

Methodologie

REACH, les essais sur des animaux et le principe de précaution

Andre Menache¹

Candida Nastrucci²

¹Antidote Europe, Perpignan, France

²Université de Rome, "Tor Vergata", Rome, Italie

Abstract

On en sait relativement peu sur la toxicité des nombreuses substances chimiques qui existent aujourd'hui. Ceci a incité les autorités chargées de la réglementation dans l'Union européenne à lancer un programme d'essais majeur, connu sous la dénomination de enRegistrement, Evaluation, Autorisation et Restriction des substances CHimiques (REACH). Bien que le moteur de REACH soit en apparence basé sur le principe de précaution, en pratique, les faits suggèrent qu'il est plus orienté vers l'évaluation du risque que vers la précaution. De plus, les méthodes d'essais utilisées pour évaluer le risque chimique suscitent des questions sur l'efficacité de REACH vis-à-vis de ses objectifs affichés de protection de la santé humaine et de l'environnement. Ces essais se fondent en grande partie sur des modèles animaux. Toutefois, au vu de preuves empiriques et des principes bien établis de la biologie de l'évolution et des systèmes complexes, le modèle animal échoue en tant que modalité prédictive pour l'homme. A leur tour, ces inquiétudes soulèvent d'importantes questions éthiques et légales qu'il est urgent de traiter. Des mesures immédiates devraient inclure un programme majeur de biosurveillance permettant d'évaluer de façon fiable le fardeau chimique sur les citoyens de l'Union européenne afin de hiérarchiser les substances les plus dangereuses présentes dans l'environnement. Des biomarqueurs présents dans le sang et dans l'urine sont des outils utiles pour mettre en œuvre la biosurveillance et pour aider à orienter la politique publique. Un paradigme écologique, basé sur la prévention de la pollution plutôt que sur le contrôle de la pollution et l'évaluation du risque lié à des substances individuelles, représente une stratégie supérieure pour prévenir la pollution chimique globale et les risques toxiques pour la santé humaine.

Mots-clés : principe de précaution, risque, substances chimiques, essais sur des animaux, biosurveillance.

Introduction

Les personnes, et non les substances chimiques, ont le droit d'être présumées innocentes jusqu'à preuve du contraire. Les personnes ont aussi le droit de ne pas subir des expériences sans leur consentement éclairé ; il n'a été donné à personne l'occasion de donner ou de refuser son consentement avant d'être exposé au fardeau [toxique] qui à présent nous contamine tous [1].

REACH est l'acronyme de "enRegistrement, Evaluation, Autorisation et Restriction de substances CHimiques" dans l'Union européenne (UE). Ce règlement est entré en vigueur le 1er juin 2007 [2]. Il aborde l'impact potentiel des substances chimiques sur la santé humaine et sur l'environnement. Il a été décrit par plusieurs parties prenantes comme la législation la plus complexe de l'histoire de l'Union et la plus importante des vingt dernières années. L'implémentation administrative de REACH est essentiellement supervisée par l'Agence européenne des

produits chimiques (ECHA) [3], qui aide les firmes à se conformer à la législation, tandis que les méthodes d'essais requises sont décrites dans les lignes directrices de l'Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE) [4]. Ces lignes directrices représentent des méthodes d'essais approuvées internationalement pour déterminer la sécurité des substances chimiques. Outre les effets sur la santé humaine et sur l'environnement, ces lignes directrices incluent des essais pour déterminer les propriétés physico-chimiques des substances et leur dégradation et accumulation dans l'environnement. Bien qu'au niveau européen et international REACH soit considéré comme étant construit sur le principe de précaution [2,5], en pratique, il repose essentiellement sur la gestion du risque, comme cet article va le montrer ; le principe de précaution et la gestion du risque sont deux concepts fondamentalement différents. De plus, nous allons démontrer qu'une grande part de la méthodologie sur laquelle se fonde cette évaluation du risque (les modèles animaux) n'est pas valable pour prédire la réponse humaine. A leur tour, ces défauts significatifs suscitent des questions fondamentales sur le rôle de REACH.

Il existe plus de 7 millions de substances chimiques reconnues. Parmi celles-ci, 80.000 sont d'usage courant dans le monde [6] et leur toxicité potentielle demeure largement inconnue [7,8]. Depuis le début des années 1970, il y a un débat grandissant dans les Etats membres de l'UE sur la meilleure façon de réglementer l'utilisation de produits chimiques industriels, surtout en ce qui concerne le risque et le danger. "Danger" est associé à la propriété intrinsèque d'une substance chimique de provoquer des effets toxiques, tandis que "risque" se réfère à la probabilité que ces effets se produisent au cours des applications variées pour lesquelles la substance sera utilisée et déversée (scénarios d'exposition) [9]. Dit simplement : risque = danger x exposition.

Malgré la différence claire entre ces deux termes, leur utilisation peut parfois être brouillée pour des motifs culturels ou politiques. Par exemple, le Royaume-Uni est plus enclin à prendre en compte le rapport bénéfices/risques dans la réglementation, alors qu'un pays comme la Suède tendra davantage vers des mesures préventives [10]. Les pays nordiques, comme le Danemark et la Suède, ont activement promu des politiques globales sur les substances chimiques. Ils ont utilisé avec succès une variété de mesures volontaires et contraignantes pour réduire la dépendance aux substances dangereuses et pour développer des substituts plus sûrs [11].

Toutefois, la considération principale de tout cadre réglementaire concernant l'identification de risque pour l'homme est la méthodologie sur laquelle il est basé. Dans le cas du programme européen d'essais de substances chi-

miques REACH, la méthodologie est clairement exposée dans les lignes directrices de l'OCDE [12], qui présentent les principes des bonnes pratiques de laboratoire et de l'acceptation mutuelle des données pour leur utilisation par les gouvernements et l'industrie. En plus des lignes directrices de l'OCDE, une aide sur les exigences d'information et l'évaluation de la sécurité des substances chimiques est fournie par l'ECHA.

Cet article va examiner les aspects scientifiques, légaux et éthiques du programme européen de régulation des substances chimiques.

REACH et le principe de précaution

"Quand une activité présente une menace pour la santé de l'homme ou de l'environnement, des mesures de précaution doivent être prises, et ce, même si certains liens de cause à effet ne sont pas clairement établis scientifiquement." (selon la déclaration de Wingspread sur le principe de précaution, janvier 1998) [13].

Le "principe de précaution", tel que largement défini, établit que si une action ou politique a un risque soupçonné de causer des dommages au public ou à l'environnement, en l'absence de consensus scientifique clair, alors la charge de la preuve que ce n'est pas dommageable incombe à ceux qui entreprennent l'action [14]. Le principe de précaution est mentionné dans le paragraphe 9 de l'introduction de REACH et il est aussi détaillé dans le paragraphe 2 de l'article 191 du Traité de fonctionnement de l'Union européenne, qui stipule :

La politique de l'Union dans le domaine de l'environnement vise un niveau de protection élevé, en tenant compte de la diversité des situations dans les différentes régions de l'Union. Elle est fondée sur les principes de précaution et d'action préventive, sur le principe de la correction, par priorité à la source, des atteintes à l'environnement et sur le principe du pollueur-payeur [15].

Selon Kriebel et al :

S'il y a une certitude à propos de la cause et de l'effet, comme c'est le cas pour le plomb et la santé infantile, alors agir ne relève plus de la précaution, même si cela peut être préventif. Concrètement, le principe de précaution fournit la justification pour prendre des mesures contre une pratique ou substance en l'absence de certitude scientifique, plutôt que de poursuivre la pratique suspecte alors qu'elle est soumise à l'étude, ou en l'absence d'études. Au lieu de demander quel niveau de dommage est acceptable, une approche de précaution demande : quelle ampleur de contamination peut être évitée ? quelles sont les alternatives à ce produit ou à cette

activité, et sont-elles plus sûres ? cette activité est-elle, même, nécessaire ? [16]

REACH est clairement à l'opposé du principe de précaution en stipulant que

Sous le règlement REACH, même si une substance présente un risque pour la santé humaine ou pour l'environnement, l'autorisation peut être donnée s'il est prouvé que les bénéfices socio-économiques dépassent les risques générés par son utilisation et s'il n'y a pas d'alternatives appropriées [17].

L'évaluation du risque est basée sur la définition d'un niveau de dommages acceptable tout en perpétuant le statu quo, à l'inverse du principe de précaution, qui appelle à un changement dynamique vers la durabilité [18]. REACH révèle clairement son caractère d'évaluation du risque dans le problème des substances très préoccupantes (en anglais, "substances of very high concern", SVHC). Ces substances sont considérées comme étant particulièrement dangereuses pour la santé humaine et pour l'environnement. A ce jour, la liste de candidats à l'enregistrement en tant que SVHC ne contient que 73 substances chimiques [19] sur un total de 143.000 substances enregistrées par l'ECHA [20]. Considérant que REACH est entré en vigueur le 1er juin 2007 et qu'il a fallu près de cinq ans pour simplement enregistrer -pas pour supprimer ou remplacer- ces 73 SVHC, il y a lieu de craindre que le processus pour éliminer ces substances soit trop lent ou trop compliqué pour prévenir des dommages évitables à la santé humaine et à l'environnement. Cette inquiétude a été relayée par le Commissaire à l'environnement Janez Potocnik, qui admettait en mars 2010 qu'il n'y avait toujours pas de SVHC sur la liste de substitution [17].

La tâche d'évaluer des milliers de substances chimiques individuelles pour leurs effets aigus et chroniques sur plusieurs organes humains ainsi que sur l'environnement est colossale mais non impossible à l'ère des systèmes d'analyse basés sur des plateformes robotisées à haut débit [21]. Toutefois, la nécessité bien réelle d'évaluer des combinaisons de substances chimiques et des mélanges chimiques relève d'un tout autre défi. Selon le toxicopathologiste Vyvyan Howard, tester les 1000 substances les plus courantes en combinaisons uniques de trois, nécessiterait 166 millions d'expériences [22]. Une alternative à la gestion du risque est un paradigme écologique centré sur le principe de précaution et qui favoriserait le "pessimisme prudent" plutôt que l'"optimisme dangereux" en présence d'incertitudes scientifiques [23]. Alors que le principe de précaution pourrait être considéré par certains comme trop vague pour constituer un standard réglementaire, un paradigme écologique établit des règles claires [1]. Celles-ci incluent la production propre et le zéro rejet. Une production propre met l'accent sur la prévention de la pollution plutôt que

sur le contrôle de la pollution, en exigeant de l'industrie qu'elle utilise les méthodes les plus bénignes disponibles et qu'elle évite de rejeter des matériaux dangereux, en premier lieu en ne les produisant pas [24]. La politique de zéro rejet interdirait le déversement de substances dangereuses dans l'environnement.

Essais sur des animaux requis par REACH

Le but affiché du programme européen d'essais de substances chimiques est de "améliorer la protection de la santé humaine et de l'environnement grâce à une meilleure et plus précoce identification des propriétés intrinsèques des substances chimiques, ainsi que permettre la libre circulation des substances sur le marché intérieur tout en augmentant la compétitivité et l'innovation" [25]. Un aspect significatif de cette évaluation des substances chimiques concerne les essais sur des animaux, étant actuellement estimé qu'entre 9 millions et 54 millions d'animaux seraient nécessaires pour respecter les exigences [26]. Les estimations originales pour la mise en œuvre et la portée de REACH étaient basées sur des données de production de substances chimiques correspondant à l'époque où un programme chimique européen était discuté dans les années 1980 et début 1990. Selon certains scientifiques de la Commission européenne (CE), le coût probable du programme d'essais de substances chimiques à cette époque aurait été d'environ 1,6 milliard d'euros et aurait dû nécessiter environ 2,6 millions d'animaux [26]. Ce qui n'a pas été prévu à la date de ces calculs sont des facteurs tels que l'augmentation spectaculaire de la production de nouvelles substances chimiques, l'inclusion de nouvelles exigences réglementaires (par exemple, les intermédiaires de réactions) et une augmentation significative du nombre d'Etats membres de l'UE, tous facteurs qui allaient mener à des estimations largement différentes. Par exemple, la première phase de REACH envisageait l'enregistrement de 30.000 substances chimiques produites ou importées dans l'UE en quantités supérieures à 1 tonne par an. Le nombre total de substances soumises pour enregistrement à l'échéance 2008 était de 143.000, bien que les autorités de la CE prévoient que ce chiffre diminuera [20]. En fait, la base de données des substances enregistrées de ECHA contient seulement 4.326 substances uniques à ce jour (mars 2012) [27]. Au total, toutefois, il apparaît clairement que le coût de REACH aujourd'hui est très supérieur aux estimations initiales, en termes de budget et de nombre d'animaux.

Tandis que le règlement REACH définit les conditions générales pour l'enregistrement, l'évaluation, l'autorisation et la restriction des substances chimiques, les méthodes d'essais courantes pour la détermination de la toxicité et autres effets sur la santé (Table 1) sont décrites par le règlement (CE) n°440/2008 de la Commission du 30 mai 2008 [28].

Table 1. Méthodes pour la détermination de la toxicité et autres effets sur la santé [135]

Test type	Test name	Animal species/organism involved	Mode of action
Acute toxicity	Acute oral toxicity	In vivo: "preferred rodent species is the rat although other rodent species may be used"	Available from: http://www.oecd.org/dataoecd/17/51/1948378.pdf . Accessed May 28, 2012
	Acute toxicity (inhalation)	In vivo: rat (as above). Ten animals to be used for each concentration. Animals are exposed to one limit concentration or a series of concentrations over multiple time durations. Usually two animals per concentration each time interval are used. Animals are observed for at least 14 days. In the traditional LC50 (median lethal concentration), animals are exposed to 1 limit concentration or to 3 concentrations, at least, for a predetermined duration, generally of 4 hours	Available from: www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-403-acute-inhalation-toxicity_9789264070608-en . Accessed May 28, 2012
	Acute toxicity (dermal)	In vivo: rodents (rat, rabbit, or guinea pig may be used). For each dose at least five animals (of the same sex) are used. The substance is applied to the skin (not less than 10% of the body surface area) in graduated doses to several groups of animals, one dose being per group. At least three dose levels are recommended to be used to produce a dose-response curve. A limit test of at least 2000 mg/kg is proposed. The observation period is at least 14 days	Available from: www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-402-acute-dermal-toxicity_9789264070585-en . Accessed May 28, 2012
	Acute toxicity: dermal irritation/corrosion	In vivo: albino rabbit is the preferred animal. The substance to be tested is applied in a single dose to an area of skin of approximately 6 cm ² of the rabbit. The exposure time is 4 hours. Residual test substance is then removed. The dose is 0.5 mL (liquid) or 0.5 g (solid) applied to the test site. The method consists of two tests: the initial test and the confirmatory test (used if a corrosive effect is not observed in the initial test). Animals are examined for signs of erythema and edema over 14 days. The dermal irritation scores are evaluated with the nature and severity of lesions, and their reversibility or lack thereof. When responses persist to the end of the 14-day observation period, the test substance is considered an irritant	Available from: www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-404-acute-dermal-irritation-corrosion_9789264070622-en . Accessed May 28, 2012
	Acute toxicity: eye irritation/corrosion	In vivo: albino rabbit preferred. Substance is applied in a single dose in the conjunctival sac of one eye of each animal. The other untreated eye is used as control. The initial test uses one animal; the dose level depends on the substance. A confirmatory test is advised if a corrosive effect is not observed in the initial test, the irritant or negative response should be confirmed using up to two additional animals. The duration depends on how long is needed to evaluate fully the magnitude and reversibility of the effects observed. The eyes should be examined at 1 hour and 24, 48, and 72 hours after test substance application. The ocular irritation scores are evaluated in conjunction with the nature and severity of lesions and their reversibility or lack thereof	Available from: www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-405-acute-eye-irritation-corrosion_9789264070646-en . Accessed May 28, 2012
	Skin sensitization	In vivo: guinea pig is preferred, but also mouse. For the guinea pig maximization test (GPMT) at least ten animals in the treatment group and five in the control group are used. For the Buehler test, a minimum of 20 animals is used in the test group and at least ten animals in the control. The animals are initially exposed to the substance, then to a rest period, and an induction period (10–14 days), for an immune response to develop. Following this, the animals are exposed to a challenge dose. The GPMT is made over 23–25 days, the Buehler test over 30–32 days. The concentration of substance used for each induction exposure should be well tolerated systemically and the highest to cause mild-to-moderate skin irritation. For the challenge exposure, the highest nonirritant dose should be used	Available from: www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-406-skin-sensitisation_9789264070660-en . Accessed May 28, 2012

Repeated dose toxicity	Repeated dose (28 days) toxicity (oral)	In vivo: rodents (rat preferred). Test made during one limited period (one dose level daily during 28 days). At least ten animals (five female and five male) are used for each dose level and at least three tests groups. The substance is given by gavage or via the diet or drinking water. A limit test may be performed if no effects would be expected at a dose of 1000 mg/kg body weight per day (bw/day). Clinical and functional observations, body weight and food/water consumption measurements, hematology and clinical biochemistry tests are made; as well as gross necropsy and histopathology, as animals will be killed at the end of the test In vivo: adult rodent, preferred species rat (as above). Groups of at least five male and five female exposed 6 hours per day for 28 days to: a) the test animal at three or more concentration levels, b) filtered air (negative control), and/or c) the vehicle (vehicle control). Animals are generally exposed 5 days per week but exposure for 7 days per week is also allowed.	Available from: www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-407-repeated-dose-28-day-oral-toxicity-study-in-rodents_9789264070684-en . Accessed May 28, 2012
	Repeated dose (28 days) toxicity (inhalation) (subacute inhalation toxicity; 28-day study)	In vivo: adult rodent, preferred species rat (as above). Groups of at least five male and five female exposed 6 hours per day for 28 days to: a) the test animal at three or more concentration levels, b) filtered air (negative control), and/or c) the vehicle (vehicle control). Animals are generally exposed 5 days per week but exposure for 7 days per week is also allowed.	Available from: http://www.oecd.org/document/29/0,3746,en_21571361_43392827_45356509_1_1_1_1_0_0.html and www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-412-subacute-inhalation-toxicity-28-day-study_9789264070783-en . Both accessed May 28, 2012
	Repeated dose (28 days) toxicity (dermal)	In vivo: adult rat, rabbit, or guinea pig. Two tests: main test and limit test. At least ten animals (five female and five male) with healthy skin used at each dose level (at least three). The highest dose level to result in toxic effect not producing fatalities. The limit test is one dose level of at least 1000 mg/kg body weight. The method consists of repeated application of the substance during a limited period (several hours daily during 21/28 days). At the end, animals are killed In vitro: mammalian somatic cell lines	Available from: www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-410-repeated-dose-dermal-toxicity-21-28-day-study_9789264070745-en . Accessed May 28, 2012 Available from: www.oecd-ilibrary.org/content/book/9789264071261-en . Accessed May 28, 2012
Genetic toxicology: mutagenicity and aberration	Mutagenicity – in vitro mammalian chromosome aberration test	In vivo: usually rodents (rats, mice, and Chinese hamsters [<i>Cricetulus griseus</i>])	Available from: www.oecd-ilibrary.org/content/book/9789264071308-en . Accessed May 28, 2012
	Mutagenicity – in vivo mammalian bone marrow chromosome aberration test	In vivo: erythrocytes from bone marrow and/or peripheral blood cells of animals, usually rodents (mice or rats)	Available from: www.oecd-ilibrary.org/content/book/9789264071285-en . Accessed May 28, 2012
	Mutagenicity – in vivo mammalian erythrocyte micronucleus test	In vitro: bacteria	Available from: www.oecd-ilibrary.org/content/book/9789264071247-en . Accessed May 28, 2012
	Mutagenicity: reverse mutation test using bacteria	In vitro: yeast	Available from: www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-480-genetic-toxicology-saccharomyces-cerevisiae-gene-mutation-assay_9789264071407-en . Accessed May 28, 2012
	Mutagenicity testing and screening for carcinogenicity gene mutation – saccharomyces cerevisiae or: saccharomyces cerevisiae, gene mutation assay		

Test type	Test name	Animal species/organism involved	Mode of action
Genetic toxicology: mutagenicity and those involving genetic mutations	Mitotic recombination assay in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	In vitro: yeast	Available from: www.oecd-ilibrary.org/content/book/9789264071421-en . Accessed May 28, 2012
	Mutagenicity – in vitro mammalian cell gene mutation test	In vitro: cultured mammalian cells	Available from: www.oecd-ilibrary.org/content/book/9789264071322-en . Accessed May 28, 2012
	DNA damage and repair – unscheduled DNA synthesis in mammalian cells in vitro	In vitro: cells	Available from: www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-482-genetic-toxicology-dna-damage-and-repair-unscheduled-dna-synthesis-in-mammalian-cells-in-vitro_9789264071445-en . Accessed May 28, 2012
	Unscheduled DNA synthesis (UDS) test with mammalian liver cells in vivo	In vivo: Rats are commonly used, at least three animals per group. Test based on incorporation of tritium-labeled thymidine, 3H-TdR, (during 3–8 hours) into the DNA of liver cells of animals. Substances are administered as a single treatment by gavage using a stomach tube or a suitable intubation cannula. At least two dose levels are used. A limit test is advised if no effects would be expected at a dose of 2000 mg/kg bw/day	Available from: www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-486-unscheduled-dna-synthesis-uds-test-with-mammalian-liver-cells-in-vivo_9789264071520-en . Accessed May 28, 2012
	Sister chromatid exchange assay in vitro	In vitro: mammalian cells	Available from: www.oecd-ilibrary.org/content/book/9789264071384-en . Accessed May 28, 2012
	Sex-linked recessive lethal test in <i>Drosophila melanogaster</i>	In vivo: <i>Drosophila melanogaster</i> insects, offsprings, germline mutations	Available from: www.oecd-ilibrary.org/content/book/9789264071346-en . Accessed May 28, 2012
	Mutagenicity – in vitro mammalian cell gene mutation test	In vitro: cells	
	DNA damage and repair – unscheduled DNA synthesis – mammalian cells in vitro	In vitro: cells	
	Sister chromatid exchange assay in vitro	In vitro: cells	
	Sex-linked recessive lethal test in <i>Drosophila melanogaster</i>	In vitro: cells	
	In vitro mammalian cell transformation tests	In vitro: cells	

Genetic toxicology: lethal, genetic, and aberration tests	Rodent dominant lethal test	In vivo: rats or mice, males and females germinal tissues and organs	Available from: www.oecd-ilibrary.org/content/book/9789264071360-en . Accessed May 28, 2012
	Mammalian spermatogonial chromosome aberration test	In vivo: male Chinese hamsters and mice	Available from: www.oecd-ilibrary.org/content/book/9789264071469-en . Accessed May 28, 2012
	Mouse spot test	In vivo: mouse, embryos to 4 weeks	Available from: www.oecd-ilibrary.org/content/book/9789264071483-en . Accessed May 28, 2012
	Mouse heritable translocation assay	In vivo: mouse, germ lines	Available from: www.oecd-ilibrary.org/content/book/9789264071506-en . Accessed May 28, 2012
	Sub-chronic oral toxicity test: repeated dose 90-day oral toxicity study in rodents	In vivo: mouse, rat, at least ten males and ten females	Available from: www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-408-repeated-dose-90-day-oral-toxicity-study-in-rodents_9789264070707-en . Accessed May 28, 2012
	Sub-chronic oral toxicity test repeated dose 90-day oral toxicity study in nonrodents	In vivo: the dog (the beagle is frequently used). At least eight animals (four female and four male) should be used for each test group	Available from: www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-409-repeated-dose-90-day-oral-toxicity-study-in-non-rodents_9789264070721-en . Accessed May 28, 2012
	Sub-chronic dermal toxicity study 90-day repeated dermal dose study using rodent species	In vivo: usually rats, at least 20 animals per sex	Available from: www.oecd-ilibrary.org/content/book/9789264071209-en . Accessed May 28, 2012
	Sub-chronic inhalation toxicity: 90-day, repeated inhalation dose study	In vivo: rodents (usually rats). Groups of ten male and ten female rodents are exposed for 6 hours per day over 90 days (13 weeks)	Available from: www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-413-subchronic-inhalation-toxicity-90-day-study_9789264070806-en . Accessed May 28, 2012
	Prenatal developmental toxicity study	In vivo: pregnant test animal and on the developing organism, rodent (rat suggested) and nonrodent (rabbit suggested, but can also be dog)	Available from: www.oecd-ilibrary.org/content/book/9789264070820-en . Accessed May 28, 2012
	Chronic toxicity studies	In vivo: usually rats, at least 20 animals per sex, while for nonrodents (eg, dogs) a minimum of four per sex per group is recommended. Daily exposure, may vary if oral, dermal or inhalation. The duration of the exposure period should be 12 months, after which animals are killed	Available from: www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-452-chronic-toxicity-studies_9789264071209-en . Accessed May 28, 2012

Test type	Test name	Animal species/organism involved	Mode of action
Carcinogenicity	Combined chronic toxicity/carcinogenicity test	In vivo: rat typically used. Each dose group and control group for the carcinogenicity test uses at least 50 animals of each sex, for the chronic toxicity at least ten animals of each sex	Available from: www.oecd-ilibrary.org/content/book/9789264071223-en . Accessed May 28, 2012
Reproduction toxicity	One-generation reproduction toxicity test	In vivo: usually rat or mouse. Each test and control group contains a number of animals to obtain about 20 pregnant females at or near term, three test groups, at least, are recommended	Available from: www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-415-one-generation-reproduction-toxicity-study_9789264070844-en . Accessed May 28, 2012
Toxicokinetics	Two-generation reproduction toxicity study	In vivo: usually rat or mouse. Each test and control group contains a number of animals to obtain about 20 pregnant females at or near term; three test groups, at least, are recommended. Parent generation (5–9 weeks old), offspring, and administration of the substance is continued to first generation offspring during their growth into adulthood, mating and production of a second generation (until weaning)	Available from: www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-416-two-generation-reproduction-toxicity_9789264070868-en . Accessed May 28, 2012
	Toxicokinetics	In vivo: adult domestic laying hen (<i>Gallus gallus domesticus</i>), aged 8–12 months, recommended group is twelve hens at least, the positive control group at least six hens. The dose level of the main study is recommended to be high as possible, with a maximum dose level of 2000 mg/kg bw/day	Available from: www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-418-delayed-neurotoxicity-of-organophosphorus-substances-following-acute-exposure_9789264070905-en . Accessed May 28, 2012
	Delayed neurotoxicity of organophosphorus substances 28 day repeated dose study	In vivo: domestic laying hens (aged 8–12 months) for 28 days, observed at least daily until 14 days after the last dose. At least twelve hens and three groups recommended to be used. The highest dose level should be chosen with the aim of inducing toxic effects, thereafter descending	Available from: www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-419-delayed-neurotoxicity-of-organophosphorus-substances-28-day-repeated-dose-study_9789264070929-en . Accessed May 28, 2012
Skin corrosion	In vitro skin corrosion: transcutaneous electrical resistance test	In vitro: skin taken from killed rats aged 28–30 days old	Available from: www.oecd-ilibrary.org/content/book/9789264071124-en . Accessed May 28, 2012
Phototoxicity	In vitro skin corrosion: human skin model test	In vitro: test material (solid or liquid) is applied to a three-dimensional human skin model, comprising at least a reconstructed epidermis with a functional stratum corneum. Does not require the use of live animals or animal tissue for the assessment of skin corrosivity	Available from: www.oecd-ilibrary.org/content/book/9789264071148-en . Accessed May 28, 2012
	In vitro 3T3 NRU phototoxicity test	In vitro: Balb/c 3T3 cells	Available from: www.oecd-ilibrary.org/content/book/9789264071162-en . Accessed May 28, 2012
Skin sensitization	Skin sensitization: local lymph node assay	In vivo: generally in mouse. A minimum of four animals is used per dose group, with a minimum of three concentrations of the substance and a negative control group and a positive control. The experimental schedule of the assay is during 6 days, then the animals are killed and a cell suspension of lymph node cells is prepared	Available from: www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-429-skin-sensitisation_9789264071100-en . Accessed May 28, 2012

Neurotoxicity	Neurotoxicity study in rodents	In vivo: usually rat. Daily oral administration, by gavage (in the diet, in drinking water or by capsules) of the substance. As a separate study, at least 20 animals (ten females and ten males) are used in each dose. At least three dose groups and one control group. The recommended dosing regimen is 28 days, sub-chronic (90 days), or chronic (1 year or longer)	Available from: www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-424-neurotoxicity-study-in-rodents_9789264071025-en . Accessed May 28, 2012
Skin absorption	Skin absorption: in vivo method	In vivo: rat is commonly used; at least four animals of one sex are recommended. The substance is radiolabeled and applied, for a fixed period of time, to the clipped skin of animals at one or more dose levels. Samples are taken during the study and animals are killed at the end of the test and blood collected for analysis	Available from: www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-427-skin-absorption-in-vivo-method_9789264071063-en . Accessed May 28, 2012
	Skin absorption: in vitro method	In vitro: skin from human or animal sources can be used. Viable skin is preferred, but nonviable skin can also be used	Available from: www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-428-skin-absorption-in-vitro-method_9789264071087-en . Accessed May 28, 2012

Note: Series on testing and assessment: publications by number [web page on the Internet]. © OECD, http://www.oecd.org/document/24/0,3746,en_2649_34377_47858904_1_1_1_1,00.html¹³⁵
Abbreviation: bw/day, body weight per day; UDS, unscheduled DNA synthesis; NRU, Neutral Red Uptake.

L'utilisation d'animaux pour les essais de sécurité et l'évaluation du risque des substances chimiques pour l'homme pose des questions éthiques et scientifiques. Les essais de toxicité aiguë ou à doses répétées sur des vertébrés sont connus pour provoquer la souffrance et habituellement la mort de l'animal. La société en général est mal à l'aise avec l'utilisation d'animaux pour la recherche et les essais. Une grande enquête européenne incluant 42.655 participants menée par la CE en 2006 [29] a montré qu'une majorité des citoyens de l'UE considèrent l'utilisation d'animaux comme inacceptable en toutes circonstances pour "développer des substances chimiques pour une utilisation industrielle, ménagère ou agricole et tester leur sécurité pour l'homme, les animaux et l'environnement" (question 22). En plus des préoccupations éthiques et de bien-être animal, il y a aussi des questions méthodologiques qui devraient être analysées, en particulier le règlement (CE) n°440/2008 de la Commission établissant les méthodes d'essai pour la détermination de la toxicité des substances chimiques.

Les sections suivantes de cet article examineront pourquoi les modèles animaux ne sont pas valables pour prédire la réponse humaine.

Preuves empiriques comparant la toxicité pour l'homme et pour les animaux

La question de savoir si un modèle animal est utile pour prédire la réponse humaine peut être soumise à évaluation en utilisant des indicateurs tels que la sensibilité, la spécificité et les valeurs prédictives positive et négative (Table 2). Les quelques données disponibles sur l'empoisonnement ou la surexposition humains accidentels ou délibérés à des substances industrielles ne fournissent que des informations limitées sur la toxicité humaine [30]. De plus, les substances chimiques industrielles ne sont pas soumises à des essais cliniques humains, pour des raisons éthiques.

Toutefois, il y a un corpus de preuves considérable disponible auprès de l'industrie pharmaceutique pour fournir une bonne indication sur la question de savoir si les modèles animaux peuvent prédire la réponse humaine. L'observation est basée sur des données sur le développement de médicaments, où les effets secondaires de médicaments observés sur l'homme durant les essais cliniques et la pharmacovigilance sont comparés, rétrospectivement, aux effets toxiques observés sur des animaux durant les essais précliniques [31-35]. Ceci peut le mieux être montré par un exemple spécifique. Dans le cas des tératogènes, sur 1500 substances qui ont provoqué des malformations congénitales sur des animaux de laboratoire, seules 40 avaient des corrélatives humaines, générant une valeur prédictive positive (PPV) de 3% [36]. Un autre élément à prendre en considération lorsqu'on utilise des animaux pour détecter de possibles effets tératogènes des substances chimiques

est la loi de Karnofsky, qui stipule que toute substance peut être tératogène si elle est donnée à la bonne espèce animale, à la bonne dose et au bon moment au cours de la gestation [37]. De même, il a été montré que tous les carcinogènes humains connus adéquatement étudiés étaient carcinogènes pour au moins une espèce animale [38], ce qui pose le même dilemme scientifique que la loi de Karnofsky en tératologie.

L'étude de cancérogenèse sur toute la durée de vie chez le rongeur (en anglais "lifetime rodent bioassay", LRB) est le standard réglementaire pour la prédiction du risque de cancer chez l'homme, même si elle n'a jamais été soumise à une validation formelle en tant qu'essai pour les carcinogènes humains [39]. Initialement développée dans les années 1940 et 1950 [40-42], ses principes sous-jacents sont restés globalement inchangés depuis cette époque. Un inconvénient majeur du LRB est le taux élevé de faux positifs en regard du potentiel de carcinogénicité chez l'homme [43-47].

Il y a de plus en plus de doute au sein de la communauté scientifique sur la pertinence de l'étude sur le rongeur pour le risque de cancer humain. Dans une étude citée par Ennever et Lave en 2003, seuls trois parmi six carcinogènes humains connus ont causé un cancer à la fois sur des rats et sur des souris, alors que l'un des carcinogènes humains connus n'a causé de cancer ni chez le rat ni chez la souris [48]. Selon le Programme national de toxicologie (NTP) des Etats-Unis et le Centre international de recherche sur le cancer (CIRC, en anglais "IARC") -agence sous tutelle de l'Organisation mondiale de la santé-, une substance est classée "cancérogène pour l'Homme" (CIRC Groupe 1) d'après des données solides tirées d'études épidémiologiques humaines [49]. Le NTP a actuellement classé 54 substances comme carcinogènes humains connus, alors que le CIRC en a classé 66 (CIRC 2006, NTP 2005) [50].

L'identification précise des substances causant le cancer est un objectif central de REACH. Dans un rapport préparé pour la CE sur le rôle attendu de REACH dans la réduction des morts par cancer résultant uniquement de l'exposition professionnelle aux substances chimiques, les auteurs concluaient prudemment que les bénéfices économiques sur 30 ans atteindraient entre 18 milliards et 54 milliards d'euro [51]. Les autorités de réglementation se fient dans une large mesure aux données de carcinogénicité sur des animaux pour formuler les évaluations de risque pour l'homme. Toutefois, les données animales ont fourni des résultats contradictoires, comme démontré, par exemple, par les systèmes de classification de l'Agence de protection de l'environnement (EPA) des Etats-Unis et le CIRC [52,53]. Knight et al ont trouvé que pour 111 substances chimiques pour lesquelles l'EPA considère qu'il manque des données humaines mais qu'il y a des données animales, les classifications de l'EPA et du CIRC étaient significativement différentes [54].

Revue systématique de modèles animaux

La revue systématique est actuellement une méthode prisée pour évaluer l'efficacité des traitements médicaux. Une "revue systématique" se définit comme "l'utilisation consciencieuse, explicite, judicieuse des meilleures preuves actuelles dans la prise de décisions concernant les soins à un patient donné." [55] Aujourd'hui, la revue systématique a de plus larges applications, qui incluent les études sur des animaux. La piètre prédictibilité des modèles animaux dans les études translationnelles humaines a suscité des appels à davantage de revues systématiques pour améliorer les résultats [56,57]. Beaucoup de critiques à l'égard des modèles animaux sont basées sur une piètre méthodologie de recherche, notamment la sélection des espèces, la taille de l'échantillon, les procédures en aveugle et aléatoires [58]. Plusieurs collaborations ont tenté de remédier au problème par des listes de contrôle normalisées [59,60]. Toutefois, malgré de significatives améliorations dans la méthodologie, certaines thérapies importantes continuent à éluder la traduction en applications cliniques.

Des exemples notables de ceci incluent la recherche d'un vaccin contre le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) et la recherche de médicaments neuroprotecteurs. Dans le cas du premier, environ 100 vaccins ont montré leur efficacité contre un virus proche du VIH dans un modèle animal mais aucun n'a été préventif pour le VIH chez l'homme [61-63]. Dans le cas de la neuroprotection, plus de 1000 médicaments ont montré leur efficacité sur des modèles animaux mais aucun n'a été efficace chez l'homme [64,65]. Les revues systématiques ne sont bonnes que dans la mesure où les données qu'elles analysent sont exactes. Si l'hypothèse scientifique qui sous-tend les études incluses dans la revue est fautive, alors la méthodologie s'avère ne pas être pertinente. Nous discuterons de ceci plus en détail dans les sections suivantes.

Biologie de l'évolution et complexité

L'espèce est l'unité principale de l'évolution et peut être définie en termes de son isolement reproductif [66]. L'isolement reproductif est intrinsèquement causé par des incompatibilités entre gènes d'espèces différentes [67]. Identifier les gènes et déterminer leurs fonctions nous amène plus près de comprendre les relations entre les mécanismes isolants et le processus de spéciation [68,69]. C'est précisément cette fonction des gènes spécifique de l'espèce qui rend impossible de prédire l'extrapolation entre espèces dans n'importe quel système complexe. Les systèmes vivants, en particulier les mammifères, sont des exemples de systèmes complexes. Les systèmes complexes ont des caractéristiques très spécifiques qui affectent la capacité d'un système complexe à prédire la réponse d'un autre [70-72].

Une caractéristique essentielle des systèmes complexes est leur réponse non linéaire aux perturbations (telles

qu'une agression chimique) [72]. Une autre est qu'ils sont dépendants des conditions initiales (par exemple, les niveaux d'expression des gènes) [73]. Différentes lignées de souris peuvent répondre très différemment à une délétion génétique [74,75]. De même, les humains peuvent répondre différemment à des médicaments ou à des substances chimiques en fonction de leur sexe [76,77] ou de leur ethnie [78,79]. Même des jumeaux monozygotes peuvent répondre différemment aux perturbations [80]. Une autre propriété essentielle des systèmes biologiques complexes est leur robustesse [81,82]. Les systèmes robustes résistent aux changements de l'environnement parce qu'ils peuvent s'adapter et ont des composantes redondantes qui peuvent agir comme une sauvegarde si des composantes individuelles font défaut. Une autre caractéristique des systèmes complexes est leur modularité. En raison de l'existence de sous-systèmes qui sont physiquement et fonctionnellement isolés, il est moins probable qu'une défaillance dans un module se propage à d'autres parties avec de potentielles conséquences délétères. En même temps, cette modularité n'empêche pas les différents compartiments de communiquer les uns avec les autres [83].

Enfin, les systèmes complexes sont plus que la somme de leurs parties, ce qui s'illustre par le fait qu'ils montrent de l'"émergence", ce qui signifie que de nouvelles propriétés d'un système complexe apparaissent à partir de l'interaction des parties. "Les propriétés émergentes résistent à toute tentative d'être prédites ou déduites par calcul explicite ou tout autre moyen" [84]. Ces nouvelles propriétés ne peuvent pas être déterminées même à la lumière de la connaissance complète des parties composantes. Greek et Shanks expliquent que l'évolution, la théorie de la complexité et la génétique démontrent pourquoi les essais sur des animaux ne peuvent pas être un moyen efficace pour prédire ce qu'un médicament ou une substance chimique fera chez l'homme [38]. Le fait que les rongeurs et les humains représentent des systèmes différemment complexes avec des trajectoires évolutives uniques invalide l'utilisation d'un système complexe (le rongeur) pour prédire la réponse d'un autre système complexe (l'humain). Les systèmes biologiques complexes, en particulier les mammifères, ne se prêtent pas au réductionnisme. Dans sa critique à la pensée réductionniste, van Regenmortel déclare :

La méthode réductionniste de disséquer des systèmes biologiques en leurs parties constituantes a été efficace pour expliquer les bases chimiques de plusieurs processus vivants. Toutefois, beaucoup de biologistes réalisent maintenant que cette approche a atteint sa limite. Les systèmes biologiques sont extrêmement complexes et ont des propriétés émergentes qui ne peuvent pas être expliquées, ou même prédites, en étudiant leurs parties individuelles. L'approche réductionniste -bien que fructueuse dans les premiers jours de la biologie moléculaire- sous-estime cette complexité et, par

conséquent, a une influence préjudiciable de plus en plus grande dans beaucoup de domaines de la recherche biomédicale, dont la découverte de médicaments et le développement de vaccins [84].

Incertitude de l'extrapolation de données

En utilisant des indicateurs tels que la sensibilité, la spécificité et les valeurs prédictives positive et négative, il est possible d'évaluer statistiquement la valeur d'un modèle animal pour prédire la réponse humaine (Table 2).

Table 2. Calcul des valeurs pour un test de classification binaire

Référence absolue			
Test		GS+	GS-
		TP	FP
	T-	FN	TN
Sensibilité = $TP / (TP + FN)$			
Spécificité = $TN / (FP + TN)$			
Valeur prédictive positive (PPV) = $TP / (TP + FP)$			
Valeur prédictive négative (NPV) = $TN / (FN + TN)$			
Abréviations : T-, test négatif ; T+, test positif ; FP, faux positif ; TP, vrai positif ; FN, faux négatif ; TN, vrai négatif ; GS-, référence absolue négative ; GS+, référence absolue positive			

Ceci requiert qu'humains et animaux soient exposés à la même agression chimique ou mélange de substances chimiques, dans des conditions contrôlées. Dans le cas de substances industrielles dans le cadre de REACH, ceci arriverait très rarement. Des exemples de tels événements rares incluraient la dispersion accidentelle d'un nuage de 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-para-dioxine (TCDD) à Seveso en 1976 [85] et la tragédie de Bhopal en 1984 dans laquelle du méthyl isocyanate avait été libéré [86]. En revanche, il y a bien plus d'exemples d'exposition contrôlée à une substance au cours du développement de substances pharmaceutiques, où la toxicité préclinique chez l'animal est comparée aux effets secondaires observés cliniquement chez l'homme. Ainsi que montré précédemment, le PPV est, dans ces cas, considérablement inférieur à ce qui serait attendu en jouant à pile ou face. Il devrait être noté que la piètre qualité des modèles animaux en toxicologie réglementaire persiste en dépit de l'utilisation de facteurs d'ajustement [87,88].

Pour l'extrapolation entre espèces, l'industrie et les autorités de réglementation se sont tournées vers l'utilisation d'algorithmes variés et de facteurs d'ajustement "dans la gamme 10-10.000" [89].

Les limites de l'utilisation de facteurs d'ajustement sont peut-être le mieux connues par les autorités de réglemen-

tation d'après les études sur des rongeurs. Le but du NTP pour les essais de carcinogénicité en utilisant le LRB est de prédire la carcinogénicité humaine en utilisant un facteur de correction requis pour traduire des doses élevées chez les rongeurs en doses typiquement faibles chez l'homme. Toutefois, selon Pritchard et al, aucun lien certain n'a été établi pour relier les réponses des animaux dans des essais sur le cancer aux effets dépendants de la dose observés chez l'homme [49]. Ce point de vue est relayé par Gad : "L'extrapolation de données de carcinogénicité des rongeurs à l'homme demeure l'un des plus grands défis de la toxicologie moderne" [90].

L'exemple du bisphénol A (BPA) en tant que substance chimique dans REACH

La première phase de REACH requiert l'enregistrement des substances en gros volume (celles produites à plus de 1000 tonnes par an) et les SVHC, dont de possibles carcinogènes, mutagènes ou substances toxiques pour la reproduction, dont l'échéance pour l'enregistrement était le 1er décembre 2010. Le BPA entre dans la catégorie des substances en gros volume puisqu'il est produit en quantités de 3 milliards de kilos par an [92]. De plus, des éléments de preuve suggèrent que le BPA pourrait être classé en tant que carcinogène, mutagène ou toxique pour la reproduction. Des preuves d'effets des perturbateurs endocriniens sur le développement dans les milieux sauvages et chez l'homme ont commencé à apparaître au début des années 1990 [93-95] et l'un des composés à être soumis à l'analyse scientifique a été le BPA [96]. Un grand nombre de recherches ont été faites sur les effets de cette substance in utero et les effets d'une faible exposition aux perturbateurs endocriniens [97-102].

La position traditionnelle en toxicologie était que "la dose fait le poison" (Paracelse) [103]. Le domaine relativement nouveau de la toxicologie du développement a apporté d'importantes nouvelles connaissances sur les effets des perturbations, dont ceux des substances chimiques exogènes, sur le fœtus. Les effets de faibles, plutôt que fortes, doses de perturbateurs endocriniens sur les récepteurs moléculaires sensibles est également significatif. Le et ses collègues ont montré que de très petites quantités (<1 part par trillion) de BPA sont capables d'affecter des neurones en développement in vitro [104]. Le fait que la gestation soit divisée en deux périodes majeures est d'une importance particulière dans la différence entre l'espèce humaine et les espèces animales :

Chez l'homme, la phase embryonnaire constitue 20% de la période de gestation totale et la phase fœtale 80%, alors que chez la souris et le rat on constate exactement le contraire [105].

L'exemple du BPA est édifiant par rapport à REACH car il illustre une partie de la confusion causée au sein des autorités de réglementation par l'actuelle confiance dans les modèles animaux et les études sur l'homme insuffi-

santes ou limitées [106-110]. En 2009, Beronius et ses collègues publiaient les découvertes d'une étude de la littérature dans laquelle les conclusions sur le risque du BPA pour la santé allaient de "il n'y a aucun risque pour aucune partie de la population" à "il y a un risque pour la population entière" [111]. L'enquête a montré que les différentes conclusions des autorités de réglementation étaient principalement influencées par l'évaluation des effets à faible dose et par les incertitudes entourant la signification de ces données pour l'évaluation du risque sanitaire. En réalité, il existe des études publiées à l'appui de chacune des positions (risque total ou nul) dans la littérature scientifique. Par exemple, Ryan et ses collègues ont démontré que des doses du contraceptif humain éthinyl estradiol pertinentes du point de vue pharmacologique étaient délétères pour la morphologie et la fonction reproductrice chez le rat femelle alors que le BPA ne l'était pas [112]. A l'extrême opposé, vom Saal et Hughes ont noté des effets négatifs chez la souris exposée à des doses inférieures à la dose prédite comme "sûre" ou dose de référence, soit 50µg/kg/jour de BPA [113]. La "dose sans effet nocif observé" officielle pour le BPA aux Etats-Unis et en Europe est actuellement de 5 mg/kg de poids corporel par jour [114,115]. Ce chiffre, destiné à servir de repère aux autorités sanitaires internationales, est basé sur des études faites sur des rats et des souris [116,117]. Negishi et al ont observé des différences considérables dans la distribution, le métabolisme et l'excrétion du BPA entre rongeurs et primates non humains, ainsi que des différences entre singes et chimpanzés [118]. Il y a aussi des différences dans la réponse au BPA selon la lignée de rats utilisée. Par exemple, alors que le BPA stimule la sécrétion de prolactine chez le rat Fischer 344, il ne le fait pas chez le rat Sprague Dawley [119].

The Toxicological and Health Aspects of Bisphenol A: Report of Joint FAO/WHO Expert Meeting (rapport du comité d'experts de l'Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) et l'Organisation mondiale de la santé, intitulé : Aspects toxicologiques et sanitaires du bisphénol A) publié en novembre 2010, indique :

Bien qu'un grand nombre d'études sur la toxicité et l'activité hormonale du BPA sur les animaux de laboratoire aient été publiées, il y a eu des divergences considérables de résultats parmi ces études en ce qui concerne aussi bien la nature des effets observés que les niveaux auxquels ils surviennent. Ceci a mené à des controverses au sein de la communauté scientifique au sujet de la sécurité du BPA, ainsi qu'à une considérable attention des médias [120].

Le comité d'experts notait la nécessité de données humaines supplémentaires :

La majeure nécessité restante de recherche consiste en des études de pharmacocinétique humaine faites selon de hautes exigences de sensibi-

lité analytique et la validation de méthodes qui fournissent des mesures exactes et précises dans le temps de l'aglycone et des formes conjuguées du BPA en conjonction avec des analyses complètes de l'excrétion urinaire. Ces données sont essentielles pour combler quelques manques de données identifiés et, ainsi, pour minimiser l'incertitude à travers l'évaluation de bilan de masse de même que des approches de modélisation pharmacocinétique et PBPK [pharmacocinétique basée sur la physiologie] classiques de la métabolisation et l'élimination du BPA par l'homme [120].

Dans l'exemple du BPA, les autorités de santé canadiennes ont établi une référence en invoquant le principe de précaution et en étant le premier pays au monde à déclarer que le BPA est une "substance toxique" [121].

Modèles d'exposition humaine

Les modèles animaux ne sont pas prédictifs pour l'homme mais plusieurs technologies émergentes pour fournir des données directement pertinentes pour la santé humaine sont prometteuses. La première étape et vraisemblablement la plus importante -la biosurveillance des populations humaines- est actuellement en cours en Europe, bien qu'à une faible échelle [122]. Manno et al définissent la biosurveillance comme

la mesure répétée, contrôlée, de marqueurs chimiques ou biologiques dans les fluides, tissus ou autres échantillons disponibles de sujets exposés

ou ayant été exposés ou devant être exposés à des facteurs de risque chimique, physique ou biologique sur leur lieu de travail et/ou dans l'environnement [123].

La biosurveillance se prête à l'identification de biomarqueurs dans les populations humaines, que ce soit en tant qu'indicateurs d'exposition, d'effet ou de susceptibilité (pour une discussion plus approfondie sur ce sujet, voir Silins et Högborg [124]). L'étude de biomarqueurs [125], ajoutée à d'autres technologies basées sur l'homme, telles que la génomique [126,127], l'épigénomique [128], les cellules souches pluripotentes induites [129,130], l'épidémiologie et la modélisation toxicocinétique basée sur la pharmacocinétique et la physiologie humaines [131] vont contribuer à l'élaboration de politiques de santé publique mieux avisées quant à l'exposition chimique et aux mesures préventives. La figure 1 illustre quelques-uns de ces concepts.

L'importance de la biosurveillance ne peut pas être sous-estimée [132]. Une enquête publiée en 2005 a révélé la présence de 287 substances chimiques industrielles dans le sang de cordon ombilical humain, 209 d'entre elles n'ayant encore jamais été détectées chez les nouveau-nés [133,134]. Comme discuté précédemment, il est bien connu que la toxicité peut être modifiée par l'exposition simultanée ou séquentielle à de multiples agents présents dans l'environnement, pouvant agir en synergie [124]. Vu ces circonstances, la prévention de la pollution est clairement préférable au contrôle de la pollution.

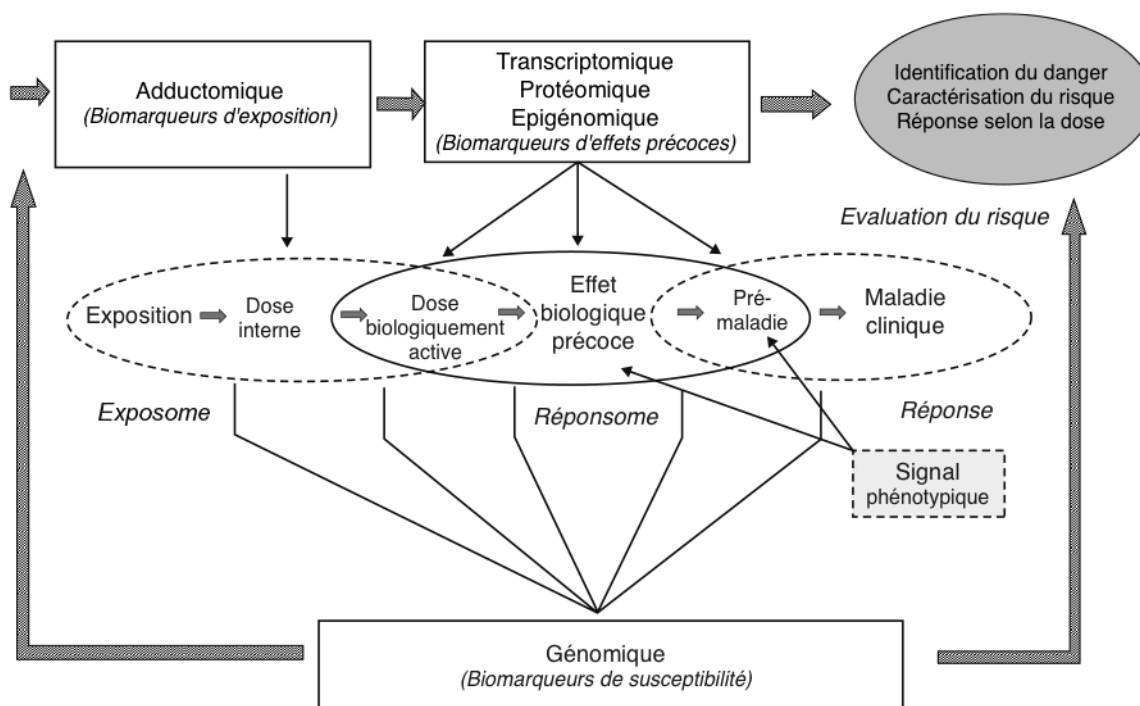


Figure 1. Applications des études de toxicogénomique humaine à l'évaluation du risque.

Reproduit d'après McHale CM, Luoping Z, Hubbard AE, Smith MT. Toxicogenomics profiling of chemically exposed humans in risk assessment. Mutat. Res. 2010; 705(3):172-183. Avec la permission de Elsevier [126]

Conclusion

La seule occasion de comparer empiriquement les réponses animale et humaine à une agression toxique est lorsque à la fois animaux et humains sont exposés à la même substance chimique ou mélange de substances chimiques, dans les mêmes conditions, en général tragiques comme à Seveso ou à Bhopal. La seule situation réaliste comparable à ce scénario d'exposition chimique est celle que l'on voit dans les études précliniques de toxicité chez l'animal et lors de l'observation d'effets secondaires de médicaments en cours de développement pharmaceutique chez l'homme. Les preuves empiriques dans ce contexte donnent un PPV inférieur au jeu de pile ou face. Il semble y avoir une déconnexion fondamentale entre le manque évident de prédiction des données animales et la mentalité administrative qui prévaut dans le milieu de la réglementation.

REACH est à l'opposé du principe de précaution, en grande partie en raison de défauts intrinsèques à son paradigme d'évaluation du risque. Ce paradigme ignore des preuves empiriques ainsi que des principes fondamentaux de la biologie de l'évolution et des systèmes complexes qui invalident le modèle animal. Bien que REACH ait placé la charge de la preuve sur les fabricants, lesquels doivent démontrer la sécurité de leurs produits, ce règlement « marque un but contre son camp » en obligeant les fabricants à utiliser des méthodes d'essais qui ne permettent pas de prédire les effets des substances sur la santé humaine.

La biosurveillance humaine et une politique réduisant la dépendance vis-à-vis des substances dangereuses et développant des alternatives sûres, devraient faire partie intégrante d'une stratégie de précaution et de prévention. La charge chimique présente actuellement dans la population humaine prouve que des mesures urgentes doivent être prises par les gouvernements nationaux et internationaux pour éviter une pollution chimique globale plus importante encore et, de plus, pour s'assurer que des essais fiables pour déterminer les effets de ces substances chimiques sur la santé humaine soient développés et mis en œuvre.

Déclaration

Les opinions exprimées dans cet article représentent celles des auteurs et pas nécessairement celles de l'Université de Rome "Tor Vergata". Les auteurs ne signalent pas de conflits d'intérêts pour ce travail.

Références

1. Thornton J. Pandora's Poison: Chlorine, Health and a New Environmental Strategy. Cambridge, MA: The MIT Press; 2000.
2. Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council of 18 December 2006. Official Journal of the European Union. 2006;L396:1–849. Available from: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=oj:l:2006:396:0001:0849:en:pdf>. Accessed May 26, 2012.
3. European Chemicals Agency (ECHA) [home page on the Internet]. Helsinki: ECHA; nd. Available from: <http://echa.europa.eu/>. Accessed April 12, 2012.
4. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). OECD Guidelines for Testing of Chemicals. Paris: OECD; 2011. Available from: <http://www.oecd.org/dataoecd/8/12/48684430.pdf>. Accessed April 12, 2012.
5. Abbott A. Lisbon Treaty could give research a boost. Nature. 2009; doi:10.1038/news.2009.1064. Available from: <http://www.nature.com/news/2009/091105/full/news.2009.1064.html>. Accessed April 12, 2012.
6. Toxic Substances Control Act; Preliminary Observations on Legislative Changes to Make TSCA More Effective; Statement of Peter F Guerrero, Director, Environmental Protection Issues, Resources, Community, and Economic Development Division [testimony]. GAO/T-RCED-94-263. 1994. Available from: <http://www.gao.gov/assets/110/105646.pdf>. Accessed May 26, 2012.
7. Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health Center for Alternatives to Animal Testing. Thomas Hartung, director of the Center for Alternatives to Animal Testing (CAAT), receives \$6 million NIH director's grant to pioneer transformative research in toxicology testing [press release]. Baltimore, MD: Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health Center for Alternatives to Animal Testing; 2011 [September 20]. Available from: <http://altweb.jhsph.edu/news/current/caatnihgrant.html>. Accessed April 12, 2012.
8. Zeliger HI. Human Toxicology of Chemical Mixtures: Toxic Consequences Beyond the Impact of One-Component Product and Environmental Exposures. 2nd ed. Amsterdam: William Andrew/Elsevier, 2011.
9. Human and Environmental Risk Assessment on Ingredients of Household Cleaning Products (HERA). The concept of risk versus hazard [web page on the Internet]. Brussels: HERA; nd. Available from: <http://www.heraproject.com/Risk.cfm>. Accessed April 12, 2012.
10. Lofstedt R, Boudier F, Wardman J, Chakrobarty S. The changing nature of communication and regulation of risk in Europe. J Risk Res. 2011; 14(4):409–429.
11. Tickner J, Geiser K. The problem of current toxic chemicals management. New Solut. 2004;14(1):43–58.
12. OECD. OECD guidelines for the testing of chemicals and related documents [web page on the Internet]. Paris: OECD; nd. Available from: http://www.oecd.org/document/12/0,3746,en_2649_37465_48704140_1_1_1_37465,00.html. Accessed April 12, 2012.
13. The Global Development Research Center. Wingspread statement of the precautionary principle [web page on the Internet]. The Global Development Research Center; nd. Available from: <http://www.gdrc.org/u-gov/precaution-3.html>. Accessed April 12, 2012.
14. Wikipedia. Precautionary principle [web page on the Internet]. <http://www.unep.org/Documents/multilingual/Default.asp?DocumentID=78 &ArticleID=1163>. Accessed May 26, 2012.
15. Consolidated Version of the Treaty on the Functioning of the European Union. Official Journal of the European Union. 2010;C83: 47–200. Available from: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:C:2010:083:0047:0200:EN:PDF>. Accessed April 12, 2012.
16. Kriebel D, Tickner J, Epstein P, et al. The precautionary principle in environmental science. Environ Health Perspect. 2001;109(9): 871–875.
17. EurActiv.com. EU considers changing REACH chemicals law [web page on the Internet]. Brussels: EurActiv.com; 2010 [updated May 10, 2012]. Available from: <http://www.euractiv.com/sustainability/potocnik-considers-amending-reach-news-368775>. Accessed April 12, 2012.
18. Collins LM. Strange bedfellows? The precautionary principle and toxic tort: a tort paradigm for the 21st century. Environmental Law Reporter News and Analysis. 2005;35(6):10361–10372.
19. Chemical Inspection and Regulation Service (CIRS). REACH SVHC list 2012: SVHC testing [web page on the Internet]. Drogheda: CIRS; 2012. Available from: http://www.cirs-reach.com/Testing/REACH_SVHC_List_SVHC_Testing.html. Accessed April 12, 2012.
20. REACH – time to act on registration. Enterprise and Industry Online Magazine. September 9, 2009. Available from: http://ec.europa.eu/enterprise/magazine/articles/industrial-policy/article_9312_en.htm. Accessed April 12, 2012.
21. National Toxicology Program. The NTP High Throughput Screening

- (HTS) Initiative. Research Triangle Park, NC: National Toxicology Program; 2007. Available from: http://ntp.niehs.nih.gov/files/1_HTS_Initiative.pdf. Accessed April 12, 2012.
22. Howard V. Synergistic effects of chemical mixtures: can we rely on traditional toxicology? *Ecologist*. 1997;27(5):192–195.
23. Jacobs M. *The Green Economy: Environment, Sustainable Development, and the Politics of the Future*. Concord, MA: Pluto Press; 1991.
24. International Joint Commission. Sixth Biennial Report under the Great Lakes Water Quality Agreement of 1978: to the Governments of the United States and Canada and the State and Provincial Governments of the Great Lakes Basin. Washington DC, Ottawa, ON, and Windsor, ON: International Joint Commission; 1992 [updated February 10, 1997]. Available from: <http://www.ijc.org/php/publications/html/6bre.html>. Accessed May 26, 2012.
25. European Commission. Chemicals: REACH – Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals [web page on the Internet]. Brussels: European Commission; 2012 [updated February 2, 2012]. Available from: http://ec.europa.eu/enterprise/sectors/chemicals/reach/index_en.htm. Accessed April 12, 2012.
26. Gilbert N. Crucial data on REACH not disclosed. *Nature*. 2010;464:1116–1117. Available at <http://altweb.jhsph.edu/wc6/paper553.pdf>.
27. ECHA. Registered substances: chemical substance search [database on the Internet]. Helsinki: ECHA; nd. Available from: <http://altweb.jhsph.edu/wc6/paper553.pdf>. Accessed April 12, 2012.
28. Council Regulation (EC) No 440/2008 of the European Parliament and of the Council of May 30, 2008. Available from: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2008:142:0001:0739:en:PDF>. Accessed April 12, 2012.
29. European Commission. Laboratory animals: increasing the welfare of animals used in experiments; results of citizen's questionnaire on the revision of Directive 86/609/EEC on the protection of animals used for experimental and other scientific purposes [web page on the Internet]. Brussels and Luxembourg: European Commission; 2012 [updated February 23]. Available from: http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/questionnaire1.htm. Accessed April 12, 2012.
30. Toxicology Data Network [database on the Internet]. Bethesda, MD: US National Library of Medicine; nd. Available from: <http://toxnet.nlm.nih.gov>. Accessed April 12, 2012.
31. Olson H, Betton G, Robinson D, et al. Concordance of the toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2000;32(1):56–67.
32. Shanks N, Greek R, Nobis N, Greek J. Animals and medicine: do animal experiments predict human response? *Skeptic*. 2007;13(3):2–9.
33. Wall RJ, Shani M. Are animal models as good as we think? *Theriogenology*. 2008;69(1):2–9.
34. Heywood R. Clinical toxicity – could it have been predicted? Post-marketing experience. In Lumley CE, Walker SR, editors. *Animal Toxicity Studies: Their Relevance for Man*. Lancaster: Quay; 1990:57–67.
35. Spriet-Pourra C, Auriche M. *Drug Withdrawal from Sale*. 2nd ed. New York: PJB Publications; 1994.
36. Shepard TH, Lemire, RJ. *Catalog of Teratogenic Agents*. 11th ed. Baltimore, MD: The Johns Hopkins University Press; 2004.
37. Karnofsky CA. Mechanisms of action of certain growth-inhibiting drugs. In: Wilson JG, Warkany J, editors. *Teratology: Principles and Techniques*. Chicago, IL: University of Chicago Press; 1965:185–213.
38. Shanks N, Greek CR. *Animal Models in Light of Evolution*. Boca Raton, FL: BrownWalker Press; 2009.
39. Salsburg D. The lifetime feeding study in mice and rats – an examination of its validity as a bioassay for human carcinogens. *Fundam Appl Toxicol*. 1983;3(1):63–67.
40. Berenblum I, editor. *A Report of the Panel on Carcinogenicity of the Cancer Research Commission of IUCC*. Geneva: International Union Against Cancer; 1969.
41. Weisburger EK. History of the Bioassay Program of the National Cancer Institute. *Prog Exp Tumor Res*. 1983;26:187–201.
42. Weisburger JH, Williams GM. Carcinogen testing: current problems and new approaches. *Science*. 1981;214(4519):401–407.
43. Alden CL, Smith PF, Piper CE, Brey L. A critical appraisal of the value of the mouse cancer bioassay in safety assessment. *Toxicol Pathol*. 1996;24(6):722–725.
44. Cohen SM, Klaunig J, Meek ME, et al. Evaluating the human relevance of chemically-induced animal tumors. *Toxicol Sci*. 2004;78(2):181–186.
45. Gaylor DW. Are tumor incidence rates from chronic bioassays telling us what we need to know about carcinogens? *Regul Toxicol Pharmacol*. 2005;41(2):128–133.
46. Rhomberg LR, Baetcke K, Blancato J, et al. Issues in the design and interpretation of chronic toxicity and carcinogenicity studies in rodents: approaches to dose selection. *Crit Rev Toxicol*. 2007;37(9):729–837.
47. Van Oosterhout JP, Van der Laan JW, De Waal EJ, et al. The utility of two rodent species in carcinogenic risk assessment of pharmaceuticals in Europe. *Regul Toxicol Pharmacol*. 1997;25(1):6–17.
48. Ennever FK, Lave LB. Implications of the lack of accuracy of the lifetime rodent bioassay for predicting human carcinogenicity. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2003;38(1):52–57.
49. Pritchard JB, French JE, Davis BJ, Haseman JK. The role of transgenic mouse models in carcinogen identification. *Environ Health Perspect*. 2003;111(4):444–454.
50. Long ME. Predicting carcinogenicity in humans: the need to supplement animal-based toxicology. *ALTEX*. 2007;14(Special Issue):553–559. Proceedings of the 6th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences August 21–25, 2007, Tokyo, Japan.
51. Risk and Policy Analysts Limited (RPA) for the European Commission – Environment Directorate-General. Assessment of the Impact of the New Chemicals Policy on Occupational Health: Final Report. J414/ Occup. Norfolk, UK: RPA; 2003. Available from: http://ec.europa.eu/environment/chemicals/reach/background/docs/finrep_occ_health.pdf. Accessed April 12, 2012.
52. International Agency for Research on Cancer (IARC). *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*. Vols 1–82. Lyon: IARC; 1972–2004.
53. US Environmental Protection Agency (EPA). *Integrated Risk Information System* [database on the Internet]. Washington DC: EPA; 2012 [updated May 25]. Available from: <http://www.epa.gov/IRIS/>. Accessed May 25, 2012.
54. Knight A, Bailey J, Balcombe J. Animal carcinogenicity studies: 1. Poor human predictivity. *Altern Lab Anim*. 2006;34(1):19–27.
55. Sackett DL, Rosenberg WM, Gray JA, Haynes RB, Richardson WS. Evidence based medicine: what it is and what it isn't. 1996. *Clin Orthop Relat Res*. 2007;455:3–5.
56. Hooijmans CR, Leenaars M, Ritskes-Hoitinga M. A gold standard publication checklist to improve the quality of animal studies, to fully integrate the Three Rs, and to make systematic reviews more feasible. *Altern Lab Anim*. 2010;38(2):167–182.
57. Macleod MR, Fisher M, O'Collins V, et al. Reprint: Good laboratory practice: preventing introduction of bias at the bench. *J Cerebral Blood Flow Metab*. 2009;29(2):221–223.
58. Macleod MR, O'Collins T, Howells DW, Donnan GA. Pooling of animal experimental data reveals influence of study design and publication bias. *Stroke*. 2004;35(5):1203–1208.
59. Kilkenny C, Browne W, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Animal research: reporting in vivo experiments – The ARRIVE Guidelines. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2011;31(4):991–993.
60. Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving bioscience research reporting: The ARRIVE Guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol*. 2010;8(6):e1000412.
61. Gamble LJ, Matthews QL. Current progress in the development of a prophylactic vaccine for HIV-1. *Drug Des Devel Ther*. 2010;5:9–26.
62. Editorial; *Nature Reviews Drug Discovery* doi:10.1038/nrd1817. The time is now. *Nat Rev Drug Discov*. 2005;4(8):613.
63. Cold shower for AIDS vaccines. *Nat Med*. 2007;13(12):1389–1390.
64. van der Worp HB, Macleod MR. Preclinical studies of human disease: time to take methodological quality seriously. *J Mol Cell Cardiol*. 2011;51(4):449–450.
65. Dirnagl U, Macleod MR. Stroke research at a road block: the streets from adversity should be paved with meta-analysis and good laboratory practice. *Br J Pharmacol*. 2009;157(7):1154–1156.

66. Mayr E. What is a species, and what is not? *Philos Sci.* 1996;63: 262–277. Available from: <http://darwiniana.org/mayrspecies.htm>. Accessed April 12, 2012.
67. Dettman JR, Anderson JB, Kohn LM. Genome-wide investigation of reproductive isolation in experimental lineages and natural species of *Neurospora*: identifying candidate regions by microarray-based genotyping and mapping. *Evolution.* 2010;64(3):694–709.
68. Coyne JA, Orr HA. *Speciation*. Sunderland, MA: Sinauer Associates; 2004.
69. Wu CI, Ting CT. Genes and speciation. *Nat Rev Genet.* 2004;5(2):114–122.
70. Csete ME, Doyle JC. Reverse engineering of biological complexity. *Science.* 2002;295(5560):1664–1669.
71. Kitano H. Computational systems biology. *Nature.* 2002;420(6912):206–210.
72. Alm E, Arkin AP. Biological networks. *Curr Opin Struct Biol.* 2003;13(2):193–202.
73. Sole R, Goodwin B. *Signs of Life: How Complexity Pervades Biology*. New York, NY: Basic Books; 2002.
74. Nijhout HF. The importance of context in genetics. *Am Sci.* 2003;91(5):416–423.
75. Rohan RM, Fernandez A, Udagawa T, Yuan J, D'amato RJ. Genetic heterogeneity of angiogenesis in mice. *FASEB J.* 2000;14(7):871–876.
76. Kaiser J. Gender in the pharmacy: does it matter? *Science.* 2005;308(5728):1572.
77. Macdonald JS. Vive la difference: sex and fluorouracil toxicity. *J Clin Oncol.* 2002;20(6):1439–1441.
78. Gregor Z, Joffe L. Senile macular changes in the black African. *Br J Ophthalmol.* 1978;62(8):547–550.
79. Spielman RS, Bastone LA, Burdick JT, Morley M, Ewens WJ, Cheung VG. Common genetic variants account for differences in gene expression among ethnic groups. *Nat Genet.* 2007;39(2):226–231.
80. Cheung DS, Warman ML, Mulliken JB. Hemangioma in twins. *Ann Plast Surg.* 1997;38(3):269–274.
81. Kitano H. A robustness-based approach to systems-oriented drug design. *Nat Rev Drug Discov.* 2007;6(3):202–210.
82. Monte J, Liu M, Sheya A, Kitami T. Definitions, Measures, and Models of Robustness in Gene Regulatory Network. nd. Available from: <http://cite-seerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.89.1604&rep=rep1&type=pdf>. Accessed April 12, 2012.
83. Kauffman SA. *The Origins of Order: Self-Organization and Selection in Evolution*. Oxford: Oxford University Press; 1993.
84. van Regenmortel MH. Reductionism and complexity in molecular biology. *EMBO Rep.* 2004;5(11):1016–1020.
85. Pesatori AC, Consonni D, Rubagotti M, Grillo P, Bertazzi PA. Cancer incidence in the population exposed to dioxin after the “Seveso accident”: twenty years of follow-up. *Environ Health.* 2009; 8:39.
86. Mishra PK, Samarath RM, Pathak N, et al. Bhopal Gas Tragedy: review of clinical and experimental findings after 25 years. *Int J Occup Med Environ Health.* 2009;22(3):193–202.
87. US Food and Drug Administration (FDA) Center for Drug Evaluation and Research (CDER). *Guidance for Industry: Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers*. Silver Spring, MD: FDA; 2005. Available from: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm078932.pdf>. Accessed April 12, 2012.
88. Martin RD, Genoud M, Hemelrijk K. Problems of allometric scaling analysis: examples from mammalian reproductive biology. *J Exp Biol.* 2005;208(Pt 9):1731–1747.
89. Committee on Toxicity (COT) of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment. *Health Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals – the Danish EPA Report and Exposure Time Trends to Phthalates*. TOX/2010/16. London: COT; 2010. Available from: <http://cot.food.gov.uk/pdfs/tox201016.pdf>. Accessed April 12, 2012.
90. Gad SC. *Drug Safety Evaluation*. 2nd ed. Hoboken, NJ: John Wiley and Sons; 2009.
91. ECHA. *Proposals to identify substances of very high concern previous consultations* [web page on the Internet]. Helsinki: ECHA; nd. Available from: <http://echa.europa.eu/web/guest/proposals-to-identify-substances-of-very-high-concern-previous-consultations>. Accessed April 12, 2012.
92. Wikipedia. *Bisphenol A* [web page on the Internet]. Wikipedia; 2012 [updated May 23]. Available from: http://msdsearch.dow.com/PublishedLiteratureDOWCOM/dh_088c/0901b8038088c783.pdf?filepath=productsafety/pdfs/noreg/233-00250.pdf&fromPage=GetDoc. Accessed May 23, 2012.
93. Krishnan AV, Starhis Permeth SF, Tokes L, Feldman D. Bisphenol-A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endocrinology.* 1993;132(2):2279–2286.
94. Guillette LJ Jr, Crain DA, Rooney AA, Pickford DB. Organization versus activation: the role of endocrine-disrupting contaminants (EDCs) during embryonic development in wildlife. *Environ Health Perspect.* 1995;103(Suppl 7):157–164.
95. Jobling S, Reynolds T, White R, Parker MG, Sumpter JP. A variety of environmentally persistent chemicals including some phthalates plasticizers are weakly estrogenic. *Environ Health Perspect.* 1995;103(6):582–587.
96. Nagel SC, vom Saal FS, Thayer KA, Dhar MG, Boechler M, Welshons WV. Relative binding affinity-serum modified access (RBA-SMA) assay predicts the relative in vivo bioactivity of the xenoestrogens bisphenol A and octylphenol. *Environ Health Perspect.* 1997;105(1):70–76.
97. Calafat AM, Weuve J, Ye X, et al. Exposure to bisphenol A and other phenols in neonatal intensive care unit premature infants. *Environ Health Perspect.* 2009;117(4):639–644.
98. Edgington AN, Ritter L. Predicting plasma concentrations of bisphenol A in children younger than 2 years of age after typical feeding schedules, using a physiologically based toxicokinetic model. *Environ Health Perspect.* 2009;117(4):645–652.
99. Kuruto-Niwa R, Tateoka Y, Usuki Y, Nozawa R. Measurement of bisphenol A concentrations in human colostrum. *Chemosphere.* 2007;66(6):1160–1164.
100. Ikezuki Y, Tsutsumi O, Takai Y, Kamei Y, Taketani Y. Determination of bisphenol A concentrations in human biological fluids reveals significant early prenatal exposure. *Hum Reprod.* 2002;17(11):2839–2841.
101. Schönfelder G, Wittfoht W, Hopp H, Talsness CE, Paul M, Chahoud I. Parent Bisphenol A accumulation in the human maternal-fetal-placental unit. *Environ Health Perspect.* 2002;110(11):A703–A707.
102. Cantonwine D, Meeker JD, Hu H, et al. Bisphenol A exposure in Mexico City and risk of prematurity: a pilot nested case control study. *Environ Health.* 2010;18(9):62.
103. Wikipedia. *Paracelsus* [web page on the Internet]. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359644606001164>. Wikipedia; 2012 [updated May 9, 2012]. Accessed May 26, 2012.
104. Le HH, Carlson EM, Chua JP, Belcher SM. Bisphenol A is released from polycarbonate drinking bottles and mimics the neurotoxic actions of estrogen in developing cerebellar neurons. *Toxicol Lett.* 2008;176(2):149–156.
105. Eriksson P, principal investigator. *Developmental toxicology: neurodevelopmental toxicity in mammals* [web page on the Internet]. Uppsala: Uppsala Universitet; 2005 [updated October 15, 2009]. Available from: http://www.fu.uu.se/etox/devtox_1.html. Accessed April 12, 2012.
106. Beronius A, Rudén C, Hanberg A, Håkansson H. Health risk assessment procedures for endocrine disrupting compounds within different regulatory frameworks in the European Union. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2009;55(2):111–122.
107. vom Saal FS, Prins GS, Welshons WV. Report of very low real-world exposure to bisphenol A is unwarranted based on a lack of data and flawed assumptions. *Toxicol Sci.* 2012;125(1):318–320.
108. vom Saal FS, Myers JP. Good laboratory practices are not synonymous with good scientific practices, accurate reporting or valid data. *Environ Health Perspect.* 2010;118(2):A60.
109. vom Saal FS, Akingbemi BT, Belcher SM, et al. Chapel Hill bisphenol A expert panel consensus statement: integration of mechanisms, effects in animals, and potential to impact human health at current levels of exposure. *Reprod Toxicol.* 2007;24(2):131–138.
110. Vandenberg LN, Chahoud I, Padmanabhan V, et al. Biomonitoring Studies Should Be Used by Regulatory Agencies to Assess Human Exposure Levels and Safety of Bisphenol A. *Environ Health Perspect.* 2010;118(8):1051–1054.

111. Beronius A, Rudén C, Håkansson H, Hanberg A. Risk to all or none? A comparative analysis of controversies in the health risk assessment of bisphenol A. *Reprod Toxicol*. 2010;29(2):132–146.
112. Ryan BC, Hotchkiss AK, Crofton KM, Gray LE Jr. In utero and lactational exposure to bisphenol A, in contrast to ethinyl estradiol, does not alter sexually dimorphic behaviour, puberty, fertility and anatomy of female LE rats. *Toxicol Sci*. 2009;114(1):133–148.
113. vom Saal FS, Hughes C. An extensive new literature concerning low-dose effects of bisphenol A shows the need for a new risk assessment. *Environ Health Perspect*. 2005;113(8):926–933.
114. European Food Safety Authority (EFSA). Opinion of the Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food on a request from the Commission related to 2,2-bis(4-hydroxyphenyl)propane (bisphenol A). *The EFSA Journal*. 2006;428. Available from: www.efsa.europa.eu/en/scdocs/doc/s428.pdf. Accessed April 12, 2012.
115. FDA. Draft assessment of bisphenol A for use in food contact applications. Silver Spring, MD: FDA; 2008. Available from: http://heartland.org/sites/all/modules/custom/heartland_migration/files/pdfs/26773.pdf. Accessed May 27, 2012.
116. Tyl RW, Myers CB, Marr MC, et al. Three-generation reproductive toxicity study of dietary bisphenol A in CD Sprague-Dawley rats. *Toxicol Sci*. 2002;68(1):121–146.
117. Tyl RW, Myers CB, Marr MC, et al. Two-generation reproductive toxicity study of dietary bisphenol A in CD-1 (Swiss) mice. *Toxicol Sci*. 2008;104(2):362–384.
118. Negishi T, Tominaga T, Ishii Y, et al. Comparative study on toxicokinetics of bisphenol A in F344 rats, monkeys (*Macaca fascicularis*) and chimpanzees (*Pan troglodytes*). *Exp Anim*. 2004;53(4):391–394.
119. Long X, Steinmetz R, Ben-Jonathan N, et al. Strain differences to vaginal responses to the xenoestrogen bisphenol A. *Environ Health Perspect*. 2000;108(3):243–247.
120. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization. Toxicological and Health Aspects of Bisphenol A: Report of Joint FAO/WHO Expert Meeting November 2–5, 2010 and Report of Stakeholder Meeting on Bisphenol A November 1, 2010 Ottawa, Canada. Geneva: World Health Organization; 2011. Available from: http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/97892141564274_eng.pdf. Accessed April 12, 2012.
121. Harrington R. Bisphenol A officially declared toxic by Canada. *Food-Productiondaily.com*. October 14, 2010. Available from: <http://www.foodproductiondaily.com/Quality-Safety/Bisphenol-A-officially-declared-toxic-by-Canada>. Accessed April 12, 2012.
122. European Human Biomonitoring [home page on the Internet]. Munich: European Human Biomonitoring; 2009. Available from: <http://www.eu-humanbiomonitoring.org/>. Accessed April 12, 2012.
123. Manno M, Viau C; in collaboration with Cocker J, et al. Biomonitoring for occupational health risk assessment (BOHRA). *Toxicol Lett*. 2010;192(1):3–16.
124. Silins I, Högberg J. Combined toxic exposures and human health: biomarkers of exposure and effect. *Int J Environ Res Public Health*. 2011;8(3):629–647.
125. Swenberg JA, Frvar-Tita E, Jeong YC, et al. Biomarkers in toxicology and risk assessment: informing critical dose-response relationships. *Chem Res Toxicol*. 2008;21(1):253–265.
126. McHale CM, Zhang L, Hubbard AE, Smith MT. Toxicogenomic profiling of chemically exposed humans in risk assessment. *Mutat Res*. 2010;705(3):172–183.
127. Sone H, Okura M, Zaha H, et al. Profiles of Chemical Effects on Cells (pCEC): a toxicogenomics database with a toxicoinformatics system for risk evaluation and toxicity prediction of environmental chemicals. *J Toxicol Sci*. 2010;35(1):115–123.
128. Hou L, Zhang X, Wang D, Baccarelli A. Environmental chemical exposures and epigenetics. *Int J Epidemiol*. 2012;41(1):79–105.
129. Cai J, Li W, Su H, et al. Generation of human induced pluripotent stem cells from umbilical cord matrix and amniotic membrane mesenchymal cells. *J Biol Chem*. 2010;285(15):11227–11234.
130. Chang WY, Garcha K, Manias JL, Stanford WL. Deciphering the complexities of human diseases and disorders by coupling induced-pluripotent stem cells and systems genetics. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. Epub April 10, 2012.
131. SimCYP [home page on the Internet]. Sheffield, UK: Simcyp Ltd; 2012. Available from: www.simcyp.com. Accessed April 12, 2012.
132. Clewell HJ, Tan YM, Campbell JL, Andersen ME. Quantitative interpretation of human biomonitoring data. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2008;231(1):122–133.
133. Environmental News Service staff. Toxic chemicals by the hundred found in blood of newborns [web page on the Internet]. Washington DC: Environmental Working Group; 2005. Available from: <http://www.ewg.org/news/toxic-chemicals-hundred-found-blood-newborns>. Accessed April 12, 2012.
134. Goodman S. Tests find more than 200 chemicals in newborn umbilical cord blood. *Scientific American*. December 2, 2009. Available from: <http://www.scientificamerican.com/article.cfm?id=newborn-babies-chemicals-exposure-bpa>. Accessed May 27, 2012.
135. OECD, Series on Testing and Assessment: Publications by Number. Available from: http://www.oecd.org/document/24/0,3746,en_2649_34377_47858904_1_1_1_1,00.html. Accessed July 30, 2012.