



(ID Modèle = 454913)

Ineris - 200367 - 2540126 - v1.0

29/01/2021

Méthodes alternatives pour l'évaluation des dangers par inhalation

PRÉAMBULE

Le présent document a été réalisé au titre de la mission d'appui aux pouvoirs publics confiée à l'Ineris, en vertu des dispositions de l'article R131-36 du Code de l'environnement.

La responsabilité de l'Ineris ne peut pas être engagée, directement ou indirectement, du fait d'inexactitudes, d'omissions ou d'erreurs ou tous faits équivalents relatifs aux informations utilisées.

L'exactitude de ce document doit être appréciée en fonction des connaissances disponibles et objectives et, le cas échéant, de la réglementation en vigueur à la date d'établissement du document. Par conséquent, l'Ineris ne peut pas être tenu responsable en raison de l'évolution de ces éléments postérieurement à cette date. La mission ne comporte aucune obligation pour l'Ineris d'actualiser ce document après cette date.

Au vu de ses missions qui lui incombent, l'Ineris, n'est pas décideur. Les avis, recommandations, préconisations ou équivalents qui seraient proposés par l'Ineris dans le cadre des missions qui lui sont confiées, ont uniquement pour objectif de conseiller le décideur dans sa prise de décision. Par conséquent, la responsabilité de l'Ineris ne peut pas se substituer à celle du décideur qui est donc notamment seul responsable des interprétations qu'il pourrait réaliser sur la base de ce document. Tout destinataire du document utilisera les résultats qui y sont inclus intégralement ou sinon de manière objective. L'utilisation du document sous forme d'extraits ou de notes de synthèse s'effectuera également sous la seule et entière responsabilité de ce destinataire. Il en est de même pour toute autre modification qui y serait apportée. L'Ineris dégage également toute responsabilité pour chaque utilisation du document en dehors de l'objet de la mission.

Nom de la Direction en charge du rapport : Direction des Risques Chroniques

Rédaction : TROISE Adrien

Vérification : ANDRES Sandrine ; PANDARD Pascal

Approbation : Document approuvé le 29/01/2021 par MORIN ANNE

Table des matières

1	Introduction	5
2	Extrapolation voie à voie pour la détermination de valeurs de référence	5
3	Méthodes <i>in-silico</i>	6
4	Méthodes alternatives <i>in-vitro</i>	7
4.1.1	Les monocultures de cellules	7
4.1.2	Les co-cultures de cellules	8
4.1.3	La culture à l'interface air-liquide (ALI)	9
4.1.4	Les modèles tissulaires (ou 3-D)	9
4.1.5	Conclusions sur les modèles <i>in vitro</i> pulmonaires	10
5	Adverse Outcome Pathway	10
5.1	Concept des Adverse Outcome Pathway.....	10
5.2	Développement d'AOP pour la toxicité par inhalation	11
6	Conclusion	13
7	Références	14
	Annexe 1 : "Adverse Outcome Pathway" pour une exposition par inhalation.....	15

Résumé

L'inhalation de substances chimiques est une voie majeure d'exposition chez la population générale ou les travailleurs. Cette voie d'exposition doit systématiquement (sauf cas particulier) être prise en compte lors de l'évaluation des risques dans le cadre des règlements relatifs aux substances chimiques (Règlement n°1907/2006, REACH), aux produits biocides (Règlement n°528/2012) ou encore aux produits phytopharmaceutiques (Règlement n°1107/2009).

Dans ce cadre, des essais expérimentaux chez l'animal sont généralement réalisés afin d'évaluer la toxicité par inhalation pour les substances mises sur le marché pour des tonnages annuels importants. Toutefois, la mise en œuvre des expositions par inhalation est complexe et selon leur durée, ces essais ne permettent pas nécessairement d'évaluer certains types d'effets tels que les effets locaux comme des effets irritants par exemple.

Aussi, de nouvelles approches méthodologiques (NAM), complémentaires aux méthodes réglementaires et limitant l'utilisation d'animaux, sont développées depuis plusieurs années afin d'évaluer la toxicité par inhalation. Il s'agit de modèles *in-silico* essentiellement basé sur des relations structure-activité, de modèles *in-vitro* (modèles cellulaires) ou encore d'approches intégratrices du type « chemins de l'effet néfastes (Adverse Outcome Pathway (AOP)) ». Le rapport fait un état des lieux de ces approches afin d'identifier les outils et méthodes disponibles permettant d'évaluer la survenue d'effets à la suite d'une exposition par inhalation.

Pour citer ce document, utilisez le lien ci-après :

Méthodes alternatives pour l'évaluation des dangers par inhalation ; Institut national de l'environnement industriel et des risques, Verneuil-en-Halatte : Ineris - 200367 - v1.0, 29/01/2021.

Mots-clés :

Inhalation ; évaluation des dangers ; méthodes alternatives ; AOP

1 Introduction

L'exposition par inhalation est une voie d'exposition courante lors de l'évaluation des risques que ce soit pour la population générale ou les travailleurs. Dans le cadre des réglementations relatives aux produits chimiques, biocides ou phytopharmaceutiques, cette voie d'exposition doit systématiquement être prise en compte lors de l'évaluation des risques et notamment pour l'élaboration du rapport sur la sécurité chimique (CSR) dans REACH. Toutefois cette voie d'exposition est plus compliquée et plus coûteuse à mettre en œuvre, et, les données spécifiques ne sont pas toujours disponibles notamment en ce qui concerne les faibles tonnages où des essais par inhalation ne sont pas requis. Dans ce cas, des extrapolations de la voie orale à l'inhalation sont généralement réalisées conformément aux documents guide de l'ECHA.

Cependant, des différences d'absorption, de métabolisme et d'élimination peuvent être constatées ainsi que la survenue d'effets locaux au niveau de l'appareil respiratoire. En effet, certaines substances telles que les substances irritantes ou corrosives peuvent induire des lésions locales au niveau du tractus respiratoire. Ce type d'effet est alors insuffisamment considéré lors de l'élaboration du rapport sur la sécurité chimique dans le cas d'extrapolation à partir de données pour une exposition par voie orale et de substances à faible tonnage.

L'objectif de ce rapport est d'identifier les outils et méthodes alternatives disponibles permettant d'explorer la survenue d'effets à la suite d'une exposition par inhalation. Pour ce faire, un état des lieux des essais *in vitro* et *in silico* ainsi que des approches « Adverse Outcome Pathway (AOP) » disponibles a été réalisé.

2 Extrapolation voie à voie pour la détermination de valeurs de référence

Dans le cadre de l'évaluation des risques d'une substance, une valeur de référence est un indice toxicologique qui permet, par comparaison avec l'exposition, de qualifier ou de quantifier un risque pour la santé humaine. Cette valeur est généralement basée sur une étude expérimentale réalisée pour la voie d'exposition considérée dans laquelle la concentration sans effet néfaste observable (NOAEC) est déterminée.

Dans le cadre des réglementations relatives aux produits chimiques, biocides ou phytopharmaceutiques, les industriels ou les évaluateurs peuvent être amenés à déterminer des valeurs pour une exposition par inhalation malgré l'absence de données expérimentales.

Dans la très grande majorité des cas, ces valeurs sont établies par extrapolation à partir de la voie orale et de façon générique, d'après la méthodologie décrite par l'Agence Européenne des produits chimiques (ECHA, 2012).

La concentration sans effet néfaste observable déterminée pour une exposition par voie orale, exprimée en quantité de substance par kilogramme de masse de corporelle, peut être extrapolée pour une exposition par inhalation en appliquant la formule ci-dessous.

$$NOAEC \text{ extrapol inh} = NOAEC \text{ orale} \times \frac{1}{sRV_{rat}} \times \frac{ABS_{orale \text{ rat}}}{ABS_{inh \text{ homme}}}$$

NOAEC extrapol inh :	concentration sans effet néfaste observable extrapolée pour l'inhalation (mg/L)
NOAEC orale :	concentration sans effet néfaste observable déterminée pour une exposition par voie orale (mg/kg)
ABS orale rat :	absorption par voie orale chez le rat
ABS inh homme :	absorption par inhalation chez l'homme
sRV rat :	volume respiratoire standard chez le rat (L/min/kg)

En cas d'absence de données d'absorption, une approche par défaut est alors généralement appliquée. Elle consiste à considérer que l'absorption par voie orale est égale à 50% et que celle par inhalation est de 100 %. Cette hypothèse est conservatrice et permet, en cas d'absence de données d'absorption, de disposer d'une valeur utilisable pour l'évaluation des risques par inhalation (ECHA, 2012).

Cette approche permet donc de prendre en compte les potentielles différences d'absorption entre voie orale et inhalation mais uniquement dans une certaine mesure (facteur 2 au maximum). De plus, les potentielles différences de métabolisme entre la voie orale et l'inhalation ne sont pas prises en compte. Par ailleurs, comme indiqué précédemment, l'extrapolation à partir de la voie orale ne permet pas de considérer les potentiels effets locaux au niveau des voies respiratoires tels que la fibrose pulmonaire, l'œdème pulmonaire, l'altération des fonctions respiratoires...

3 Méthodes *in-silico*

L'étude quantitative des relations structure-activité (Quantitative structure-activity relationship, QSAR) est une méthode *in silico* qui peut être utilisée pour prédire la toxicité des substances sans effectuer d'essais au préalable. Cette méthode repose sur le principe qu'il existe une relation entre la structure d'une substance et sa capacité à induire un effet selon un mode d'action donné. Les modèles prennent en compte à la fois les propriétés physicochimiques des molécules et leur structure.

Les modèles QSAR permettant prédire la toxicité des substances pour une exposition par inhalation sont limités. Selon les modèles, l'effet indésirable prédit diffère :

- Concentration létale induisant 50 % de mortalité (CL₅₀)

Le logiciel commercial TOPKAT¹ intègre un modèle qui vise spécifiquement à prédire la valeur de la CL₅₀ chez le rat après 4 heures d'exposition. Etant un modèle commercial, le code du modèle, les données sources et le jeu d'apprentissage ne sont pas disponibles. Il est donc difficile d'évaluer la fiabilité des prédictions.

Un autre modèle permettant d'estimer la CL₅₀ (exprimée en équivalent log molaire) a été développée pour les substances organiques neutres volatiles supposées provoquer une toxicité par narcose (Veith *et al.*, 2009). Ce modèle est basé sur la pression de vapeur des substances. Ce modèle prenant uniquement en compte la pression de vapeur de la substance, une faible confiance est attendue quant aux prédictions obtenues.

Enfin, un autre modèle commercial permettant d'estimer la CL₅₀ (exprimée en équivalent log molaire) a été développée par MULTICASE. Ce modèle se base sur un jeu d'apprentissage de 2 740 substances. Il présenterait une sensibilité de 52-71 % et une spécificité de 71-74 % (Saiakhov, 2018).

- Cancérogénicité

Le logiciel VEGA² comprend deux modèles permettant d'évaluer le potentiel cancérogène d'une substance par inhalation : « Carcinogenicity inhalation classification model » et « Carcinogenicity inhalation Slope Factor model ». Ces modèles ont été développés par l'Institut Mario Negri de recherche pharmacologique (IRFMN). Ce modèle se base sur l'analyse d'alertes structurelles susceptibles d'induire des effets cancérogènes.

La boîte à outils QSAR³ de l'OCDE comprend plusieurs modèles de mutagénicité/cancérogénicité (Carcinogenicity alerts by ISS, DNA Alerts for Ames, CA and MNT by OASIS) ainsi que des modèles permettant d'évaluer la liaison de la substance aux protéines (Protein binding by OECD, Protein binding by OASIS) ou l'ADN (DNA binding by OECD, DNA binding by OASIS). Ces modèles ne sont pas spécifiques d'une exposition par inhalation. Ils sont toutefois applicables aux substances induisant des effets systémiques.

- Sensibilisation respiratoire

Un modèle a été développé dans la boîte à outils QSAR de l'OCDE pour évaluer la sensibilisation des voies respiratoires de substances de faible masse molaire. Il identifie la potentialité des substances à se lier de façon covalente aux protéines pulmonaires. Il est basé sur 41 catégories d'alertes structurelles différentes. Les auteurs signalent que ce modèle doit être utilisé avec prudence en raison du faible nombre de données disponibles pour le développement d'alertes structurelles.

¹ <https://www.toxkit.it/en/services/software/topkat>

² <https://www.vegahub.eu/>

³ <https://qsartoolbox.org/>

Il existe également des modèles *in silico* pour prédire le dépôt de particules au niveau des voies respiratoires. Il s'agit de modèles mathématiques, comme le Multiple Path Particle Dosimetry model (MPPD). Ce modèle permet d'estimer le dépôt pulmonaire dans chaque région ou sous-région pulmonaire en fonction des propriétés physico-chimiques de la substance (taille des particules, densité, ratio longueur-largeur...) et des caractéristiques du modèle expérimental utilisé. Ces modèles sont destinés à évaluer l'exposition et non les dangers intrinsèques des substances.

4 Méthodes alternatives *in-vitro*

Il existe différents modèles cellulaires *in vitro* permettant d'évaluer la toxicité des substances et d'étudier leur mécanisme d'action. Il est possible de distinguer 3 principaux types de modèles *in vitro* différents : les monocultures, les co-cultures et les cultures 3-D. Un mode de culture très utilisé est la culture à l'interface air/liquide (Cidem *et al.*, 2020 ; Faber et McCullough, 2018 ; Loret, 2017).

4.1.1 Les monocultures de cellules

Il s'agit de modèles fréquemment utilisés et constitués d'un unique type cellulaire (cultures primaires ou lignées cellulaires). Les cellules primaires sont des cellules normales qui sont prélevées directement à partir d'un organisme. Ces cellules ont la propriété de conserver les mêmes caractéristiques qu'*in vivo*. Cependant, la durée de vie du modèle est limitée. Les lignées cellulaires quant à elles sont composées de cellules immortalisées et sont beaucoup plus utilisées. Elles sont issues de cellules cancéreuses prélevées chez un patient ou de cellules normales qui ont été transformées par génie génétique. Les lignées cellulaires ne possèdent généralement pas toutes les caractéristiques des cellules *in vivo*, mais elles ont l'avantage de se multiplier à l'infini tout en conservant leurs caractéristiques de départ. Pour ces raisons, elles sont facilement disponibles et utilisables, peu coûteuses, et elles permettent une bonne reproductibilité des résultats.

Ces modèles ont permis de comprendre le rôle des cellules épithéliales ainsi que les mécanismes moléculaires responsables de l'induction de phénomènes toxicologiques clés tels que le stress oxydant ou la signalisation pro-inflammatoire.

Les monocultures sont assez facilement utilisables, cependant, le modèle ne permet pas de prendre en compte les interactions entre les différents types cellulaires qui peuvent avoir lieu *in vivo*.

Le tableau 1 présente les principaux modèles d'épithélium pulmonaires monocultures ainsi que leurs avantages et inconvénients.

Tableau 1 : principaux modèles d'épithélium pulmonaires monocultures (Loret, 2017)

Situation au niveau de la barrière pulmonaire	Nom du modèle cellulaire	Provenance	Avantages	Inconvénients
Épithélium nasal et bronchique	Calu-3	Cellules isolées d'un adénocarcinome bronchique	Lignée (immortalisée) ; formation de jonctions serrées ; sécrétion de mucus	Variabilité entre les laboratoires pour la formation de jonctions serrées
	BEAS-2B	Cellules transformées d'épithélium bronchique	Lignée (immortalisée) ; sécrétion de cytokines ; antioxydants ; différenciation	Absence de sécrétion de mucus, de cellules ciliées et de jonction serrées
	16HBE14o-	Cellules transformées d'épithélium bronchique	Lignée (immortalisée) ; différenciation, organisation en multicouches, formation de cellules ciliées et de jonction serrées ; sécrétion de cytokines	Absence de sécrétion de mucus

Situation au niveau de la barrière pulmonaire	Nom du modèle cellulaire	Provenance	Avantages	Inconvénients
	NHBE, hAECB	Cellules primaires bronchique	Cellules non tumorales, non transformées ; organisation en multicouche ; différenciation ; formation de cellules ciliées et de jonctions serrées ; sécrétion de mucus ; expression de cytokines	Non immortelles (durée de vie limitée) ; Perte de certaines fonctions ; complexe à mettre en œuvre
	hAECN	Cellules primaires d'épithélium nasal	Cellules non tumorales, non transformées ; organisation en multicouche ; différenciation ; formation de cellules ciliées et de jonctions serrées ; sécrétion de mucus ; expression de cytokines	Non immortelles (durée de vie limitée) ; Perte de certaines fonctions des passages ; complexe à mettre en œuvre
Épithélium alvéolaire	A549	Cellules isolées d'un adénocarcinome	Lignée (immortalisée) ; phénotype de cellules épithéliales alvéolaires de type II ; synthèse de surfactant	Pas de formation de jonctions serrées ; synthèse de surfactant
	THP-1	Cellules isolées d'un patient atteint de leucémie aiguë	Lignée monocytique humaine ; les cellules peuvent être différenciées en macrophages	Utilisation d'une substance chimique pour différencier les monocytes en macrophages
	AE I (alveolar type I) and AE II (alveolar type II)	Cellules primaires d'épithélium alvéolaire	Cellules primaires humaines ; Phénotype bien différencié ; Présence de jonctions serrées fortes	Processus d'isolation des cellules difficile ; perte du phénotype de type II après 2-3 jours de culture ; phénotype de type I ne peut être directement isolé. Type I produit par transformation de cellules de type II après 4-7 jours de culture directement isolé.

4.1.2 Les co-cultures de cellules

Afin de reproduire au mieux l'organisation cellulaire pulmonaire et de prendre en compte les interactions entre différents types cellulaires, des modèles plus complexes et plus réalistes ont été développés. Des co-cultures entre différents types cellulaires constitutifs des voies pulmonaires (notamment entre des cellules épithéliales et des cellules immunitaires) ont été développées.

La lignée A549 est une des lignées de cellules épithéliales alvéolaires de type II la plus utilisée. Elle est cultivée en bi-culture avec des macrophages de la lignée THP-1. Cette association permet de mimer l'organisation cellulaire à la partie apicale des alvéoles (notamment en ce qui concerne la présence de surfactant). Par ailleurs, en utilisant des inserts (membrane microporeuse permettant les échanges entre la partie apicale et la partie basale), il est possible de reproduire l'organisation des barrières pulmonaires, et plus particulièrement de la barrière alvéolo-capillaire. Des co-cultures associant des cellules épithéliales, des macrophages, des cellules endothéliales et même parfois des mastocytes ont été développées.

Le tableau 2 présente les modèles d'épithélium pulmonaires co-cultures ainsi que leurs avantages et inconvénients.

Tableau 2 : modèles d'épithélium pulmonaires co-cultures (Loret, 2017)

Nom du modèle cellulaire	Provenance	Avantages	Inconvénients
Cellules épithéliales pulmonaires associées avec un autre type cellulaire composant la barrière pulmonaires (macrophages, cellules dendritiques fibroblastes cellules endothéliales...)	Co-culture de lignées ou co-culture de cellules primaires	Modèle physiologique plus représentatif de la barrière pulmonaire ; coopération existante entre les différents types cellulaires.	Complexe à mettre en œuvre ; Variabilité plus importante ; Culture sur inserts parfois nécessaire

4.1.3 La culture à l'interface air-liquide (ALI)

Bien qu'une couche de mucus (au niveau bronchique) ou de surfactant (dans les alvéoles) soit présente à la surface apicale des cellules épithéliales, il est admis que les cellules pulmonaires se trouvent à l'interface air-liquide (ALI). Pour mimer cette organisation dans un modèle *in vitro*, des cellules pulmonaires sont cultivées à l'interface air-liquide en utilisant des inserts. Une fois que les cellules se trouvent à confluence en partie apicale, il est possible d'enlever le milieu qui se trouve en partie apicale puis de conserver les cellules à l'interface air-liquide avec du milieu de culture uniquement en partie basale. Grâce à cette technique, les cellules peuvent être exposées à des contaminants directement à l'interface air-liquide.

Le tableau 3 présente les modèles d'épithélium pulmonaires en culture à l'interface air-liquide ainsi que leurs avantages et inconvénients.

Tableau 3 : Modèles d'épithélium pulmonaires en culture à l'interface air-liquide (Loret, 2017)

Type de culture	Nom du modèle cellulaire	Provenance	Avantages	Inconvénients
Culture en interface Air/Liquide (ALI)	Possible pour la plupart des modèles de barrière épithéliale pulmonaire	Mono-culture, co-culture, culture 3D, de lignées ou de cellules primaires	Augmentation de la différenciation des cellules, de la sécrétion de mucus ou de surfactant, de la fonction de barrière	Culture sur inserts nécessaire ; couteux

4.1.4 Les modèles tissulaires (ou 3-D)

Lors de la culture à l'interface air-liquide sur des inserts, il est possible d'obtenir un tissu différencié en utilisant des cellules primaires provenant d'un donneur, il s'agit de modèles tissulaires (ou 3-D). Des modèles d'épithéliums bronchique ou nasal ont été développés. Grâce à un renouvellement continu des cellules, il est possible de maintenir ces modèles fonctionnels pendant 6 mois sans altération du tissu. De ce fait, ils peuvent être exposés de manière répétée dans le temps à des contaminants. Des modèles associant des cellules cultivées en 3-D avec d'autres types cellulaires (fibroblastes, macrophages) sont également disponibles (EpiAirway, EpiAlveolar).

Au-delà des modèles 3-D, il existe également des poumons sur puces. Il s'agit de cultures de cellules 3-D, qui reproduisent, grâce à la microfluidique, le fonctionnement d'un tissu ou d'un organe. Ces dispositifs sont très couteux et au stade expérimental (Benam, 2017).

Le tableau 4 présente les modèles tissulaires ainsi que leurs avantages et inconvénients.

Tableau 4 : principaux modèles tissulaire (ou 3-D) (Loret, 2017)

Nom du modèle cellulaire	Provenance	Avantages	Inconvénients
MatTek EpiAirway Epithelix MucilAir	Epithéliums reconstitué à partir de cellules primaires trachéo- bronchiques ou épithéliales nasales	Epithélium reconstitué ; cellules différenciées en cellules sécrétrices de mucus et cellules ciliés ; formation multicouches ; formation de jonctions serrées ; Tissu viable plusieurs mois	Couteux, faible reproductibilité

4.1.5 Conclusions sur les modèles *in vitro* pulmonaires

Les voies respiratoires sont composées de plus de 40 types de cellules différents localisés dans des régions spécifiques selon leur fonction. Au niveau des voies respiratoires supérieures, l'épithélium respiratoire et olfactif contient des cellules sustentaculaires, ciliées, basales, en gobelet, séreuses et en brosse. La région alvéolaire est composée de cellules alvéolaires de type I et de type II (produisant un surfactant), de cellules séreuses et de cellules Club (cellule exocrine bronchiolaire). Les cellules immunitaires (par exemple, les cellules dendritiques et les macrophages) existent à différents endroits dans toutes les régions du système respiratoire. Ces différences dans les populations de type cellulaire au fur et à mesure que les voies respiratoires passent de la fonction conductrice à la fonction respiratoire font de l'étude des voies respiratoires un défi unique. La création d'un système de test *in vitro* contenant tous ces types de cellules n'est actuellement pas techniquement réalisable. Cependant, des systèmes contenant des cellules spécifiques (seules ou en co-culture) pour un mode d'action donné pourraient être utiles pour prédire les effets des substances inhalées dans des régions spécifiques des voies respiratoires.

Il n'existe pas de synthèse qui permette de comparer les différents modèles entre eux car il est difficile d'évaluer la pertinence de chacun d'eux qui est très dépendante des effets recherchés et du mode d'action de la substance. Chaque modèle a ses avantages et ses limites et le choix du modèle à utiliser dépendra de l'objectif spécifique de l'essai. La spécificité de chaque modèle peut permettre d'étudier plus particulièrement une étape clé du mécanisme d'action de la substance.

Les avancées en matière de modèles *in vitro* permettent aujourd'hui d'utiliser des modèles de plus en plus représentatifs de l'organisation cellulaire *in vivo*.

5 Adverse Outcome Pathway

Afin de structurer et d'intégrer les informations sur les substances chimiques (qu'elles soient issues de données *in vivo*, *in vitro* ou *in silico*) et de favoriser les approches prédictives dans l'évaluation des risques, l'OMS IPCS, l'OCDE et l'US EPA ont développé le concept des AOP (Adverse Outcome Pathway) ou « chemin de l'effet néfaste » en 2010 (INERIS, 2012).

5.1 Concept des Adverse Outcome Pathway

Un AOP est une construction conceptuelle qui représente les connaissances disponibles concernant le lien entre un événement 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'événements qui ont lieu à différents niveaux de l'organisation biologique (molécules, cellules, organes) (cf. figure 1). 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. Le schéma ci-après (cf. figure 1) présente les principales caractéristiques d'un AOP. Chaque AOP commence par un événement moléculaire au cours duquel une substance chimique interagit avec une cible biologique (ancrage 1). Cette interaction conduit à une série d'événements à différents niveaux de l'organisation biologique puis à un effet néfaste (par exemple, un cancer ou une fibrose pulmonaire, ancrage 2).

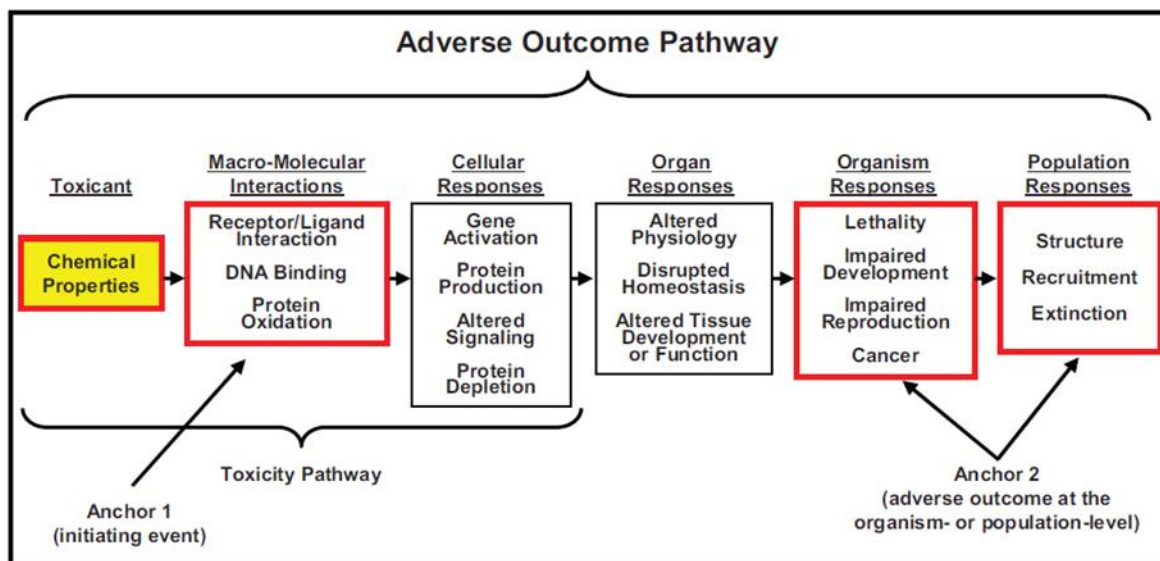


Figure 1 : Schéma conceptuel des principales caractéristiques d'un AOP (Ankley et al., 2010)

Les AOP peuvent permettre :

- d'inclure et d'organiser les connaissances toxicologiques (depuis l'évènement initiateur au niveau moléculaire jusqu'à l'effet néfaste observé) sur une substance chimique,
- 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, et,
- d'identifier les similitudes et les différences entre les espèces des évènements initiateur afin d'affiner les facteurs d'évaluation.

Ce cadre conceptuel permet également le partage de données à l'échelle internationale. En effet, les AOP finalisés ou en cours de développement sont référencés sur le module collaboratif AOP-Wiki⁴ qui est rattaché à la base de connaissances AOP-KB (Adverse Outcome Pathway Knowledge Base). Lancée en 2012 par l'Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE), elle est mise en œuvre et développée avec la collaboration du Centre commun de recherches de la Commission européenne (JRC) de l'Agence américaine de protection de l'environnement (US EPA) et du Centre de recherche et de développement de l'armée américaine (ERDC).

5.2 Développement d'AOP pour la toxicité par inhalation

Les AOP existants fournissent un cadre pour mieux comprendre les mécanismes qui mènent à des effets néfastes (notamment la toxicité locale) à la suite d'expositions par inhalation, et de nombreux travaux sont en cours pour développer davantage les AOP liés à l'exposition par inhalation.

Le tableau en annexe 1 présente les 26 AOP en cours de développement présentant potentiellement une pertinence pour l'évaluation de la toxicité par inhalation. Pour chaque AOP, il est précisé : le numéro d'identification de l'AOP, l'effet néfaste étudié, les étapes clés du mode d'action ainsi qu'un exemple de substance (si disponible). Ces informations sont issues du module AOP-Wiki.

Ces AOP décrivent les étapes du mode d'action au niveau moléculaire, cellulaire et des tissus/organes conduisant à un effet néfaste donné et pour un évènement initiateur donné au niveau moléculaire. Le tableau 5 ci-dessous présente de façon synthétique les différents effets indésirables et les différentes étapes clés identifiés dans les AOP disponibles pour une exposition par inhalation.

⁴ <https://aopwiki.org/>

Tableau 5 : Effets néfastes et étapes clés des AOP pour une exposition par inhalation (Clippinger et al., 2018)

Target Site Exposure	Molecular Initiating Events	Cellular Key Events	Tissue / Organ Key Events	Organism / Population Responses
<ul style="list-style-type: none"> - Solubility - Vapor pressure - Particle size, density, distribution - Mass transfer coefficient - Chemical reactivity - ADME - Breathing mode, rate and volume 	<ul style="list-style-type: none"> - Oxidation of cellular molecules - Acetylcholinesterase inhibition - Cytochrome C oxidase inhibition - DNA/protein alkylation - Modulation of ion channels - Receptor binding e.g., - Activation of EGFR - Activation of TRPA1 receptor - Activation of glucocorticoid receptor - Activation/inhibition of G protein coupled receptors - Inhibition of muscarinic acetylcholine receptors - Inhibition of NMDA receptors - Binding to hormone receptor 	<ul style="list-style-type: none"> - R-5 formation - Antioxidant (e.g., glutathione) depletion - Inhibition of energy (ATP) production - Cytotoxicity - Collagen deposition - Increased mucous production - Cytoskeleton disruption - Cytokine/chemokine production - Surfactant depletion - Modulation of signal transduction pathways - Inhibition of nucleotide synthesis - Protein modification - Modulation of protein synthesis - Effects on the blood - Vitamin interference 	<ul style="list-style-type: none"> - Cell proliferation - Inflammatory response - Cell transformation - Squamous cell metaplasia - Loss of epithelial barrier function - Reduced ciliary beat frequency - Goblet (mucous) cell hyperplasia, metaplasia, and proliferation - Respiratory failure - Tracheitis - Bronchiolitis - Alveolitis - Pulmonary edema - Bronchoconstriction - Alveolar distention - Smooth muscle remodeling - Change in lung mechanics (resistance, compliance, pressure-volume curves, FEV1) 	<ul style="list-style-type: none"> - Systemic toxicity - Acute lethality - Target organ effects (e.g., hepatotoxicity) - Airway hyperreactivity - Chemical narcosis

Un événement initiateur au niveau moléculaire est susceptible de conduire à différents effets néfastes et inversement plusieurs événements initiateurs différents peuvent conduire à un même effet néfaste. Par exemple, cinq AOP sont actuellement en cours de développement pour la fibrose pulmonaire et présentent différents événements initiateurs au niveau moléculaire (inactivation PPAR, activation du TGF- β , inhibition de l'AC2, activation des récepteurs Toll-like, augmentation des médiateurs pro-inflammatoires et pro-fibrotiques) ainsi des étapes clés du mode d'action qui peuvent différer.

Plusieurs étapes clés peuvent donc être responsables du même effet indésirable. Ceci souligne l'importance des données expérimentales *in vitro* et *in silico* qui vont permettre, à mesure que les lacunes dans les connaissances sont comblées, d'affiner continuellement la compréhension mécanistique de la toxicité aiguë par inhalation et donc les AOP.

Par ailleurs, la complexité des voies respiratoires souligne l'importance d'utiliser un cadre conceptuel mécanistique (AOP) pour aider à la conception d'approches intelligentes d'essais *in vitro* et *in silico* pour les expositions par inhalation.

6 Conclusion

En l'état actuel des connaissances, il n'existe pas de méthodologie clairement définie pour évaluer les effets néfastes d'une substance à la suite d'une exposition par inhalation à partir de méthodes alternatives (*in silico*, *in vitro*, AOP). De ce fait, en l'absence de données expérimentales *in vivo* par inhalation, les valeurs de référence par inhalation sont généralement basées sur celles déterminées par voie orale et ne permettent alors pas de prendre en compte les effets locaux qui pourraient survenir au niveau des voies respiratoires.

Toutefois, de nombreux modèles *in vitro* ont été développés et sont en constante évolution afin de disposer de modèles les plus représentatifs de l'organisation des barrières pulmonaires, comme les modèles tissulaires. Chaque modèle a ses avantages et ses limites et le choix du modèle à utiliser dépendra de l'objectif spécifique de l'essai. La spécificité de chaque modèle peut permettre d'étudier plus particulièrement une étape clé du mécanisme d'action de la substance.

Les outils d'évaluation des dangers que sont les « Adverse Outcome Pathway » permettent d'intégrer et d'organiser les connaissances toxicologiques (*in silico*, *in vitro*, *in vivo*), d'affiner continuellement la compréhension mécanistique de la toxicité aiguë par inhalation et ainsi de mieux prédire la survenue d'effet néfaste pour une exposition par inhalation. Les connaissances toxicologiques sur les effets locaux au niveau des voies respiratoires ainsi que les mécanismes d'action ne sont pas encore bien connus. Toutefois, de nombreux travaux sur la fibrose pulmonaire ont permis le développement de 5 AOP conduisant à cet effet néfaste. Il est à noter que cet effet peut être induit par différents événements initiateurs au niveau moléculaire ce qui souligne la complexité du mécanisme d'action.

Les AOP établis pour un effet au niveau pulmonaire pourrait donc permettre de compléter le rapport sur la sécurité chimique dans le cadre de REACH en évaluant les potentiels effets locaux que pourraient induire une substance. Pour ce faire, il est nécessaire de consolider l'AOP pour un effet donné et d'identifier les méthodes alternatives qui peuvent être utilisées pour renseigner chacun des événements clés de l'AOP. En raison des nombreuses données disponibles et de la connaissance du mode d'action, les AOP en cours de développement pour la fibrose pulmonaire sont les plus renseignés. La prise en compte de l'ensemble de ces AOP dans une évaluation globale pourrait permettre de fournir de précieuses informations à l'évaluateur pour l'évaluation de ce type d'effet. Toutefois, il est nécessaire de bien définir au préalable les différents modes actions, événements initiateurs et les différentes méthodes *in silico* ou *in vitro* applicables.

7 Références

Ankley G.T., Bennett R.S., Erickson R.J., Hoff D.J., Hornung M.W., Johnson R.D., Mount D.R., Nichols J.W., Russom C.L., Schmieder P.K., Serrano J.A., Tietge J.E. and Villeneuve D.L. (2010) - Adverse outcome pathways: a conceptual framework to support ecotoxicology research and risk assessment. *Environ Toxicol Chem*, **29**, 3, 730-741.

Benam K.H. (2017) - Disrupting experimental strategies for inhalation toxicology: the emergence of microengineered breathing-smoking human lung-on-a-chip. *Applied in Vitro Toxicology*, **4**, 2, 107-114.

Cidem A., Bradbury P., Traini D. and Ong H.X. (2020) - Modifying and Integrating in vitro and ex vivo Respiratory Models for Inhalation Drug Screening. *Front Bioeng Biotechnol*, **8**, 581995.

Clippinger A.J., Allen D., Behrsing H., BeruBe K.A., Bolger M.B., Casey W., DeLorme M., Gaca M., Gehen S.C., Glover K., Hayden P., Hinderliter P., Hotchkiss J.A., Iskandar A., Keyser B., Luettich K., Ma-Hock L., Maione A.G., Makena P., Melbourne J., Milchak L., Ng S.P., Paini A., Page K., Patlewicz G., Prieto P., Raabe H., Reinke E.N., Roper C., Rose J., Sharma M., Spoo W., Thorne P.S., Wilson D.M. and Jarabek A.M. (2018) - Pathway-based predictive approaches for non-animal assessment of acute inhalation toxicity. *Toxicol In Vitro*, **52**, 131-145.

ECHA (2012) - Guidance on information requirements and chemical safety assessment, Chapter R.8: Characterisation of dose [concentration]-response for human health. *European Chemicals Agency*.

Faber S.C. and McCullough S.D. (2018) - Through the Looking Glass: In Vitro Models for Inhalation Toxicology and Interindividual Variability in the Airway. *Appl In Vitro Toxicol*, **4**, 2, 115-128.

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. *Institut National de l'environnement industriel et des risques*.

Loret T. (2017) - Capacité de modèles in vitro de complexité différente à prédire les réponses toxiques pulmonaires observées in vivo après exposition aiguë à des nanoparticules de TiO₂ et de CeO₂. *Université technologique de Compiègne*.

Saiakhov R. (2018) - New QSAR system to predict acute inhalation toxicity. *MultiCASE Inc.*

Veith G.D., Petkova E.P. and Wallace K.B. (2009) - A baseline inhalation toxicity model for narcosis in mammals. *SAR QSAR Environ Res*, **20**, 5-6, 567-578.

Annexe 1 : “Adverse Outcome Pathway” pour une exposition par inhalation

AOP ID	Adverse outcome	Short name	MIE/key events	Example stressor
302	Acute inhalation toxicity	Lung surfactant function disruption leading to immediate adverse lung effects	<ul style="list-style-type: none"> - Lung surfactant interaction - Disruption of lung surfactant function - Alveolar collapse - Alveolar reopening - Loss of alveolar capillary membrane integrity - Blood extravasation into the lungs - Reduced lung volume - Impaired oxygenation of the blood 	
16	Acute mortality	AChE inhibition - acute mortality	<ul style="list-style-type: none"> - Acetylcholinesterase inhibition - Accumulation of acetylcholine in synapses - Increased cholinergic signaling - Increased respiratory distress/arrest - Dysregulation of heart rate and vascular tone 	Organophosphorous compounds
96	Acute mortality	Sodium channel modulation	<ul style="list-style-type: none"> - Axonal sodium channel inhibition - Prolonged depolarization of neuronal membrane - Neurotransmitter release - Muscle contraction - Induction of ataxia, paralysis, or hyperactivity 	Volatile anaesthetics
320	Acute respiratory distress	S glycoprotein, Acute respiratory distress	<ul style="list-style-type: none"> - Binding of S protein to ACE receptor - Enhanced viral entry and gene expression - Increased, secretion of proinflammatory and profibrotic mediators - Increase inflammatory immune responses - Increase, the risk of acute respiratory failure 	SARS-CoV ; COVID-19
39	Allergic Respiratory Hypersensitivity Response	Covalent binding to proteins	<ul style="list-style-type: none"> - Covalent Binding Protein - Activation, Inflammatory cytokines, chemokines, cytoprotective gene pathways - Activation, Dendritic Cells - Activation/Proliferation, T-cells 	
139	Cancer	Alkylation of DNA	<ul style="list-style-type: none"> - DNA alkylation - Failure of DNA repair - Mutation 	

AOP ID	Adverse outcome	Short name	MIE/key events	Example stressor
187	Coagulopathy and haemorrhage	VKOR inhibition resulting in coagulopathy	<ul style="list-style-type: none"> - Inhibition of vitamin K epoxide reductase (inhibition of vitamin K cycle) - Depletion of functional clotting factors - Failure to form clot - Prevention of vascular repair 	Anticoagulant rodenticide
205	Cytotoxicity (Apoptosis, Necrosis)	AOP on basal cytotoxicity	<ul style="list-style-type: none"> - Decompartmentalization - Direct mitochondrial inhibition - Narcosis (membrane disruption) - Mitochondrial impairment - Apoptosis, Necrosis 	
148	Decreased lung function	EGFR Activation	<ul style="list-style-type: none"> - EGFR activation (phosphorylation) - Transdifferentiation of ciliated epithelial cells - Goblet cell metaplasia - Hyperplasia of goblet cells - Proliferation of goblet cells - Apoptosis of ciliated epithelial cells - Transcription factor (SP1) modulation - Increased mucus production 	Reactive oxygen species
149	Hypertension	Peptide Oxidation	<ul style="list-style-type: none"> - Oxidative stress-mediated perturbation of endothelial nitric oxide bioavailability - Glutathione oxidation - S-Glutathionylation, eNOS - Decrease in GTPCH-1 - Decrease in tetrahydrobiopterin - Uncoupling of eNOS - Depletion of nitric oxide - Impaired vasodilation - Increase in vascular resistance - Decrease in Akt/eNOS activity 	Reactive oxygen species
14	Increased disease susceptibility	Glucocorticoid Receptor, Activation	<ul style="list-style-type: none"> - Glucocorticoid receptor activation - Inhibition of NF-κB - Suppression of inflammatory cytokines - Decreased lymphocytes - Induction on IκB - Suppression of the immune system 	Corticosteroids

AOP ID	Adverse outcome	Short name	MIE/key events	Example stressor
38	Liver fibrosis	Protein Alkylation to Liver Fibrosis	<ul style="list-style-type: none"> - Protein alkylation - Cell injury/death - Activation and recruitment of Kupffer cells - Upregulation of TGFbeta1 expression - Activation of stellate cells - Collagen accumulation 	Allyl Alcohol; Carbon tetrachloride; Retinol; Dimethyl nitrosamine; Thioacetamide
272	Lung cancer	Ionizing energy leading to lung cancer	<ul style="list-style-type: none"> - Direct Deposition of Energy - Increase, DNA strand breaks - Inadequate DNA repair - Increase, Mutations - Increase, Chromosomal aberrations - Increase, Cell Proliferation 	Ionizing Radiation
303	Lung cancer	Frustrated phagocytosis-induced lung cancer	<ul style="list-style-type: none"> - Frustrated phagocytosis - Release, Cytokine - Increased, recruitment of inflammatory cells - Increased, Reactive oxygen species - Increased, DNA damage and mutation - Increase, Cell Proliferation 	High aspect ratio material
171	Mesothelioma	Chronic cytotoxicity of the serous membrane and mesotheliomas	<ul style="list-style-type: none"> - Chronic cytotoxicity of the serous membrane - Persistent cytotoxicity - Increased inflammation - Increased oxidative stress - Increased secretion of local growth factors - Increased cell proliferation 	Asbestos
136	Nasal Tumors	pH Induced Nasal Tumors	<ul style="list-style-type: none"> - Decrease, Intracellular pH - Increase, Tissue Degeneration, Necrosis & Atrophy - Increase, Cell Proliferation - Increase, Respiratory or Squamous Metaplasia - Increase, Cytotoxicity - Increase, Mutations in Critical Genes - Increase, Site of Contact Nasal Tumors 	Vinyl acetate

AOP ID	Adverse outcome	Short name	MIE/key events	Example stressor
173	Pulmonary fibrosis	Substance interaction with the lung cell membrane leading to lung fibrosis	<ul style="list-style-type: none"> - Interaction with the lung resident cell membrane components - Increased, secretion of proinflammatory and profibrotic mediators - Increased, recruitment of inflammatory cells - Loss of alveolar capillary membrane integrity - Increased, activation of T (T) helper (h) type 2 cells - Increased, fibroblast proliferation and myofibroblast differentiation - Increased, extracellular matrix deposition 	Bleomycin ; Carbon nanotubes, carbon nanofibres
206	Pulmonary fibrosis	PPAR γ inactivation leading to lung fibrosis	<ul style="list-style-type: none"> - Inactivation of PPARγ - Activation of TGF-β signaling - Increase, Inflammation - Collagen Deposition - Induction, Epithelial Mesenchymal Transition 	
241	Pulmonary fibrosis	Latent TGFbeta1 activation leads to pulmonary fibrosis	<ul style="list-style-type: none"> - Activation, Latent Transforming Growth Factor Beta 1 - Increase, Differentiation of fibroblasts - Induction, Epithelial Mesenchymal Transition - Accumulation, Collagen - Activation, Transforming Growth Factor beta pathway 	Carbon nanotubes
319	Pulmonary fibrosis	ACE2 inhibition, lung fibrosis	<ul style="list-style-type: none"> - ACE2 inhibition - Increases AngII - Increase plasma Ang II - Accumulation, Collagen 	PM 2,5 ; Streptozocin ; Losartan
347	Pulmonary fibrosis	TLR4 activation, PPAR gamma activation and Pulmonary fibrosis	<ul style="list-style-type: none"> - Toll-like receptor 4 activation - Inactivation of PPARγ - Activation, JNK - Activator protein 1 activation - Pin-1 activation - Latent Transforming growth Factor beta expression - Activation, TGF-beta pathway - Induction, Epithelial Mesenchymal Transition 	
95	Reduced survival	ether-a-go-go (ERG) inhibition	<ul style="list-style-type: none"> - Inhibition of voltage-gated potassium channel - Decreased sodium conductance - Reduced swimming speed and feeding in fish, leading to increased predation 	Volatile anaesthetics

AOP ID	Adverse outcome	Short name	MIE/key events	Example stressor
138	Renal failure and mortality	OAT1 inhibition	<ul style="list-style-type: none"> - Organic anion transporter (OAT1) inhibition - Increase in uric acid concentration in the blood - Renal proximal tubular necrosis - Increased blood potassium concentration - Increased tophi (urate) deposition - Increased occurrence of cardiac arrhythmia - Increased oxidative stress 	NSAIDs
239	Respiratory epithelial remodeling	Oxidative Stress, ILC2-mediated	<ul style="list-style-type: none"> - Oxidative Stress - ILC2 modulation 	
35	Respiratory failure	Narcosis leading to respiratory failure	<ul style="list-style-type: none"> - Narcosis (membrane disruption) - Decreased cell respiration and metabolism - Decreased respiration 	Volatile organic compounds (VOC) and solvents
196	Respiratory irritability, Increased Airway Hyper-responsiveness, Cough, Dyspnea, Irritation induced sneezing	TRPA1 activation leads to pulmonary sensory irritation	<ul style="list-style-type: none"> - TRPA1 activation, TRPA1 Receptor - Opening of calcium channel, Calcium influx - Trigeminal nerve activation - SP (Substance P) release, Local increase of SP - Increased CGRP, neuronal release of CGRP - Increased neurokinin A (NKA) by neuronal cells 	Dibenzo[B,F][1,4]Oxazepine ; 2-Chlorobenzalmononitrile

