



(ID Modèle = 454913)

Ineris - 213403 - 2768067 - v1.0

11/05/2023

**Nouvelles approches méthodologiques (NAM)
pour la prise en compte des effets locaux dans
l'évaluation des dangers par inhalation : cas
de la fibrose pulmonaire**

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 MILIEUX ET IMPACTS SUR LE VIVANT

Rédaction : TROISE Adrien -

Vérification : ANDRES SANDRINE; PANDARD PASCAL

Approbation : Document approuvé le 11/05/2023 par BOUDET CELINE

Liste des personnes ayant participé à l'étude : TROISE Adrien

Table des matières

1	Introduction	5
2	Adverse Outcome Pathway (AOP) pour la fibrose pulmonaire	6
2.1	Définition	6
2.2	AOP en développement	6
2.3	Analyse et comparaison des AOP.....	9
3	Etude de cas : Inactivation des récepteurs activés par les proliférateurs de peroxysomes (PPAR- γ) conduisant à une fibrose pulmonaire	10
3.1	AOP n°206.....	10
3.2	Identification des substances induisant potentiellement une fibrose pulmonaire via ce mode d'action à partir de données de dépistage à haut débit	11
3.3	Croisement des données de dépistage à haut débit avec les informations de classification par inhalation (CLP).....	13
5	Conclusion	15

Liste des figures

Figure 1 : Schéma conceptuel des principales caractéristiques d'un AOP (d'après, Ankley et al., 2010).....	7
Figure 2 : Schéma synthétique de l'AOP n°206 « inactivation des récepteurs activés par les proliférateurs de peroxysomes (PPAR- γ) conduisant à une fibrose pulmonaire »	11
Figure 3 : Nombre de substances ayant au moins un résultat positif par étape clé (KE)	13

Liste des tableaux

Tableau 1 : « Adverse Outcome Pathway » en cours de développement pour la fibrose pulmonaire, événements moléculaires initiateurs (MIE) et statut de revu au sein de l'OCDE.....	7
Tableau 2 : Analyse des AOP conduisant à une fibrose pulmonaire dans la base de données AOP-Wiki (les événements moléculaires initiateurs et étapes clés identiques ont été mis en évidence par un code couleur (ex : induction d'une TEM en vert, accumulation de collagène en bleu...))	9
Tableau 3 : Liste des essais ciblant potentiellement des étapes clés de l'AOP n°206 (CompTox 3.0.5).....	11
Tableau 4 : Substances toxique aiguë par inhalation présentent au moins un essai positif dans chacune des étapes clés	14

Résumé

L'inhalation de substances chimiques est une voie majeure d'exposition chez la population générale ou les travailleurs. Cette voie d'exposition peut induire localement des effets réversibles faibles à modérés du type irritation à des effets plus sévères, voire irréversibles, comme une fibrose pulmonaire.

Sauf dans certains cas particuliers, cette voie d'exposition doit systématiquement être prise en compte lors de l'évaluation de la sécurité chimique dans le cadre des réglementations relatives aux produits chimiques, biocides ou phytosanitaires. Des méthodes d'essais *in vivo* chez l'animal sont généralement suivies pour évaluer la toxicité par inhalation mais sont complexes à mettre en œuvre, coûteuses, utilisent un nombre conséquent d'animaux et nécessitent des installations d'essais adaptées. Les données spécifiques à cette voie d'exposition ne sont donc pas toujours disponibles notamment en ce qui concerne les substances à faibles tonnages au sens de REACH pour lesquelles des essais par inhalation ne sont pas réglementairement requis.

Ainsi, afin d'explorer la survenue d'effets loco-régionaux (telle que la fibrose pulmonaire) à la suite d'une exposition par inhalation, l'utilisation de nouvelles approches méthodologiques (NAM) pourrait fournir des éléments de réponse et notamment les Adverse Outcome Pathway (AOP) qui permettent d'intégrer et d'organiser les connaissances toxicologiques (*in silico*, *in vitro*, *in vivo*) pour cet effet. Cette approche couplée à des données de toxicité *in vitro* ou *in silico* ciblant des événements moléculaires initiateurs (Molecular Initiating Event, MIE) ainsi que des étapes clés (Key Event, KE) de l'AOP pourrait permettre de cibler les substances susceptibles d'induire une fibrose pulmonaire.

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

Institut national de l'environnement industriel et des risques, Nouvelles approches méthodologiques (NAM) pour la prise en compte des effets locaux dans l'évaluation des dangers par inhalation : cas de la fibrose pulmonaire Nouvelles approches méthodologiques (NAM) pour la prise en compte des effets locaux dans l'évaluation des dangers par inhalation : cas de la fibrose pulmonaire, Verneuil-en-Halatte : Ineris - 213403 - v1.0, 11/05/2023.

Mots-clés :

Nouvelles approches méthodologiques (NAM) ; Adverse Outcome Pathway (AOP) ; évaluation des dangers toxiques ; inhalation ; fibrose pulmonaire ; *in-vitro* ; *in-silico*

1 Introduction

L'inhalation de substances chimiques est une voie majeure d'exposition chez la population générale ou les travailleurs. Cette voie d'exposition peut induire localement des effets réversibles faibles à modérés du type irritation à des effets plus sévères, voire irréversibles, comme une fibrose pulmonaire. Sauf dans certains cas particuliers, cette voie d'exposition doit systématiquement être prise en compte lors de l'évaluation de la sécurité chimique dans le cadre des réglementations relatives aux produits chimiques, biocides ou phytosanitaires.

Les méthodes d'essais *in vivo* permettant l'évaluation des effets pulmonaires, telles que les lignes directrices OCDE n°403/433/436 pour des expositions aiguës ou les lignes directrices OCDE n°412 ou n°413 pour des expositions plus longues (respectivement 28 et 90 jours) sont complexes à mettre en œuvre, coûteuses, utilisent un nombre conséquent d'animaux et nécessitent des installations d'essais adaptées. Les données spécifiques à cette voie d'exposition ne sont donc pas toujours disponibles notamment en ce qui concerne les substances à faibles tonnages au sens de REACH où des essais par inhalation ne sont pas réglementairement requis. Une extrapolation voie à voie est alors généralement réalisée à partir de la voie orale mais cette approche ne permet pas de prendre en considération les effets loco-régionaux au niveau de l'appareil respiratoire. Des méthodes permettant d'anticiper la survenue probable de ces effets permettrait d'évaluer la faisabilité de cette extrapolation voie à voie. De plus, il est important de souligner ici que la distinction entre effets locaux et systémiques a des conséquences sur le facteur d'extrapolation appliqué sur la construction de valeurs seuils dans certains contextes réglementaires et qu'il est aussi souvent nécessaire de distinguer les effets réversibles des effets irréversibles.

Afin d'explorer la survenue d'effets loco-régionaux à la suite d'une exposition par inhalation, l'utilisation de nouvelles approches méthodologiques (NAM) pourrait fournir des éléments de réponse et permettre de compléter le rapport sur la sécurité chimique. Dans ce cadre, un état des lieux des méthodes d'essais *in vitro* et des modèles *in silico* disponibles ainsi que des approches « Adverse Outcome Pathway (AOP) » a été réalisé en 2020¹.

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 par inhalation et ainsi de mieux prédire la survenue d'effets néfastes. 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). 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 cultivés à l'interface air-liquide (ALI).

Bien que les connaissances toxicologiques sur les effets loco-régionaux au niveau de l'appareil respiratoire et les mécanismes d'action ne soit pas encore complètement définis, plusieurs travaux sur la fibrose pulmonaire ont permis le développement de différents AOP conduisant à cet effet néfaste. La prise en compte de l'ensemble de ces AOP dans une évaluation globale pourrait permettre de fournir de précieuses informations pour l'évaluation de ce type d'effet. Toutefois, il est nécessaire de bien définir au préalable les différents modes d'actions, événements initiateurs et les différentes méthodes *in silico* ou *in vitro* applicables.

Dans ce contexte, une analyse des AOP conduisant à une fibrose pulmonaire a été réalisée (cf. section 2). Cette analyse a débuté par l'identification des différents AOP actuellement en développement sur la fibrose pulmonaire puis par une analyse des événements moléculaires initiateurs (Molecular Initiating Event, MIE) ainsi que des étapes clés (Key Event, KE) du mécanisme d'action de ce type d'effet. Afin de cibler les substances qui pourraient potentiellement induire une fibrose pulmonaire, en amont d'études complémentaires, une approche couplant les AOP et les données de criblage à haut débit de la plateforme CompTox² a ensuite été testée (cf. section 3).

La liste de substances candidates à une étude plus approfondie a ensuite été encore affinée en s'appuyant sur les classifications, selon le règlement CLP, pour filtrer les substances qui disposent, *a priori*, de données expérimentales pour leur toxicité par inhalation et leur caractère irritant.

¹ Ineris (2021) - Méthodes alternatives pour l'évaluation des dangers par inhalation, 200367-2540126

² <https://comptox.epa.gov/dashboard/>

2 Adverse Outcome Pathway (AOP) pour la fibrose pulmonaire

2.1 Définition ^{3,4,5}

La fibrose pulmonaire est une maladie respiratoire potentiellement mortelle définie comme un épaississement ou la cicatrisation du tissu pulmonaire, en raison d'une accumulation excessive de tissu conjonctif fibreux ce qui entraîne une perte de la fonction alvéolaire, une destruction de l'architecture pulmonaire normale et une détresse respiratoire. Ce mécanisme est caractérisé par le développement de la matrice extracellulaire associée à la multiplication des fibroblastes. Les composants de la matrice extracellulaire synthétisés par les fibroblastes sont essentiellement des fibres de collagène de type I et III, mais aussi de la fibronectine et de la laminine.

À la suite d'une altération cellulaire de l'épithélium pulmonaire, l'organisme déclenche un processus inflammatoire marqué par l'afflux de leucocytes et de macrophages dans les tissus. Ces cellules vont libérer des cytokines et des facteurs de croissance dont le principal est le TGF- β (Transforming Growth Factor) qui déclenche la migration et la prolifération des fibroblastes. D'autres mécanismes seraient également à l'origine de fibrose comme l'augmentation locale de peptides vasoactifs telles que l'angiotensine II et l'endothéline. Ces peptides vasoactifs sont capables de se fixer à des récepteurs spécifiques présents à la surface des fibroblastes et ainsi activer les voies de signalisation qui induisent la synthèse des protéines de la matrice.

L'accumulation de tissu conjonctif perturbe les échanges gazeux entre les vaisseaux sanguins et les alvéoles pulmonaires au niveau des foyers fibroblastiques, entraînant des difficultés respiratoires. L'intégrité de la membrane basale est irréversiblement perdue et une fibrose s'installe progressivement.

La fibrose pulmonaire affecte principalement l'interstitium alvéolaire ou la lumière de l'alvéole mais peut également plus rarement toucher les bronchioles, les vaisseaux et la plèvre.

2.2 AOP en développement

Un « Adverse Outcome Pathway » (AOP) (ou « chemin de l'effet adverse ») est une construction conceptuelle qui représente les connaissances disponibles concernant le lien entre un événement déclencheur au niveau moléculaire (MIE) et un effet néfaste sur l'organisme. Les AOP sont généralement constitués d'une série d'événements clés (KE) 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, mécanistiques, 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 1 ci-après présente les principales caractéristiques d'un AOP. Chaque AOP commence par un événement moléculaire où 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 (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 pathologie⁶.

³ Selman M, King TE Jr, Pardo A. Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Prevailing and Evolving Hypotheses about Its Pathogenesis and Implications for Therapy. *Ann Intern Med* 2001;134:136-151

⁴ Koval, M., & Sidhaye, V. (2017). Introduction: The Lung Epithelium. In *Lung Epithelial Biology in the Pathogenesis of Pulmonary Disease* (pp. xiii-xviii).

⁵ Gracey DR, Divertie MB and Brown Jr. AL. Alveolar-Capillary Membrane in Idiopathic Interstitial Pulmonary Fibrosis. 1968. *American Review of Respiratory Disease*, 98(1), pp. 16–21.

⁶ INERIS (2016) - Méthodes et outils émergents d'évaluation des dangers, DRC-16-156196-06372A.

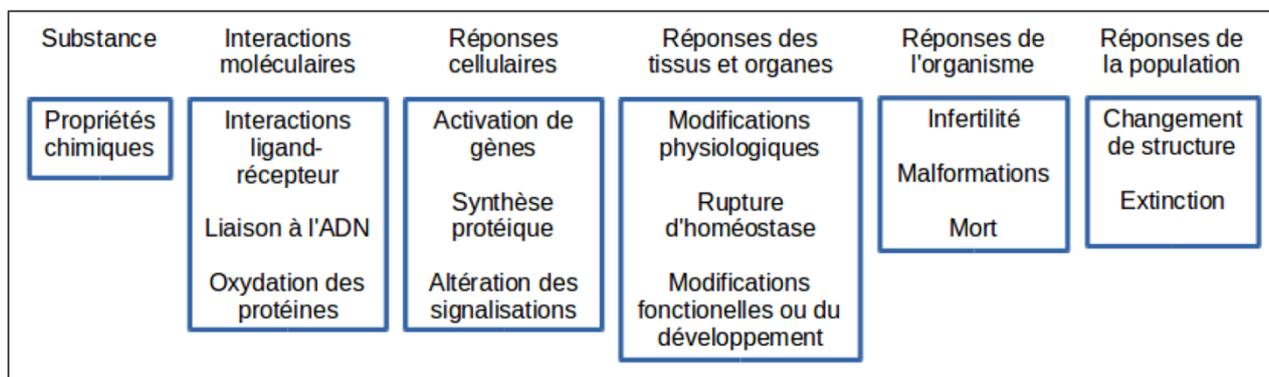


Figure 1 : Schéma conceptuel des principales caractéristiques d'un AOP (d'après, Ankley et al., 2010⁷)

Plusieurs AOP sont en cours de développement dans la base de données collaborative AOP-Wiki dédiée à la détermination et au partage d'« Adverse Outcome Pathway » (<https://aopwiki.org/>).

Le tableau 1 présente les différents AOP en cours de développement conduisant à une fibrose pulmonaire ainsi que les événements moléculaires initiateurs (MIE) et le statut de validation au niveau de l'OCDE.

Tableau 1 : « Adverse Outcome Pathway » en cours de développement pour la fibrose pulmonaire, événements moléculaires initiateurs (MIE) et statut de revu au sein de l'OCDE

AOP ID	Titre	Auteur	MIE [n° identification]	Statut (OCDE)
173	Interaction de la substance avec les composants de la membrane cellulaire conduisant à une fibrose pulmonaire	Sabina Halappanavar	Interaction de la substance avec les composants de la membrane cellulaire [1495]	En cours d'examen à l'OCDE (Extended Advisory Group on Molecular Screening and Toxicogenomics; EAGMST ⁸)
382	Agonisme des récepteurs de l'angiotensine II de type 1 (AT1R) conduisant à une fibrose pulmonaire	Young Jun Kim	Liaison d'un agoniste au récepteur de l'angiotensine II de type 1 (AT1R) [1851]	En développement
319	Inhibition de l'enzyme de conversion de l'angiotensine 2 conduisant à une fibrose pulmonaire	Young Jun Kim	Inhibition de l'enzyme de conversion de l'angiotensine 2 (ACE2) [1740]	En développement
415	Activation des récepteurs d'aryl hydrocarbure (AhR) conduisant à une fibrose pulmonaire via la voie de toxicité de l'Interleukine-6	Dianke Yu	Activation des récepteurs d'aryl hydrocarbure (AhR) [18]	Pas encore considéré

⁷ Ankley GT, Bennett RS, Erickson RJ, Hoff DJ, Hornung MW, Johnson RD, Mount DR, Nichols JW, Russom CL, Schmieder PK, Serrano JA, Tietge JE, Villeneuve DL. Adverse outcome pathways: a conceptual framework to support ecotoxicology research and risk assessment. Environ Toxicol Chem. 2010 Mar;29(3):730-41.

⁸ L'activité du EAGMST relative aux AOP sera reprise par le nouveau Advisory Group on Emerging Science in Chemicals Assessment (ESCA).

AOP ID	Titre	Auteur	MIE [n° identification]	Statut (OCDE)
414	Activation du récepteur aryl hydrocarboné (AhR) conduisant à une fibrose pulmonaire via la voie de toxicité TGF- β	Dianke Yu	Activation des récepteurs d'aryl hydrocarboné (AhR) [18]	Pas encore considéré
241	Activation du facteur de croissance TGF- β 1 conduisant une fibrose pulmonaire	Marvin Martens	Activation du facteur de croissance TGF- β 1 (Transforming Growth Factor Beta) [1468]	Pas encore considéré
206	Inactivation des récepteurs activée par les proliférateurs de peroxyosomes (PPAR- γ) conduisant à une fibrose pulmonaire	Jinhee Choi	Inactivation des récepteurs activée par les proliférateurs de peroxyosomes (PPAR- γ) [1270]	En développement
347	Activation du récepteur Toll-like 4 et inactivation du récepteur activé par les proliférateurs de peroxyosomes (PPAR- γ) conduisant à une fibrose pulmonaire	Seokjoo Yoon	Activation du récepteur Toll-like 4 1270: Inactivation du récepteur activé par les proliférateurs de peroxyosomes (PPAR- γ) [1792]	Pas encore considéré

- : aucune information disponible sur le statut

Le tableau 1 ci-dessus montre que 8 AOP sont actuellement en cours de développement et qu'un seul AOP est suffisamment avancé et détaillé pour passer au stade d'examen par le groupe dédié au sein de l'OCDE (Extended Advisory Group on Molecular Screening and Toxicogenomics; EAGMST). Par ailleurs, chaque AOP débute par un événement moléculaire initiateur différent avec un numéro d'identification unique excepté pour l'activation des récepteurs d'aryl hydrocarboné (AhR) et l'inactivation du récepteur activé par les proliférateurs de peroxyosomes (PPAR- γ) partagé par deux AOP distincts. Ceci souligne la complexité de la fibrose pulmonaire qui peut être induite par plusieurs mécanismes d'action différents.

Afin d'identifier de potentiels recouvrements entre ces différents AOP, les différentes étapes clés (KE) faisant suite à l'évènement moléculaire initiateur (MIE) sont analysées et comparées dans le paragraphe suivant pour chacun des AOP.

2.3 Analyse et comparaison des AOP

Tableau 2 : Analyse des AOP conduisant à une fibrose pulmonaire dans la base de données AOP-Wiki (les évènements moléculaires initiateurs et étapes clés identiques ont été mis en évidence par un code couleur (ex : induction d'une TEM en vert, accumulation de collagène en bleu...))

AOP ID	Titre	Evènement moléculaire initiateur (MIE)	Etapas clés (KE)						Adverse Outcome (AO)
173	Interaction de la substance avec les composants de la membrane cellulaire conduisant à une fibrose pulmonaire	Interaction de la substance avec les composants de la membrane cellulaire [1495]	1496 : Augmentation de la sécrétion des médiateurs proinflammatoires et profibrotiques	1497 : Augmentation du recrutement de cellules inflammatoires	1498 : Perte de l'intégrité de la membrane des capillaires alvéolaires	1499 : Augmentation de l'activation des lymphocytes auxiliaires (helper) de type 2	1500 : Augmentation de la prolifération des fibroblastes et de la différenciation des myofibroblastes	1501 : Dépôt accru de matrice extracellulaire	1458 : Pulmonary fibrosis
382	Agonisme des récepteurs de l'angiotensine II de type 1 (AT1R) conduisant à une fibrose pulmonaire	Liaison d'un agoniste au récepteur de l'angiotensine II de type 1 (AT1R) [1851]	1115 : Augmentation des espèces réactives de l'oxygène (ERO)	1172 : Augmentation de l'activation du facteur de transcription nucléaire NF-kB	1496 : Augmentation de la sécrétion des médiateurs proinflammatoires et profibrotiques	68 : Accumulation de collagène			1276 : Lung fibrosis
319	Inhibition de l'enzyme de conversion de l'angiotensine 2 conduisant à une fibrose pulmonaire	Inhibition de l'enzyme de conversion de l'angiotensine 2 (ACE2) [1740]	1752 : Augmentation de l'angiotensine 2	1743 : Augmentation de l'angiotensine 2 plasmatique	68 : Accumulation de collagène				1276 : Lung fibrosis
415	Activation des récepteurs d'aryl hydrocarbone (AhR) conduisant à une fibrose pulmonaire via la voie de toxicité de l'Interleukine-6	Activation des récepteurs d'aryl hydrocarbone (AhR) [18]	1921 : Altération de l'expression des gènes dépendants de la voie de toxicité de l'Interleukine-6 via le facteur de transcription nucléaire NF-kB	1457 : Induction d'une transition épithélio-mésenchymateuse (TEM)	1501 : Dépôt accru de matrice extracellulaire				1276 : Lung fibrosis
414	Activation des récepteurs d'aryl hydrocarbone (AhR) conduisant à une fibrose pulmonaire via la voie de toxicité TGF-β	Activation des récepteurs d'aryl hydrocarbone (AhR) [18]	1920 : Altération de l'expression des gènes dépendants de la voie de toxicité de TGF-β	1457 : Induction d'une transition épithélio-mésenchymateuse (TEM)	1501 : Dépôt accru de matrice extracellulaire				1276 : Lung fibrosis
241	Activation du facteur de croissance TGF-β1 conduisant une fibrose pulmonaire	Activation du facteur de croissance TGF-β1 (Transforming Growth Factor Beta) [1468]	1469 : Activation de la voie TGF-β	1457 : Induction d'une transition épithélio-mésenchymateuse (TEM)	1456 : Augmentation de la différenciation des fibroblastes	68 : Accumulation de collagène			1458 : Pulmonary fibrosis
206	Inactivation des récepteurs activés par les proliférateurs de peroxyosomes (PPAR-γ) conduisant à une fibrose pulmonaire	Inactivation des récepteurs activés par les proliférateurs de peroxyosomes (PPAR-γ) [1270]	1271 : Activation de la signalisation TGF-β	149 : Augmentation de l'inflammation	1457 : Induction d'une transition épithélio-mésenchymateuse (TEM)	1275 : Dépôt de collagène			1276 : Lung fibrosis
347	Activation du récepteur Toll-like 4 et inactivation du récepteur activé par les proliférateurs de peroxyosomes (PPAR-γ) conduisant à une fibrose pulmonaire	Activation du récepteur Toll-like 4 [1792] Inactivation du récepteur activé par les proliférateurs de peroxyosomes (PPAR-γ) [1270]	1292 : Activation des protéines kinases CNK (c-Jun N-terminal Kinase)	1793 : Activation de la protéine activatrice 1 (AP-1)	1794 : Activation de la peptidyl-prolyl isomérase 1 (Pin1)	1795 : Expression du TGF-β	1283 : Activation de la voie de toxicité TGF-β	1457 : Induction d'une transition épithélio-mésenchymateuse (TEM)	1458 : Pulmonary fibrosis

L'analyse des différents AOP synthétisée dans le tableau 2 met en évidence le fait que les étapes clés finales qui conduisent à une fibrose pulmonaire sont partagées entre les différents AOP. Il s'agit d'une induction de la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) conduisant à un dépôt accru de matrice extracellulaire/accumulation de collagène.

En revanche, comme il l'a été identifié précédemment, les événements moléculaires initiateurs de fibrose pulmonaire semblent différents entre ces différents AOP sauf pour l'activation des récepteurs AhR et l'inactivation des récepteurs PPAR- γ partagés entre deux AOP.

Pour un certain nombre d'AOP présenté dans le tableau 2 (206, 241, 347 et 414), les étapes clés « intermédiaires » correspondent au même mode d'action global médié par la voie de toxicité TGF- β mais le niveau de détail de ces AOP est différent et les événements initiateurs varient. Il semble admis que l'activation de la voie de toxicité TGF- β conduit à une induction d'une transition épithélio-mésenchymateuse (TEM), un dépôt accru de matrice extracellulaire/accumulation de collagène. En revanche, les étapes clés ayant conduit à l'activation de cette voie de toxicité peuvent être liées à différents événements initiateurs tels que l'inactivation des récepteurs PPAR- γ , l'activation des récepteurs AhR ou l'activation du récepteur Toll-like 4. Le lien éventuel entre ces différents événements initiateurs n'est pas clairement identifié bien qu'il semblerait que l'activation des récepteurs AhR induise une inhibition de la fonction des PPAR- γ ⁹.

Enfin, deux AOP (319, 382) sont basés sur l'action de l'angiotensine II qui est un peptide vasoactif qui pourrait agir sur des récepteurs présents à la surface des fibroblastes, activant ainsi des voies de signalisation qui aboutissent à la synthèse des protéines de la matrice.

3 Etude de cas : Inactivation des récepteurs activés par les proliférateurs de peroxyosomes (PPAR- γ) conduisant à une fibrose pulmonaire

Afin de cibler les substances qui pourraient potentiellement induire une fibrose pulmonaire, en amont d'études complémentaires, une approche couplant les AOP et les données de criblage à haut débit de la plateforme CompTox a été testée. Ce travail a été réalisé pour l'AOP 206 « Inactivation des récepteurs activés par les proliférateurs de peroxyosomes (PPAR- γ) conduisant à une fibrose pulmonaire » car celui-ci apparaît comme l'un des AOP ayant un stade de développement plus avancé.

3.1 AOP n°206

L'AOP n°206 « Inactivation des récepteurs activés par les proliférateurs de peroxyosomes (PPAR- γ) conduisant à une fibrose pulmonaire » a été décrit dans la section 2. La figure 2 synthétise l'évènement moléculaire initiateur (MIE) et les étapes clés induisant à la fibrose pulmonaire.

⁹ Khazaal AQ, Jaeger CD, Bottum KM, Tischkau SA. Environmental factors act through aryl hydrocarbon receptor activation and circadian rhythm disruption to regulate energy metabolism. *Journal of Receptor, Ligand and Channel Research*. 2018;10:13-24

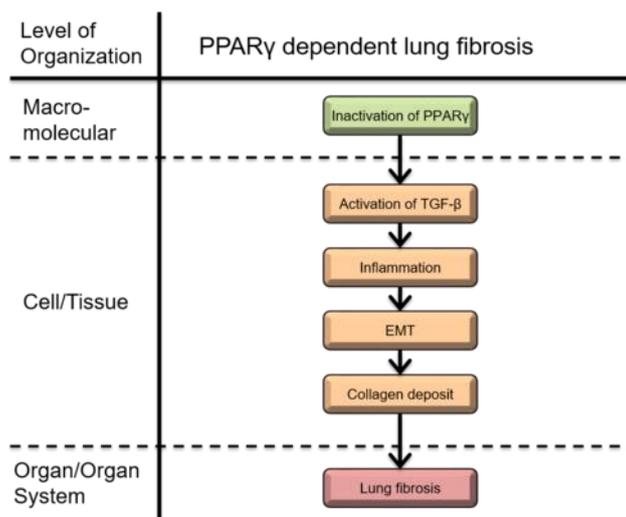


Figure 2 : Schéma synthétique de l'AOP n°206 « inactivation des récepteurs activés par les proliférateurs de peroxyssomes (PPAR- γ) conduisant à une fibrose pulmonaire »¹⁰
 Inactivation des récepteurs activés par les proliférateurs de peroxyssomes (PPAR- γ) ; Activation de la TGF- β ; Augmentation de l'inflammation ; Induction d'une transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) ; Dépôt de Collagène ; Fibrose pulmonaire.

3.2 Identification des substances induisant potentiellement une fibrose pulmonaire via ce mode d'action à partir de données de dépistage à haut débit

La plateforme CompTox Chemicals est une base de données en ligne librement accessible développée par l'Agence de protection de l'environnement des Etats-Unis (US EPA). Cette plateforme donne accès à plusieurs types de données, notamment les propriétés physicochimiques, le devenir et le transport dans l'environnement, l'exposition, l'utilisation, la toxicité *in vivo* et les essais biologiques *in vitro*. La dernière version de cette plateforme (version 3.0.5) contient des données pour plus de 875 000 substances chimiques et intègre les dernières données générées par le programme de dépistage à haut débit Toxicity Forecaster (ToxCast)¹¹ de l'US-EPA. Ce programme intègre notamment des essais de dépistage *in vitro* à moyen et haut débit sur des cellules vivantes, des protéines isolées ou d'autres molécules biologiques.

Dans le cadre de cette note, cette plateforme a été utilisée afin d'identifier les essais permettant de cibler l'évènement moléculaire initiateur (MIE) et chacune des étapes clés induisant à la fibrose pulmonaire dans l'AOP n°206. Pour ce faire, la liste des essais disponibles dans cette plateforme a été analysée et les essais qui semblent pertinents au regard de l'AOP n°206 sont rapportés dans le tableau 3.

Tableau 3 : Liste des essais ciblant potentiellement des étapes clés de l'AOP n°206 (CompTox 3.0.5)

PPAR γ , récepteur nucléaire, non-stéroïdien	
ATG_PPARGa_TRANS_up	https://comptox.epa.gov/dashboard/assay-endpoints/ATG_PPARGa_TRANS_up
TOX21_PPARG_BLA_Agonist_ratio	https://comptox.epa.gov/dashboard/assay-endpoints/TOX21_PPARG_BLA_Agonist_ratio
TOX21_PPARG_BLA_antagonist_ratio	https://comptox.epa.gov/dashboard/assay-endpoints/TOX21_PPARG_BLA_antagonist_ratio
NVS_NR_hPPARG	https://comptox.epa.gov/dashboard/assay-endpoints/NVS_NR_hPPARG

¹⁰ <https://aopwiki.org/aops/206>

¹¹ <https://www.epa.gov/chemical-research/toxicity-forecasting>

TGF-β, facteur de croissance transformant β	
ATG_TGFb_CIS_dn	https://comptox.epa.gov/dashboard/assay-endpoints/ATG_TGFb_CIS_dn
ATG_TGFb_CIS_up	https://comptox.epa.gov/dashboard/assay-endpoints/ATG_TGFb_CIS_up
BSK_BE3C_TGFb1_down	https://comptox.epa.gov/dashboard/assay-endpoints/BSK_BE3C_TGFb1_down
BSK_KF3CT_TGFb1_down	https://comptox.epa.gov/dashboard/assay-endpoints/BSK_KF3CT_TGFb1_down
BSK_KF3CT_TGFb1_up	https://comptox.epa.gov/dashboard/assay-endpoints/BSK_KF3CT_TGFb1_up
ATG_NF_kB_CIS_dn	https://comptox.epa.gov/dashboard/assay-endpoints/ATG_NF_kB_CIS_dn
ATG_NF_kB_CIS_up	https://comptox.epa.gov/dashboard/assay-endpoints/ATG_NF_kB_CIS_up
TOX21_NFkB_BLA_agonist_ratio	https://comptox.epa.gov/dashboard/assay-endpoints/TOX21_NFkB_BLA_agonist_ratio
Inflammation, cytokine, interleukins	
BSK_BE3C_IL1a_down	https://comptox.epa.gov/dashboard/assay-endpoints/BSK_BE3C_IL1a_down
BSK_BE3C_IL1a_up	https://comptox.epa.gov/dashboard/assay-endpoints/BSK_BE3C_IL1a_up
BSK_KF3CT_IL1a_down	https://comptox.epa.gov/dashboard/assay-endpoints/BSK_KF3CT_IL1a_down
BSK_KF3CT_IL1a_up	https://comptox.epa.gov/dashboard/assay-endpoints/BSK_KF3CT_IL1a_up
BSK_LPS_IL1a_down	https://comptox.epa.gov/dashboard/assay-endpoints/BSK_LPS_IL1a_down
BSK_LPS_IL1a_up	https://comptox.epa.gov/dashboard/assay-endpoints/BSK_LPS_IL1a_up
BSK_CASM3C_IL6_down	https://comptox.epa.gov/dashboard/assay-endpoints/BSK_CASM3C_IL6_down
BSK_CASM3C_IL6_up	https://comptox.epa.gov/dashboard/assay-endpoints/BSK_CASM3C_IL6_up
Inflammation, Facteur de Nécrose Tumorale α	
BSK_LPS_TNFa_down	https://comptox.epa.gov/dashboard/assay-endpoints/BSK_LPS_TNFa_down
BSK_LPS_TNFa_up	https://comptox.epa.gov/dashboard/assay-endpoints/BSK_LPS_TNFa_up
EMT, protéase, métalloprotéases matricielles	
NVS_ENZ_hMMP2	https://comptox.epa.gov/dashboard/assay-endpoints/NVS_ENZ_hMMP2
NVS_ENZ_hMMP9	https://comptox.epa.gov/dashboard/assay-endpoints/NVS_ENZ_hMMP9
BSK_KF3CT_MMP9_down	https://comptox.epa.gov/dashboard/assay-endpoints/BSK_KF3CT_MMP9_down

L'ensemble des résultats de ces essais ont été analysés et compilés dans un tableur Excel afin d'identifier les substances pour lesquelles des résultats positifs ont été rapportés. Au total, 2 075 substances ont été identifiées. Il est important de signaler que l'ensemble des essais du tableau 3 n'ont pas été réalisés pour chacune des 2 075 substances. La compilation de ces résultats a permis d'identifier les substances pour lesquelles au moins un essai positif par étape clé a été rapporté. Les étapes clés ou évènements initiateurs considérés sont les suivants (cf. tableau 3) :

- Inactivation des récepteurs activés par les proliférateurs de peroxysomes (PPAR- γ) PPAR γ , récepteur nucléaire, non-stéroïdien,
- Activation of TGF- β signaling TGF- β , facteur de croissance transformant β ,
- Inflammation, cytokines, interleukines,
- Inflammation, facteur de Nécrose Tumorale α ,
- Induction d'une transition épithélio-mésenchymateuse EMT, protéase, métalloprotéases matricielles.

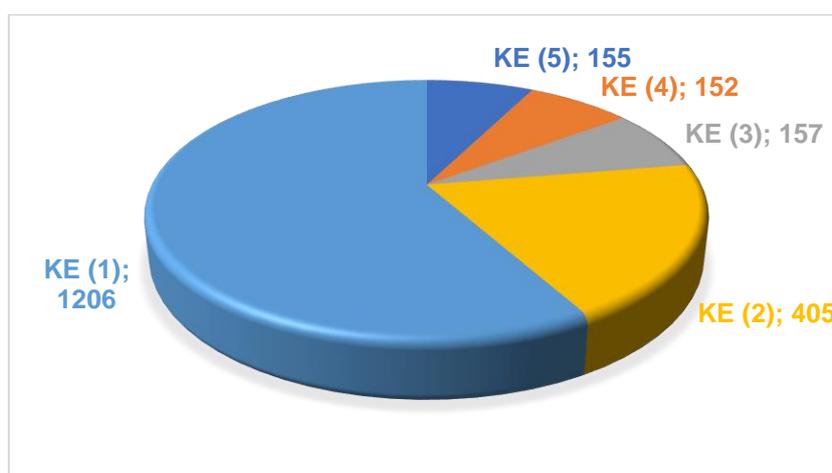


Figure 3 : Nombre de substances ayant au moins un résultat positif par étape clé (KE)

La figure 3 montre le nombre de substances ayant au moins un essai positif pour une étape clé, et le nombre d'étapes clés partagées. Sur la base de ces résultats, 155 substances présentent au moins un essai positif dans chacune des étapes clés précédemment citées ; ce qui indiquerait que la substance soit potentiellement susceptible d'induire une fibrose pulmonaire.

3.3 Croisement des données de dépistage à haut débit avec les informations de classification par inhalation (CLP)

Le mode d'action de la fibrose pulmonaire décrit dans l'AOP n°206 n'est pas spécifique à l'appareil respiratoire. En effet, ce mode d'action peut s'exercer au niveau de plusieurs organes. Ainsi, afin d'affiner le nombre de substances potentielles qui pourraient faire l'objet d'études complémentaires, la classification harmonisée selon le règlement CLP de ces 155 substances a été analysée afin de retenir les substances toxiques aiguës par inhalation (mentions de dangers H330, H331 et H332). Pour ces substances, les composés classés irritants pour les voies respiratoires (H335) et la peau (H314, H315), effets induisant potentiellement des lésions tissulaires précurseurs à l'apparition d'une fibrose pulmonaire, ont également été renseignées. Les 17 substances du tableau 4 ont ainsi été identifiées.

Tableau 4 : Substances toxique aiguë par inhalation présentent au moins un essai positif dans chacune des étapes clés

Substance	CAS	Toxicité aiguë par inhalation	Irritation/Corrosion
2-(Thiocyanométhylthio)benzothiazole (TCMTB)	21564-17-0	H330	H315
3-Iodo-2-propynyl-N-butylcarbamate (IPBC)	55406-53-6	H331	
Bis(diméthylaminothiocarbonyle) disulfure	137-26-8	H332	H315
Captane	133-06-2	H331	
Chlorothalonil	1897-45-6	H330	H335
Chlorophène	120-32-1	H332	H315
Dinocap	39300-45-3	H332	H315
Emamectine (benzoate)	155569-91-8	H331	
Fluazinam	79622-59-6	H332	
Glutaraldéhyde	111-30-8	H330	H314 ; H335
Hexachlorocyclopentadiène	77-47-4	H330	H314
Méthylène bis(thiocyanate)	6317-18-6	H330	H314
Octhilinone	26530-20-1	H330	H314
Pyridabène	96489-71-3	H331	
Tebufenpyrad	119168-77-3	H332	
Triphenyltin hydroxide	76-87-9	H330	H315 ; H335
Ziram	137-30-4	H330	H335

H330 : Mortel par inhalation ; H331 : Toxique par inhalation ; H332 : Nocif par inhalation ; H314 : Provoque des brûlures de la peau et de graves lésions des yeux ; H315 : Provoque une irritation cutanée ; H335 : Peut irriter les voies respiratoires

Par conséquent, sur la base des résultats des essais de dépistage à haut débit de la plateforme CompTox ainsi que des événements clés définis dans l'AOP n°2026, les 17 substances présentées dans le tableau 4 seraient candidates pour une étude plus poussée sur leur potentiel à induire une fibrose pulmonaire et plus spécialement les substances également classées irritantes. La majorité de ces substances sont des biocides. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que le filtre destiné à cibler les substances toxiques par inhalation est basé sur la classification harmonisée. En effet, l'évaluation de la toxicité aiguë par inhalation est une exigence réglementaire pour les biocides alors que dans le cadre de REACH, seules les substances avec un tonnage annuel important sont concernées.

5 Conclusion

L'analyse des différents AOP en cours de développement sur la fibrose pulmonaire montre que les étapes clés finales qui conduisent à une fibrose pulmonaire sont partagées entre les différents AOP. Il s'agit de l'induction d'une transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) qui conduit à un dépôt accru de matrice extracellulaire/accumulation de collagène.

Bien que les événements moléculaires initiateurs renseignés dans les AOP identifiés soient différents, il semble au vu des étapes clés « intermédiaires » que ces AOP soient étroitement liés. En effet, il est possible de distinguer deux étapes clés « intermédiaires » essentielles qui sont l'activation de la voie de toxicité TGF- β dans les AOP 206, 241, 347 et 414, et la libération l'angiotensine II dans les AOP 319 et 382. Ces éléments montrent l'importance de continuer ces développements d'AOP afin de mieux comprendre les mécanismes d'actions et de renforcer les collaborations entre les différents acteurs afin d'identifier les liens existants entre les différents mécanismes.

En l'état actuel, les travaux sur ces AOP ne sont encore pas assez aboutis pour conduire à une utilisation réglementaire. Ils sont toutefois un outil précieux pour l'identification et la sélection d'outils (*in-vitro* ou *in silico*) visant à explorer la survenue de fibrose pulmonaire en ciblant des étapes clés précises telles que la liaison de composés à certains récepteurs (PPAR- γ , AhR, Toll-like 4), le dosage de médiateurs pro-inflammatoires et pro-fibrotiques ou encore de peptide vasoactif (angiotensine II).

Afin d'évaluer la pertinence de cette approche, une recherche de données bibliographiques de toxicité sur ces substances pourra être réalisée pour identifier la potentielle survenue de fibrose pulmonaire. Par ailleurs, elle pourrait également être testée sur d'autres AOP ou encore sur d'autres effets afin d'en évaluer l'applicabilité. Comme signalé précédemment, il s'agit ici de filtrer des substances susceptibles d'induire un effet donné sur la base du mode d'action et des essais de dépistage haut débit mais en aucun cas d'affirmer la survenue d'un effet donné.

Des approches plus complexes à mettre œuvre, utilisant des méthodes de « deep learning » et de réseaux neuronaux, peuvent également être utilisés afin de mieux cibler les substances comme cela a été réalisé par Jeong *et al.* (2019)¹². Ces techniques demandent toutefois des compétences avancées en informatique et programmation ainsi qu'un jeu de données initial suffisant pour faciliter l'apprentissage.

¹² Jeong *et al.*, 2019. Development of Adverse Outcome Pathway for PPAR γ Antagonism Leading to Pulmonary Fibrosis and Chemical Selection for Its Validation: ToxCast Database and a Deep Learning Artificial Neural Network Model-Based Approach. *Chem. Res. Toxicol.* 2019, 32, 1212–1222.

