

Université de Montréal

**Établissement d'une valeur d'exposition acceptable pour l'acide
perfluorooctanoïque (APFO) à partir d'études *in vitro***

par

Antoine Bocéno

Département de santé environnementale et santé au travail,

École de santé publique

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures et postdoctorales

en vue de l'obtention du grade de Maître ès Science (M. Sc.)

en santé environnementale et santé au travail

Option recherche

Mars 2022

© Antoine Bocéno, 2022

Résumé

Les valeurs toxicologiques de référence pour les contaminants de l'environnement sont généralement basées sur les résultats d'études animales dont la pertinence pour l'humain est remise en question. L'objectif de mon projet était d'évaluer une approche combinant les études *in vitro* sur des cellules humaines et la modélisation pharmacocinétique pour établir des valeurs toxicologiques de référence. Nous avons mené une étude de cas sur l'hépatotoxicité de l'acide perfluorooctanoïque (APFO). Un point de départ (POD) a été déterminé sur la base des concentrations sans effet néfaste observable (NOAEL) d'études *in vitro*. Ce POD a été traduit en équivalents de surveillance biologique, qui ont été comparés aux concentrations mesurées dans les études épidémiologiques sur l'exposition à l'APFO et l'hépatotoxicité. Des apports quotidiens tolérables (AQT) ont été estimés par dosimétrie inverse à l'aide d'un modèle pharmacocinétique. Nous avons utilisé un POD de 1 μM des études *in vitro*, qui a été traduit en une concentration plasmatique de 414 ng/mL. Pour atteindre cette concentration chez l'enfant exposé prénatalement et par l'allaitement, nous avons estimé que la concentration plasmatique chez la mère au début de la grossesse doit être de 155 ng/mL. Ces concentrations ont été traduites en équivalents de biosurveillance de 4,14 ng/mL (adulte) et 1,55 ng/mL (femme enceinte) (facteurs d'incertitude combinés : 100 à partir du POD), des valeurs se situant dans l'intervalle des concentrations médianes dans les études épidémiologiques (0,49 à 16 ng/mL). Des AQT de 0,121 (hépatotoxicité chez l'adulte) et 0,047 ng/kg/jour (hépatotoxicité développementale) ont également été obtenus (facteurs d'incertitude combinés : 300) à partir du même POD. En conclusion, les résultats laissent croire que l'approche évaluée offre une alternative adéquate et prudente pour l'établissement de valeurs toxicologiques de référence.

Mots-clés : Acide perfluorooctanoïque, *in vitro*, alternative à l'expérimentation animale, modélisation biologique, exposition pre- et postnatale, analyse des risques, hépatotoxicité.

Abstract

Acceptable exposure levels for environmental contaminants are generally calculated based on animal studies, but the scientific community is currently questioning their relevance to humans. The objective of this project was to evaluate a new approach combining *in vitro* studies on human cells and pharmacokinetic modeling to derive acceptable exposure levels. We conducted a case study on the hepatotoxicity of perfluorooctanoic acid (PFOA). We determined a point of departure (POD) based on no observable adverse effect levels (NOAELs) from *in vitro* studies using human cells. We then translated this POD into a biomonitoring equivalent and compared it to concentrations measured in epidemiological studies on PFOA exposure and hepatotoxicity. A Tolerable Daily Intake (TDI) was estimated using a pharmacokinetic model. We used a POD of 1 μM from *in vitro* studies and translated it into a 414 ng/mL plasma concentration. To reach this concentration in children exposed prenatally and by breastfeeding, we estimated that the plasma concentration in the mother during pregnancy must be 155 ng/mL. We translated these concentrations into biomonitoring equivalents of 4.14 ng/mL (adult) and 1.55 ng/mL (pregnant women) when using a composite uncertainty factor of 100. These biomonitoring equivalents are within the range of median concentrations in epidemiologic studies (0.49 to 16 ng/mL). TDIs of 0.121 and 0.047 ng/kg/day for adult hepatotoxicity and developmental hepatotoxicity, respectively, were estimated using a composite uncertainty factor of 300. In conclusion, the results suggest that the evaluated approach offers an adequate and conservative alternative to derive acceptable exposure levels.

Keywords: perfluorooctanoic acid (PFOA), *in vitro*, alternatives to animal experimentation, biological modeling, pre- and postnatal exposure, risk assessment, hepatotoxicity

Table des matières

Résumé	2
Abstract	3
Table des matières	4
Liste des tableaux	7
Liste des figures	8
Liste des sigles	9
Remerciement.....	10
Introduction	11
I. Contexte scientifique et problématique.....	12
II. Structure, propriétés physicochimiques et utilisation de l'APFO	13
III. Sources et voies d'exposition de l'APFO	13
1. Devenir dans l'environnement	13
2. Exposition.....	14
IV. Toxicocinétique	15
1. Absorption.....	15
2. Distribution.....	15
3. Métabolisme	16
4. Excrétion	16
V. Toxicité.....	16
1. Effets non cancérogènes.....	17
2. Effets cancérogènes.....	19
VI. Les facteurs d'incertitudes en analyse de risques.....	20
VII. Valeurs toxicologiques de référence, normes et réglementations	20
VIII. Limites des approches traditionnelles en analyse du risque.....	22
IX. Les alternatives à l'approche traditionnelle	24

1. Études <i>in vitro</i>	24
2. Études <i>in silico</i>	27
Objectifs.....	30
Méthodologie	31
I. Compilation des études <i>in vitro</i>	31
II. Évaluation de la distribution dans le milieu <i>in vitro</i>	32
III. Détermination d'un point de départ <i>in vitro</i>	32
IV. Estimation d'équivalents de biosurveillance.....	33
V. Comparaison avec exposition dans les études épidémiologiques	34
VI. Calcul d'un apport quotidien tolérable.....	34
Article.....	36
Abstract	38
Introduction	39
Methods.....	41
I. Compilation of available <i>in vitro</i> dose-response data	41
II. Chemical disposition in the <i>in vitro</i> system	42
III. Determination of an <i>in vitro</i> point of departure	42
IV. Estimating a biomonitoring equivalent	42
V. Compilation of plasma/serum levels in epidemiologic studies and comparison with estimated BEs	44
Results	45
I. Determination of an <i>in vitro</i> point of departure	45
II. Estimating a biomonitoring equivalent	46
III. Comparison with epidemiologic studies	46
IV. Calculating an acceptable daily dose	47
Discussion	48
Conclusion.....	51

Acknowledgments	52
References	53
Discussion générale.....	57
I. Retour sur les résultats	57
II. Comparaison avec les valeurs guides actuelles.....	58
III. Limitations de l'étude.....	58
IV. Perspectives	59
Conclusion.....	60
Bibliographie.....	61

Liste des tableaux

Tableau 1 : Caractéristiques physicochimiques du PFOA	13
Table 1: Comparison of epidemiological studies with a positive association between exposure of PFOA and hepatotoxicity-related endpoints	49

Liste des figures

Figure 1 : Exemple de la représentation conceptuelle d'un modèle PBPK. Les débits sanguins sont notés Q, V_{max} est la vitesse maximale du métabolisme et K_m est la constante de Michaelis-Menten.....	28
Figure 2 : Méthodologie de l'étude de cas.....	31
Figure 3 : Modèle pharmacocinétique pour l'exposition prénatale et postnatale aux PFAS (Verner, et al. 2015)	35
Figure 1: Study methods	41
Figure 2: Pharmacokinetic model of prenatal and postnatal exposure to perfluoroalkyl substances (Verner, and al. 2016)	44
Figure 3: Dose-response relationships from in vitro studies in HAWC, with doses ranging from 0,0001 μ M to 1 μ M.....	45
Figure 4: EPA's Toxcast data of PFOA.....	46
Figure 5: Comparison of biomonitoring equivalent with epidemiological studies.....	47

Liste des sigles

ALT : Alanine aminotransferase

APFO : Acide perfluorooctanoïque

AQT : Apport quotidien tolérable

AST : Aspartate aminotransferase

BE : Équivalent de biosurveillance

BMDL : Benchmark Dose

BSA : Bovin serum albumin

CAR : Activateur du récepteur des androstanes

CCRC : Comité de coordination de la recherche au Canada

CIRC : Centre international de la recherche sur le cancer

EPA : Environmental protection agency

GGT : Gamma glutamyltransferase

LOAEL : Low observed adverse effect level

NOAEL : Non observed adverse effect level

PBPK : Modèle pharmacocinétique à base physiologique

PFAS : Perfluoroalkylique

PFOA : Perfluorooctanoic acid

POD : Point de départ

PPAR α : Proliférateurs de peroxysomes

QSAR : Modélisation relation structure à activité

REACH : Registration, evaluation, authorization and restriction of chemicals

SPFO : Sulfonate de perfluorooctane

TDI : Tolerable daily intake

VTR : Valeur toxicologique de référence

Remerciement

Je souhaite remercier les personnes qui ont permis la réalisation de ce projet et la rédaction de ce mémoire de maîtrise.

Tout d'abord, je voudrais grandement remercier mon directeur de recherche, Marc-André Verner, pour ses qualités d'enseignant, pour m'avoir guidé tout au long de ma maîtrise, et pour m'avoir fait confiance tout au long de ce projet de recherche. Il m'a été d'une très grande aide, et je remercie son implication.

Je remercie également le Comité de coordination de la recherche au Canada (CCRC) pour avoir financé ce projet de recherche, et qui m'a permis de poursuivre ma maîtrise de recherche.

Je voudrais remercier le développeur de l'outil HAWC, Andrew Shapiro, qui a su se montrer disponible pour répondre à mes questions et m'aider dans l'avancement de ce projet.

Je souhaite également remercier toute l'équipe du laboratoire, Sherri, Nadia, Lucie, Laura, Emmanuel et Lilit, pour la bonne ambiance et l'entraide lors des rencontres en ligne malgré la situation sanitaire. Un merci particulier pour Sherri et Nadia qui ont passé du temps à répondre à mes questions et qui ont toujours été présentes pour mon projet.

Et enfin, je veux remercier mon conjoint Dylan, ma famille, mes amis du Québec et de partout dans le monde, et chaque personne qui m'ont apporté du soutien dans la réalisation de cette maîtrise de recherche.

Introduction

Les substances per- et poly-fluoroalkyliques (PFAS) sont des composés chimiques créés artificiellement par l'humain et utilisés dans le monde industriel pour leurs propriétés imperméables et antitaches. Elles sont omniprésentes dans notre quotidien, notamment dans les emballages alimentaires, les tissus, les meubles, les tapis, l'eau potable, et même dans nos ustensiles de cuisine (Franco, et al. 2020). Elles ont longtemps été sujet à des préoccupations sur leurs répercussions dans l'environnement et notre santé. Il a été prouvé que ces composés sont très persistants, bioaccumulables, et toxiques pour l'humain. Parmi ceux-là, les plus connus et les plus étudiés sont le sulfonate de perfluorooctane (SPFO) et l'acide perfluorooctanoïque (APFO). Ces derniers sont synthétisés depuis les années 1940, et ont été détecté dans plus de 99% des échantillons sanguins prélevés chez 5700 canadiens âgés de 3 à 79 ans en 2017 (Santé Canada, 2019), ce qui laisse penser que la population est largement exposée. Du fait de ses propriétés thermiques et de sa stabilité chimique, il ne se dégrade pas dans l'environnement, et s'est répandu partout autour du globe (Hong Lein, et al. 2008). L'APFO, ses sels ainsi que ses composés, ont été inscrits à la convention de Stockholm sur les polluants organiques persistants (Stockolm convention, 2019. Même s'il n'est plus synthétisé aujourd'hui, l'exposition de la population est toujours présente. En effet, l'APFO est toujours détectable dans la majorité des échantillons sanguins prélevés à l'échelle mondiale. Plusieurs effets néfastes ont été rapportés sur le foie, le développement, le système immunitaire, et les hormones thyroïdiennes (Buhrke, et al. 2015 ; Wang, et al. 2021).

Des valeurs d'exposition acceptables, jugées sans effets néfastes chez l'humain, sont généralement calculées sur la base des études animales. En revanche, il a été démontré que les données issues d'études animales n'assurent pas toujours une bonne estimation des risques toxicologiques chez l'humain pour un même composé, car il existe des différences entre les espèces (Scholz, et al. 2013). Il est donc important d'évaluer des méthodes alternatives plus éthiques, plus économiques et plus fiables dans l'évaluation des risques toxicologiques. Les études *in vitro* associées à la modélisation biologique pourraient être une alternative prometteuse.

I. Contexte scientifique et problématique

Nous sommes constamment exposés à de nombreux contaminants chimiques avant même notre naissance, et tout au long de notre vie. Ces contaminants sont présents dans notre environnement et peuvent se retrouver dans l'eau, l'air et la nourriture. Avec les grandes avancées industrielles, et donc la synthèse de nouveaux composés par l'humain qui ne se retrouvent pas naturellement dans l'environnement, il est important d'évaluer les risques toxicologiques qui nous entourent. Une multitude de ces composés sont présents dans nos échantillons biologiques tels que le sang ou l'urine, ce qui confirme notre exposition à ceux-ci. Ils peuvent comporter des risques pour notre santé même en très faible quantité (Theodore, et al. 2012). Comme dit Paracelse, « Tout est poison, rien n'est poison, c'est la dose qui fait le poison ». Il faut donc déterminer la dose à ne pas dépasser pour éviter des effets néfastes sur la santé.


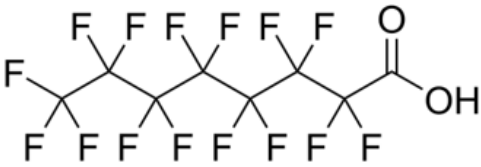
La majorité des valeurs d'exposition acceptable chez l'humain sont déterminées à partir d'études sur les animaux. Il a pourtant été démontré que ces études animales ne sont pas toujours représentatives, car nous sommes physiologiquement différents des autres espèces. À titre d'exemple, l'aspirine qui est un antalgique bien connu, peut être létale chez les rongeurs et les chats à une dose beaucoup plus faible que chez l'humain (Fitzgerald, et al. 2006). De plus, les doses administrées aux animaux ne sont pas représentatives de l'exposition humaine. Les tests sur les animaux sont également très coûteux, souvent très longs, et posent problème pour des questions éthiques évidentes.

La United States Environmental Protection Agency (EPA) a déjà annoncé qu'ils arrêteraient le financement des tests sur les mammifères d'ici 2035. Il est donc essentiel de trouver d'autres alternatives tout en assurant la fiabilité des résultats. Les études *in vitro* pourraient être la solution, mais certains chercheurs restent sceptiques quant à leur fiabilité par rapport aux tests sur les animaux. Pourtant, en utilisant des cellules humaines, on réduit l'incertitude quant à l'extrapolation des résultats de l'animal à l'humain. Il est donc intéressant d'établir une valeur d'exposition acceptable à partir des études *in vitro*, et de comparer les résultats de ces études aux études épidémiologiques qui ont rapporté une association entre un effet et l'exposition à un composé. Pour cela, une étude de cas sur les effets néfastes de l'APFO a été réalisée afin de déterminer une valeur d'exposition acceptable, dérivée à partir des études *in vitro*, qui sera ensuite comparée au niveau d'exposition dans des études épidémiologique.

II. Structure, propriétés physicochimiques et utilisation de l'APFO

L'APFO, de formule $C_8HF_{15}O_2$, fait partie des substances perfluoroalkyliques, et plus précisément à la classe des acides perfluorocarboxyliques. Il a été créé artificiellement par l'humain, et comprend une chaîne à huit carbones, dont sept associés à des atomes de fluor (tableau 1). La structure de la molécule combine des propriétés hydrophobe et lipophile grâce à la queue fluocarbonnée, et hydrophile grâce au groupe carboxylate conjugué à la tête (Zareitalabad, et al. 2013). Du fait de ses propriétés particulières, l'APFO a été utilisé dans plusieurs applications industrielles telles que dans les mousses anti-incendie, la moquette antisalissure, et les revêtements antiadhésifs, essentiellement pour l'alimentation.

Tableau 1 : Caractéristiques physicochimiques du PFOA

Acide perfluorooctanoïque	$C_8HF_{15}O_2$
Solubilité dans l'eau	9,5 g/L
Demi-vie dans le sérum	3,8 ans
Masse molaire	414,07 g/mol
Pictogrammes SGH	
	

III. Sources et voies d'exposition de l'APFO

1. Devenir dans l'environnement

L'APFO n'a jamais été synthétisé au Canada, mais il a toujours été importé par des producteurs situés aux États-Unis, en Europe et en Asie (Steenland, et al. 2010). Il a été introduit pour la première fois dans les produits de consommation en 1949 par la compagnie américaine *du pont de Nemours* en l'associant au Téflon pour la fabrication d'ustensiles de cuisine

antiadhésifs. On le trouve désormais dans l'eau, dans le sol et même dans l'air. Il s'agit d'une molécule très mobile et bioaccumulable, qui ne peut se dégrader naturellement. Il s'étend jusqu'en Arctique et on en a trouvé dans les plus hauts niveaux trophiques terrestres et marins, ce qui laisse penser qu'il est largement présent dans la biodiversité (Steenland, et al. 2010).

Les résidents proches des sites de production de l'APFO sont les plus à risques, comme le démontre le scandale de la société DuPont en 1980. Durant plusieurs années, la compagnie a transformé 66 hectares de terrain en site de déchets chimiques. Après avoir rejeté l'APFO dans cet environnement, l'eau de toute la région a été contaminée. Près de 70 000 personnes ont été exposées quotidiennement en raison de ces rejets, en plus des animaux d'élevage (Nicole, 2013).

2. Exposition

L'alimentation est la principale voie d'exposition de la population générale, et les doses d'exposition moyennes estimées sont bien inférieures aux doses considérées néfastes pour l'humain estimé à 20 ng/kg/jour (EPA, 2006). À titre d'exemple, des concentrations de 0,74 ng/g ont été retrouvées dans les pizzas et jusqu'à 3,6 ng/g dans les sachets de pop-corn à mettre en micro-onde (Environnement Canada et Santé Canada, 2012). L'APFO est utilisé dans ce dernier pour éviter aux aliments d'adhérer à l'emballage. Le revêtement des ustensiles de cuisine contribue également à cette exposition comme les poêles contenant de l'APFO (Tittelier, et al. 2007). L'exposition moyenne quotidienne des Canadiens via l'alimentation est estimée à 250 ng/jour de composés perfluorés, dont 70 ng/jour d'APFO (Ostertag, et al. 2009).

L'ingestion d'eau potable contaminée ne représente qu'une petite fraction de l'exposition, mais elle peut être beaucoup plus importante pour les habitants proches des sites de production et d'utilisation de l'APFO. Une étude a démontré que les aéroports, les bases militaires, ainsi que les stations de traitements des eaux usées sont des sources d'éléments perfluorés pour les eaux de surfaces et souterraines (Hu, et al. 2016). Des données démontrent que les résidents habitant proches d'une source d'eau potable contaminée possèdent une concentration sérique élevée de PFOA, notamment dans la région de Sauerland en Allemagne (Wilhelm et al., 2008).

Avec les applications industrielles de l'APFO comme agent tensioactif par exemple, l'exposition par inhalation des produits de consommation représente la seconde voie la plus importante. Il est présent dans bien plus de produits qu'on ne le pense, tels que les tapis, les

vêtements, les produits de nettoyage, le cire à parquet, et même dans les peintures (Tittiemier, et al. 2007).

L'exposition par l'air est vraiment négligeable du fait de sa faible volatilité, excepté pour les expositions en milieu de travail. Elle peut également dépendre de la contamination des poussières dans l'air intérieur. Cette dernière n'est pas négligeable et représente une médiane de 19,7 ng/g, d'après l'étude de Kubwabo, et al. de 2005.

IV. Toxicocinétique

Cette section aborde la toxicocinétique de l'APFO, soit l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'excrétion (ADME). Les études laissent croire que la voie orale est la principale voie d'exposition (Hundley, et al. 2008). L'APFO n'est pas métabolisé dans l'organisme et son absorption est rapide et complète. Il persiste donc de façon prolongée dans le sérum (Lau, et al. 2007). Il se distribue largement dans le plasma en se liant fortement à l'albumine, avant d'être lentement éliminé dans l'urine et les fèces (Han et al, 2003, Sabouraud-Margerand, 2020).

1. Absorption

L'APFO est pratiquement entièrement absorbé par la voie gastro-intestinale après être ingéré par voie orale. Des études chez le rat ont démontré un taux d'absorption supérieur à 93% après gavage pour une dose unique (Cui et al, 2010). On le retrouve très rapidement dans le plasma, de l'ordre de quelques minutes à quelques heures après l'administration chez les rongeurs (Hoffman et al., 2011).

2. Distribution

L'APFO a un volume de distribution estimé à 170 mL/kg de poids corporel, ce qui laisse croire qu'il reste en grande partie dans le plasma (Butenhoff, et al. 2004). Des chercheurs ont mesuré le niveau d'APFO dans différents tissus humains au cours d'autopsies, et les résultats ont démontré une accumulation légèrement plus importante dans les os et le foie que les reins et les poumons (Pérez, et al. 2013). La quasi-totalité dans le plasma serait liée électrostatiquement à l'albumine (supérieur à 90%) et le reste à d'autres protéines plasmatiques. Il occuperait 9 des 12 sites de fixation, ce qui peut empêcher d'autres molécules endogènes ou pharmaceutiques de s'y fixer (MacManus-Spencer et al., 2009). La distribution peut également s'effectuer à travers la barrière placentaire durant la grossesse et dans le lait maternel pendant

l'allaitement, comme il a été démontré chez les rongeurs (Fenton et al., 2009). Des données chez les humains montrent que des concentrations d'APFO retrouvées dans le sérum du cordon ombilical des nouveau-nés étaient légèrement plus faibles à celles retrouvées dans le sérum maternel (Tittlemier et al., 2004; Midasch et al., 2007).

3. Métabolisme

Les données actuelles démontrent que l'APFO ne se métabolise pas et ne subit pas de réaction chimique dans l'organisme. Il n'y a donc aucun métabolite (Kemper et Nabb, 2005).

4. Excrétion

Les données montrent que le temps de demi-vie est le même, peu importe la voie d'absorption (Butenhoff et al. 2004). Les temps de demi-vie sont très différents entre les espèces. En effet, elle est d'environ 2,7 ans chez les humains alors qu'elle est de seulement 30 jours chez les singes mâles ou de quelques jours chez les rongeurs (Butenhoff, et al. 2004 ; Li, et al. 2013). L'excrétion de l'APFO se fait principalement via l'urine, puis une plus petite partie est éliminée dans les fèces et le lait maternel. Chez les animaux, les études ont montré que la voie d'absorption n'avait pas d'effet sur les taux d'élimination (Kowalczyk, et al. 2013). Les rongeurs mâles possédaient une concentration plus élevée que les femelles, suggérant que les femelles éliminaient plus vite que les mâles (Kemper, 2003). Plusieurs études chez l'humain ont démontré une différence de concentration entre les sexes et les âges (Santé Canada, 2013). Chez les femmes, l'APFO peut également être excrété par les menstruations, le transfert placentaire et le lait maternel, ce qui contribue à une élimination plus rapide chez les jeunes femmes. Les modèles animaux ne sont donc pas représentatifs de l'humain concernant l'excrétion. Cela s'explique par la réabsorption tubulaire qui est plus performante chez l'humain, un mécanisme permettant la réabsorption de certaines substances au niveau du tube proximal dans le rein, ce qui rallonge la demi-vie de la substance. Le cycle entérohépatique permet également la réabsorption de la substance lorsqu'elle se trouve dans la lumière intestinale après son excrétion dans la bile.

V. Toxicité

Les données d'études animales et épidémiologiques concernant la toxicité du PFOA sont nombreuses. Entre autres, des personnes vivant à proximité de l'usine DuPont à Parkersburg (Virginie Occidentale) ont été sollicitées pour des études épidémiologiques.

1. Effets non cancérogènes

a) *Études in vivo animales*

- Fonction immunitaire

Une étude animale a montré une diminution du poids de la rate et du thymus, de même que leurs produits cellulaires tels que le taux de lymphocytes B et T auxiliaires sur différente souche de souris (DeWitt et al., 2008). Des effets significatifs ont été observés à partir de 3,75 mg/kg/jour pendant 10 jours par voie orale. Le rétablissement a été observé après l'arrêt de l'administration de l'APFO.

- Fonction hépatique

La toxicité au niveau du foie proviendrait de l'activation du récepteur activé par les proliférateurs de peroxyosomes (PPAR α), un récepteur nucléaire jouant un rôle majeur dans le métabolisme des acides gras dans le foie chez les mammifères. Ce dernier serait responsable d'une hypertrophie hépatocellulaire et d'une augmentation du ratio du poids du foie sur le poids corporel chez les rongeurs, à partir de 3 mg/kg/jour durant les 17 premiers jours de leur vie (Hall et al. 2012). L'APFO serait un activateur du récepteur constitutif des androstanes (CAR), qui est également un récepteur nucléaire induisant certaines enzymes responsables du métabolisme de certains xénobiotique et médicaments. Cette activation par l'APFO augmenterait les niveaux d'ARNm du CYP2B10, un gène cible de CAR. Dans d'autres études, les niveaux sériques d'alanine aminotransférase (ALT) et d'aspartate aminotransférase (AST) ont fortement augmenté chez les rats et les souris, ce qui indique une apoptose ou nécrose des hépatocytes (Butenhoff et al. 2012 ; Minata et al. 2010).

- Fonction rénale

Certaines études animales ont observé une augmentation du poids des reins à partir d'une administration orale de 1 mg/kg/jour d'APFO chez les souris et les rats (Yahia, et al. 2010 ; Cui et al. 2008).

- Fonction thyroïdienne

L'étude de Butenhoff et al. (2002) a rapporté une baisse significative des niveaux de l'hormone thyroïdienne T3 totale et libre chez le singe mâle sur une période d'administration de 6 mois à partir d'une dose de 20 mg/kg/jour. Cette hormone joue un rôle essentiel dans le métabolisme et contribue au bon fonctionnement du cœur, des muscles, du cerveau et au développement du corps. Chez les singes femelles, on n'a pas rapporté de baisse significative.

- Développement

Les études sur les rongeurs ont démontré des effets toxiques de l'APFO sur le développement. Un faible poids des rejetons à la naissance, une ossification réduite, et une puberté précoce ont été observés après une exposition de la mère pendant 17 jours au cours de la gestation, et à partir d'une dose de la dose la plus faible testée, soit 1 mg/kg/jour (Butenhoff et al. 2004 ; Lau et al. 2006).

- Lipides sériques

Des changements dans les lipides sériques ont été rapportés dans certaines études. Les taux de cholestérol et de triglycérides étaient significativement plus élevés dans le foie, mais pas dans le plasma, chez les souris exposées à une dose de 0,1 mg/kg/jour pendant deux semaines par gavage (Nakamura et al. 2009). Une diminution du cholestérol total et une augmentation des triglycérides totaux ont été observées à partir de 10 mg/kg/jour dose chez les souris exposées pendant quatre semaines (Minata et al. 2010).

b) Études épidémiologiques

- Fonction immunitaire

Des études ont démontré une association entre la concentration en APFO et une baisse de la réponse vaccinale. Une étude aux îles Féroé, avec un échantillon de 557 enfants, a démontré une association entre une exposition à l'APFO et une réponse immunitaire réduite aux vaccins infantiles de routine chez les enfants âgés de 5 à 7 ans (Grandjean et al. 2012). Une autre étude a recruté 99 femmes enceintes qui ont accouché à Oslo et à Akershus en Norvège en 2007, pour observer les expositions prénatales. Une diminution du niveau des anticorps anti-rubéole a été observée chez les enfants âgés de 3 ans des mères exposées (Granum et al. 2013).

- Fonction hépatique

Des associations positives ont été observées entre les concentrations sériques de l'APFO et plusieurs enzymes hépatiques. Une étude a recruté 2216 adultes américains âgés de 18 ans et plus entre 1999 et 2003 pour déterminer l'effet de l'APFO sur les enzymes hépatiques (Lin et al, 2010). Les concentrations d'AST, d'ALT et de GGT (gammaglutamyle transpeptidase) étaient plus élevées chez les participants avec des concentrations sériques plus élevées d'APFO, ce qui est cohérent avec les études animales et les résultats d'une altération des hépatocytes.

- Fonction thyroïdienne

Une étude auprès de 10 725 enfants âgés de 1 à 17 ans habitant proche d'une usine de Teflon dans la Mid-Ohio Valley aux États-Unis a démontré que les enfants sont plus sujets à des modifications des concentrations sériques d'hormones thyroïdiennes lorsqu'ils sont exposés à l'APFO, (Lopez-Espinosa et al. 2012). Dans une autre étude sur 3974 adultes américains en 2010, des chercheurs ont observé une association entre les concentrations sériques d'APFO et le risque de développer des maladies thyroïdiennes (Melzer et al. 2010).

- Effets sur la fertilité, la grossesse et le nouveau-né

L'exposition prénatale à l'APFO était négativement associée avec le poids à la naissance dans une étude chez 1400 femmes et leurs nourrissons au Danemark (Fei et al. 2007). Dans le même pays en 2013, une autre étude sur 965 femmes et leurs nourrissons a observé une association entre l'exposition et un âge plus avancé de la puberté (Kristensen et al. 2013).

c) *Études in vitro*

La plupart des études *in vitro* ont été réalisées sur des hépatocytes d'origines animale et humaine. L'étude de Franco, et al. (2020), a démontré une diminution significative de l'expression et l'activité de certaines enzymes hépatiques (CYP1A2, CYP2C19 et CYP3A4), jouant un rôle clé dans la métabolisation et la biotransformation des composés exogènes. L'expression de nombreux gènes impliqués dans la synthèse et le transport du cholestérol et de l'acide biliaire ont été affectés par l'APFO (Berh et al. 2020). Il jouerait également un rôle dans l'activation du gène cible CAR (récepteur constitutif de l'androstane), qui est un facteur de transcription clé pour les gènes impliqués dans la métabolisation des médicaments et pouvant provoquer une hépatocarcinogénèse (Abe et al. 2020).

2. Effets cancérigènes

L'APFO a été classé possiblement cancérigène 2B par le centre international de la recherche sur le cancer (CIRC). Une étude épidémiologique a observé une association positive entre le niveau sérique de l'APFO et l'apparition de cancers du rein et des testicules. Cette étude a été réalisée sur une cohorte de 32 254 adultes américains résident dans la communauté de Mid-Ohio Valley où l'eau était contaminée, avec 2507 cancers validés (Barry et al. 2013). Une seconde étude concentrée sur les 19 716 résidents vivants proche de l'usine de fabrication du Téflon de Dupont dans la même communauté entre 1996 et 2005 a démontré une association

positive entre l'exposition à l'APFO et le cancer du rein. (Vieira et al. 2013). Puisque ce mémoire se concentre sur les effets hépatiques non cancérogènes de l'APFO, les effets cancérogènes ne seront pas couverts en détail.

VI. Les facteurs d'incertitudes en analyse de risques

En analyse du risque, des facteurs d'incertitudes sont généralement utilisés pour éviter la sous-estimation des risques due aux incertitudes et aux variabilités possibles, dans le but d'obtenir des valeurs toxicologiques de référence les plus protectrices pour toutes les populations considérées. On en retrouve principalement cinq :

- Facteur interindividuel : Ajuste pour la variabilité interindividuelle chez l'humain.
- Facteur interspécifique : Ajuste pour l'extrapolation des études animales à l'humain
- Facteur sous-chronique – chronique : Ajuste pour l'extrapolation des études sous-chroniques (courte durée) à chronique (longue durée).
- Facteur LOAEL – NOAEL : Ajuste l'extrapolation d'une LOAEL (Lowest Observed Adverse Effect Level) à une NOAEL (No Observed Adverse Effect Level).
- Facteur données insuffisantes : Ajuste pour le manque de données de toxicité.

VII. Valeurs toxicologiques de référence, normes et réglementations

L'APFO a été ajouté récemment à la liste des polluants organiques persistants (POPs) de la convention de Stockholm en 2019, mais il était déjà désigné pour y être ajouté depuis 2015. Il s'agit d'un traité international créé en 2001, et signé par 152 pays pour l'interdiction et la restriction de certains polluants chimiques.

- Réglementation en Amérique du Nord

Le Canada a mis en place un plan d'action depuis 2006 sur la gestion des acides perfluorocarboxyliques qui interdit la fabrication, l'utilisation, la vente et l'entrée sur le territoire de ces composés et de leurs précurseurs. Environnement Canada a depuis poursuivi les évaluations et la compréhension scientifique de ces substances dans notre environnement (Environnement Canada, Santé Canada, 2012).

Le gouvernement fédéral des États-Unis ne réglemente pas l'utilisation de l'APFO mais donne des recommandations par l'Environmental Protection Agency (EPA) et des valeurs de

référence. Chaque État décide de les suivre ou d'appliquer sa propre réglementation. La fabrication et l'utilisation ont cessé en 2015 après une entente signée avec les producteurs.

- Réglementation en Europe

L'APFO étant inscrit dans la convention de Stockholm, la plupart des pays d'Europe ont interdit et limité sa fabrication et son utilisation. Il est présent dans le règlement de l'Union Européenne concernant les polluants organiques persistants et extrêmement préoccupante (UE, 2019). On le retrouve également inscrit dans le règlement du Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals (REACH) depuis 2017 avec de nombreuses restrictions.

- Valeurs toxicologiques de référence

Au Canada, une valeur toxicologique de référence (VTR) a été déterminée à partir d'un point de départ (POD) identifié dans l'étude de Perkins et al. (2004). Le POD sélectionné est une dose sans effet néfaste observable (NOAEL) correspondant à une hypertrophie hépatocellulaire chez le rat, à 0,06 mg/kg poids corporel par jour pendant 13 semaines. Cette valeur a été divisée par un facteur d'ajustement spécifique pour la composante toxicocinétique des différences interspécifiques (CSAF), calculée comme le rapport entre la clairance de l'espèce étudiée et celle de l'humain. La clairance chez les animaux et les humains a été calculée en multipliant le volume de distribution par le logarithme naturel de 2 et en divisant par la demi-vie du composé. Les clairances utilisées pour les humains et les animaux sont respectivement de 0,1 mL/kg/jour et de 7,4 mL/kg/jour. Un POD équivalent chez l'humain (POD_{EQH}) a été obtenu :

$$\text{POD}_{\text{EQH}} = \frac{0,06 \text{ mg/kg p.c.par jour}}{96}$$

$$\text{POD}_{\text{EQH}} = 0,000625 \text{ mg/kg p.c.par jour}$$

À ce POD_{EQH}, des facteurs d'incertitude ont été ajoutés comprenant un facteur d'incertitude interspécifique pour la portion toxicodynamique (2,5) et un facteur d'incertitude interindividuel (10), pour un total de 25 :

$$\text{VTR}_{\text{Canada}} = \frac{0,000625 \text{ mg/kg p.c.par jour}}{25}$$

$$\text{VTR}_{\text{Canada}} = 0,025 \text{ ug/kg p.c.par jour}$$

Aux Etats-Unis, l'EPA a déterminé la valeur de référence à partir d'une étude de Lau et al. (2006). Le POD sélectionné est une LOAEL et correspond à la réduction de l'ossification des phalanges proximales et de l'accélération de la puberté des rejets chez le rat exposé prénatalement durant 17 jours et posnatalement par l'allaitement. Un modèle pharmacocinétique a été utilisé pour déterminer la dose équivalente chez l'humain dans le plasma, pour obtenir une valeur de 0,0053 mg/kg de poids corporel/jour. Des facteurs d'incertitude ont été utilisés : le facteur interindividuel (10), la composante toxicodynamique du facteur interspèce (3), et le facteur extrapolation LOAEL à NOAEL (10), pour un total de 300 :

$$VTR_{\text{Etats-Unis}} = \frac{0,0053 \text{ mg/kg p.c.par jour}}{300}$$

$$VTR_{\text{Etats-Unis}} = 0,02 \text{ ug / kg p. c. par jour}$$

En Europe, l'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments (EFSA) a cependant sélectionné un POD à partir d'une étude épidémiologique chez l'humain démontrant une association positive entre le niveau plasmatique de l'APFO et l'augmentation du cholestérol total chez l'adulte dans une population danoise, considéré comme un effet critique (Eriksen, et al. 2013). La BMDL₅ (Lower Benchmark Dose) de 9,3 ng/mL a été utilisée dans un modèle pharmacocinétique pour déterminer une VTR de 0,8 ng/kg poids corporel/jour. Aucun facteur d'incertitude n'a été ajouté car le modèle était basé sur une large étude épidémiologique dans la population générale, en prenant en compte les groupes potentiellement sensibles.

VIII. Limites des approches traditionnelles en analyse du risque

L'analyse du risque toxicologique est un processus essentiel qui détermine la probabilité de l'apparition d'effets néfastes sur la santé à la suite de l'exposition à un agresseur chimique, physique ou biologique. Ce processus se réalise en quatre étapes qui sont l'identification du danger, la caractérisation toxicologique, l'estimation de l'exposition et la caractérisation du risque. L'approche traditionnelle en analyse du risque depuis les dernières décennies repose essentiellement sur les études animales pour déterminer les effets néfastes potentiels chez l'humain. Cependant, les études animales ne représentent pas forcément ce qu'il se passe chez l'humain, d'où le besoin d'alternatives (Höfer, et al. 2004).

Les animaux les plus utilisés dans l'analyse du risque sont les souris et les rats en raison de leur gestation rapide, leur courte espérance de vie et la facilité d'élevage de ces derniers. Ils sont utilisés dans de nombreuses études pour déterminer des effets cancérigènes (apparition de tumeurs) et non cancérigènes (reproduction, comportement, létalité, immunité, etc.). Ensuite, les lapins et les cochons d'inde sont également utilisés en analyse de risque pour les études immunologiques, pharmacologiques et de sensibilisation cutanée et oculaire. Pour ces dernières par exemple, on applique plusieurs doses d'un produit chimique sur la peau et les yeux de ces espèces pour observer s'il y aura des effets néfastes. Enfin, plus rarement, les primates et les chiens sont utilisés en toxicologie et en pharmacologie (Höfer, et al. 2004).

Cette approche traditionnelle comporte néanmoins de nombreuses limites. En effet, on démontre de plus en plus que les études réalisées sur les animaux ne prédisent pas adéquatement les effets chez les humains, en raison de la différence de physiologie entre les espèces. C'est le cas par exemple de la gestation qui diffère par rapport à l'humain entre la durée, le nombre de descendants, ou encore la maturité des rejetons à la naissance. De même avec la biotransformation des composés qui peut être différente entre les espèces, via la formation de métabolites potentiellement dangereux pour l'humain qui ne seraient pas néfastes ou formés chez les espèces étudiées (Andersen, 2003). Enfin, les études utilisant des animaux sont souvent très longues et très coûteuses, et demandent de grandes infrastructures.

Avec l'évolution des technologies actuelles, il est intéressant d'opter pour des alternatives sur le plan éthique. Même si dans certains cas l'expérimentation animale peut être jugée désirable, il est important d'opter pour de nouvelles alternatives lorsque possible, et d'intégrer un nouveau cadre éthique. Les comités éthiques et les agences en santé environnementale encouragent d'ailleurs l'application de la règle des 3R : Réduire le nombre d'animaux dans les études, Raffiner la méthode pour réduire les souffrances et la détresse, et Remplacer les animaux par des méthodes alternatives. Cette règle a été élaborée en 1959 par deux scientifiques anglais, et correspond au fondement de l'éthique en matière d'expérimentation animale en Europe et en Amérique de Nord (Degrazia, et al. 2019).

Certaines agences gouvernementales ont déjà répondu à cet objectif. L'agence de protection de l'environnement aux États-Unis est la première à annoncer qu'elle cesserait d'ici 2035 de réaliser et de financer des études animales (Grimm, 2019). Les agences canadiennes et européennes possèdent des lois et des cadres éthiques pour limiter l'expérimentation animale (CCPA, 1990 ; UE, 2009).

IX. Les alternatives à l'approche traditionnelle

La toxicité de la plupart des molécules chimiques mises sur le marché n'a pas été évaluée. La réglementation gouvernementale voudrait que chacun de ces composés industriels soit étudié afin de prédire des effets néfastes et vérifier leur innocuité, mais il faut également réduire l'expérimentation animale en trouvant des alternatives fiables, ce qui représente un défi de taille. Il existe plusieurs alternatives qui ont été développées au fil du temps et ont démontré une bonne fiabilité pour prédire les risques chez l'humain. On compte notamment l'utilisation de cellules et tissus humains en laboratoire (*in vitro*), et des technologies innovantes de modélisation informatique (*in silico*). En revanche, ces alternatives, tout comme l'utilisation d'animaux, ont des limites (Höfer, et al. 2004).

1. Études *in vitro*

Grâce à la recherche fondamentale, les études *in vitro* sont devenues de plus en plus importantes et innovantes, et deviendront sûrement incontournables dans les prochaines années. Le principe consiste à exposer des cultures cellulaires à des doses croissantes et d'analyser la viabilité ou d'autres atteintes biologiques. On utilise généralement des cellules humaines représentatives des organes tels que les hépatocytes, les fibroblastes, les kératinocytes, ou encore les cellules rénales et endothéliales (Griesinger, et al. 2016). En Europe, les tests *in vitro* sont devenus un incontournable pour les produits cosmétiques, car il est interdit depuis 2009 de commercialiser des produits dont un ou plusieurs ingrédients ont été testés sur des animaux (Liebsch, et al. 2011).

Il existe deux principaux types de culture cellulaire dans ces études. On retrouve les cultures primaires, qui sont des cellules isolées à partir de fragments d'organes ou de tissu, et placées directement dans le milieu de culture *in vitro*. Ces cellules ne sont pas immortelles puisqu'elles n'ont subi aucune modification, sont sujettes au phénomène de sénescence et ont donc un nombre de divisions limité. Une fois que les cellules se sont assez multipliées pour former une couche dans le milieu, la croissance s'arrête et la différenciation commence, c'est ce qu'on appelle l'inhibition de contact (Griesinger, et al. 2016). Les cultures les plus couramment utilisées sont les lignées cellulaires issues de cellules transformées pour qu'elles soient cancéreuses, c'est-à-dire qu'elles ont la particularité d'être immortelles et d'avoir un

nombre de division illimité. Ce type de culture cellulaire échappe à l'inhibition de contact et se multiplie constamment (Abercrombie, 1970).

a) Test de génotoxicité

Il existe plusieurs tests de génotoxicité qui permettent de déterminer si un composé pourrait induire des mutations et altérer le génome. Le plus connu est le test d'Ames, qui consiste à utiliser des bactéries génétiquement modifiées, les empêchant de synthétiser de l'histidine, un acide aminé essentiel à leur survie. L'exposition de ces bactéries à un agent chimique génotoxique induirait une mutation qui permettrait à celles-ci de retrouver la capacité de synthétiser l'histidine et de se multiplier dans un milieu sans histidine. La présence ou non de bactérie dans le milieu après incubation indiquera si l'agent est génotoxique. Certains agents chimiques ne sont pas toxiques en tant que tel, mais durant le métabolisme, des métabolites peuvent être formés par les enzymes de biotransformation, et devenir toxiques. Dans ce cas, le test doit être réalisé en présence d'hépatocytes ou de fractions hépatiques (p. ex. microsomes, S9) dans le milieu pour permettre la formation des métabolites (Kirkland, et al. 2011).

b) Test de corrosion et d'irritation

Ces tests sont principalement effectués sur des produits pharmaceutiques et cosmétiques, mais aussi avec d'autres substances chimiques, pour s'assurer que ces produits mis sur le marché ne portent pas d'atteinte oculaire ni cutanée à la dose thérapeutique souhaitée. Pour les tests de corrosion cutanée, des kératinocytes, qui représentent les cellules de la couche superficielle de la peau, sont misent en culture et exposés à différente dose pour déterminer la viabilité cellulaire après 3 minutes d'exposition, et la corrosivité de celle-ci (Kandárová, et al. 2006). La viabilité peut être déterminée grâce à une enzyme mitochondriale qui transforme le colorant MTT en un sel de formazan bleu dont l'absorbance peut être mesurée, proportionnellement au nombre de cellules viables.

On peut également réaliser le test d'irritation cutanée, qui est le même principe que celui de la corrosion, mais l'exposition des cellules est de 42 minutes. Les tests de phototoxicité sont aussi réalisés pour déterminer si une substance est capable d'induire une irritation cutanée en présence de rayons UV. Les cellules sont incubées avec la substance en présence et en absence de ces rayons pour observer la viabilité cellulaire grâce au test rouge neutre, qui permet la détection de cellule viable lorsque la molécule colorée s'infiltré dans le lysosome de ces dernières (Kandárová, et al. 2009). Les tests d'irritation oculaire sont également pertinents pour évaluer la capacité d'une substance à endommager la cornée. Des épithéliums de cornée

humaine sont exposés pendant 30 minutes puis incubés pour vérifier la viabilité cellulaire grâce au sel de tétrazolium (Kaluzhny, et al. 2011).

c) Test de l'activité enzymatique

Il est possible de réaliser des tests *in vitro* pour déterminer la capacité d'une substance à altérer l'activité enzymatique des cellules. La plupart des cellules utilisées sont les hépatocytes puisqu'ils sont riches en enzymes pour permettre la biotransformation des composés. On peut déterminer, par exemple, l'expression des enzymes hépatiques en ajoutant un substrat spécifique au milieu de culture en présence des hépatocytes, et de la substance à tester. L'enzyme spécifique fabriquera un métabolite hautement fluorescent dont on pourra lire l'absorbance (Buhrke, et al. 2015). Une plus faible absorbance par rapport au témoin indiquera une faible expression de l'enzyme.

d) Test des perturbateurs endocriniens

Certains composés peuvent dérégler le système hormonal d'un organisme qui assure la communication entre les cellules et régule l'activité des organes, ce sont les perturbateurs endocriniens. Ils sont préoccupants et peuvent impacter le développement, la reproduction, le système nerveux et immunitaire (Scott, et al. 2014). On peut déterminer si un composé agit comme perturbateur endocrinien avec le test *in vitro* « YES and YAS assay ». Il permet d'observer l'affinité du composé à se lier aux récepteurs des œstrogènes et des androgènes humains, et à générer une activation ou une inhibition. Des levures de type *Saccharomyces cerevisiae* ont été génétiquement modifiées pour insérer les gènes de ces récepteurs dans leur génome, couplé à un gène rapporteur. La liaison aux récepteurs entraînera une cascade de réactions qui exprimera le produit du gène rapporteur, et générera un substrat qui changera la couleur de milieu en fonction de l'affinité (Czernych, et al. 2017).

e) Limites des tests in vitro

Les études *in vitro* peuvent être une excellente alternative à l'expérimentation animale, mais chaque type d'étude possède ses atouts et ses limites. Dans ces études, il est plus compliqué de faire des tests de toxicité sur la reproduction et le développement des individus, car les lois sont très strictes sur l'utilisation des cellules embryonnaires. De plus, ces tests ne représentent pas la partie cinétique, à savoir les interactions entre les organes et les différents systèmes qui font la complexité d'un organisme. Il est également difficile de déterminer la dose interne exacte des cellules puisqu'une partie peut se déposer sur les parois des puits ou n'interagit pas avec les cellules. Enfin, les lignées cellulaires immortalisées sont davantage utilisées pour leur facilité de culture puisqu'elles ont un nombre de divisions illimité, mais elles

ne représentent pas nécessairement adéquatement nos cellules saines. De plus, plusieurs lignées cellulaires ne métabolisent que peu ou pas les composés, ce qui suppose que la toxicité provient uniquement du composé testé et non de ses métabolites. On peut donc obtenir des résultats faussement négatifs si seulement les métabolites sont toxiques (Höfer, et al. 2004).

2. Études *in silico*

a) Modélisation relation structure à activité (QSAR)

Les modèles QSAR sont des modèles de relation structure à activité qui sont basés sur des calculs mathématiques à partir de la structure chimique du composé, pour prédire statistiquement la relation entre sa structure et ses propriétés biochimiques. Ils se basent sur l'hypothèse que des molécules à structures similaires induisent des effets similaires, car elles peuvent cibler les mêmes sites d'action (Gramatica, 2007). Cela nécessite donc une grande base de données pour avoir des prédictions fiables et un vaste domaine d'applicabilité. Ces modèles ciblent souvent un seul type de mécanisme d'action, comme l'inhibition de l'activité enzymatique ou la liaison à un récepteur nucléaire. Cependant, ces modèles ne sont pas fiables à 100%, mais fournissent une prédiction. Un composé pourrait donc être classé comme présentant un faible potentiel de toxicité, mais comporter tout de même un risque pour l'humain. De plus, ce type de modèle nécessite au préalable beaucoup de données pour fonctionner (Gramatica, 2007).

b) Modèle pharmacocinétique à base physiologique (PBPK)

La modélisation PBPK correspond à une procédure mathématique, qui représente les quatre processus pharmacocinétiques d'un organisme, à savoir l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'élimination d'un composé chimique. Ce modèle permet de déterminer la dose interne aux tissus cibles, qui n'est pas possible de mesurer dans les études *in vivo* et *in vitro*. Il se divise en plusieurs compartiments représentant pour chacun un organe ou un tissu, et sont liés entre eux par un flux sanguin. Le modèle se base essentiellement sur l'anatomie et la physiologie de l'organisme, les propriétés physico-chimiques de la substance, les paramètres biochimiques de chaque organe, et les interactions de ceux-ci entre les autres tissus et la substance à étudier (Brochot, et al. 2014). Les valeurs physiologiques et biochimiques prises en compte incluent le volume des organes, la perfusion sanguine tissulaire, la vitesse de métabolisation, ou encore le coefficient de partage tissu/sang (Brochot, et al. 2014). Ces modèles représentent généralement les organes impliqués dans l'élimination et dans la

distribution du composé étudié, les sites d'action du composé, et les fluides dans lesquels il circule. Le modèle est ensuite représenté sous forme d'un diagramme avec les différents compartiments reliés entre eux (voir exemple en figure 1). Avec un modèle PBPK, il est possible d'obtenir différentes valeurs utiles telles que la concentration maximale dans un organe cible, l'aire sous la courbe (AUC), la concentration moyenne, ou encore le temps au-dessus d'une concentration.

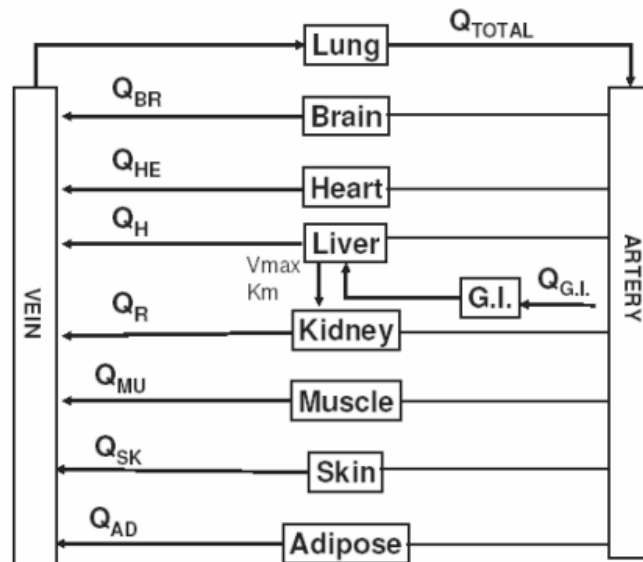


Figure 1 : Exemple de la représentation conceptuelle d'un modèle PBPK. Les débits sanguins sont notés Q , V_{max} est la vitesse maximale du métabolisme et K_m est la constante de Michaelis-Menten.

Les modèles PBPK sont très utilisés désormais dans l'analyse des risques toxicologiques puisqu'ils permettent de quantifier la variabilité interspécifique et interindividuelle, et ainsi de réduire l'incertitude. Les organismes gouvernementaux utilisent également ces modèles à partir des études animales pour extrapoler une dose équivalente chez l'humain (HED). Par exemple, l'EPA s'est basée sur un modèle PBPK pour extrapoler une HED pour l'APFO à partir de la diminution de l'ossification des souriceaux comme point de départ (Lau et al. 2006).

Les modèles PBPK sont également utilisés pour faire de l'extrapolation *in vitro-in vivo* (IVIVE). Cette approche permet d'estimer la relation entre une concentration d'intérêt *in vitro* et l'exposition nécessaire chez l'animal ou l'humain afin d'obtenir la concentration du composé dans le tissu cible (Fabian, et al. 2018).

Il existe des modèles classiques à un ou deux compartiments, mais ceux-ci ne prennent pas en compte toute la physiologie de l'organisme, et ne s'appliquent donc pas nécessairement

pour l'extrapolation interspécifique. Cependant, un modèle PBPK plus élaboré exige une quantité importante de données. Ces modèles ne tiennent pas toujours compte de la variabilité interindividuelle, mais il est possible de réaliser des simulations Monte-Carlo dans les deux types de modèles permettant de générer une multitude de résultats en modifiant certaines variables aléatoirement, ce qui est plus représentatif de la population.

Objectifs

L'objectif principal de mon projet de maîtrise consistait en l'élaboration et l'évaluation d'une nouvelle approche en analyse de risque qui permet d'établir des valeurs d'exposition acceptable sans avoir recours à l'expérimentation animale. Plus spécifiquement, les travaux portaient sur une étude de cas concernant l'hépatotoxicité de l'APFO en cinq points :

1. compilation des données *in vitro* sur des cellules humaines en lien avec une hépatotoxicité ;
2. détermination d'un point de départ (POD) basé sur les études *in vitro* ;
3. estimation d'un équivalent de biosurveillance et de la dose externe associée au point de départ à l'aide d'un modèle pharmacocinétique ;
4. élaboration d'une valeur d'exposition acceptable ;
5. comparaison des niveaux d'exposition acceptables estimés aux niveaux d'exposition retrouvés dans les études épidémiologiques, qui ont rapporté une association entre une exposition à l'APFO et une hépatotoxicité.

Méthodologie

Mon projet a suivi les étapes présentées dans la figure 2 ci-dessous. Chacune des étapes est présentée en détail dans cette section.

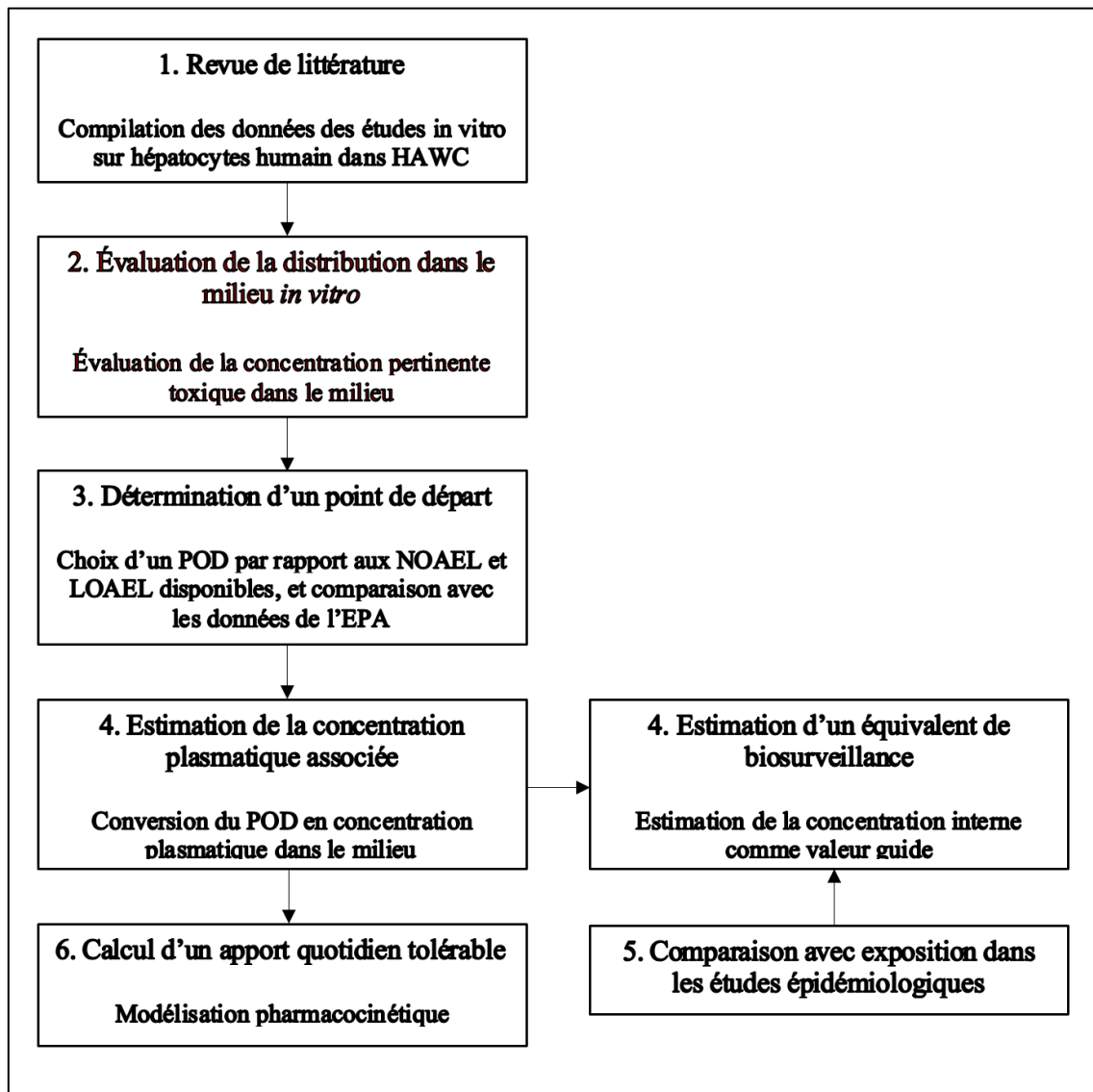


Figure 2 : Méthodologie de l'étude de cas

I. Compilation des études *in vitro*

J'ai effectué une revue de littérature de toutes les études *in vitro* disponibles utilisant des hépatocytes humains (telles que les cellules HepaRG) exposés à de l'APFO. Les données ont été compilées dans le Health Assessment Workspace Collaborative (HAWC) (Shapiro, et

al. 2018). Il s'agit d'un outil collaboratif en ligne utilisé pour l'évaluation des risques des produits chimiques. Il permet d'extraire les données de tout type d'études afin de juxtaposer les relations dose-réponse pour une visualisation plus simple qui sert à déterminer un point de départ.

II. Évaluation de la distribution dans le milieu *in vitro*

Il est nécessaire d'évaluer la distribution du composé dans le système *in vitro*, car les concentrations initiales des contaminants dans le milieu ne représentent pas nécessairement les concentrations cellulaires durant l'expérience (Proença, et al. 2021). Les composés chimiques peuvent se répartir inégalement dans le milieu. En fonction des propriétés physicochimiques de ces composés, certains vont rester dans le milieu et se lier plus aux cellules, et d'autres vont davantage se lier au plastique des puits. Nous avons eu accès à des données expérimentales d'une étude *in vitro* qui ont mesuré la concentration de l'APFO dans le milieu après 1, 24 et 48h (Franco, et al, 2020). Il n'y a pas eu de différence significative entre les concentrations mesurées durant l'expérience et les concentrations initiales. D'autres études ont mesuré les liaisons de l'APFO aux protéines plasmatiques et il a été démontré que plus de 90% du PFOA se lie fortement à l'albumine sérique (Han, et al. 2003 ; Forsthuber, et al. 2020). Le milieu *in vitro* de l'étude de Franco et al., contenait de l'albumine de sérum bovin (BSA), tout comme chaque étude de notre revue de littérature, ce qui laisse croire que l'APFO en présence d'albumine reste en grande partie dans le milieu. Nous n'avons donc pas eu besoin de réaliser un modèle de bilan de masse pour déterminer la distribution du composé dans le milieu, et nous avons présumé que la concentration dans le milieu correspondait à la concentration plasmatique puisque l'APFO se lie fortement à l'albumine sérique.

III. Détermination d'un point de départ *in vitro*

Le graphique obtenu à l'issue de la revue de littérature avec HAWC a été utilisé pour la détermination du point de départ (POD). Nous avons choisi un POD en fonction des NOAEL et LOAEL disponibles sur la base d'effets considérés néfastes pour l'humain. Nous avons comparé notre POD avec les données de Toxcast, un programme de criblage à haut débit de

l'EPA, pour voir si le POD déterminé se situait dans le même intervalle de concentrations ou des effets ont été observés.

IV. Estimation d'équivalents de biosurveillance

Nous avons estimé deux équivalents de biosurveillance en utilisant le niveau plasmatique de l'APFO comme biomarqueur d'exposition pour une mère allaitant son enfant et un adulte. Un BE est la concentration interne d'une substance dans un milieu biologique correspondant à une valeur toxicologique de référence. Nous avons considéré que la concentration mesurée dans le milieu *in vitro* est un équivalent pertinent de la concentration plasmatique puisqu'on s'attend à ce que l'APFO se lie fortement à l'albumine dans le milieu de culture et dans le plasma, et que la concentration d'APFO dans le milieu ne semble pas changer pendant les tests *in vitro*. Nous avons choisi d'utiliser cette concentration comme valeur indicative d'exposition selon les critères de Hays sur les équivalents de biosurveillance (Hays et al. 2008). Nous avons converti la concentration molaire (mol/L) au POD en une concentration plasmatique (ng/mL). Afin d'obtenir notre $BE_{\text{POD-}in\ vitro}$, nous avons divisé le POD par un facteur d'extrapolation sous-chronique à chronique de 10. En effet, les études *in vitro* sont généralement de courte durée, et il est possible que les effets soient plus prononcés pour une exposition plus longue. Puisque notre POD était une concentration considérée sans effet néfaste, nous n'avons pas inclus de facteur d'incertitude LOAEL-NOAEL. Pour obtenir le $BE_{\text{POD-humain}}$, nous avons divisé le $BE_{\text{POD-}in\ vitro}$ par un facteur d'incertitude arbitraire pour l'extrapolation *in vitro* – *in vivo*, soit 3,16, en raison de la différence toxicodynamique entre l'organisme entier et les cellules en culture. (p. ex. des effets subtils pourraient être plus facilement observable au niveau de l'organisme entier qu'au niveau des cellules). Ensuite, nous avons déterminé le BE en divisant le $BE_{\text{POD-humain}}$ par un facteur d'incertitude pour la composante toxicodynamique du facteur d'incertitude interindividuel, soit 3,16. Notre concentration correspond à une dose interne, donc nous avons jugé que la composante toxicocinétique du facteur d'incertitude n'est pas nécessaire. Cette valeur représente le BE pour l'adulte.

Afin d'estimer notre BE chez une femme allaitant son enfant, nous avons utilisé un modèle pharmacocinétique (Verner et al. 2016) pour modéliser son exposition et celle de son enfant dès sa conception jusqu'à un an d'allaitement (Figure 2). Ce modèle suppose que l'APFO est entièrement absorbé par voie orale, et que l'absorption par voie cutanée et l'inhalation sont considérées comme négligeables (Verner, et al. 2016). L'exposition de la mère se fait par voie

orale, et celle de l'enfant à travers le placenta pendant la grossesse, et par l'allaitement après la naissance. Un volume de distribution de 170 ml/kg de poids corporel, un poids médian de 65 kg à 20 ans pour une femme pré-grossesse, et un taux d'élimination basé sur la demi-vie du PFOA de 3,8 ans dans le plasma humain ont été utilisés dans le modèle (Olsen, et al. 2007). Ce modèle a permis d'estimer la concentration moyenne d'une femme enceinte pour que son enfant atteigne une concentration plasmatique correspondant à notre BE déterminé comme indiqué plus haut.

V. Comparaison avec exposition dans les études épidémiologiques

Les études épidémiologiques rapportant une association entre une exposition à l'APFO et une hépatotoxicité ont été compilées dans un tableau. Pubmed a été utilisé avec les mots-clés « hepatotoxicity », « PFOA » et « human ». Nous avons extrait les distributions de concentrations plasmatiques et sériques en APFO et séparé les études qui ont rapporté des associations de celles qui n'en n'ont pas rapporté. Les concentrations d'APFO rapportées dans ces études ont été comparées aux deux équivalents de biosurveillance pour voir s'ils se situent sensiblement dans les mêmes plages de concentrations. Puisque ces études épidémiologiques ont observé une association entre des concentrations sanguines d'APFO et un effet néfaste sur la santé, nous avons considéré qu'une valeur d'exposition acceptable dans le plasma (BE) devrait idéalement se situer sous les concentrations médianes dans les études afin d'être jugée adéquate.

VI. Calcul d'un apport quotidien tolérable

Un apport quotidien tolérable a été calculé à l'aide du modèle pharmacocinétique décrit plus haut (Verner et al. 2016) et l'application de facteurs d'incertitude.

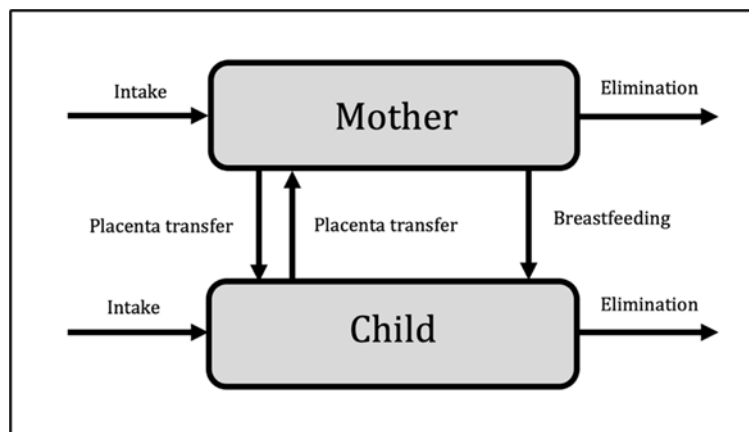


Figure 3 : Modèle pharmacocinétique pour l'exposition prénatale et postnatale aux PFAS (Verner, et al. 2015)

Nous avons déterminé deux doses journalières chez l'humain par dosimétrie inverse à partir du POD; une pour la dosimétrie chez l'enfant allaité et une pour l'adulte. Brièvement, nous avons ajusté la dose externe dans le modèle pharmacocinétique jusqu'à ce que la concentration chez l'enfant ou chez l'adulte soit égale au POD. Nous avons ensuite ajouté des facteurs d'incertitude de 10 pour la variabilité interindividuelle, 10 pour l'extrapolation subchronique-chronique, et 3.16 pour l'extrapolation *in vitro*-humain (facteur arbitraire).

Article

CONTRIBUTION DES AUTEURS

Antoine Bocéno

- a fait la collecte de données *in vitro* ;
- a travaillé sur la gestion des données, l'analyse et l'interprétation des résultats en lien avec son directeur de recherche ;
- a produit une première ébauche de l'article en anglais et intégré les commentaires des coauteurs en interaction avec son directeur de recherche ;

Marc-André Verner

- est chercheur principal sur le projet de recherche et a participé à la conception de l'étude ;
- a participé à l'interprétation des résultats en lien avec Antoine Bocéno ;
- a contribué à la révision des différentes versions de l'article, en collaboration avec Antoine Bocéno ;

Sherri Bloch

- a contribué à la révision de l'article en collaboration avec Antoine Bocéno ;

Nadia Tahiri

- a contribué à la révision de l'article en collaboration avec Antoine Bocéno ;

Carole Yauk

- révisera l'article et fournira des commentaires avant la soumission

Charu Chandrasekera

- révisera l'article et fournira des commentaires avant la soumission

A case study evaluating the use of *in vitro* data on perfluorooctanoic acid (PFOA) hepatotoxicity to derive acceptable exposure levels

Antoine Bocéno^{1,2}, Sherri Bloch², Nadia Tahiri², Carole Yauk³, Charu Chandrasekera⁴, Marc-André Verner^{1,2}

1. Centre de Recherche en Santé Publique, Université de Montréal and CIUSSS du Centre-Sud-de-l'Île-de-Montréal, Montreal, Canada
2. Department of Occupational and Environmental Health, School of Public Health, Université de Montréal, Montréal, QC
3. Department of Biology, University of Ottawa, Ottawa, Canada
4. Canadian Centre for Alternatives to Animal Methods, Canadian Centre for the Validation of Alternative Methods, University of Windsor, Windsor, Canada

Corresponding author:

Marc-André Verner

Department of Occupational and Environmental Health

School of Public Health

Université de Montréal

Pavillon Marguerite d'Youville

2375 chemin de la Côte-Sainte-Catherine, Suite 4105

E-mail : marc-andre.verner.1@umontreal.ca

Telephone: (514) 343-6465

Abstract

Acceptable exposure levels for environmental contaminants are generally calculated based on animal studies, but the scientific community is currently questioning their relevance to humans. The objective of our study was to evaluate a new approach combining *in vitro* studies on human cells and pharmacokinetic modeling to derive acceptable exposure levels. We conducted a case study on the hepatotoxicity of perfluorooctanoic acid (PFOA). We determined a point of departure (POD) based on a no observed adverse effect level (NOAEL) from *in vitro* studies using human cells. We then translated this POD into biomonitoring equivalents for breastfed children and adults, and compared them to concentrations measured in epidemiologic studies on PFOA exposure and hepatotoxicity. Acceptable exposure levels were estimated by reverse dosimetry using a pharmacokinetic model and relevant uncertainty factors. We used a POD of 1 μM from *in vitro* studies and translated it into a 414 ng/mL plasma concentration. To reach this average concentration in children exposed prenatally and by breastfeeding, we estimated that the plasma concentration in the mother at the beginning of pregnancy must be 155 ng/mL. We calculated biomonitoring equivalents of 4.14 ng/mL and 1.55 ng/mL for an adult and a pregnant woman, respectively, using relevant uncertainty factors (100). These biomonitoring equivalents were within the range of median concentrations in epidemiologic studies (0.49 to 16 ng/mL), indicating consistency. TDIs of 0.121 and 0.047 ng/kg/day for adult hepatotoxicity and developmental hepatotoxicity, respectively, were estimated using a combined uncertainty factor of 300). In conclusion, the results suggest that the evaluated approach may offer an adequate and conservative alternative to derive acceptable exposure levels.

Keywords: perfluorooctanoic acid (PFOA), *in vitro*, alternatives to animal experimentation, biological modeling, pre- and postnatal exposure, risk assessment, hepatotoxicity.

Introduction

Acceptable exposure levels for environmental contaminants (e.g., reference doses, tolerable daily intakes) are generally derived from toxicological studies using animal models. However, the scientific community is increasingly questioning the reliability of results from animal studies to predict adverse outcomes in humans due to differences in physiology, namely in terms of pregnancy, lactation, and metabolism (Hartung 2013, Hartung 2017). Epidemiologic studies regularly observe associations between exposure levels and adverse health effects in populations with levels below acceptable exposure levels (Hoffmann and Hartung, 2006). Moreover, animal studies are expensive and take years to carry out, making it impossible to assess all the chemical contaminants to which the population is exposed. Some governmental agencies are moving away from animal testing in the context of risk assessment. The U.S. Environmental Protection Agency (EPA) has announced that they will stop funding mammal studies by 2035, and European Parliament has already banned the use of animal testing in cosmetics (Desprez, et al. 2018). It is time to opt for alternatives that are faster, less expensive, and more relevant for humans.

Interest in *in vitro* studies has increased as they become more and more innovative (Bernauer, et al. 2005). *In vitro* studies are commonly used in the risk assessment for cosmetic and pharmaceutical products, namely for eye and skin irritation, corrosion assays, and genotoxicity assays. Efforts have been limited in terms leveraging this data to determine acceptable exposure levels for environmental chemicals. In a recent study, Honda et al. (2019) evaluated the use of *in vitro* data to derive points of departure (PODs) and compared those to data from animal studies. They evaluated *in vitro* data on 97 chemicals, and used a PBPK model to relate *in vitro* bioactivity and *in vivo* toxicity data in rats. Of these chemicals, 84 had *in vitro* bioactivity corresponding to *in vivo* data. Friedman, et al. (2020) determined human PODs for 448 chemicals from *in vitro* studies: 89% of chemicals had an *in vitro*-based POD lower than the POD obtained using traditional approaches. In another study, Rowan-Carroll et al. (2021) obtained bioactivity exposure ratios based on transcriptomic data from human hepatocytes exposed to PFOA that were similar to those obtained in studies using rats for risk assessment. Although these studies support the use of *in vitro* data in human health risk assessment, they were mostly evaluated against values derived from animal studies. Evaluating these methods against human data would complement previous assessment, and potentially increase the use of *in vitro* data in regulatory decision-making in risk assessment.

Our objectives were to evaluate the use of *in vitro* data and biological modeling to derive acceptable levels without the use of animals, and to compare acceptable exposure levels to levels measured in epidemiologic studies reporting associations between exposure and adverse health outcomes. We decided to perform a case study on perfluorooctanoic acid (PFOA) hepatotoxicity, an effect that has been observed in both *in vitro* and epidemiologic studies.

Methods

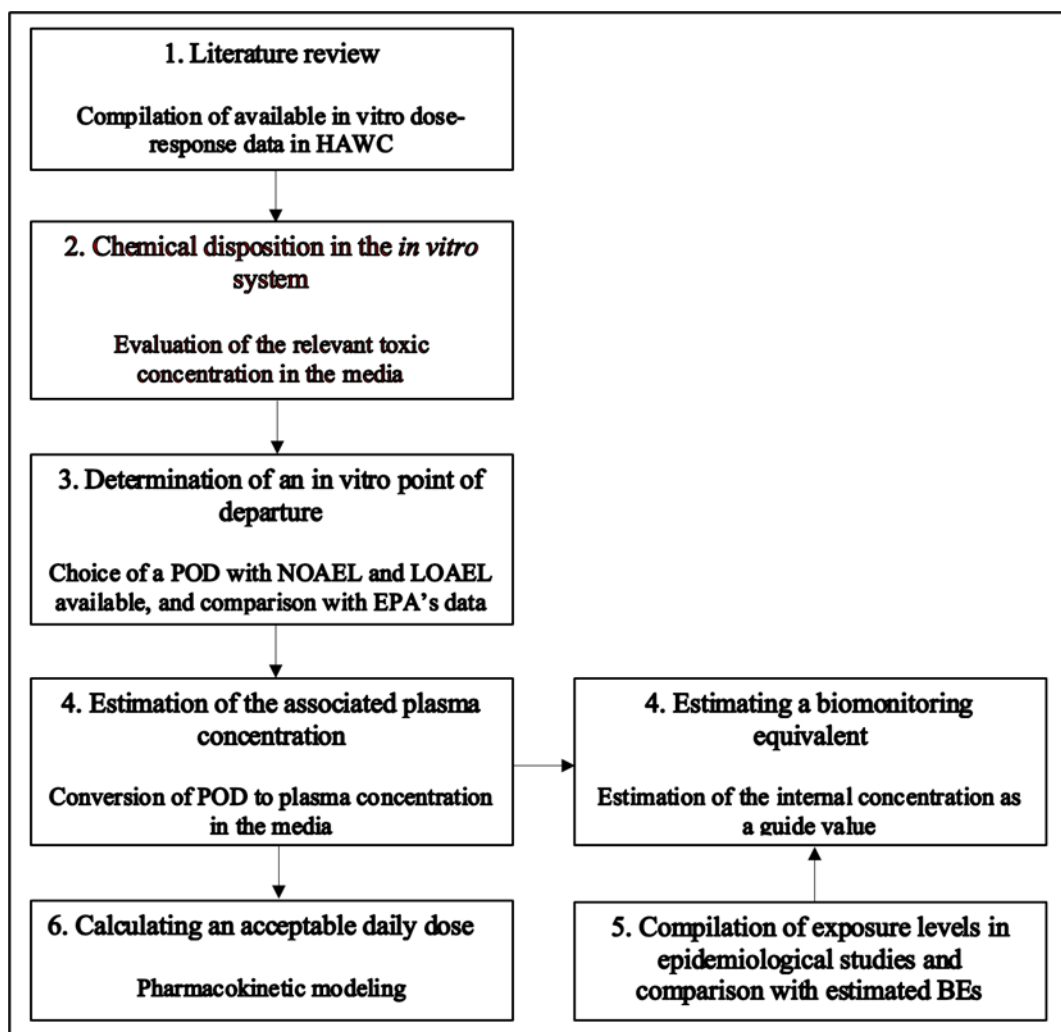


Figure 1: Study methods

I. Compilation of available *in vitro* dose-response data

We conducted a literature review on *in vitro* studies of PFOA exposure using human hepatocytes. We compiled the data using the Health Assessment Workspace Collaborative (HAWC) tool (Shapiro, et al. 2018). HAWC is a collaborative online tool used for the risk assessment of chemicals. It allows data to be extracted from all types of studies, and to juxtapose dose-response relationships for a simpler visualization that we used to determine an *in vitro* point of departure.

II. Chemical disposition in the *in vitro* system

An important step when using dose-response data from *in vitro* studies is to assess the distribution of the compound in the *in vitro* system because nominal contaminant concentrations in the medium do not always represent concentrations *in vivo* at molecular targets (Proença, et al. 2021). Chemical compounds may distribute irregularly in the medium, cells and well material (Armitage et al. 2014). Depending on the physicochemical properties of these compounds, some will bind more to cells, and others will bind more to the plastics in the wells of the *in vitro* plates. We evaluated experimental data from an *in vitro* study that measured PFOA levels in the media after 1, 24, and 48h (Franco, et al, 2020). There was no significant difference between the measured and nominal concentrations throughout the experiment. Other studies have measured the binding of PFOA to plasma proteins and estimated that more than 90% of PFOA binds strongly to serum albumin (Han, et al. 2003; Forsthuber, et al. 2020). The medium of Franco et al. (2020) study contained bovine serum albumin (BSA), which supports the hypothesis that PFOA remains mostly in the medium in the presence of albumin. Therefore, we decided not to conduct mass balance modeling to determine the distribution of the compound in the medium, and we assumed that the concentration in the medium is equivalent to a plasma concentration because PFOA binds strongly to serum albumin in both medium and blood, and should have similar partitioning into cells/tissues in both systems.

III. Determination of an *in vitro* point of departure

We obtained a graph from the literature review with HAWC for the determination of the *in vitro* POD. We chose a POD based on NOAELs and LOAELs available. We visually compared this POD with bioactivity data compiled in the EPA CompTox Dashboard to evaluate if our POD is consistent with data for the wide range of *in vitro* models in ToxCast.

IV. Estimating a biomonitoring equivalent

We estimated two biomonitoring equivalents (BEs) using plasma PFOA level as a biomarker of exposure: one for adults and one for the pregnant/breastfeeding mother to account

for developmental exposure. A BE is the biological (e.g., plasma, urine) concentration of a substance corresponding to a toxicological reference value (e.g., tolerable daily intake, reference dose). We considered that the concentration measured in the *in vitro* media is a relevant equivalent of the plasma concentration as PFOA is expected to bind strongly to albumin in plasma, and that the concentration of PFOA in the media does not appear to change during *in vitro* assays when the media contains albumin (Franco et al. 2020). We have chosen to use this concentration as an indicative exposure value according to the Hays criteria on BEs (Hays et al. 2008). We converted the molar concentration into a plasma concentration ($\mu\text{g/L}$). We first calculated a $\text{BE}_{\text{POD-}in\ vitro}$ by dividing the POD by an uncertainty factor of 10 for the subchronic to chronic exposure extrapolation. Indeed, *in vitro* studies are generally of short duration, and it is possible that the effects are more pronounced with longer exposure. Next, we calculated a $\text{BE}_{\text{POD-human}}$ by dividing the $\text{BE}_{\text{POD-}in\ vitro}$ by a default uncertainty factor related to toxicodynamics for *in vitro* – *in vivo* extrapolation (3.16). Next, we determined the BE by dividing the $\text{BE}_{\text{POD-human}}$ by an uncertainty factor for the toxicodynamic component of the inter-individual uncertainty factor (3.16). The BE corresponding to an internal dose, we assumed that the toxicokinetic component of the uncertainty factor is not necessary.

For the adult BE, we used the BE described above. For the BE that accounts for developmental exposure to PFOA, we estimated the maternal concentration during pregnancy that would lead to an average concentration in the child (between conception and one year of age) equal to this BE. We used a two-compartment pharmacokinetic, one for the mother and one for the child, to relate fetal/child and maternal PFOA dosimetry (Figure 1). The model assumes that PFOA is completely absorbed orally, and dermal absorption and inhalation are considered negligible (Verner, et al. 2016). Exposure for the mother was assumed to be through oral ingestion, and children were assumed to be exposed through placental and lactational transfer. We used a volume of distribution of 170 mL/kg, a median pre-pregnancy body weight of 70 kg, a maternal age of 20 years at the beginning of pregnancy, a child's birth weight of 3.4 kg, and an elimination rate based on the half-life of PFOA of 3.8 years in human plasma. (Olsen, et al. 2007).

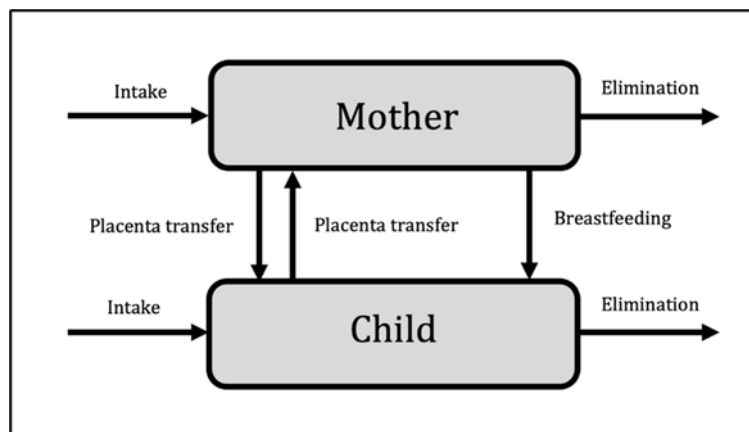


Figure 2: Pharmacokinetic model of prenatal and postnatal exposure to perfluoroalkyl substances (Verner, and al. 2016)

V. Compilation of plasma/serum levels in epidemiologic studies and comparison with estimated BEs

We compiled epidemiologic studies reporting an association between PFOA exposure and hepatotoxicity. Pubmed was used with the keywords “hepatotoxicity”, “PFOA” and “human”. We extracted the PFOA concentration distributions (median and 95th percentile) for plasma, and we compared them to the two calculated BEs to see if they were within the same concentration ranges. Given that these epidemiological studies have observed an association between serum/plasma concentrations of PFOA and adverse effects, we considered that an acceptable exposure level in plasma (BE) should ideally be below the median concentrations in the studies to be considered protective.

Results

I. Determination of an *in vitro* point of departure

We found seven relevant studies with 19 endpoints from *in vitro* assays studying the effects of PFOA on human hepatocytes (Figure 5). The range of NOAELs was from 0.0001 μM to 1000 μM . We selected a POD representing a NOAEL of 1 μM ; NOAELs below 1 μM were based on transcriptomic markers that are not necessarily associated with adverse effects.

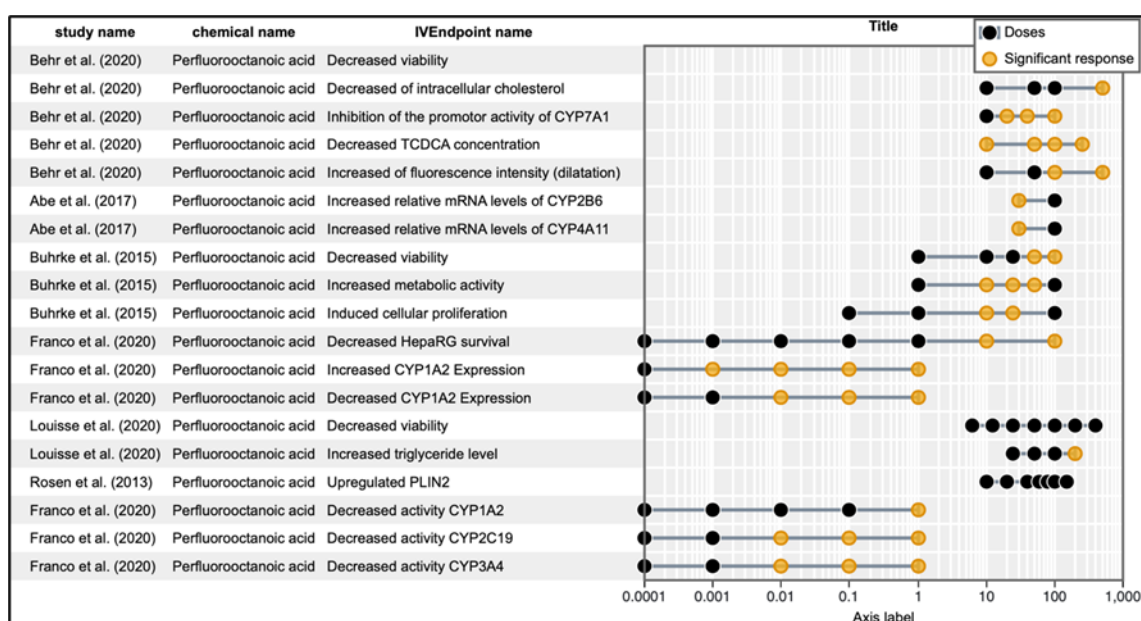


Figure 3: Dose-response relationships from *in vitro* studies in HAWC, with doses ranging from 0,0001 μM to 1 μM

We compared the selected POD to the data compiled in the EPA's Comptox Dashboard (Figure 6). The dots in the Figure represent the half-maximal activity concentration (AC50) for different endpoints. The selected 1 μM POD is below most AC50s, with the exception of a few values between 0.1 and 1 μM corresponding to endpoints like decreased catalytic activity and regulation of transcription factor activity.

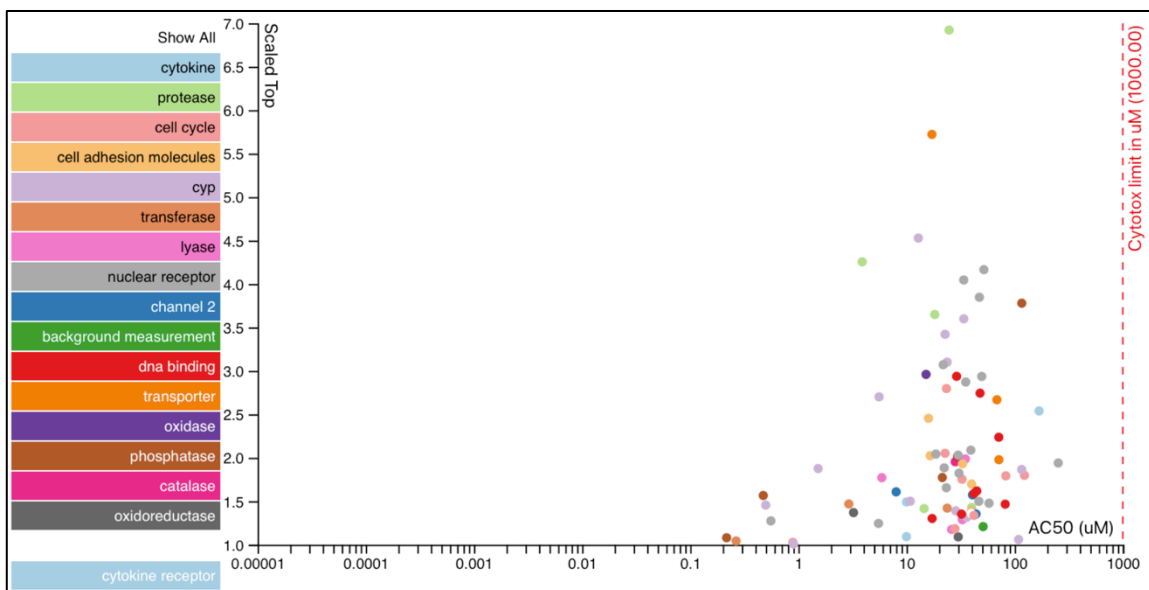


Figure 4: EPA's Toxcast data of PFOA

II. Estimating a biomonitoring equivalent

We converted the 1 μM POD into a plasma concentration of 414 ng/mL by multiplying with its molar mass (414 g/mol). After adding uncertainty factors, we determined a BE of 4.14 ng/mL for adults. To reach an average level equal to that BE in breastfed children, the maternal concentration needs to be 1.55 ng/mL. Therefore, we considered that the BE for pregnant women is 1.55 ng/mL.

III. Comparison with epidemiologic studies

We compared the BEs estimated in the previous section with the serum concentrations of participants from five epidemiologic studies reporting an association between exposure to PFOA and hepatotoxicity. These studies median plasma or serum concentrations ranging from 0.49 to 16 ng/mL. BEs were within the range of median concentrations.

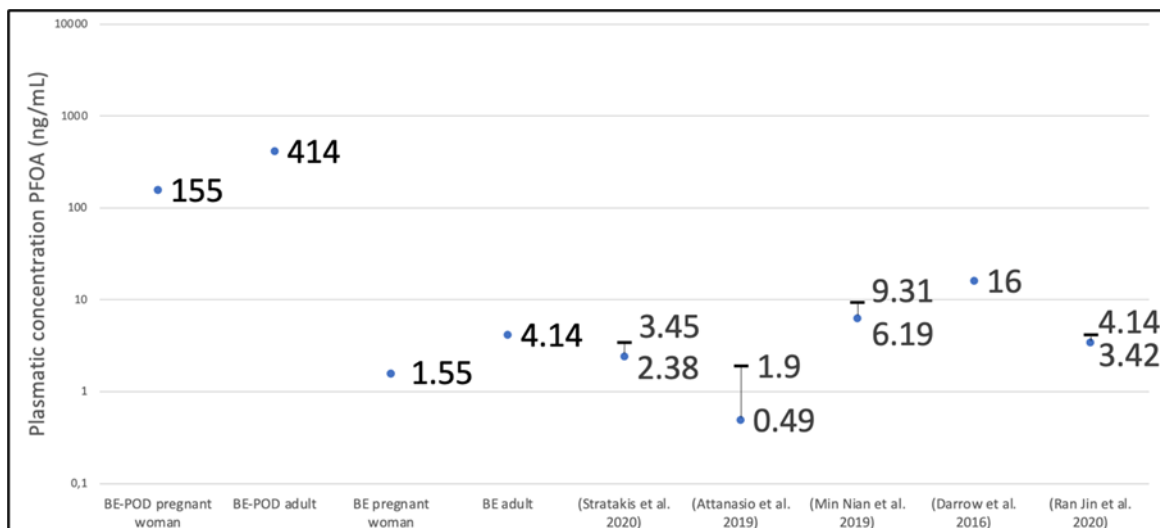


Figure 5: Comparison of biomonitoring equivalent with epidemiological studies

The error bars were represented for each study, with 75th for Stratakis et al. (2020), maximum value for Attanasio et al. (2019), 75th percentile for Min Nian et al. (2019), and 95th percentile for Ran Jin et al. (2020). We only had the median for Darrow et al. (2016).

IV. Calculating an acceptable daily dose

We determined acceptable daily doses for an adult and a pregnant/breastfeeding woman. For an adult, we estimated, with a pharmacokinetic model, that a daily dose of 36.2 ng/kg/day is needed to reach a plasma concentration of 414 ng/mL. For the pregnant/breastfeeding woman, we started from an average concentration of 414 ng/mL in the child exposed from conception to one year of age. We found that the mother should have a plasma concentration of 155 ng/mL to reach an average concentration of 414 ng/mL in the developing child breastfed for 12 months. We determined that a maternal daily dose of 14.1 ng/kg/day is needed to achieve this internal concentration in pregnant women. We added three uncertainty factors and obtained acceptable exposure levels of 0.12 ng/kg/day for an adult, and 0.047 ng/kg/day for a pregnant/breastfeeding woman.

Discussion

In this study, we evaluated a new approach to establish acceptable exposure levels without animal testing. We calculated biomonitoring equivalents (BEs) and acceptable exposure levels for adults and pregnant/breastfeeding women using *in vitro* studies of PFOA hepatotoxicity and pharmacokinetic modeling, and we compared the BEs to levels measured in epidemiologic studies reporting associations between exposure to PFOA and hepatotoxicity-related outcomes. Calculated BEs were 4.14 ng/mL for adults, and 1.55 ng/mL for pregnant women. We calculated acceptable exposure levels of 0.12 ng/kg/day for adults and 0.047 ng/kg/day for pregnant/breastfeeding women. As pregnant women and children may be particularly vulnerable populations with regards to PFOA adverse health effects, we believe the acceptable exposure level derived for pregnant/breastfeeding women may be protective for the entire population.

We selected a point of departure of 1 μ M based on our literature review for adverse effects in hepatocytes. One study found significant changes in the transcription and enzyme activity in hepatocytes at levels below 1 μ M (Franco, et al. 2020). They found a decrease in the activity of CYP2C19 and CYP3A4 starting at a concentration of 0.01 μ M, and an increase in the expression of CYP1A2 starting at a concentration of 0.001 μ M. In this study, we refrained from using these values as points of departure because increased expression of a gene or enzyme activity may not necessarily reflect an adverse effect. We were within the range of plasma concentrations, and ToxCast's data confirmed this choice. The fact that our POD was consistent with the lowest AC50 values from ToxCast, and that our BEs were within the range of median

Table 1: Comparison of epidemiological studies with a positive association between exposure of PFOA and hepatotoxicity-related endpoints

Studies	Measured effect	Biological sample	Results
Stratakis, et al. (2020)	Hepatic injury and serum metabolic alteration in children (median age of 8.2 years)	Maternal serum (PFOA) and child serum (from 6 to 10 years) (biomarkers of liver injury). Maternal blood was collected during the middle of pregnancy (between 13.7 and 18.7 weeks) and at the end of pregnancy (between 26.1 and 39.4 weeks).	Median: 2.38 ng/mL 25 th percentile: 1.45 ng/mL 75 th percentile: 3.45 ng/mL
Attanasio, et al. (2019)	Increased GGT, AST, ALT and total bilirubin	Serum (PFOA and biomarkers of liver injury) from fasting adolescent (12 to 19 years)	Men median: 0.59 ng/mL Women median: 0.49 ng/mL 100 th percentile : 1.90 ng/mL
Nian, et al. (2019)	Increased serum level of clinical biomarkers of liver function	Serum (PFOA and biomarkers of liver injury) from fasting adult (22 to 96 years)	Median: 6.19 ng/mL 75 th percentile: 9.31 ng/mL
Darrow, et al. (2016)	Increased GGT, ALT and direct bilirubin	Serum (PFOA and biomarkers of liver injury) from fasting adult (≥ 20 years)	Men median: 17.1 ng/mL Woman median: 16 ng/mL
Jin, et al. (2020)	Histological injury of non-alcoholic fatty liver disease in children	Serum (PFOA and biomarkers of liver injury) from fasting children (7 to 19 years)	Median: 3.42 ng/mL 95 th percentile L 4.14 ng/mL

GGT: gamma glutamyltransferase; AST: aspartate aminotransferase; ALT: alanine aminotransferase.

concentrations from epidemiologic studies reporting associations between PFOA and hepatotoxicity provides some support to selecting PODs associated with apical effects.

We compared our BEs with 5 epidemiological studies that measured hepatotoxicity markers related to PFOA exposure. The Stratakis et. al (2020) study evaluated the association between maternal and child PFAS levels and hepatic injury (based on liver enzyme concentrations) and serum metabolic alteration in children using Bayesian Kernel Machine Regression (BKMR). Maternal serum PFOA level was measured during the second trimester and the end of the pregnancy, whereas child serum PFOA concentration was measured at 6-8 years of age. This study reported an association between the PFAS mixture in maternal serum and liver injury during childhood, and PFNA and PFOA had the greatest contribution to the mixture effect. No threshold was found in this study, and effects estimates were not provided for PFOA alone. Attanasio et al. (2019) evaluated the cross-sectional association between serum

PFOA concentration in adolescents (12-19 years) and liver function (based on liver enzyme concentrations) using linear regression. In multiple regression models, serum PFOA concentrations were associated with increased alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and gamma glutamyltransferase (GGT), but only in females. Analyses based on quartiles of exposure supported a linear association, and did not allow identifying a threshold. In a cross-sectional study of 22 to 96-year-olds by Nian et al. (2019), each ln increase in serum PFOA concentrations was associated with an increase in many biomarkers of liver function, namely a 7.4% increase in ALT levels (95% confidence interval: 3.9-11.0%). In the C8 study (Darrow et al. 2016), modeled serum PFOA concentrations in adults were associated with increased ALT levels. For example, moving from the first to the fifth quintile of cumulative PFOA exposure was associated with a 6% increase in ALT levels (95% confidence interval: 4-8%), with no indication of a threshold. Finally, Jin et al. (2020) evaluated the association between plasma PFOA concentration and severity of nonalcoholic fatty liver in 74 children. Overall, PFOA was not associated with liver histology indicators associated with liver disease.

Because no serum PFOA concentration threshold for hepatotoxicity was identified in the epidemiological studies discussed above, direct comparison with estimated BEs is challenging. Associations were mostly linear, and medians ranged from 0.59 mg/mL to 17.1 ng/mL. The BE derived from pregnant/breastfeeding woman (1.55 ng/mL) is comparable with the median serum PFOA level (2.38 ng/mL) in the only developmental hepatotoxicity study (Strakastis et al. 2020). The medians of the other studies ranged from 0.49 ng/mL to 17.1 ng/mL; our BE for adults (4.14 ng/mL) falls within this range. Although it's impossible to determine a serum PFOA concentration with no adverse hepatic effect from available epidemiological studies, the BEs derived herein would have allowed determining that a portion of the participants in most of these studies were above a concentration with negligible risk. Overall, we believe this comparison provides partial support for the use of *in vitro* data and biological modeling to derive acceptable exposure levels. We obtained acceptable exposure levels of 0.12 ng/kg/day for adults and 0.047 ng/kg/day for pregnant/breastfeeding women. We compared these values to Health Canada and EPA acceptable exposure levels based on animal studies data. The tolerable daily intake (TDI) set by Health Canada is 21 ng/kg/day. To derive this value, they chose a BMDL10 of 0.05 mg/kg/day from the study Perkins et al. (2005) for hepatocellular hypertrophy in rats. Then, they added an AKUF (animal to human kinetic uncertainty factor) of 96 derived from PBPK modeling. Finally, they added an interspecific

factor of 2.5, and an intraspecific factor of 10, for a total of 25. The reference dose (RfD) derived by the US Environmental Protection Agency is 20 ng/kg/day. They derived this value using a LOAEL of 1 mg/kg/day from the study Lau et al. (2006), which reported reduced ossification and accelerated puberty in male offspring born to gestationally-exposed dams. EPA used a composite uncertainty factor of 300, including a factor of 10 for LOAEL-NOAEL extrapolation, 3 for animal-human extrapolation and 10 for intraspecific. The acceptable exposure levels calculated in our study were approximately two orders of magnitude lower than those of Health Canada and EPA. Our results suggest that *in vitro*-based acceptable exposure levels may be more conservative than animal-based values, in line with findings from Friedman et al. (2019). The study from Friedman et al. (2019) determined PODs for 448 chemicals from *in vitro* data, then compared them to PODs determined using the traditional approach; 89% of *in vitro*-based PODs were lower than traditional PODs. Of note, Friedman did not use uncertainty factors.

Our study has some limitations. Our results are based on a single POD that was selected arbitrarily, and we did not perform benchmark dose modeling. Also, altered gene expression observed below 1 uM may have implications for human health; in this case, our estimates would not be sufficiently protective. Because this is a new approach to derive guidance values, assumptions were made in terms of which uncertainty factors should be included compared to the traditional approach. Moreover, the pharmacokinetic model is partially evaluated, and the evaluation performed by Verner et al. (2016) suggests there is an important part of variability in plasma concentrations in children that is not explained by the model. Using a full PBPK model could be more appropriate, but PBPK model evaluation for prenatal and postnatal exposure is limited. Also, we considered that the concentration in the media could be converted into plasma concentration as a point of departure. The distribution of the compound in cells may differ between the *in vitro* system and humans if their composition (e.g., protein content) is different. Likewise, this approach can be used for other chemical compounds only if the parent compound is toxic and not its metabolites, because most *in vitro* models are not metabolically competent.

Conclusion

We derived BEs and acceptable exposure levels for adults and pregnant/breastfeeding based on *in vitro* studies of PFOA hepatotoxicity and pharmacokinetic modeling. We compared

the BEs with concentrations found in epidemiologic studies reporting associations between exposure and hepatotoxicity, and values were in the range of median concentrations. It is necessary to carry out other case studies to advance and validate this new approach in risk assessment in order to use the results of *in vitro* studies to derive acceptable exposure levels and regulatory decision-making.

Acknowledgments

This research project is funded by the Coordinating Committee for Research in Canada (New Frontiers in Research Fund). Nadia Tahiri was the recipient of a postdoctoral fellowship from the Fonds de recherche du Québec - Santé (FRQS). Marc-André Verner is the recipient of a Research Scholars J2 Award from the Fonds de recherche du Québec - Santé (FRQS).

Declaration of interest: none.

References

Abe T, Takahashi M, Kano M, Amaike Y, Ishii C, Maeda K, and al. Activation of nuclear receptor CAR by an environmental pollutant perfluorooctanoic acid. *Arch Toxicol.* 2017;91(6):2365-74.

Andersen ME, Clewell HJ, Carmichael PL, Boekelheide K. Can case study approaches speed implementation of the NRC report: "toxicity testing in the 21st century: a vision and a strategy?". *ALTEX.* 2011;28(3):175-82.

Andrea Rowan-Carroll, Anthony Reardon, Karen Leingartner, Remi Gagné, Andrew Williams, Matthew J Meier, Byron Kuo, Julie Bourdon-Lacombe, Ivy Moffat, Richard Carrier, Andy Nong, Luigi Lorusso, Stephen S Ferguson, Ella Atlas, Carole Yauk, High-Throughput Transcriptomic Analysis of Human Primary Hepatocyte Spheroids Exposed to Per- and Polyfluoroalkyl Substances as a Platform for Relative Potency Characterization, *Toxicological Sciences*, Volume 181, Issue 2, June 2021, Pages 199–214, <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfab039>

Attanasio R. Association between perfluoroalkyl acids and liver function: Data on sex differences in adolescents. *Data Brief.* 2019;27:104618.

Behr AC, Kwiatkowski A, Ståhlman M, Schmidt FF, Luckert C, Braeuning A, and al. Impairment of bile acid metabolism by perfluorooctanoic acid (PFOA) and perfluorooctanesulfonic acid (PFOS) in human HepaRG hepatoma cells. *Arch Toxicol.* 2020;94(5):1673-86.

Bernauer U, Oberemm A, Madle S, Gundert-Remy U. The Use of in vitro Data in Risk Assessment. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology.* 2005;96(3):176-

Buhrke T, Krüger E, Pevny S, Rößler M, Bitter K, Lampen A. Perfluorooctanoic acid (PFOA) affects distinct molecular signalling pathways in human primary hepatocytes. *Toxicology.* 2015;333:53-62.

Calafat AM, Wong L-Y, Kuklennyik Z, Reidy JA, Needham LL. Polyfluoroalkyl Chemicals in the U.S. Population: Data from the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2003–2004 and Comparisons with NHANES 1999–2000. *Environmental Health Perspectives.* 2007;115(11):1596-602.

Darrow LA, Groth AC, Winqvist A, Shin HM, Bartell SM, Steenland K. Modeled Perfluorooctanoic Acid (PFOA) Exposure and Liver Function in a Mid-Ohio Valley Community. *Environ Health Perspect.* 2016;124(8):1227-33.

Forsthuber M, Kaiser AM, Granitzer S, Hassl I, Hengstschläger M, Stangl H, and al. Albumin is the major carrier protein for PFOS, PFOA, PFHxS, PFNA and PFDA in human plasma. *Environment International.* 2020;137:105324.

Franco ME, Sutherland GE, Fernandez-Luna MT, Lavado R. Altered expression and activity of phase I and II biotransformation enzymes in human liver cells by perfluorooctanoate (PFOA) and perfluorooctane sulfonate (PFOS). *Toxicology.* 2020;430:152339.

Han X, Snow TA, Kemper RA, Jepson GW. Binding of perfluorooctanoic acid to rat and human plasma proteins. *Chem Res Toxicol.* 2003;16(6):775-81.

Hartung, T. (2013). "Look back in anger - what clinical studies tell us about preclinical work." *ALTEX* 30(3): 275-291.

Hartung, T. (2017). "Evolution of toxicological science: the need for change." *International Journal of Risk Assessment and Management* 20(1-3): 21-45.

Hays SM, Aylward LL, LaKind JS, Bartels MJ, Barton HA, Boogaard PJ, and al. Guidelines for the derivation of Biomonitoring Equivalents: Report from the Biomonitoring Equivalents Expert Workshop. *Regulatory Toxicology and Pharmacology.* 2008;51(3, Supplement):S4-S15.

Hoffmann, S. and T. Hartung (2006). "Toward an evidence-based toxicology." *Human & Experimental Toxicology* 25(9): 497-513.

Honda, G. S., R. G. Pearce, L. L. Pham, R. Setzer, B. A. Wetmore, N. S. Sipes, J. Gilbert, B. Franz, R. S. Thomas and J. F. Wambaugh (2019). "Using the concordance of in vitro and in vivo data to evaluate extrapolation assumptions." *PloS one* 14(5): e0217564.

Hoffmann S, Kleinstreuer N, Alépée N, Allen D, Api AM, Ashikaga T, and al. Non-animal methods to predict skin sensitization (I): the Cosmetics Europe database<sup/>. *Crit Rev Toxicol.* 2018;48(5):344-58.

Jin R, McConnell R, Catherine C, Xu S, Walker DI, Stratakis N, and al. Perfluoroalkyl substances and severity of nonalcoholic fatty liver in Children: An untargeted metabolomics approach. *Environment International.* 2020;134:105220.

Kieskamp KK, Worley RR, McLanahan ED, Verner MA. Incorporation of fetal and child PFOA dosimetry in the derivation of health-based toxicity values. *Environ Int.* 2018;111:260-7.

Louisse J, Rijkers D, Stoopen G, Janssen A, Staats M, Hoogenboom R, and al. Perfluorooctanoic acid (PFOA), perfluorooctane sulfonic acid (PFOS), and perfluorononanoic acid (PFNA) increase triglyceride levels and decrease cholesterologenic gene expression in human HepaRG liver cells. *Arch Toxicol.* 2020;94(9):3137-55.

Nian M, Li QQ, Bloom M, Qian ZM, Syberg KM, Vaughn MG, and al. Liver function biomarkers disorder is associated with exposure to perfluoroalkyl acids in adults: Isomers of C8 Health Project in China. *Environ Res.* 2019;172:81-8.

Paul Friedman K, Gagne M, Loo LH, Karamertzanis P, Netzeva T, Sobanski T, Franzosa JA, Richard AM, Lougee RR, Gissi A, Lee JJ, Angrish M, Dorne JL, Foster S, Raffaele K, Bahadori T, Gwinn MR, Lambert J, Whelan M, Rasenberg M, Barton-Maclaren T, Thomas RS. Utility of In Vitro Bioactivity as a Lower Bound Estimate of In Vivo Adverse Effect Levels and in Risk-Based Prioritization. *Toxicol Sci.* 2020 Jan 1;173(1):202-225. doi: 10.1093/toxsci/kfz201. PMID: 31532525; PMCID: PMC7720780.

Proença S, Escher BI, Fischer FC, Fisher C, Grégoire S, Hewitt NJ, and al. Effective exposure of chemicals in in vitro cell systems: A review of chemical distribution models. *Toxicol In Vitro.* 2021;73:105133.

Prevedouros, K., I. T. Cousins, R. C. Buck and S. H. Korzeniowski (2006). "Sources, Fate and Transport of Perfluorocarboxylates." *Environmental Science & Technology* 40(1): 32-44.

Shapiro AJ, Antoni S, Guyton KZ, Lunn RM, Loomis D, Rusyn I, and al. Software Tools to Facilitate Systematic Review Used for Cancer Hazard Identification. *Environmental Health Perspectives.* 2018;126(10):104501.

Stratakis N, D VC, Jin R, Margetaki K, Valvi D, Siskos AP, and al. Prenatal Exposure to Perfluoroalkyl Substances Associated With Increased Susceptibility to Liver Injury in Children. *Hepatology.* 2020;72(5):1758-70.

Verner MA, Ngueta G, Jensen ET, Fromme H, Völkel W, Nygaard UC, and al. A Simple Pharmacokinetic Model of Prenatal and Postnatal Exposure to Perfluoroalkyl Substances (PFASs). *Environ Sci Technol.* 2016;50(2):978-86.

Rijs, K. and R. Bogers (2017). "PFOA and possible health effects: A review of scientific literature."

Yan S, Zhang H, Guo X, Wang J, Dai J. High perfluorooctanoic acid exposure induces autophagy blockage and disturbs intracellular vesicle fusion in the liver. Arch Toxicol. 2017;91(1):247-58.

Discussion générale

Ce mémoire propose une nouvelle approche en évaluation des risques toxicologiques pour élaborer des valeurs d'exposition acceptables sans avoir recours à l'expérimentation animale. Nous avons choisi de réaliser cette étude de cas sur l'acide perfluorooctanoïque pour déterminer des équivalents de biosurveillance, et des apports quotidiens tolérables, en combinant les résultats d'études *in vitro* utilisant des hépatocytes humains à de la modélisation biologique. Les concentrations obtenues ont ensuite été comparées à celles retrouvées dans les études épidémiologiques qui ont rapporté des associations entre une exposition à l'APFO et des marqueurs d'hépatotoxicité, afin de déterminer la cohérence de nos résultats. À ma connaissance, cette étude est la première à proposer ce type d'approche en analyse de risques toxicologiques en comparant les concentrations issues des données *in vitro* avec les résultats d'études épidémiologiques.

Nous avons estimé des équivalents de biosurveillance et des apports quotidiens tolérables pour un adulte et une femme enceinte/allaitante exposant son enfant durant la grossesse puis l'allaitement, puisque cette population est souvent considérée comme vulnérable face aux contaminants. Nous avons utilisé un modèle pharmacocinétique afin d'estimer la concentration de la mère et celle de son enfant exposé via les échanges placentaires et l'allaitement.

I. Retour sur les résultats

Nous sommes partis d'un point de départ de 1 μM après la compilation des données dans HAWC. Il se situait dans les valeurs inférieures des AC50 compilées dans le CompTox Dashboard de l'EPA. Nous avons considéré que la concentration dans le milieu pouvait être directement convertie en concentration plasmatique puisque des données expérimentales ont démontré que la concentration dans le milieu *in vitro* demeure stable durant l'expérience, et que l'APFO se retrouve principalement sous sa forme liée à l'albumine sérique dans les deux systèmes. Nous avons estimé une concentration plasmatique associée à notre POD de 414 ng/mL. Nous avons trouvé à l'aide d'un modèle pharmacocinétique que la mère devait avoir une concentration plasmatique de 155 ng/mL au début de la grossesse pour que son enfant ait

une concentration moyenne égale à notre 414 ng/mL entre le moment de la conception jusqu'à l'âge de 12 mois. Nous avons ensuite déterminé des équivalents de biosurveillance pour une femme enceinte et un adulte de 1,55 ng/mL et de 4,14 ng/mL, après l'ajout des facteurs d'incertitude (100). Ces équivalents de biosurveillance se trouvaient dans les plages des concentrations médianes des études épidémiologiques qui ont rapporté un lien entre l'exposition à l'APFO et des marqueurs d'hépatotoxicité (0,5 à 16 ng/mL). Enfin, nous avons obtenu des doses d'exposition externes correspondantes de 14,1 ng/kg/jour et 36,2 ng/kg/jour pour une femme enceinte et un adulte, qui ont été réduits à 0,047 ng/kg/jour et 0,12 ng/kg/jour après l'ajout des facteurs d'incertitude (300).

II. Comparaison avec les valeurs guides actuelles

Les valeurs d'exposition acceptables en vigueur établies par les instances gouvernementales sont principalement issues d'études animales. L'apport quotidien tolérable (AQT, Santé Canada), et la Reference Dose (RfD, EPA) pour l'APFO sont respectivement de 21 ng/kg/jour et de 20 ng/kg/jour. Nos valeurs mesurées dans notre étude sont donc bien inférieures aux valeurs guides actuelles. Nos résultats laissent croire que cette nouvelle approche pour déterminer des valeurs d'exposition acceptables à partir de données *in vitro* pourrait être plus protectrice que l'approche traditionnelle. L'étude de Friedman et al. (2019) a déterminé les POD de 448 produits chimiques à partir de données *in vitro*, puis les ont comparés aux POD déterminés à l'aide de l'approche traditionnelle ; 89 % des POD *in vitro* étaient inférieurs aux POD traditionnels. Nos résultats sont en lien avec ceux de Friedman.

III. Limitations de l'étude

Le choix de notre POD est la base de l'approche proposée. Nous avons observé des effets significatifs à des doses inférieures à notre POD, soit des changements au niveau de l'expression génique. Il est nécessaire de séparer les effets considérés néfastes chez l'humain de ceux qui ne le sont pas. Cependant, si d'autres études devenaient disponibles avec des effets pertinents à des concentrations plus basses, ou si nous estimons qu'un effet transcriptomique

dans une étude pourraient être considéré comme un effet néfaste, alors nos valeurs seraient plus faibles.

Nous avons choisi nos facteurs d'incertitude sur la base de nos connaissances dans le domaine. L'utilisation des facteurs d'incertitude est moins claire car notre approche n'est pas traditionnelle. Le facteur d'incertitude sous-chronique à chronique peut être ajusté. Il est compliqué de justifier ce facteur car les études *in vitro* ne peuvent pas être aussi longues que les études animales, et il est difficile de déterminer la durée de l'étude correspondant à un effet chronique.

De plus, nous avons considéré que la concentration dans le milieu pouvait être directement convertie en concentration plasmatique comme point de départ de notre étude. La distribution du composé peut différer entre les cellules *in vitro* et humaines si leur composition (par exemple en protéines) est différente.

Toutes les études épidémiologies sélectionnées pour cette étude de cas ont été réalisées sur des adultes ou des enfants chez qui on a mesuré les concentrations plasmatiques ou sériques d'APFO. L'idéal aurait été d'avoir une étude sur l'exposition prénatale et postnatale, avec une mesure du sang au cordon ombilical, pour évaluer les effets d'une exposition développementale.

IV. Perspectives

Nous savons, en principe, que l'APFO est presque totalement lié à l'albumine, et donc que la concentration dans le milieu peut être traduite directement en concentration plasmatique. Toutefois, il est possible de faire de la modélisation du bilan de masse dans le système *in vitro* afin d'estimer la concentration réelle présente dans le milieu et dans les cellules, à l'aide par exemple du modèle Armitage et al. (2009), qui simule le devenir et le transport de l'APFO. Il serait également intéressant de réaliser une modélisation dose-réponse afin d'estimer la concentration cellulaire minimale associée à un niveau de réponse prédéfini de 5 %, connu sous le nom de la benchmark dose (BMD), à partir des relations doses-réponses obtenues dans la revue de littérature. Et enfin, il est possible de réaliser la même étude de cas sur d'autres types de cellules et donc un autre effet qu'une hépatotoxicité. Il est également tout à fait possible d'utiliser cette nouvelle approche sur un autre contaminant, mais il faut un modèle PBPK adapté pour estimer les doses d'exposition externes associées, et il pourrait s'avérer nécessaire de faire

de la modélisation du bilan de masse dans le système. Cette étude de cas pourra être utilisée pour les futures recherches dans le domaine de l'analyse de risques.

Conclusion

En conclusion, cette étude a permis de calculer des équivalents de biosurveillance et des apports quotidiens tolérables pour une femme enceinte/allaitante et un adulte, sur la base de résultats issus des études *in vitro* à l'aide de la modélisation biologique. Les équivalents de biosurveillance calculés sur la base d'études *in vitro* se situaient dans l'intervalle des concentrations médianes issues des études épidémiologiques. Nos résultats laissent donc croire que l'approche évaluée offre une alternative adéquate et prudente pour élaborer des niveaux d'exposition acceptables sans avoir à utiliser de modèles animaux. Il est nécessaire de réaliser d'autres études de cas pour utiliser les données *in vitro* dans la prise de décision réglementaire.

Bibliographie

Abe T, Takahashi M, Kano M, Amaike Y, Ishii C, Maeda K, et al. Activation of nuclear receptor CAR by an environmental pollutant perfluorooctanoic acid. *Arch Toxicol.* 2017;91(6):2365-74.

Abercrombie M. Contact inhibition in tissue culture. *In Vitro.* 1970;6(2):128-42.

Andersen ME. Toxicokinetic modeling and its applications in chemical risk assessment. *Toxicology Letters.* 2003;138(1):9-27.

Andersen ME, Clewell HJ, Carmichael PL, Boekelheide K. Can case study approaches speed implementation of the NRC report: "toxicity testing in the 21st century: a vision and a strategy?". *ALTEX.* 2011;28(3):175-82.

Andrea Rowan-Carroll, Anthony Reardon, Karen Leingartner, Remi Gagné, Andrew Williams, Matthew J Meier, Byron Kuo, Julie Bourdon-Lacombe, Ivy Moffat, Richard Carrier, Andy Nong, Luigi Lorusso, Stephen S Ferguson, Ella Atlas, Carole Yauk, High-Throughput Transcriptomic Analysis of Human Primary Hepatocyte Spheroids Exposed to Per- and Polyfluoroalkyl Substances as a Platform for Relative Potency Characterization, *Toxicological Sciences*, Volume 181, Issue 2, June 2021, Pages 199–214, <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfab039>

Attanasio R. Association between perfluoroalkyl acids and liver function: Data on sex differences in adolescents. *Data Brief.* 2019;27:104618.

Barry V, Winqvist A, Steenland K. Perfluorooctanoic Acid (PFOA) Exposures and Incident Cancers among Adults Living Near a Chemical Plant. *Environmental Health Perspectives.* 2013;121(11-12):1313-8.

Behr AC, Kwiatkowski A, Ståhlman M, Schmidt FF, Luckert C, Braeuning A, et al. Impairment of bile acid metabolism by perfluorooctanoic acid (PFOA) and perfluorooctanesulfonic acid (PFOS) in human HepaRG hepatoma cells. *Arch Toxicol.* 2020;94(5):1673-86.

Bernauer U, Oberemm A, Madle S, Gundert-Remy U. The Use of in vitro Data in Risk Assessment. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology.* 2005;96(3):176-81.

Bornehag C-G, Kitraki E, Stamatakis A, Panagiotidou E, Rudén C, Shu H, et al. A Novel Approach to Chemical Mixture Risk Assessment—Linking Data from Population-Based Epidemiology and Experimental Animal Tests. *Risk Analysis*. 2019;39(10):2259-71.

Buhrke T, Krüger E, Pevny S, Rößler M, Bitter K, Lampen A. Perfluorooctanoic acid (PFOA) affects distinct molecular signalling pathways in human primary hepatocytes. *Toxicology*. 2015;333:53-62.

Butenhoff J, Costa G, Elcombe C, Farrar D, Hansen K, Iwai H, et al. Toxicity of Ammonium Perfluorooctanoate in Male Cynomolgus Monkeys after Oral Dosing for 6 Months. *Toxicological Sciences*. 2002;69(1):244-57.

Butenhoff JL, Chang S-C, Olsen GW, Thomford PJ. Chronic dietary toxicity and carcinogenicity study with potassium perfluorooctanesulfonate in Sprague Dawley rats. *Toxicology*. 2012;293(1):1-15.

Butenhoff JL, Gaylor DW, Moore JA, Olsen GW, Rodricks J, Mandel JH, et al. Characterization of risk for general population exposure to perfluorooctanoate. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2004;39(3):363-80.

Butenhoff JL, Kennedy GL, Frame SR, O'Connor JC, York RG. The reproductive toxicology of ammonium perfluorooctanoate (APFO) in the rat. *Toxicology*. 2004;196(1):95-116.

Butenhoff JL, Kennedy GL, Jr., Hinderliter PM, Lieder PH, Jung R, Hansen KJ, et al. Pharmacokinetics of Perfluorooctanoate in Cynomolgus Monkeys. *Toxicological Sciences*. 2004;82(2):394-406.

Butenhoff JL, Pieterman E, Ehresman DJ, Gorman GS, Olsen GW, Chang S-C, et al. Distribution of perfluorooctanesulfonate and perfluorooctanoate into human plasma lipoprotein fractions. *Toxicology Letters*. 2012;210(3):360-5. Calafat AM, Wong L-Y, Kuklenyik Z, Reidy JA, Needham LL. Polyfluoroalkyl Chemicals in the U.S. Population: Data from the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2003–2004 and Comparisons with NHANES 1999–2000. *Environmental Health Perspectives*. 2007;115(11):1596-602.

Canada ECeS. Screening assessment report perfluorooctanoic acid, its salts, and its precursors. 2012.

Cui L, Liao C-y, Zhou Q-f, Xia T-m, Yun Z-j, Jiang G-b. Excretion of PFOA and PFOS in Male Rats During a Subchronic Exposure. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 2010;58(1):205-13.

Cui L, Zhou Q-f, Liao C-y, Fu J-j, Jiang G-b. Studies on the Toxicological Effects of PFOA and PFOS on Rats Using Histological Observation and Chemical Analysis. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 2008;56(2):338.

Czernych R, Chraniuk M, Zagożdżon P, Wolska L. Characterization of estrogenic and androgenic activity of phthalates by the XenoScreen YES/YAS in vitro assay. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2017;53:95-104.

Darrow LA, Groth AC, Winqvist A, Shin HM, Bartell SM, Steenland K. Modeled Perfluorooctanoic Acid (PFOA) Exposure and Liver Function in a Mid-Ohio Valley Community. *Environ Health Perspect*. 2016;124(8):1227-33.

DeGrazia D, Beauchamp TL. Beyond the 3 Rs to a More Comprehensive Framework of Principles for Animal Research Ethics. *ILAR Journal*. 2019.

DeWitt Jamie C, Copeland Carey B, Strynar Mark J, Luebke Robert W. Perfluorooctanoic Acid-Induced Immunomodulation in Adult C57BL/6J or C57BL/6N Female Mice. *Environmental Health Perspectives*. 2008;116(5):644-50.

Eriksen KT, Raaschou-Nielsen O, McLaughlin JK, Lipworth L, Tjønneland A, Overvad K, et al. Association between Plasma PFOA and PFOS Levels and Total Cholesterol in a Middle-Aged Danish Population. *PLOS ONE*. 2013;8(2):e56969.

Fàbrega F, Kumar V, Schuhmacher M, Domingo JL, Nadal M. PBPK modeling for PFOS and PFOA: Validation with human experimental data. *Toxicology Letters*. 2014;230(2):244-51.

Fei C, McLaughlin Joseph K, Tarone Robert E, Olsen J. Perfluorinated Chemicals and Fetal Growth: A Study within the Danish National Birth Cohort. *Environmental Health Perspectives*. 2007;115(11):1677-82.

Fenton SE, Reiner JL, Nakayama SF, Delinsky AD, Stanko JP, Hines EP, et al. Analysis of PFOA in dosed CD-1 mice. Part 2: Disposition of PFOA in tissues and fluids from pregnant and lactating mice and their pups. *Reproductive Toxicology*. 2009;27(3):365-72.

Forsthuber M, Kaiser AM, Granitzer S, Hassl I, Hengstschläger M, Stangl H, et al. Albumin is the major carrier protein for PFOS, PFOA, PFHxS, PFNA and PFDA in human plasma. *Environment International*. 2020;137:105324.

Franco ME, Sutherland GE, Fernandez-Luna MT, Lavado R. Altered expression and activity of phase I and II biotransformation enzymes in human liver cells by perfluorooctanoate (PFOA) and perfluorooctane sulfonate (PFOS). *Toxicology*. 2020;430:152339.

Gallo V, Leonardi G, Genser B, Lopez-Espinosa M-J, Frisbee Stephanie J, Karlsson L, et al. Serum Perfluorooctanoate (PFOA) and Perfluorooctane Sulfonate (PFOS) Concentrations and Liver Function Biomarkers in a Population with Elevated PFOA Exposure. *Environmental Health Perspectives*. 2012;120(5):655-60.

Geiger SD, Xiao J, Ducatman A, Frisbee S, Innes K, Shankar A. The association between PFOA, PFOS and serum lipid levels in adolescents. *Chemosphere*. 2014;98:78-83.

Gramatica P. Principles of QSAR models validation: internal and external. *QSAR & Combinatorial Science*. 2007;26(5):694-701.

Grandjean P, Andersen EW, Budtz-Jørgensen E, Nielsen F, Mølbak K, Weihe P, et al. Serum Vaccine Antibody Concentrations in Children Exposed to Perfluorinated Compounds. *JAMA*. 2012;307(4):391-7.

Granum B, Haug LS, Namork E, Stølevik SB, Thomsen C, Aaberge IS, et al. Pre-natal exposure to perfluoroalkyl substances may be associated with altered vaccine antibody levels and immune-related health outcomes in early childhood. *Journal of Immunotoxicology*. 2013;10(4):373-9.

Griesinger C, Desprez B, Coecke S, Casey W, Zuang V. Validation of Alternative In Vitro Methods to Animal Testing: Concepts, Challenges, Processes and Tools. In: Eskes C, Whelan M, editors. *Validation of Alternative Methods for Toxicity Testing*. Cham: Springer International Publishing; 2016. p. 65-132.

Grimm D. EPA plan to end animal testing splits scientists. *Science*. 2019;365(6459):1231.

Hall AP, Elcombe CR, Foster JR, Harada T, Kaufmann W, Knippel A, et al. Liver Hypertrophy: A Review of Adaptive (Adverse and Non-adverse) Changes—Conclusions from the 3rd International ESTP Expert Workshop. *Toxicologic Pathology*. 2012;40(7):971-94.

Han X, Kemper RA, Jepson GW. Subcellular Distribution and Protein Binding of Perfluorooctanoic Acid in Rat Liver and Kidney. *Drug and Chemical Toxicology*. 2005;28(2):197-209.

Han X, Snow TA, Kemper RA, Jepson GW. Binding of perfluorooctanoic acid to rat and human plasma proteins. *Chem Res Toxicol*. 2003;16(6):775-81.

Hays SM, Aylward LL, LaKind JS, Bartels MJ, Barton HA, Boogaard PJ, et al. Guidelines for the derivation of Biomonitoring Equivalents: Report from the Biomonitoring Equivalents Expert Workshop. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2008;51(3, Supplement):S4-S15.

Höfer T, Gerner I, Gundert-Remy U, Liebsch M, Schulte A, Spielmann H, et al. Animal testing and alternative approaches for the human health risk assessment under the proposed new European chemicals regulation. *Arch Toxicol*. 2004;78(10):549-64.

Hoffman K, Webster Thomas F, Bartell Scott M, Weisskopf Marc G, Fletcher T, Vieira Verónica M. Private Drinking Water Wells as a Source of Exposure to Perfluorooctanoic Acid (PFOA) in Communities Surrounding a Fluoropolymer Production Facility. *Environmental Health Perspectives*. 2011;119(1):92-7.

Hoffmann S, Kleinstreuer N, Alépée N, Allen D, Api AM, Ashikaga T, et al. Non-animal methods to predict skin sensitization (I): the Cosmetics Europe database<sup/>. *Crit Rev Toxicol*. 2018;48(5):344-58.

Hundley SG, Sarrif AM, Kennedy GL. Absorption, Distribution, and Excretion of Ammonium Perfluorooctanoate (APFO) After Oral Administration to Various Species. *Drug and Chemical Toxicology*. 2006;29(2):137-45.

Jin R, McConnell R, Catherine C, Xu S, Walker DI, Stratakis N, et al. Perfluoroalkyl substances and severity of nonalcoholic fatty liver in Children: An untargeted metabolomics approach. *Environment International*. 2020;134:105220.

Kaluzhny Y, Kandárová H, Hayden P, Kubilus J, d'Argembeau-Thornton L, Klausner M. Development of the EpiOcular™ Eye Irritation Test for Hazard Identification and Labelling of Eye Irritating Chemicals in Response to the Requirements of the EU Cosmetics Directive and REACH Legislation. *Alternatives to Laboratory Animals*. 2011;39(4):339-64.

Kandárová H, Hayden P, Klausner M, Kubilus J, Kearney P, Sheasgreen J. In Vitro Skin Irritation Testing: Improving the Sensitivity of the EpiDerm Skin Irritation Test Protocol. *Alternatives to Laboratory Animals*. 2009;37(6):671-89.

Kandárová H, Liebsch M, Spielmann H, Genschow E, Schmidt E, Traue D, et al. Assessment of the human epidermis model SkinEthic RHE for in vitro skin corrosion testing of chemicals according to new OECD TG 431. *Toxicology in Vitro*. 2006;20(5):547-59.

Kemper RA, Nabb DL. In Vitro Studies in Microsomes from Rat and Human Liver, Kidney, and Intestine Suggest That Perfluorooctanoic Acid Is Not a Substrate for Microsomal UDP-Glucuronosyltransferases. *Drug and Chemical Toxicology*. 2005;28(3):281-7.

Kieskamp KK, Worley RR, McLanahan ED, Verner MA. Incorporation of fetal and child PFOA dosimetry in the derivation of health-based toxicity values. *Environ Int*. 2018;111:260-7.

Kristensen SL, Ramlau-Hansen CH, Ernst E, Olsen SF, Bonde JP, Vested A, et al. Long-term effects of prenatal exposure to perfluoroalkyl substances on female reproduction. *Human Reproduction*. 2013;28(12):3337-48.

Kubwabo C, Stewart B, Zhu J, Marro L. Occurrence of perfluorosulfonates and other perfluorochemicals in dust from selected homes in the city of Ottawa, Canada. *Journal of Environmental Monitoring*. 2005;7(11):1074-8.

Lau C, Anitole K, Hodes C, Lai D, Pfahles-Hutchens A, Seed J. Perfluoroalkyl Acids: A Review of Monitoring and Toxicological Findings. *Toxicological Sciences*. 2007;99(2):366-94.

Lau C, Thibodeaux JR, Hanson RG, Narotsky MG, Rogers JM, Lindstrom AB, et al. Effects of Perfluorooctanoic Acid Exposure during Pregnancy in the Mouse. *Toxicological Sciences*. 2006;90(2):510-8.

Lein NPH, Fujii S, Tanaka S, Nozoe M, Tanaka H. Contamination of perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoate (PFOA) in surface water of the Yodo River basin (Japan). *Desalination*. 2008;226(1):338-47.

Liebsch M, Grune B, Seiler A, Butzke D, Oelgeschläger M, Pirow R, et al. Alternatives to animal testing: current status and future perspectives. *Archives of Toxicology*. 2011;85(8):841-58.

Lin C-Y, Lin L-Y, Chiang C-K, Wang W-J, Su Y-N, Hung K-Y, et al. Investigation of the Associations Between Low-Dose Serum Perfluorinated Chemicals and Liver Enzymes in US Adults. *Official journal of the American College of Gastroenterology | ACG*. 2010;105(6).

Louisse J, Rijkers D, Stoopen G, Janssen A, Staats M, Hoogenboom R, et al. Perfluorooctanoic acid (PFOA), perfluorooctane sulfonic acid (PFOS), and perfluorononanoic acid (PFNA) increase triglyceride levels and decrease cholesterologenic gene expression in human HepaRG liver cells. *Arch Toxicol*. 2020;94(9):3137-55.

MacManus-Spencer LA, Tse ML, Hebert PC, Bischel HN, Luthy RG. Binding of Perfluorocarboxylates to Serum Albumin: A Comparison of Analytical Methods. *Analytical Chemistry*. 2010;82(3):974-81.

Melzer D, Rice N, Depledge Michael H, Henley William E, Galloway Tamara S. Association between Serum Perfluorooctanoic Acid (PFOA) and Thyroid Disease in the U.S. National Health and Nutrition Examination Survey. *Environmental Health Perspectives*. 2010;118(5):686-92.

Midasch O, Drexler H, Hart N, Beckmann MW, Angerer J. Transplacental exposure of neonates to perfluorooctanesulfonate and perfluorooctanoate: a pilot study. *International Archives of Occupational and Environmental Health*. 2007;80(7):643-8.

Minata M, Harada KH, Kärrman A, Hitomi T, Hirosawa M, Murata M, et al. Role of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha in hepatobiliary injury induced by ammonium perfluorooctanoate in mouse liver. *Ind Health*. 2010;48(1):96-107.

Nian M, Li QQ, Bloom M, Qian ZM, Syberg KM, Vaughn MG, et al. Liver function biomarkers disorder is associated with exposure to perfluoroalkyl acids in adults: Isomers of C8 Health Project in China. *Environ Res*. 2019;172:81-8.

Nicole W. PFOA and Cancer in a Highly Exposed Community: New Findings from the C8 Science Panel. *Environmental Health Perspectives*. 2013;121(11-12):A340-A.

Nicolotti O, Benfenati E, Carotti A, Gadaleta D, Gissi A, Mangiatordi GF, et al. REACH and in silico methods: an attractive opportunity for medicinal chemists. *Drug Discovery Today*. 2014;19(11):1757-68.

Ostertag SK, Tague BA, Humphries MM, Tittlemier SA, Chan HM. Estimated dietary exposure to fluorinated compounds from traditional foods among Inuit in Nunavut, Canada. *Chemosphere*. 2009;75(9):1165-72.

Paul Friedman K, Gagne M, Loo LH, Karamertzanis P, Netzeva T, Sobanski T, Franzosa JA, Richard AM, Lougee RR, Gissi A, Lee JJ, Angrish M, Dorne JL, Foster S, Raffaele K, Bahadori T, Gwinn MR, Lambert J, Whelan M, Rasenberg M, Barton-Maclaren T, Thomas RS. Utility of In Vitro Bioactivity as a Lower Bound Estimate of In Vivo Adverse Effect Levels and in Risk-Based Prioritization. *Toxicol Sci*. 2020 Jan 1;173(1):202-225. doi: 10.1093/toxsci/kfz201. PMID: 31532525; PMCID: PMC7720780.

Pérez F, Nadal M, Navarro-Ortega A, Fàbrega F, Domingo JL, Barceló D, et al. Accumulation of perfluoroalkyl substances in human tissues. *Environment International*. 2013;59:354-62.

Perkins RG, Butenhoff JL, Kennedy GL, Palazzolo MJ. 13-Week Dietary Toxicity Study of Ammonium Perfluorooctanoate (APFO) in Male Rats. *Drug and Chemical Toxicology*. 2004;27(4):361-78.

Proença S, Escher BI, Fischer FC, Fisher C, Grégoire S, Hewitt NJ, et al. Effective exposure of chemicals in in vitro cell systems: A review of chemical distribution models. *Toxicol In Vitro*. 2021;73:105133.

Scholz S, Sela E, Blaha L, Braunbeck T, Galay-Burgos M, García-Franco M, et al. A European perspective on alternatives to animal testing for environmental hazard identification and risk assessment. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2013;67(3):506-30.

Scott PD, Bartkow M, Blockwell SJ, Coleman HM, Khan SJ, Lim R, et al. An assessment of endocrine activity in Australian rivers using chemical and in vitro analyses. *Environmental Science and Pollution Research*. 2014;21(22):12951-67.

Shapiro AJ, Antoni S, Guyton KZ, Lunn RM, Loomis D, Rusyn I, et al. Software Tools to Facilitate Systematic Review Used for Cancer Hazard Identification. *Environmental Health Perspectives*. 2018;126(10):104501.

Steenland K, Fletcher T, Savitz David A. Epidemiologic Evidence on the Health Effects of Perfluorooctanoic Acid (PFOA). *Environmental Health Perspectives*. 2010;118(8):1100-8.

Steenland K, Tinker S, Frisbee S, Ducatman A, Vaccarino V. Association of Perfluorooctanoic Acid (PFOA) and Perfluorooctanesulfonate (PFOS) with Serum Lipids Among Adults Living Near a Chemical Plant. *Epidemiology*. 2009;20(6).

Stratakis N, D VC, Jin R, Margetaki K, Valvi D, Siskos AP, et al. Prenatal Exposure to Perfluoroalkyl Substances Associated With Increased Susceptibility to Liver Injury in Children. *Hepatology*. 2020;72(5):1758-70.

Theodore L, & Dupont, R.R. *Environmental Health and Hazard Risk Assessment: Principles and Calculations* (1st ed)2012.

Tittlemier SA, Pepper K, Seymour C, Moisey J, Bronson R, Cao X-L, et al. Dietary Exposure of Canadians to Perfluorinated Carboxylates and Perfluorooctane Sulfonate via Consumption of Meat, Fish, Fast Foods, and Food Items Prepared in Their Packaging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007;55(8):3203-10.

Tittlemier SA, Ryan JJ, Van Oostdam J. Presence of anionic perfluorinated organic compounds in serum collected from Northern Canadian populations. *Organohalogen Compounds*. 2004;66:3959-64.

Vélez MP, Arbuckle TE, Fraser WD. Maternal exposure to perfluorinated chemicals and reduced fecundity: the MIREC study. *Human Reproduction*. 2015;30(3):701-9.

Verner MA, Ngueta G, Jensen ET, Fromme H, Völkel W, Nygaard UC, et al. A Simple Pharmacokinetic Model of Prenatal and Postnatal Exposure to Perfluoroalkyl Substances (PFASs). *Environ Sci Technol*. 2016;50(2):978-86.

Vieira Verónica M, Hoffman K, Shin H-M, Weinberg Janice M, Webster Thomas F, Fletcher T. Perfluorooctanoic Acid Exposure and Cancer Outcomes in a Contaminated Community: A Geographic Analysis. *Environmental Health Perspectives*. 2013;121(3):318-23.

Vierke L, Staude C, Biegel-Engler A, Drost W, Schulte C. Perfluorooctanoic acid (PFOA) — main concerns and regulatory developments in Europe from an environmental point of view. *Environmental Sciences Europe*. 2012;24(1):16.

Wilhelm M, Kraft M, Rauchfuss K, Hölzer J. Assessment and Management of the First German Case of a Contamination with Perfluorinated Compounds (PFC) in the Region

Sauerland, North Rhine-Westphalia. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*. 2008;71(11-12):725-33.

Yan S, Zhang H, Guo X, Wang J, Dai J. High perfluorooctanoic acid exposure induces autophagy blockage and disturbs intracellular vesicle fusion in the liver. *Arch Toxicol*. 2017;91(1):247-58.

Zareitalabad P, Siemens J, Hamer M, Amelung W. Perfluorooctanoic acid (PFOA) and perfluorooctanesulfonic acid (PFOS) in surface waters, sediments, soils and wastewater – A review on concentrations and distribution coefficients. *Chemosphere*. 2013;91(6):725-32.