations (AC) s'impose pour évaluer les risques du mélange. En présence de substances agissant selon un mode d'action dissemblable, la notion d'action indépendante (AI) est, en revanche appliquée. Cette

notion suppose que l'effet toxique d'un mélange est le résultat d'événements aléatoires indépendants (Kienzler *et al.*, 2017).

Dans la plupart des cas, les différences entre la toxicité du mélange selon que l'on considère l'AC ou l'AI, excèdent rarement un facteur cinq (Kienzler *et al.*, 2016). Cependant, une évaluation précise de la toxicité d'un mélange chimique ne peut être conduite que dans le cas où il est possible d'identifier les modalités d'interaction des substances chimiques. Les AOPs peuvent renseigner sur cet aspect car, par définition, ils informent sur les EC conduisant à un EN. Notamment, ils peuvent permettre de caractériser d'un point de vue mécanistique des mélanges avec différents types d'interactions comme montré sur le panneau D de la figure 3.

La figure 3 illustre comment la connaissance des AOPs et de l'activation des ECs par les substances constituant un mélange peut orienter le modèle d'estimation des effets toxicologiques du mélange (Nelms *et al.*, 2018) :

- / Si les substances chimiques du mélange partagent le même EMI ou convergent en correspondance d'un même EC, il sera approprié d'appliquer une AC (Fig. 3A et 3B)
- / S'il y a une simple convergence de deux ou plusieurs AOP vers le même EN, la superposition de modes d'actions différents sera à privilégier (Fig. 3C)
- / Enfin, il sera nécessaire d'intégrer l'AC avec un mode d'action indépendante si les cas de figure illustrés par les exemples B (ou A) et C de la figure 3 se superposent.

## Les AOPs et l'épidémiologie

Les études épidémiologiques permettent de démontrer une association entre une exposition aux substances chimiques et la survenue d'une pathologie au sein d'une population (Parascandola and Weed, 2001). Un des défis de ce type d'études est de pouvoir distinguer entre une corrélation fallacieuse et une véritable relation de cause à effet. Les AOPs peuvent contribuer à identifier une causa-

lité en apportant des éléments mécanistiques sur l'action des substances (Leist *et al.*, 2017).

L'utilisation d'un AOP pour la maladie de Parkinson<sup>12</sup> par l'autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) est un exemple pratique d'utilisation d'un AOP afin de statuer sur la plausibilité d'une causalité (Ockleford *et al.*, 2017). Dans cette étude, la qualification de la plausibilité biologique des études épidémiologiques a été réalisée en organisant et en analysant la littérature scientifique et les données expérimentales grâce au cadre conceptuel des AOPs. Le point le plus important de l'étude a été d'identifier un symptôme bien défini pour la maladie de Parkinson, équivalent à un EN reproductible dans les modèles animaux. Cette approche a conduit à la définition d'un EN assimilable aux troubles de la motricité observées chez l'homme et reproductible chez l'animal. En effet, les données expérimentales associées avec trois substances chimiques (la neurotoxine MPTP, l'insecticide roténone et l'herbicide paraquat) ont permis d'établir que cet EN serait provoqué par une diminution du nombre de neurones dopaminergiques. Sur la base de cette information, deux AOPs initiés par deux MIE distincts (liaison au complexe I des mitochondries et une perturbation de l'équilibre de l'état d'oxydo-réduction des neurones dopaminergiques) ont été formalisés. La qualification de ces deux AOPs selon les critères de Bradford-Hill<sup>13</sup> a mis en évidence un lien robuste entre les MIE identifiés et l'apparition de la maladie de Parkinson. La robustesse de cette étude a conduit les experts à informer l'EFSA sur la pertinence de l'hypothèse qui assimilerait les pesticides affectant les MIE proposés à des facteurs de risque pour le développement de la maladie de Parkinson.

Toujours dans un contexte d'études épidémiologiques, les AOPs peuvent se révéler des outils particulièrement efficaces pour guider le choix de biomarqueurs dans le domaine de l'épidémiologie moléculaire. Lors d'études de biosurveillance, les biomarqueurs d'effet ont le potentiel d'expliquer les relations entre l'exposition aux substances chimiques et leurs effets sur la santé humaine (Gil and Pla, 2001). Ils sont souvent sous-utilisés car il est difficile d'élucider les mécanismes biologiques sous-jacents (Zare Jeedi *et al.*, 2021). Dans ce contexte de manque d'information, les EMI, les ECs et, plus spécifiquement les « EC communs » (ECCs) contenus dans les AOPs peuvent constituer un

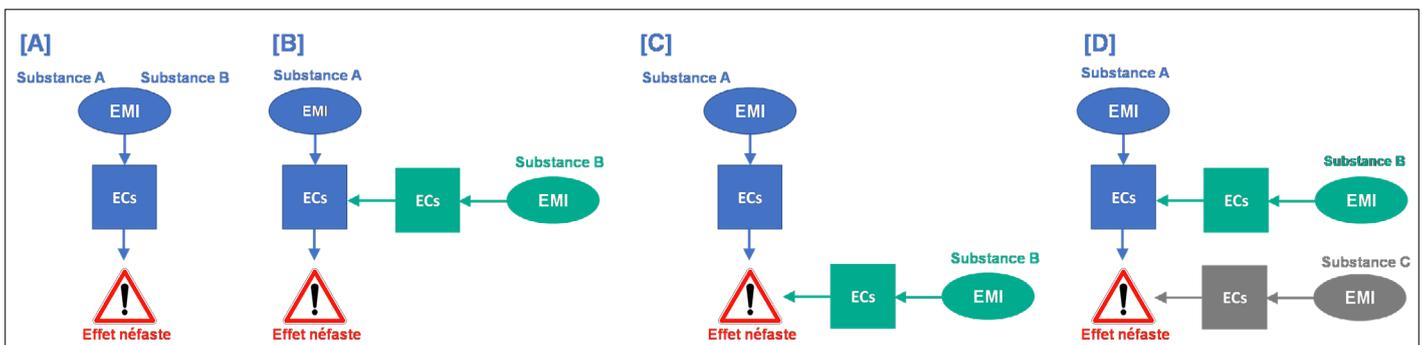


Figure 3 / Schématisation de l'identification du modèle d'estimation des effets toxicologiques d'un mélange de substances chimiques à l'aide des AOPs. A) Addition des concentrations (mode d'action identique) ; B) Addition des concentrations à la suite d'une convergence de l'action toxicologique au sein du même AOP ; C) Modes d'action indépendants ; D) Modèle basé sur une intégration entre l'addition des concentrations et un mode d'action indépendant.

excellent point de départ pour l'identification de potentiels biomarqueurs d'effet. Les ECCs correspondent aux intersections entre plusieurs AOP et permettent d'établir des réseaux d'AOP qui décrivent de façon plus proche de la réalité la complexité des phénomènes toxicologiques (OECD, 2018). Compte tenu de leur positionnement stratégique au carrefour de plusieurs chemins, les ECCs sont des candidats idéaux pour devenir des biomarqueurs.

L'étude conduite par l'initiative européenne de biosurveillance HBM4EU (Apel *et al.*, 2020) pour le Bisphénol A (Mustieles *et al.*, 2020) est un exemple concret d'application d'un ECC. L'objectif de cette étude était d'identifier des biomarqueurs d'effet pour les fonctions cérébrales car ces fonctions constituaient le manque informationnel le plus important à combler. Mustieles *et al.* (2020) ont analysé 119 articles guidés par le concept d'AOP ce qui a permis de proposer le facteur neurotrophique issu du cerveau (« Brain-derived neurotrophic factor », BDNF) comme biomarqueur d'effet pour le bisphénol A.

Le BDNF joue un rôle important dans la survie et la croissance des neurones et participe à la plasticité neuronale, essentielle à l'apprentissage et à la mémoire (Bathina and Das, 2015). La réduction du niveau de BDNF représente un ECC au carrefour de trois AOPs conduisant au même EN (Fig. 4) : des troubles de la mémoire et de l'apprentissage. Ces AOPs sont nommés AOP 12, 13 et 54 selon la nomenclature AOP-wiki (OECD, 2021):

/ AOP 12 : Troubles cognitifs dus à une neurodégénérescence post-natale au niveau de l'hippocampe et du cortex cérébral. Cet AOP est initié par une inhibition chronique des récepteurs ionotropes NMDA conduisant à une réduction du niveau de BDNF à la suite d'une diminution du flux de calcium dans les cellules.

/ AOP 13 : Troubles cognitifs dus à une réduction de la synaptogénèse lors du développement intra-utérin du cerveau. Cet AOP partage le même EMI que l'AOP 12.

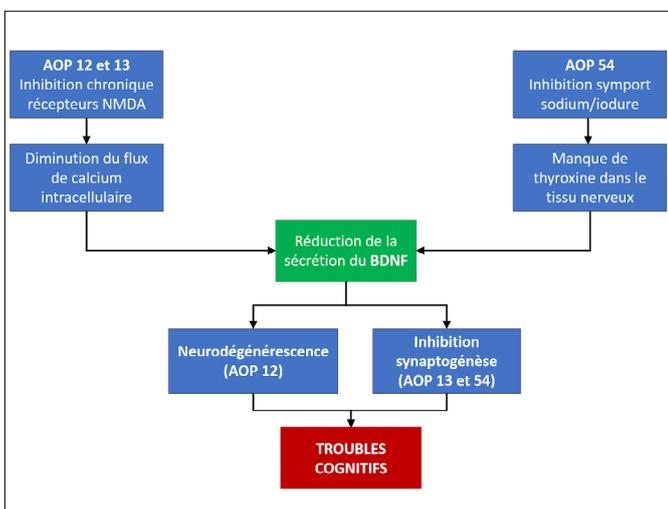


Figure 4 / Rôle du BDNF lors de l'enchaînement d'ECs conduisant à l'apparition de troubles cognitifs.

/ AOP 54 : Troubles cognitifs dus à une réduction de la synaptogénèse lors du développement intra-utérin du cerveau. Cet AOP est initié par l'inhibition du symport sodium/iodure conduisant à une réduction du niveau de BDNF à la suite d'une réduction de la concentration de thyroxine dans le tissu nerveux.

## Les AOPs couplés à l'expologie

Le concept des chemins de l'exposition agrégée (« Aggregate Exposure Pathways », AEP) a été récemment proposé afin de créer un trait d'union entre l'expologie et la toxicologie (Teeguarden *et al.*, 2016). Ce concept adopte le formalisme et la terminologie des AOPs (séquence d'EC). Dans un AEP, l'exposition est définie comme la quantité d'une substance chimique qui atteint un « récepteur » biotique (ex. concentration cellulaire) ou abiotique (ex. concentration dans l'air). Selon Teeguarden *et al.* (2016), les AEPs sont composés par une séquence d'ECs décrivant l'introduction d'une substance chimique dans l'environnement suivi par son transport à travers un ou plusieurs milieux environnementaux jusqu'à l'atteinte de son site d'action (ex. tissu hépatique) à l'intérieur d'un organisme vivant (Fig. 5). Le trait d'union entre expologie et toxicologie est assuré par le fait que ce site d'action n'est rien d'autre que l'endroit où l'EMI d'un AOP a lieu. Il apparaît donc qu'une comparaison entre la concentration au niveau du site d'action et la concentration déclenchant l'EMI permettrait l'estimation d'une marge de sécurité pour les expositions (Teeguarden *et al.*, 2016).

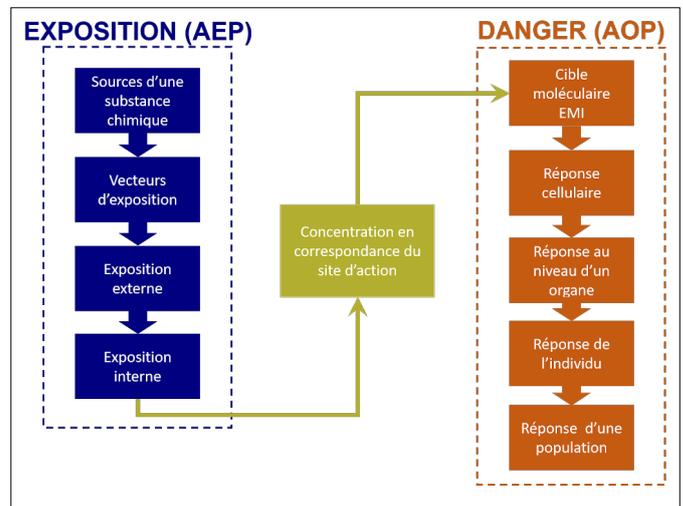


Figure 5 / Couplage entre un chemin de l'exposition agrégée (AEP) et un chemin de l'effet néfaste (AOP).

De façon similaire aux AOP, les AEP n'ont nécessairement pas vocation à décrire toutes les étapes du transport d'une substance à travers l'environnement mais ils doivent s'arrêter au niveau de détail suffisant et nécessaire pour les objectifs de l'évaluation d'intérêt (Teeguarden *et al.*, 2016).

Alors que les AOPs ont un objectif bien spécifique (à savoir comprendre l'enchaînement d'ECs conduisant à un EN), les AEP peuvent répondre à plusieurs objectifs : une meilleure

leure compréhension des contributions des différents sources d'exposition (ex. incinération des déchets, traitement des eaux usées), le rôle des voies environnementales d'exposition (ex. contamination d'une nappe phréatique et passage dans l'eau potable), la connaissance de la concentration d'une substance chimique dans son site d'action biologique au sein d'un organisme.

Le concept d'un couplage entre AEPs et AOPs en est encore à ses débuts et il existe peu d'exemples d'application. Dans ce contexte, la notion d'estrome évoquée par Teeguarden (2016), les travaux sur le perchlorate (Hines *et al.*, 2018) et sur les phtalates (Clewell *et al.*, 2020) sont pionniers en la matière.

L'exemple d'un couplage entre l'« estrome » (ensemble des AEPs pour les estrogènes naturels et de synthèse) et les AOPs conduisant à des effets néfastes initiés par une perturbation des récepteurs pour les estrogènes, représente un des premiers exemples évoqués d'application potentielle des AEP (Teeguarden *et al.*, 2016). Ce couplage serait rendu possible par les nombreuses informations existantes sur les concentrations d'estrogènes synthétiques et d'origine végétale présentes dans les aliments, les produits de consommation quotidienne et les tickets de caisse qui pourraient être utilisées pour assembler des réseaux d'AEP pour tous les composés œstrogéniques. Une fois mis en place, ces réseaux pourraient être utilisés pour pondérer les sources d'exposition et permettre ainsi le déploiement de stratégies d'atténuation ou pour calculer la probabilité des ENs associés avec un ou de plusieurs AOPs initiés par une perturbation œstrogénique.

En ce qui concerne le deuxième exemple, Hines et coauteurs (2018) ont modélisé l'impact du perchlorate (un perturbateur de l'homéostasie thyroïdienne) à partir d'un couplage AEP-AOP sur douze espèces (vertébrées et non vertébrées) et de la prise en compte de sources multiples d'exposition (dépôt atmosphérique, rejet dans l'eau et les sols de sels de perchlorate). Les voies d'exposition qui en résultent comprennent à la fois l'exposition directe des organismes et l'exposition par le biais d'interactions trophiques. Leurs résultats indiquent qu'une exposition de ces espèces à la dose de référence<sup>14</sup> pour le perchlorate ne devrait pas induire d'effets néfastes toxicologiques et écotoxicologiques. Cette approche intégrant plusieurs espèces a aussi la capacité de prédire un risque en fonction des conditions d'exposition spécifiques à chaque espèce animale et donc de pouvoir identifier les espèces les plus impactées. Hines et coauteurs (2018) ont illustré comment cette intégration pourrait être utilisée comme outil d'aide à la décision car capable de modéliser l'impact d'hypothèses formulées en présence d'informations manquantes en termes d'AOP et/ou AEP et donc d'aider à définir les priorités en termes d'acquisition de données manquantes.

Dans le troisième exemple, Clewell et coauteurs (2020) ont couplé AEP et AOP pour évaluer les effets reprotoxiques induits par les métabolites de deux phtalates (DEHP et DnBP) sur la synthèse de testostérone chez des rats mâles. Cette approche a permis aux auteurs de l'étude d'estimer

une marge de sécurité<sup>15</sup> pour une coexposition aux deux phtalates égale à 13 000. Cette marge de sécurité a été considérée comme étant suffisamment importante en termes de protection de la santé humaine même après prise en compte des facteurs d'incertitudes communément adoptés lors d'une analyse du risque chimique (Clewell *et al.*, 2020).

## Conclusions

Les AOPs se sont imposés comme des outils qui occupent de plus en plus de place en toxicologie réglementaire (Coady *et al.*, 2019; Kleinstreuer *et al.*, 2016; Wittwehr *et al.*, 2017). Cependant, il est nécessaire de souligner que les AOPs représentent un sujet dont une compréhension approfondie des hypothèses et des limitations qui les sous-tendent sont des questions de spécialistes. Le fait de juger de la pertinence d'un AOP représente un exercice particulièrement ardu car il nécessite la contribution d'experts dans de nombreuses disciplines telles que la biologie cellulaire et la toxicologie *in vitro*. Si toutes les limitations associées aux éléments constituant un AOP ne sont pas clairement mises en évidence, son utilisation par des non-spécialistes pourrait se révéler peu pertinente.

Certains axes de progrès ont pu être identifiés. Par exemple, certains AOP ont été critiqués comme étant une approximation trop éloignée de la réalité biologique (Leist *et al.*, 2017) entraînant une prise de conscience de la nécessité de représenter la complexité du vivant grâce à des réseaux d'AOPs (Knapen *et al.*, 2018; Villeneuve *et al.*, 2018). Toujours par rapport à leur pertinence biologique, un sujet qui donne lieu à des débats sur les AOPs concerne la plasticité des voies métaboliques et de signalisation cellulaire qui peuvent changer lors de conditions pathologiques. Cette plasticité imposerait la nécessité de pouvoir disposer d'AOPs capables de prendre en compte ces changements physiologiques liés aux pathologies (Leist *et al.*, 2017).

Les ECs composant les AOPs ont une certaine tendance à être trop généraux (ex. « disfonctionnement synaptique »). Ce regroupement de plusieurs phénomènes biochimiques au sein d'un même EC complique la définition des relations qui connectent les ECs entre eux (REC). Ce manque de précision peut aussi donner lieu à des fausses identifications d'EC communs qui partageraient le même nom mais qui reposeraient sur des phénomènes biochimiques différents (Leist *et al.*, 2017).

La question du « manque de toxicité » reste toujours ouverte. Il est communément admis qu'un AOP ne peut pas renseigner sur cet aspect (Leist *et al.*, 2017). Pour pouvoir conclure sur l'innocuité d'une substance chimique, il faudrait avoir la certitude de connaître tout l'ensemble des AOPs possiblement impactés par cette substance et de prendre aussi en compte les aspects toxicocinétiques<sup>16</sup> qui sont aujourd'hui exclus de la définition d'un AOP (Leist *et al.*, 2017). Il est donc évident que pour une évaluation du risque sanitaire évoluée, un couplage toxicociné-

tique-AOP (en relation avec le concept d'AEP) et la définition d'ECs communs demeurent deux axes de progrès. Dans ce contexte, il faut souligner le grand potentiel du couplage AEP et AOP pour une vision holistique de l'évaluation du risque chimique. Cette évaluation globale prendrait en compte l'enchaînement d'étapes-clés qu'à partir de l'introduction d'un polluant dans l'environnement arriverait jusqu'à l'apparition d'un EN au niveau de plusieurs espèces animales (Hines *et al.*, 2018).

Un autre challenge est le passage d'une description qualitative à une description quantitative pouvant prendre en compte une modélisation des relations doses-réponses et la dimension temporelle de ces dernières. Ce passage se heurte à des difficultés d'ordre méthodologique pour la modélisation des REC dont la calibration nécessite de jeux de données particulièrement adaptés à la prise en compte de leur dimension temporelle (Zgheib *et al.*, 2019). Malgré ces difficultés méthodologiques importantes, le développement d'AOP quantitatifs représente un enjeu de recherche majeur car il permettrait la prise en compte des relations dose-réponse pour les EMI et des relations « réponse-réponse » entre des ECs adjacents. La caractérisation complète de cet enchaînement de cause à effet permettrait de définir un point de départ pour le calcul des doses externes nécessaires pour induire un EN.

L'assurance qualité des AOPs est une autre question ouverte car leur formalisation se base sur une analyse de publications scientifiques qui peuvent être impactées par la « crise de la reproductibilité » due au fait que les résultats publiés peuvent être impossibles à reproduire (Leist *et al.*, 2017). De plus, ces publications décrivent aussi des données obtenues chez les animaux de laboratoire et la question de leur pertinence pour la toxicologie humaine demeure ouverte. Ces aspects liés à la qualité et pertinence des données disponibles ne concernent pas que les AOPs mais ils sont transversaux à toute la toxicologie. Cependant, ils représentent un écueil particulièrement dangereux lors d'une transposition réglementaire d'un AOP parce qu'ils pourraient conduire à des prises de décisions reposant sur des bases peu robustes ou clairement fausses.

Au niveau de l'acceptabilité réglementaire des AOP, le fait d'avoir des ECs dont la caractérisation expérimentale n'est pas couverte par des lignes directrices de l'OCDE pourrait représenter un obstacle pour leur application. En parallèle, il faut aussi remarquer que le temps nécessaire à une appropriation réglementaire peut s'étendre sur plusieurs années car il faut attendre que les méthodes de caractérisation toxicologique soient disponibles et leur combinaison validée.

En raison de leur structuration des mécanismes biologiques, les AOPs sont en cours d'assimilation par des disciplines annexes (expologie, épidémiologie, recherche fondamentale, design de nouveaux tests toxicologiques). En effet, les AOPs permettent des discussions et prises de décisions éclairées en toxicologie réglementaire et sont un excellent moyen pour le transfert de connaissances vers toute discipline qui fait usage d'informations mécanistiques en toxicologie.

Le rôle de plus en plus important des AOPs dans le développement actuel de la toxicologie motive aussi plusieurs activités de recherche et expertise au sein de la direction milieux et impacts sur le vivant (MIV) de l'Ineris. Ces activités de recherche ont abouti à des publications dans le domaine de la modélisation QSAR d'EMI (Gadaleta *et al.*, 2018) et dans le domaine de la modélisation d'AOP quantitatifs (Battistoni *et al.*, 2019; Zgheib *et al.*, 2019). En parallèle, une thèse de doctorat sur le couplage entre modèles PBPK<sup>17</sup> et AOP pour les effets neurodéveloppementaux du plomb est en train d'être rédigée et plusieurs projets (coordonnés par du personnel de la direction MIV ou au sein desquels son personnel est impliqué) faisant appel au concept d'AOP sont en cours :

- / le projet NEUROPHYTO<sup>18</sup> dédié à l'étude, via des AOPs, des mécanismes pouvant expliquer l'apparition de troubles neurodéveloppementaux associées à une exposition aux produits phytosanitaires ;
- / le projet FEATS<sup>19</sup> qui vise à conduire des expérimentations sur des modèles de poissons zèbres et à appliquer des modèles mathématiques (PBPK, AOP) pour caractériser les effets sur le développement du cerveau et du comportement ;
- / le projet GinFiz<sup>20</sup> visant à développer un AOP quantitatif pour la caractérisation de la baisse de la fécondité chez les poissons après une exposition aux produits phytopharmaceutiques ;
- / le projet BRAINSOL<sup>21</sup> qui, parmi ses activités, vise aussi à construire des AOPs dans le cadre d'une évaluation des effets neurotoxiques qui peuvent être provoqués par des mélanges de substances représentatifs des sites pollués ;
- / le projet OBERON<sup>22</sup> qui vise à établir une IATA et des nouveaux AOPs pour détecter et caractériser les pathologies métaboliques liés aux perturbateurs endocriniens ;
- / le projet EU-ToxRisk<sup>23</sup> qui promeut un changement de paradigme en toxicologie grâce à une application systématique du concept d'AOP ;
- / l'action 24 du SNPE2 qui utilise des AOP en lien avec la perturbation endocrinienne pour confirmer ce mode d'action et permettre la prise en compte de ces effets dans l'établissement des Normes de Qualité Environnementale (NQE).

En conclusion, il est remarquable de constater l'impulsion que les AOPs ont donné à la toxicologie pour la propulser dans le 21ème siècle. Cependant, il faut souligner que plusieurs applications des AOPs restent encore à un niveau de preuve de concept. Pour une utilisation réglementaire, il sera nécessaire de finaliser plusieurs initiatives de recherche interdisciplinaires comme, par exemple, celles évoquées dans les paragraphes précédents afin de pouvoir augmenter le nombre d'AOPs disponibles et à les accompagner par une mise à disposition d'outils *in vitro* et *in silico* compatibles avec une utilisation réglementaire.

## Références

- / Ankley, G. T., et al., 2010. Adverse Outcome Pathways: a Conceptual Framework to Support Ecotoxicology Research and Risk Assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 29, 730-741.
- / Apel, P., et al., 2020. Human biomonitoring initiative (HBM4EU) - Strategy to derive human biomonitoring guidance values (HBM-GVs) for health risk assessment. *Int J Hyg Environ Health*. 230, 113622.
- / Bathina, S., Das, U. N., 2015. Brain-derived neurotrophic factor and its clinical implications. *Arch Med Sci*. 11, 1164-78.
- / Battistoni, M., et al., 2019. Quantitative AOP based teratogenicity prediction for mixtures of azole fungicides. *Computational Toxicology*. 11, 72-81.
- / Casati, S., et al., 2018. Standardisation of defined approaches for skin sensitisation testing to support regulatory use and international adoption: position of the International Cooperation on Alternative Test Methods. *Archives of toxicology*. 92, 611-617.
- / Clewell, R. A., et al., 2020. Application of a combined aggregate exposure pathway and adverse outcome pathway (AEP-AOP) approach to inform a cumulative risk assessment: A case study with phthalates. *Toxicology in Vitro*. 66, 104855.
- / Coady, K., et al., 2019. When Are Adverse Outcome Pathways and Associated Assays «Fit for Purpose» for Regulatory Decision-Making and Management of Chemicals? *Integr Environ Assess Manag*. 15, 633-647.
- / Gadaleta, D., et al., 2018. QSAR Modeling of ToxCast Assays Relevant to the Molecular Initiating Events of AOPs Leading to Hepatic Steatosis. *J Chem Inf Model*. 58, 1501-1517.
- / Gil, F., Pla, A., 2001. Biomarkers as biological indicators of xenobiotic exposure. *J Appl Toxicol*. 21, 245-55.
- / Hines, D. E., et al., 2018. A Case Study Application of the Aggregate Exposure Pathway (AEP) and Adverse Outcome Pathway (AOP) Frameworks to Facilitate the Integration of Human Health and Ecological End Points for Cumulative Risk Assessment (CRA). *Environmental Science & Technology*. 52, 839-849.
- / Kienzler, A., et al., Assessment of Mixtures - Review of Regulatory Requirements and Guidance. 2017.
- / Kienzler, A., et al., 2016. Regulatory assessment of chemical mixtures: Requirements, current approaches and future perspectives. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 80, 321-334.
- / Kleinstreuer, N. C., et al., 2016. Adverse outcome pathways: From research to regulation scientific workshop report. *Regul Toxicol Pharmacol*. 76, 39-50.
- / Knapen, D., et al., 2018. Adverse outcome pathway networks I: Development and applications. *Environ Toxicol Chem*. 37, 1723-1733.
- / Leist, M., et al., 2017. Adverse outcome pathways: opportunities, limitations and open questions. *Arch Toxicol*. 91, 3477-3505.
- / Mustieles, V., et al., 2020. Bisphenol A and its analogues: A comprehensive review to identify and prioritize effect biomarkers for human biomonitoring. *Environ Int*. 144, 105811.
- / Nelms, M. D., et al., 2018. Adverse Outcome Pathways to Support the Assessment of Chemical Mixtures. in: Rider, C., Simmons, J. E., (Eds.), *Chemical Mixtures and Combined Chemical and Nonchemical Stressors*. Springer, Cham, pp. 177-201.
- / Ockleford, C., et al., 2017. Investigation into experimental toxicological properties of plant protection products having a potential link to Parkinson's disease and childhood leukaemia. *Efsa j*. 15, e04691.
- / OECD, Guidance document for the use of adverse outcome pathways in developing integrated approaches to testing and assessment (IATA). Vol. 260. OECD, Paris, 2016.
- / OECD, Users' handbook supplement to the guidance document for developing and assessing adverse outcome pathways. OECD Series on Adverse Outcome Pathways. OECD, Paris, 2018.
- / OECD, Overview of Concepts and Available Guidance related to Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA). Series on Testing and Assessment, Vol. 329. OECD, Paris, 2020.
- / OECD, Adverse Outcome Pathway Knowledge Base (AOP-KB). 2021.
- / Parascandola, M., Weed, D. L., 2001. Causation in epidemiology. *J Epidemiol Community Health*. 55, 905-12.
- / Teeguarden, J. G., et al., 2016. Completing the Link between Exposure Science and Toxicology for Improved Environmental Health Decision Making: The Aggregate Exposure Pathway Framework. *Environ Sci Technol*. 50, 4579-86.
- / Villeneuve, D. L., et al., 2018. Adverse outcome pathway networks II: Network analytics. *Environ Toxicol Chem*. 37, 1734-1748.

/ Wittwehr, C., et al., 2017. How Adverse Outcome Pathways Can Aid the Development and Use of Computational Prediction Models for Regulatory Toxicology. *Toxicol Sci.* 155, 326-336.

/ Zare Jeddi, M., et al., 2021. Towards a systematic use of effect biomarkers in population and occupational biomonitoring. *Environ Int.* 146, 106257.

/ Zgheib, E., et al., 2019. Application of three approaches for quantitative AOP development to renal toxicity. *Computational Toxicology.* 11, 1-13.

<sup>1</sup> Abréviations : AD = Approche Définie ; AEP = Aggregate Exposure Pathway ; AOP = Adverse Outcome Pathway ; EC = événement-clé ; ECC = événement-clé commun ; EMI = Événement Moléculaire initiateur ; EN = Effet Néfaste ; REC = Relation entre Evènements-Clés.

<sup>2</sup> Business and Industry Advisory Committee

<sup>3</sup> International Council on Animal Protection in OECD Programmes

<sup>4</sup> <http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/projects-adverse-outcome-pathways.htm>

<sup>5</sup> <https://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/projects-adverse-outcome-pathways.htm#SectionA>

<sup>6</sup> [https://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-series-on-adverse-outcome-pathways\\_2415170x](https://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-series-on-adverse-outcome-pathways_2415170x)

<sup>7</sup> <https://aopkb.oecd.org/index.html>

<sup>8</sup> Les AOPs quantitatifs se basent sur une compréhension quantitative de l'ampleur et/ou de la durée du changement dans un EC en amont qui serait nécessaire pour un déclenchement des ECs en aval. La recherche en matière d'AOP quantitatifs est encore à ses débuts compte tenu de difficultés intrinsèques à leur paramétrisation.

<sup>9</sup> Ce sujet avait aussi été traité dans le cadre du programme DRC49 en 2016 « Méthodes et outils émergents d'évaluation des dangers » DRC-16-156196-06372A

<sup>10</sup> Méthodes expérimentales permettant de mesurer la réactivité chimique

<sup>11</sup> <http://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/iata-integrated-approaches-to-testing-and-assessment.htm#Project>

<sup>12</sup> La maladie de Parkinson endommage les neurones dopaminergiques qui contribuent au contrôle des mouvements. La destruction de ces neurones fait apparaître les tremblements caractéristiques de cette maladie.

<sup>13</sup> Ensemble de conditions vérifiables (ex. caractérisation des relations dose-réponse) pouvant apporter une preuve pertinente d'une relation causale entre des événements qui conduisent au développement d'une pathologie.

<sup>14</sup> La dose de référence citée dans l'article et établie par l'EPA représente l'estimation d'une exposition quotidienne pour la population humaine (y compris pour les sous-populations sensibles) qui devrait être sans risque appréciable d'effets néfastes au cours d'une vie entière.

<sup>15</sup> Cette marge a été calculée en divisant le point de départ de l'activité anti-androgénique quantifiée in vitro (sur une culture de cellules de Leydig) par la concentration totale estimée de phtalates dans le plasma qui correspondrait à l'apport total journalier de ces substances.

<sup>16</sup> La toxicocinétique est la discipline scientifique qui étudie le devenir des substances chimiques au sein d'un organisme vivant. De façon plus précise, la toxicocinétique caractérise l'absorption, la distribution tissulaire, le métabolisme et l'excrétion des substances chimiques. Grâce à des informations toxicocinétiques il est possible de connaître sous quelle forme (substance parente ou métabolite) l'agent toxique exerce son EN et de connaître sa concentration dans le tissu (ou tissus) qu'il cible

<sup>17</sup> La modélisation pharmacocinétique physiologique (PBPK) se base sur la dérivation de modèles mathématiques visant à prédire l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'excrétion de substances chimiques.

<sup>18</sup> <https://ecophytopic.fr/sites/default/files/2021-06/%C3%89ecophytopic%20-%20Sant%C3%A9%20et%20%C3%89cosyst%C3%A8mes%20-%20Livret%20des%20fiches%20projets.pdf>

<sup>19</sup> <https://umr-sebio.fr/programmes-recherche/feats-2020-2024>

<sup>20</sup> <https://umr-sebio.fr/programmes-recherche/ginfiz-2020-2024>

<sup>21</sup> <https://www.ademe.fr/content/impacts-interactions-entre-polluants-lhomme-environnement>

<sup>22</sup> <https://oberon-4eu.com/the-project/>

<sup>23</sup> <https://www.eu-toxrisk.eu/>