HAL
open science

Caractérisation des dangers des contaminants alimentaires : ce qui change ; Conséquences pour la recherche et l'évaluation

Jean Pierre J. P. Cravedi

▶ **To cite this version:**

Jean Pierre J. P. Cravedi. Caractérisation des dangers des contaminants alimentaires : ce qui change ; Conséquences pour la recherche et l'évaluation. Carrefours de l'Innovation Agronomique (CIAG), Dec 2018, Paris, France. hal-02733622

HAL Id: hal-02733622

https://hal.inrae.fr/hal-02733622

Submitted on 2 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

CARACTÉRISATION DES DANGERS DES CONTAMINANTS ALIMENTAIRES : CE QUI CHANGE ; CONSÉQUENCES POUR LA RECHERCHE ET L'ÉVALUATION

Cravedi Jean-Pierre [1]

[1] UMR 1331 Toxalim, INRA, Université de Toulouse, ENVT, INP Toulouse.
180, chemin de Tournefeuille, BP 93173, F-31027 Toulouse Cedex 3

Correspondance : jean-pierre.cravedi@inra.fr

RÉSUMÉ

En dépit de progrès majeurs en matière de biologie moléculaire et cellulaire, de biologie des systèmes et de bioinformatique, la toxicologie appliquée à l'évaluation du risque des substances chimiques et des toxines n'a pas beaucoup évolué au cours des dernières décennies. Un changement conceptuel et méthodologique radical doit émerger si l'on veut pouvoir tester à moindre coût et rapidement un grand nombre de produits chimiques, seuls ou en mélanges. Le développement et la mise en application d'outils *in vitro*, recommandés par les instances règlementaires internationales, sont des étapes essentielles de ces changements.

Les toxicologues doivent désormais s'appuyer sur la biologie des systèmes, l'intégration de données multi-omiques et les bases de données publiques pour combler l'écart entre les événements moléculaires initialement repérés et les effets néfastes à l'échelle d'un système biologique, puis d'un individu. Outre les données de protéomique et de transcriptomique capables d'appréhender les changements moléculaires et cellulaires, les approches métabolomiques renseignent sur les niveaux de métabolites ou les flux de métabolites altérés par les toxiques et peuvent guider le choix de biomarqueurs précoces spécifiques et sensibles pour le développement ultérieur de dépistages haut débit. L'utilisation des données massives et leur modélisation devraient permettre de mieux prédire les liens entre exposition aux substances toxiques et états physiopathologiques.
Mots-clés : Contaminants alimentaires, Toxicité, Risque, Approches globales, Santé.

ABSTRACT: Hazard characterization of food contaminants: what is changing; consequences for research and risk assessment

Despite major advances in molecular and cellular biology, systems biology and bioinformatics, toxicology applied to the risk assessment of chemicals and toxins has not changed significantly during the last decades. A radical conceptual and methodological change must emerge if a large number of chemicals or their combinations in mixtures need to be tested at a lower cost and quickly. The development and implementation of *in vitro* tools, recommended by international regulatory authorities, are essential steps in these changes.

Toxicologists must now rely on the potential of systems biology, multiomics data integration and public databases to bridge the gap between initial molecular events and adverse effects at the level of a biological system and then an individual. In addition to proteomics and transcriptomics data capable of informing about potential changes in cell function and infrastructure, metabolomics approaches provide information about metabolite levels or flows of metabolites altered by toxic substances and can guide the selection of specific and sensitive early biomarkers for the subsequent

development of high throughput screening. The analysis of big data and their modelling should make it possible to better predict the links between exposure to toxic substances and physiopathological conditions.
Keywords: Food contaminants, Toxicity, Risk, Global approaches, Health

INTRODUCTION

L'évaluation du risque chimique en sécurité sanitaire des aliments comprend plusieurs étapes qui se rapportent d'une part au danger que présentent les substances faisant l'objet de l'évaluation et d'autre part au degré d'exposition du consommateur à ces substances; le danger ne devenant un risque qu'à la condition qu'une exposition ait lieu. L'étape de caractérisation du danger telle qu'elle a été définie par le Codex Alimentarius (2003) pour les agents chimiques présents dans l'alimentation consiste à évaluer la nature des effets adverses de ces agents pour la santé et à déterminer la relation dose-réponse. Ce processus repose jusqu'à présent sur des études toxicologiques qui doivent permettre de mettre en évidence un effet toxique sur tous les organes, un éventuel effet cancérigène (mutagène ou non), un risque de malformation des fœtus, ou encore une atteinte de la reproduction. Les données toxicologiques dont dispose l'évaluateur du risque émanent d'études de toxicité aiguë, sub-chronique, ou chronique, établies à plusieurs doses et menées pour l'essentiel chez le rongeur. Bien plus rarement des travaux plus spécifiques, destinés à investiguer le caractère neurotoxique, immunotoxique, ou *métabolique* de la substance, ou encore des travaux destinés à déterminer son mécanisme d'action peuvent figurer au dossier. Ces informations sont généralement complétées par des données toxicocinétiques, c'est-à-dire relatives à l'absorption, la distribution tissulaire, la transformation et l'élimination de la substance. Sur la base de l'ensemble de ces données scientifiques et en tenant compte des incertitudes propres aux extrapolations de l'animal à l'Homme et aux différences interindividuelles, des groupes d'experts compétents établissent des valeurs toxicologiques de référence. L'évaluation des risques au niveau de la population générale est réalisée en comparant la VTR aux données d'exposition humaine dont on dispose. Parmi les valeurs toxicologiques de référence couramment utilisées : la dose journalière admissible (DJA) ou la dose journalière tolérable (DJT) pour les agents qui ne sont pas intentionnellement ajoutés. La DJA ou la DJT constituent une estimation de la quantité d'une substance présente dans un aliment ou dans l'eau de boisson, exprimée en fonction du poids corporel, qui peut être ingérée quotidiennement pendant toute la durée d'une vie sans risque appréciable.

Cette démarche présente de nombreuses limites. Tout d'abord, la pertinence de ces études animales pour évaluer des risques pour des populations humaines hétérogènes et le plus souvent exposées à des concentrations beaucoup plus faibles d'agents présumés toxiques est quelquefois remise en question. Par ailleurs, ces études sont coûteuses et longues : par exemple un test de cancérogénicité chez le rat, selon la ligne directrice de l'OCDE 451 coute plus de 700 000 euros et dure 2 ans et un test de reprotoxicité peut coûter plus d'un million d'euros (Meigs et al., 2018). L'association européenne de protection des plantes (European Crop Protection Association, ECPA) estime qu'une fois un produit phytosanitaire découvert, sa mise sur le marché nécessite plus de 10 ans de travaux et les études de toxicité (environ 30 études expérimentales, essentiellement chez l'animal) coûtent environ 20 millions d'euros (ECPA, 2013). Ce coût constitue un frein à la mise en œuvre des tests et a pour conséquence un déficit, voire une absence totale de données pour plusieurs milliers de substances auxquelles nous sommes susceptibles d'être exposés.

Au 31 mai 2018, dernière échéance d'enregistrement des substances chimiques dans l'Union Européenne, le règlement REACH a permis l'enregistrement de 20 000 substances fabriquées ou importées à plus d'une tonne par an (ECHA, 2018), mais plusieurs estimations indiquent que nous sommes exposés à plus de 100 000 substances chimiques (Geiss et al., 1992 ; Carpenter et Bushkin-Bedient, 2013) auxquelles s'ajoutent les nombreuses toxines et les substances néoformées.

Outre le fait de ne pas être adaptés aux défis posés par le nombre croissant de substances chimiques mises sur le marché, il est également fait reproche aux tests toxicologiques en usage d'avoir recours à un nombre très élevé d'animaux, se heurtant ainsi aux recommandations européennes et à la pression sociétale. Dans une publication récente, Meigs et al. (2018) évaluent à 11,5 millions le nombre d'animaux utilisés en 2011 à des fins scientifiques en Europe dont environ 500 000 pour des études toxicologiques. Signalons que le parlement européen, dans sa directive 2010/63/UE relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques prévoit l'application de la règle des 3R. Cette règle prévoit (1) de remplacer l'animal vivant par des modèles *in vitro* (per exemple des cellules) ou in silico (recours à la bioinformatique), (2) de réduire le nombre d'animaux par le rejet d'études non indispensables ou la limitation des répétitions inutiles, (3) de raffiner les méthodes expérimentales par le choix réfléchi des modèles et des protocoles, l'enrichissement du milieu de vie des animaux, et la formation du personnel.

Enfin, la plupart des tests sur lesquels s'appuie la toxicologie règlementaire fournissent peu d'informations sur les modes et les mécanismes d'action, qui sont pourtant essentiels à la compréhension des différences interspécifiques et interindividuelles de toxicité.

1. Le rapport du « National Research Council » (NRC) américain : une vision en rupture avec les approches toxicologiques traditionnelles

Dès 2007, le rapport « Toxicity testing in the 21st century : a vision and a strategy » publié par le National Research Council aux Etats Unis (NRC, 2007), montrait pour la première fois comment les progrès scientifiques récents en matière de toxicologie pouvaient être utilisés afin d'améliorer l'évaluation du danger des agents chimiques pour la santé. La proposition consiste à abandonner progressivement les observations recueillies chez l'animal au profit d'approches *in vitro* permettant d'examiner comment ces agents perturbent les voies de réponse cellulaire (appelées voies de toxicité) capables d'entraîner des effets néfastes sur la santé humaine. Parmi les méthodologies à privilégier figurent le criblage *in vitro* à moyen et haut débit, la toxicologie computationnelle, la biologie des systèmes, la modélisation. Cette nouvelle approche, largement menée *in vitro* à partir de cellules humaines, pourrait être plus représentative de la biologie humaine que les extrapolations animal-homme sur lesquelles sont jusque-là basées les évaluations de risque. Le rapport du NRC souligne également que les études expérimentales utilisent souvent des doses bien plus élevées que celles auxquelles l'Homme peut être exposé, ce qui peut rendre incertaine l'interprétation des résultats. Il recommande d'effectuer des essais de toxicité à des doses représentatives de l'exposition de la population et donc de mieux connaître celle-ci.

Ce rapport a servi de socle au plan stratégique de l'agence américaine de protection de l'environnement (US-EPA) pour l'évaluation de la toxicité des agents chimiques et à la mise en place du consortium américain Tox21, constitué, outre l'US-EPA du National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS), du National Toxicology Program (NTP), du National Institute of Health (NIH) et de la Food and Drug Administration (FDA). Ce consortium a pour objectif de promouvoir le développement de modèles et de tests capables de mieux prédire la dangerosité des substances

et de coordonner le programme ToxCast, actuellement en cours, qui ambitionne de cribler les voies de toxicité de plus de 10 000 composés (dont des mélanges) à partir de plusieurs modèles cellulaires. Parmi les priorités de l'initiative Tox21 figurent : (1) une meilleure compréhension des processus et des voies biologiques clefs de l'organisme, (2) le développement d'essais à haut débit (à l'aide de systèmes *in vitro* ou d'animaux phylogénétiquement inférieurs) capables de déterminer comment ces voies et processus sont affectés par les produits chimiques, (3) de développer des méthodes prédictives basées sur la modélisation mathématique afin prévoir le danger que présente un produit chimique, (4) de prioriser les produits chimiques nécessitant une évaluations toxicologique approfondie.

Le consortium Tox21 a permis de développer, de valider et d'optimisé plus de 100 essais *in vitro* basés sur des cellules humaines en utilisant un criblage quantitatif à haut débit. Huang et al. (2016) ont ainsi produit 50 millions de données sur la perturbation endocrinienne et le stress, obtenues à partir d'environ 10 000 produits chimiques. Les auteurs ont été en mesure de regrouper les composés par structure et par profil d'activité et ont montré que les données recueillies *in vitro* offraient une meilleure prédictibilité de la toxicité chez l'Homme que ne le permettaient les données recueillies chez l'animal. Ils ont toutefois précisé que les données haut débit obtenues jusqu'à présent étaient surtout intéressantes pour repérer les substances qui nécessitaient des études approfondies.

Dans la logique du rapport du NRC de 2007, du plan stratégique de l'EPA, de Tox21 et de ToxCast, le gouvernement américain a lancé en 2011 le programme « Human Toxome » visant à déterminer *in vitro* toutes les voies biochimiques impliquées dans les réactions des cellules aux substances toxiques (Hartung et McBride, 2011 ; Bouhifd et al., 2015 ; Fasani et al., 2016). Ce programme de recherches entend utiliser les approches globales dites « omiques » (principalement transcriptomique, et métabolomique) à partir de systèmes cellulaires pour cartographier et annoter les voies toxicologiques activées par une exposition aux substances chimiques, puis de développer les outils informatiques permettant l'analyse, l'intégration et la visualisation des données provenant des différentes plateformes et enfin de mettre en place une base de données sur ces voies toxicologiques.

2. L'apport de la biologie des systèmes et de la métabolomique en particulier, à la caractérisation du danger des substances chimiques.

Le développement de la biologie moléculaire dans les années 1980-2000, a été suivi, au cours des deux dernières décennies de l'automatisation et de la miniaturisation des méthodes d'analyse des réactions moléculaires et, parallèlement, de progrès notoires en bio-informatique. Ces sauts conceptuels et méthodologiques ont donné lieu à l'accumulation de millions de données relatives aux interactions dynamiques entre composants d'un système vivant. En matière de toxicologie, dans un nombre croissant de cas, il est devenu possible de comprendre et de modéliser les réactions entre système vivant et substance(s) toxique(s). Si la biologie des systèmes a commencé avec l'étude des gènes, et des protéines d'un organisme, pour quantifier les changements dans le génome, le transcriptome (ensemble des ARN messagers issus de l'expression d'une partie d'un génome) ou le protéome (ensemble des protéines présentes dans un organisme, un tissu ou une cellule), c'est l'étude du métabolome (ou métabolomique) qui offre la réponse la plus intégrée à une perturbation donnée.

La métabolomique a été définie par Nicholson et al. (1999) comme « la mesure quantitative de la réponse métabolique dynamique d'un organisme vivant à un stimulus physiologique, pathologique, ou à une modification génétique ». La réponse est captée par une empreinte métabolique (signa-

ture biologique ou « métabolome ») qui correspond à la mesure, généralement en spectrométrie de masse ou en résonnance magnétique nucléaire (RMN) des métabolites de faible poids moléculaire (Figure 1). Dans une certaine mesure, ces métabolites sont définis par la transcription des gènes et les changements de protéines, ce qui en fait la science « omique » la plus proche du phénotype et la plus intéressante pour la toxicologie (Robertson, 2005 ; Bouhifd et al., 2013, 2014 ; Ramirez et al., 2013 ; Bonvallot et al., 2018).

La métabolomique a été principalement utilisée pour des études de toxicité *in vivo* basées sur des profilages métaboliques réalisés à partir d'échantillons de plasma, d'urine ou de tissu (Cabaton et al., 2013 ; Tremblay-Franco et al., 2015). La publication récente de plusieurs études de toxicité *in vitro* reposant sur la modification du métabolome cellulaire montre que la métabolomique est très bien adaptée aux études de caractérisation du danger des contaminants chimiques à faibles doses (Cabaton et al., 2018 ; Ramirez et al., 2018). Certaines études ont été en mesure de mettre en évidence des relations doses-effets et d'identifier des biomarqueurs de toxicité (Cabaton et al., 2018). Les travaux de García- Cañaveras et ses collaborateurs (2016) effectués sur la lignée hépatocytaire humaine HepG2, ont permis de classer et d'étudier la toxicité hépatique de diverses substances en fonction de leur mode d'action.

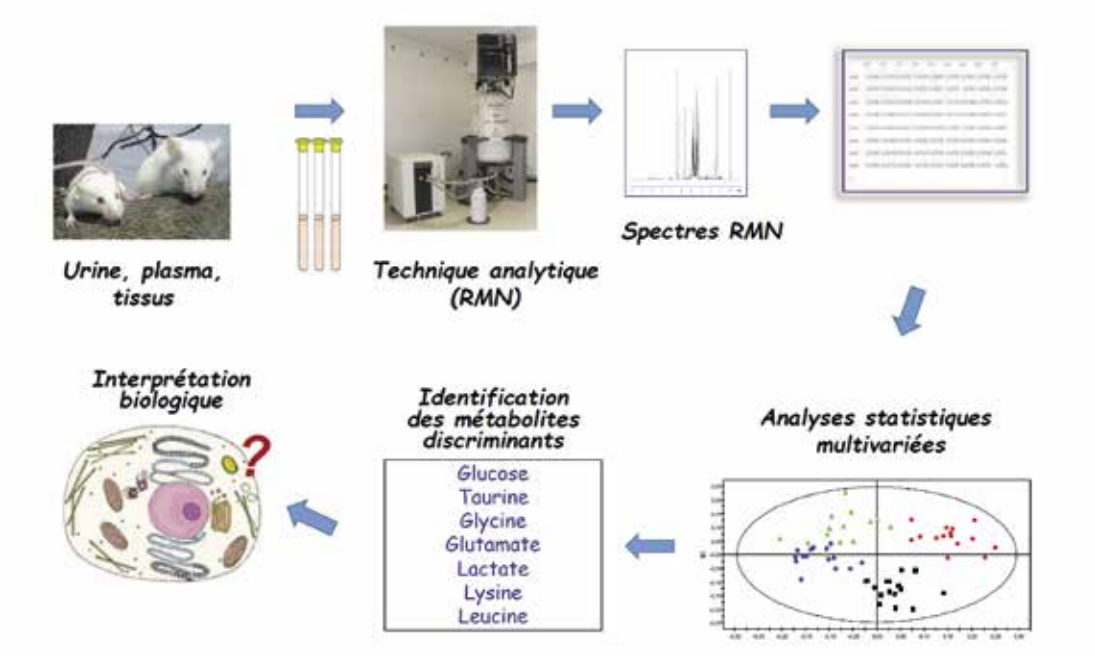

Figure 1 : Descriptif de l'approche métabolomique. La démarche présentée ici repose sur une analyse RMN. Le même processus s'applique pour une analyse en spectrométrie de masse.

Les réponses métabolomiques obtenues dans cette étude ont également abouti à l'acquisition de nouvelles connaissances sur les évènements moléculaires sous-jacents à l'hépatotoxicité. Bien que de l'avis même des auteurs, les résultats recueillis demandent à être confirmés, les données produites par ce type d'étude suggèrent qu'à brève échéance, ces outils pourront être utilisés dans le criblage des agents chimiques pour en évaluer la toxicité.

3. Le concept « d'adverse outcome pathway »

Si l'on connaissait parfaitement les étapes successives des mécanismes biologiques qui établissent le lien entre l'exposition aux substances chimiques et la survenue d'une pathologie, la caractérisation du danger pourrait alors se baser non plus sur l'identification d'un effet néfaste observé chez l'animal à des niveaux de dose élevés mais à partir de l'étude de ces voies biologiques sur des modèles expérimentaux *in vitro*. Les chemins de l'effet adverse ou « adverse outcome pathway » (AOP) est un concept élaboré afin d'améliorer la compréhension de la toxicité des substances chimiques. Les approches intégrées en matière d'essai et d'évaluation (IATA) sont quant à elles des méthodes destinées à être mise en oeuvre en pratique afin de guider l'évaluateur sur la stratégie à appliquer pour évaluer une substance chimique.

L'OCDE a produit depuis 2013 plusieurs documents guides sur le concept d'AOP visant à soutenir une évaluation des risques fondée sur le raisonnement mécanistique (OECD, 2017). Il s'agit d'une séquence logique d'évènement biologiques causalement liés, faisant suite à l'exposition à un produit chimique et ayant pour conséquence finale un effet nocif sur la santé (Figure 2). Dans ce cas, les évènements précoces qui sont prédictifs d'effets adverses suffisent à la caractérisation du danger et peuvent être mesurés dans avoir recours à des expérimentations *in vivo*.

L'événement moléculaire initiateur (MIE ou molecular initiating event) est le premier élément d'une série d'événements clés (KEs ou key events) reliés entre eux par des relations ou key event relationships (KERs). L'effet néfaste est ensuite défini comme le résultat de l'événement moléculaire initiateur et des événements clés. Cet effet néfaste peut être décrit au niveau individuel ou au niveau populationnel (Thybaud et Troise, 2016).

Landesmann (2016) a par exemple décrit la chaine d'évènement initiée par l'alkylation des protéines et conduisant à la fibrose hépatique. La fibrose hépatique chez l'Homme est associée à l'exposition à des produits chimiques tels que la diméthyl nitrosamine. C'est un processus à long terme dans lequel l'inflammation, la destruction et la réparation des tissus se produisent simultanément, avec une production soutenue de facteurs de croissance et de cytokines. Ces phénomènes proviennent d'une interaction complexe entre divers types de cellules hépatiques, différents récepteurs et voies de signalisation qui entraîne un déséquilibre de la matrice extracellulaire. En raison de ces interactions multiples, il n'existe pas de modèle cellulaire capable d'évaluer la fibrose hépatique. Une description suffisamment détaillée des évènements conduisant à la fibrose du foie facilite une stratégie de test sans avoir recours à un modèle cellulaire sophistiqué. L'événement d'initiation moléculaire (MIE) est ici l'alkylation de la protéine, qui après 5 évènements clefs conduit *in fine* à la fibrose hépatique.

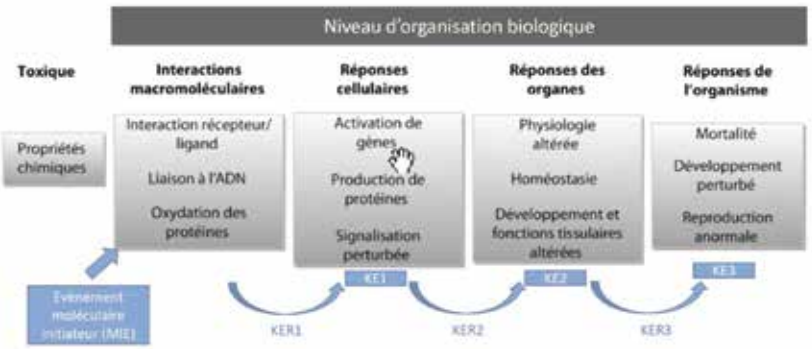

Figure 2 : Le concept d'AOP. Voir la signification des abréviations dans le corps du texte.
D'après Coumoul et al., 2017.

Une base de données interactive et mutualisée (wiki AOP) recueille les AOP ayant fait l'objet d'un processus d'approbation scientifique.

4. La recherche européenne et les nouveaux paradigmes toxicologiques

La commission européenne, en contribuant dans le cadre du programme H2020 au financement du projet EU-ToxRisk (An integrated European « Flagship » program driving mechanism-based toxicity testing and risk assessment for the 21st century) montre que la volonté de l'Europe est, comme celle des Etats-Unis, de conduire un changement de paradigme en toxicologie basé sur une approche intégrée de l'évaluation de la sécurité chimique à partir des mécanismes d'action et n'ayant plus recours à l'expérimentation animale. Ce projet qui a démarré en 2016 intègre largement le concept d'AOP et s'appuie amplement sur les approches à haut débit, et la modélisation. Il s'appuie sur les avancées de la biologie cellulaire, des technologies « omiques », de la biologie des systèmes et de la bioinformatique afin de définir les chaînes d'événements complexes reliant l'exposition chimique à des effets toxiques. Ce projet est axé sur deux domaines: toxicité systémique à doses répétées, en utilisant les poumons, les reins, le foie et le système nerveux comme exemples d'organes cibles potentiels; et toxicité pour le développement et la reproduction. Il entend baser ses études de cas sur les données issues de l'industrie pharmaceutique, cosmétique et phytosanitaire et limiter drastiquement le recours à l'expérimentation animale.

Depuis 2010 l'INRA, en collaboration avec l'INSERM a initié des projets de recherche visant à développer de nouveaux tests in vitro (principalement sur la lignées cellulaire hépatique HepaRG) et de nouvelles stratégies de prédiction de la cytotoxicité des contaminants environnementaux basés sur leur mécanisme d'action. Dans cette stratégie figurent la détermination de biosenseurs cellulaires stables adaptés au criblage des polluants, l'identification de biomarqueurs d'effet par des approches de trancriptomique et de métabolomique, l'utilisation d'outils de statistique, de bioinformatique et de modélisation pour intégrer l'ensemble des données afin d'en renforcer la prédictivité. Au plan scientifique, ce travail qui a bénéficié du concours de plusieurs infrastructures telles que Metabohub se poursuit aujourd'hui sur plusieurs fronts : (1) la qualité et la normalisation des systèmes cellulaires d'essais toxicologiques à haut débit ; (2) l'acquisition de données métabolomiques et transcriptomiques robustes ; (3) les outils de bio-informatique pour l'identification, l'annotation, la preuve de causalité ; (4) la caractérisation d'une perturbation fondée sur des réseaux ; (5) le lien entre les réseaux métaboliques affectés et les effets adverses ; (6) les perturbations produites par des mélanges.

CONCLUSIONS

Les méthodes traditionnelles de la toxicologie ne permettent plus de répondre aux besoins de l'évaluation du risque. Les approches haut débit, basées sur des tests *in vitro*, sont aujourd'hui capables, pour un nombre encore limité de substances de renseigner sur le danger qu'elles présentent et de proposer des priorités d'évaluation. Même si les défis sont considérables, les parties prenantes sont convaincues de la nécessité de mettre en œuvre une méthodologie tirant meilleur parti des données existantes, limitant le recours à l'expérimentation animale et ayant une valeur prédictive au moins égale à celle établie à ce jour. Les progrès constants en matière de phénotypage et la diversité des modèles biologiques disponibles aujourd'hui en laboratoire rendent possible la compréhension moléculaire des voies toxicologiques pouvant être activées par des xé-

nobiotiques. Les approches omiques permettent de caractériser le phénotype moléculaire associé à une exposition d'un système biologique à ces xénobiotiques. Le défi est dorénavant de prédire si cette réponse peut correspondre à celle observée lors d'un désordre physiopathologique et donc d'établir le lien, par des approches bioinformatiques, entre le toxome et les signatures obtenues au cours d'un processus pathologique chez l'Homme

L'identification et la caractérisation de ces voies toxicologiques conduisant *in fine* à un effet adverse chez l'individu ouvre de nouveaux horizons en matière de toxicologie prédictive et d'évaluation du risque. La réduction des incertitudes concernant l'extrapolation « système *in vitro*-homme » dépend à la fois du nombre et de la qualité des données mais aussi de l'interprétation de ces données (intégration de critères toxico-cinétiques dans les modèles, différences entre réponse adaptative et effet adverse).

Références bibliographiques

Bonvallot N., David A., Chalmel F., Chevrier C. Cordier S., Cravedi J.P., Zalko D., 2018. Metabolomics as a powerful tool to decipher the biological effects of environmental contaminants in humans. Current Opinion in Toxicology, 8: 48-59.

Bouhifd M., Hartung T., Hogberg H.T., Kleensang A., Zhao L., 2013. Review: toxicometabolomics. J Appl Toxicol 2013;33:1365–83.

Bouhifd M., Andersen M.E.,Baghdikian C.,Boekelheide K.,Crofton K.M., Fornace A.J.,Kleensang A., Li H., Livi C., Maertens A., McMullen P.D., Rosenberg M., Thomas R., Vantangoli M., Yager J.D., Zhao L., Hartung H., 2015. The human toxome project. ALTEX 32, 112–124.

Bouhifd M., Hogberg H.T., Kleensang A., Maertens A., Zhao L., Hartung T., 2014. Mapping the human toxome by systems toxicology. Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology 115 :24-31

Cabaton N.J., Canlet C., Wadia P.R., Tremblay-Franco M., Gautier R., Molina J., Sonnenschein C., Cravedi J.P., Rubin B.S., Soto A.M., Zalko D., 2013. Effects of low doses of bisphenol A on the metabolome of perinatally exposed CD-1 mice. Env Heal Perspect. 121:586–93.

Cabaton N.J., Poupin N., Canlet C., Tremblay-Franco M., Audebert M., Cravedi J.-P., Riu A., Jourdan F., Zalko D., 2018. An untargeted metabolomics approach to investigate the metabolic modulations of HepG2 cells exposed to low doses of bisphenol A and 17b-estradiol. Front. Endocrinol. 9:571. doi:10.3389/fendo.2018.00571

Carpenter D.O., Bushkin-Bedient S., 2013. Exposure to chemicals and radiation during childhood and risk for cancer later in life. J Adolescent Health 52:S21-S29.

Commission du Codex Alimentarius, 2003. Manuel de procédure du Codex Alimentarius, pp. 234.

Coumoul X., Andujar P., Baeza-Squiban A., Barouki R., Bodin L., et al., 2017. Toxicologie. Dunod, Paris

ECHA, 2018. https://echa.europa.eu/information-on-chemicals/registered-substances

ECPA, 2013. www.ecpa.eu/sites/default/files/7450_Registration%20brochure_3.pdf

Fasani R.A., Livi C.B., Choudhury D.R., Kleensang A., Bouhifd M., Pendse S.N., McMullen P.D., Andersen M.E., Hartung T., Rosenberg M., 2016. The Human Toxome Collaboratorium: A Shared Environment for Multi-Omic Computational Collaboration within a Consortium. Front. Pharmacol. 6:322. doi: 10.3389/fphar.2015.00322

García-Cañaveras J.C., Castell J.V., Donato M.T., Lahoz A., 2016. A metabolomics cellbased approach for anticipating and investigating drug-induced liver injury. Sci Rep. 6:27239. doi: 10.1038/srep27239

Geiss F., Del Bino G., Blech G., N□rager O., Orthmann E., Mosselmans G., Powell J., Roy R., Smyrniotis T., Town W.G., 1992. The EINECS inventory of existing chemical substances on the EC market, Toxicological & Environmental Chemistry, 37: 21-33, DOI: 10.1080/02772249209357850

Hartung T., McBride M., 2011. Food for thought… on mapping the human toxome. ALTEX *28*, 83-93.

Huang R., Xia M., Sakamuru S., Zhao J., Shahane S.A., Attene-Ramos M., Zhao T., Austin C.P., Simeonov A., 2016. Modelling the Tox21 10 K chemical profiles for in vivo toxicity prediction and mechanism characterization. Nat. Commun. 7, 10425.

Landesmann B., 2016. Adverse Outcome Pathway on Protein Alkylation Leading to Liver Fibrosis. OECD Series on Adverse Outcome Pathways, **n°**2, Éditions OCDE, Paris, https://doi.org/10.1787/5jlsvwl6g7r5-en

Linhart Y.B., Grant M.C., 1996. Evolutionary significance of local genetic differentiation in plants. Annual Review of Ecology and Systematics 27, 237-277.

Meigs L., Smirnova L., Rovida C., Leist M., Hartung T., 2018. Animal Testing and its Alternatives - the Most Important Omics is Economics. Alternatives to animal experimentation 35:275-305.

Morand-Prieur M.-E., 2003. Evolution et maintien d'un système de reproduction polymorphe. Approche génétique et écologique de la polygamie chez le frêne commun, *Fraxinus excelsior* L. Thèse de Doctorat, ENGREF, Paris, France, 155 p.

Nicholson J.K., Lindon J.C., Holmes E., 1999. Metabonomics: understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. Xenobiotica 29: 1181–1189.

NRC, 2007. Toxicity testing in the 21st century: a vision and a strategy. DOI 10.17226/11970.

Robertson D.G., 2005. Metabonomics in toxicology: a review. Toxicol Sci 2005;85:809–22.

Ramirez T., Daneshian M., Kamp H., Bois F.Y., Clench M.R., Coen M. et al., 2013. Metabolomics in toxicology and preclinical research. ALTEX 2013, 30:209–25.

Ramirez T., Strigun A., Verlohner A., Huener H.-A., Peter E., Herold M., Bordag N., Mellert W., Walk T., Spitzer M., Jiang X., Sperber S., Hofmann T., Hartung T., Kamp H., Van Ravenzwaay B., 2018. Prediction of liver toxicity and mode of action using metabolomics in vitro in HepG2 cells. Arch Toxicol. 92: 893-906.

Sauvant D., Dijkstra J., Meryens D., 1995. Optimisation of ruminal digestion : a modelling approach. In: M. Journet, E. Grenet, M-H. Farce, M. Theriez, C. Demarquilly (Eds.). Recent developments in the Nutrition of Herbivores. Proceedings of IVth International Symposium on the Nutrition of herbivores, INRA Editions, Paris, p. 143-165

Thybaud E., Troise A., 2016. Adverse outcome pathways : concept et exemple. Réseau des écotoxicologues de l'INRA. Fiche thématique N°2 - Avril 2016. https://www6.inra.fr/ecotox/content/download/4204/45813/.../1/.../16-Fiche-AOP.pdf

Tremblay-Franco M., Cabaton N.J., Canlet C., Gautier R., Schaeberle C.M., Jourdan F., Sonnenschein C., Vinson F., Soto A.M., Zalko D., 2015. Dynamic metabolic disruption in rats perinatally exposed to low doses of bisphenol-A. PLoS ONE 10:e0141698. doi: 10.1371/journal.pone.0141698

OECD, 2017. Revised Guidance Document on Developing and Assessing Adverse Outcome Pathways Series on Testing & Assessment N°. 184