

RAPPORT D'ÉTUDE

11/09/2006

N° 06CR072.doc

**Analyse et construction des VTR pour le 1,2-  
dichloroéthane, le chloroforme, le  
tétrachloroéthane et le chlorure de méthylène**

**Analyse des VTR pour le 1,2-dichloroéthane, le chloroforme, le tétrachloroéthane et le chlorure de méthylène**

Client (ministère, industriel, collectivités locales) : anonymisé

Liste des personnes ayant participé à l'étude : Blandine Doornaert, Cheikh Diack et Frédéric Bois

Ce rapport a été examiné et discuté avec le Dr Alain Baert et le Pr Jean-Marie Haguenoer.

## RAPPORT FINAL

### PREAMBULE

Le présent rapport a été établi sur la base des informations fournies à l'INERIS, des données (scientifiques ou techniques) disponibles et objectives et de la réglementation en vigueur.

La responsabilité de l'INERIS ne pourra être engagée si les informations qui lui ont été communiquées sont incomplètes ou erronées.

Les avis, recommandations, préconisations ou équivalent qui seraient portés par l'INERIS dans le cadre des prestations qui lui sont confiées, peuvent aider à la prise de décision. Etant donné la mission qui incombe à l'INERIS de par son décret de création, l'INERIS n'intervient pas dans la prise de décision proprement dite. La responsabilité de l'INERIS ne peut donc se substituer à celle du décideur.

Le destinataire utilisera les résultats inclus dans le présent rapport intégralement ou sinon de manière objective. Son utilisation sous forme d'extraits ou de notes de synthèse sera faite sous la seule et entière responsabilité du destinataire. Il en est de même pour toute modification qui y serait apportée.

L'INERIS dégage toute responsabilité pour chaque utilisation du rapport en dehors de la destination de la prestation.

|                | <b>Rédaction</b>            | <b>Vérification</b>  | <b>Approbation</b>               |
|----------------|-----------------------------|----------------------|----------------------------------|
| <b>NOM</b>     | Blandine Doornaert          | Frédéric Bois        | Philippe Hubert                  |
| <b>Qualité</b> | Ingénieur dans l'Unité ETSC | Délégué scientifique | Directeur des risques chroniques |
| <b>Visa</b>    |                             |                      |                                  |

# RAPPORT FINAL

## RESUME

Ce travail a consisté à analyser les différentes valeurs toxicologiques de référence (VTR) disponibles pour les effets cancérigènes induits par une exposition par inhalation aux quatre substances suivantes : 1,2-dichloroéthane, tétrachlorure de carbone, chloroforme et chlorure de méthylène. Les VTR proposées par les six organismes (ATSDR, OMS, US EPA, RIVM, Santé Canada et OEHHA) ont été analysées ainsi que les VTR élaborées par le client.

Cette analyse a été réalisée en s'appuyant sur les données concernant les effets cancérigènes et les effets génotoxiques possiblement induits par chaque substance ainsi que sur le mécanisme d'action cancérigène et sur la transposition animal-homme. Ces données ont été préalablement recherchées et ont été indiquées dans le rapport. Des VTR INERIS ont été proposées si cela était possible et nécessaire. Dans le cas contraire un choix de VTR a été réalisé parmi celles établies par les six organismes et par le client.

Pour les VTR que nous avons élaboré, la démarche générale que nous avons adoptée est la suivante :

Les données permettant d'établir des VTR ont été examinées et les études expérimentales ont été cotées grâce à la cotation de Klimisch *et al.*, 1997. Seules les études cotées 1 et 2 par cette cotation ont été retenues.

En fonction des résultats des tests génotoxiques et du mécanisme d'action cancérigène des substances, il a été décidé de construire **des VTR à seuil ou des VTR sans seuil.**

- Si l'ensemble des tests génotoxiques montrent que la substance n'est pas génotoxique ou génotoxique uniquement à des doses ou à des concentrations supérieures ou égales à celles induisant des effets cytotoxiques et que le mécanisme d'action met en évidence la présence d'un seuil pour les effets cancérigènes, **il a été décidé d'élaborer une VTR à seuil.**
- Si un effet génotoxique est soupçonné et que les données sur les mécanismes d'action cancérigènes ne permettent pas de définir un seuil, **il a été décidé d'établir une VTR sans seuil.**

## RAPPORT FINAL

La démarche d'élaboration est ensuite classique :

**Pour les VTR à seuil :** Etablissement d'un NOAEL ou d'un LOAEL et application des facteurs d'incertitude recommandés par l'Union européenne (TGD, 2003 et 2006).

**Pour les VTR sans seuil :** Modélisation des données à l'aide d'un modèle linéaire multi-étapes et/ou calcul de la VTR à partir d'une BMD (extrapolation linéaire aux faibles doses).

Ce travail a conduit à l'élaboration de VTR ou à la proposition de VTR parmi celles existantes. Le tableau ci-dessous présente pour chaque substance analysée les VTR choisies ou élaborées par l'INERIS et les VTR établies par le client ainsi que les modes de construction pour chaque VTR.

| Substances                  | VTR INERIS   |  | VTR établies par le client                            |  |
|-----------------------------|--|--|---|--|
|                             | Valeur   | Mode d'élaboration   | Valeur  | Mode d'élaboration   |
| 1,2-dichloroéthane          | 1,34 µg/m <sup>3</sup><br>pour un risque<br>de cancer de<br>10 <sup>-6</sup>   | VTR sans seuil établie à<br>partir de l'étude de<br>Nagano <i>et al.</i> , 1998<br><br>Modélisation (modèle<br>multi-étapes et BMD<br>tirée à l'origine) | 125 µg/m <sup>3</sup>                                 | VTR à seuil établie à partir<br>d'un NOAEL pour des<br>effets cancérogènes<br>généotoxiques par<br>inhalation<br><br>*FI = 1 000                         |
| Tétrachlorure de<br>carbone | 27 µg/m <sup>3</sup>   | VTR à seuil établie à<br>partir de l'étude de<br>Nagano <i>et al.</i> , 1998<br>LOAEL = 5,69 mg/m <sup>3</sup><br><br>*FI = 210                          | 32 µg/m <sup>3</sup>                                  | VTR à seuil établie à partir<br>de l'étude de Nagano <i>et<br/>al.</i> , 1998 LOAEL = 5,69<br>mg/m <sup>3</sup> *FI = 175                                |
| Chloroforme                 | 63 µg/m <sup>3</sup>   | VTR à seuil établie à<br>partir de l'étude de<br>Nagano <i>et al.</i> , 1998<br><br>NOAEL = 24,8 mg/m <sup>3</sup><br><br>*FI = 70 après<br>ajustement   | 200 µg/m <sup>3</sup>                                 | VTR à seuil établie à partir<br>d'études épidémiologiques<br>(données cancérogènes)<br><br>NOAEL = 13 mg/m <sup>3</sup><br><br>*FI = 15 après ajustement |
| Chlorure de<br>méthylène    | TC <sub>0,05</sub> = 2,2.10 <sup>3</sup><br>mg/m <sup>3</sup><br><br>(ERU <sub>i</sub> = 2,3.10 <sup>-8</sup><br>µg/m <sup>3</sup> ) | La VTR proposée par<br>Santé Canada a été<br>choisie   | 3000 µg/m <sup>3</sup><br>(exposition<br>vie entière) | Formation de<br>carboxyhémoglobine<br><br>Une augmentation de 0,1%<br>est sans conséquence<br>toxicologique pour l'homme                                 |

# RAPPORT FINAL

## TABLE DES MATIERES

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. GLOSSAIRE</b> .....  | <b>8</b>  |
| <b>2 INTRODUCTION</b> .....  | <b>9</b>  |
| <b>3 1,2-DICHLOROÉTHANE (N° CAS : 107-06-2)</b> .....  | <b>11</b> |
| 3.1 Cancérogénicité .....  | 11        |
| 3.1.1 <i>Etudes chez l'homme</i> .....   | 11        |
| 3.1.2 <i>Etudes chez l'animal</i> .....  | 12        |
| 3.1.3 <i>Classification cancérogène</i> .....  | 15        |
| 3.2 Génotoxicité et mutagénicité .....   | 15        |
| 3.2.1 <i>Etudes chez l'homme</i> .....   | 15        |
| 3.2.2 <i>Etudes chez l'animal</i> .....  | 16        |
| 3.2.3 <i>Tests in-vitro</i> .....  | 18        |
| 3.2.4 <i>Conclusion</i> .....  | 18        |
| 3.3 Métabolisme et mécanismes d'action cancérogène.....  | 19        |
| 3.4 Valeurs toxicologiques de référence pour les effets cancérogènes et pour<br>une exposition par inhalation..... | 20        |
| 3.4.1 <i>VTR existantes</i> .....  | 20        |
| 3.4.2 <i>VTR proposée par le client</i> .....  | 22        |
| 3.4.3 <i>Proposition de VTR et discussion</i> .....  | 24        |
| <b>4 TÉTRACHLORURE DE CARBONE (N° CAS : 56-23-5)</b> .....   | <b>30</b> |
| 4.1 Cancérogénicité .....  | 30        |
| 4.1.1 <i>Etudes chez l'homme</i> .....   | 30        |
| 4.1.2 <i>Etudes chez l'animal</i> .....  | 32        |
| 4.1.3 <i>Classification cancérogène</i> .....  | 34        |
| 4.2 Génotoxicité et mutagénicité .....   | 34        |
| 4.2.1 <i>Etudes chez l'homme</i> .....   | 34        |
| 4.2.2 <i>Etudes chez l'animal</i> .....  | 34        |
| 4.2.3 <i>Tests in-vitro</i> .....  | 35        |
| 4.2.4 <i>Conclusion</i> .....  | 37        |
| 4.3 Métabolisme et mécanisme d'action cancérogène.....   | 37        |

## RAPPORT FINAL

|  |           |
|--|-----------|
| 4.4 Valeurs toxicologiques de référence pour les effets cancérigènes et pour une exposition par inhalation.....  | 38        |
| 4.4.1 VTR existantes .....   | 38        |
| 4.4.2 VTR proposée par le client .....   | 41        |
| 4.4.3 Proposition de VTR et discussion .....   | 42        |
| <b>5 CHLOROFORME (N° CAS : 67-66-3).....</b>   | <b>46</b> |
| 5.1 Cancérogénicité .....  | 46        |
| 5.1.1 Etudes chez l'homme .....  | 46        |
| 5.1.2 Etudes chez l'animal.....  | 47        |
| 5.1.3 Classification cancérigène.....  | 50        |
| 5.2 Génotoxicité et mutagénicité.....  | 50        |
| 5.2.1 Etudes chez l'homme .....  | 50        |
| 5.2.2 Etudes chez l'animal.....  | 50        |
| 5.2.3 Tests in-vitro .....   | 52        |
| 5.2.4 Conclusion.....  | 53        |
| 5.3 Métabolisme et Mécanisme d'action cancérigène.....   | 54        |
| 5.4 Valeurs toxicologiques de référence pour les effets cancérigènes et pour une exposition par inhalation.....  | 55        |
| 5.4.1 VTR existantes .....   | 55        |
| 5.4.2 VTR proposée par le client .....   | 58        |
| 5.4.2 Proposition de VTR et discussion .....   | 60        |
| <b>6 CHLORURE DE MÉTHYLÈNE (N° CAS : 75-09-2) .....</b>  | <b>62</b> |
| 6.1 Cancérogénicité .....  | 62        |
| 6.1.1 Etudes chez l'homme .....  | 62        |
| 6.1.2 Etudes chez l'animal.....  | 63        |
| 6.1.3 Classification cancérigène.....  | 66        |
| 6.2 Génotoxicité et mutagénicité.....  | 66        |
| 6.2.1 Etudes chez l'homme .....  | 66        |
| 6.2.2 Etudes chez l'animal.....  | 66        |
| 6.2.3 Tests in-vitro .....   | 68        |
| 6.2.4 Conclusion.....  | 69        |
| 6.3 Métabolisme et Mécanisme d'action cancérigène.....   | 69        |
| 6.4 Valeurs toxicologiques de référence pour les effets cancérigènes et pour une exposition par inhalation ..... | 71        |
| 6.4.1 VTR existantes .....   | 71        |

## RAPPORT FINAL

|   |           |
|---|-----------|
| 6.4.2 VTR proposée par le client .....          | 75        |
| 6.4.2 Proposition d'une VTR et discussion ..... | 77        |
| <b>7 RÉFÉRENCE BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>        | <b>78</b> |
| <b>8 ANNEXES : .....</b>                        | <b>93</b> |

## **1. GLOSSAIRE**

|                     |   |
|---------------------|---|
| ATSDR               | : 'Agency for Toxic Substances and Disease Registry'  |
| BMD                 | : Benchmark dose  |
| CT <sub>0,05</sub>  | : Concentration Tumorigène 0,05 : c'est la concentration généralement dans l'air qui cause une augmentation de 5 % de l'incidence des tumeurs ou de la mortalité due à des tumeurs. Etablie par Santé Canada. |
| CR <sub>inhal</sub> | : 'Excess carcinogenic risk' (via air). S'exprime comme la concentration de substance induisant un excès de risque cancérigène de 10 <sup>-4</sup> . Etabli par le RIVM.                                      |
| DT <sub>0,05</sub>  | : Dose Tumorigène 0,05 : c'est la dose totale qui causerait une augmentation de 5 % de l'incidence des tumeurs ou de la mortalité attribuable à des tumeurs. Etablie par Santé Canada.                        |
| ERU                 | : Excès de Risque Unitaire. Etabli par l'US EPA et l'OMS.   |
| ERU <sub>i</sub>    | : Excès de Risque Unitaire par inhalation   |
| ERU <sub>o</sub>    | : Excès de Risque Unitaire par voie orale   |
| IARC-CIRC           | : 'International Agency for Research on Cancer' - Centre International de la Recherche pour le Cancer   |
| IRIS                | : Integrated Risk Information System  |
| OEHHA               | : 'Office of Environmental Health Hazard Assessment' 'California Environmental Protection Agency  |
| OMS                 | : Organisation Mondiale de la Santé   |
| RIVM                | : 'Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu' (National Institute of Public Health and Environment in Netherlands)  |
| US EPA              | : 'United States Environmental Protection Agency'   |
| VTR                 | : Valeur Toxicologique de Référence   |

## **2 INTRODUCTION**

Un groupe pilote a été mis en place afin de contrôler l'ERS (évaluation des risques simplifiée) réalisée sur un site. Dans cette ERS, des valeurs toxicologiques de référence (VTR) ont été élaborées par le client pour certaines substances lorsque les VTR validées et publiées par les six organismes suivants reconnus (OMS, US EPA (IRIS), ATSDR, RIVM, Santé Canada et OEHHA) ne leur paraissaient pas de qualité scientifique satisfaisante.

Il a été demandé à l'INERIS de réaliser pour les substances suivantes, 1,2-dichloroéthane, chloroforme, tétrachlorure de carbone et chlorure de méthylène, une expertise toxicologique sur le classement de ces produits comme substances cancérigènes agissant avec un mécanisme d'action non génotoxique ainsi que sur le choix des VTR et la proposition de nouvelles VTR par le client.

Les VTR actuellement disponibles dans les six bases (OMS, ATSDR, US EPA/IRIS, RIVM, Santé Canada et OEHHA) pour les effets cancérigènes du 1,2-dichloroéthane, du chloroforme, du tétrachlorure de carbone et du chlorure de méthylène ont été établies en considérant que ces effets étaient sans seuil. Or, le client considérant l'hypothèse selon laquelle des VTR à seuil doivent être élaborées pour les substances cancérigènes non génotoxiques et des VTR sans seuil pour les substances cancérigènes génotoxiques a établi des VTR à seuil pour les effets cancérigènes induits après une exposition par inhalation aux quatre substances citées ci-dessus puisque ces dernières n'ont pas été classées par l'Union européenne et qu'elles ne semblent pas être génotoxiques.

Le travail de l'INERIS a consisté dans un premier temps à réaliser une étude bibliographique sur les effets cancérigènes, les effets génotoxiques et le mécanisme d'action cancérigène des quatre substances : 1,2-dichloroéthane, chloroforme, tétrachlorure de carbone et chlorure de méthylène afin de déterminer si le mécanisme d'action de ces substances est génotoxique ou non. Les données fournies par le client concernant ce sujet ont été analysées et complétées si besoin par d'autres données de la littérature, comme celles nouvellement publiées. Lorsque cela a été possible, pour chaque substance, le mécanisme d'action cancérigène a été décrit et référencé.

Dans un second temps, nous avons analysé la pertinence d'élaborer des VTR à seuil pour les effets cancérigènes des quatre substances. Si le mode d'action génotoxique est probable, un seuil d'effet est improbable. Dans ce cas les VTR à seuil proposées par le client ne seraient pas adéquates. Si le mode d'action s'est avéré non génotoxique, les VTR à seuil proposées par le client pour les effets cancérigènes ont été examinées ainsi que les articles et les éléments ayant permis l'élaboration de ces valeurs (documents

fournis par le client). La qualité scientifique de ces VTR a été examinée en analysant les ou l'étude(s) clé(s) retenue(s) et les arguments présentés par le client. L'INERIS a, si cela était pertinent et nécessaire, proposé des modifications des VTR élaborées par le client.

Actuellement, trois écoles se distinguent dans l'élaboration des VTR cancérigènes, une préconisant l'élaboration de VTR sans seuil quel que soit le mode d'action cancérigène (génétoxique ou non), une autre recommande des VTR à seuil pour les substances cancérigènes non génétoxiques et des VTR sans seuil pour les substances cancérigènes génétoxiques. Enfin, la troisième conseille d'établir une VTR à seuil si cela est justifié quel que soit le mécanisme d'action, génétoxique ou non.

Dans notre démarche, si la substance semble être non génétoxique à des doses cytotoxiques et qu'un seuil pour les effets cancérigènes semble exister, une VTR à seuil a été proposée. Dans le cas où un effet génétoxique est soupçonné et qu'un seuil d'effet cancérigène n'a pu être défini, une VTR sans seuil a été recommandée.

Les VTR à seuil élaborées par le client ont été systématiquement comparées à celles sans seuil établies par les six agences OMS, US EPA (IRIS), ATSDR, RIVM, Santé Canada et OEHHA. La validité et la pertinence de ces VTR sans seuil ont été également examinées.

Les VTR établies par le client sont proposées uniquement pour l'inhalation. Il a été décidé de réaliser la recherche bibliographique concernant les effets cancérigènes et le mécanisme d'action pour la voie orale et l'inhalation afin de pouvoir effectuer des comparaisons en fonction des voies d'exposition. Les effets génétoxiques ont été recherchés pour l'ensemble des voies. Par contre, seules les VTR proposées par les six organismes (OMS, US EPA, ATSDR, RIVM, Santé Canada, OEHHA) pour la voie inhalation ont été regardées et analysées. Enfin seules des VTR par inhalation ont été proposées en alternative quand cela s'est avéré nécessaire.

### **3 1,2-DICHLOROETHANE (N° CAS : 107-06-2)**

#### **3.1 CANCEROGENICITE**

##### **3.1.1 Etudes chez l'homme**

###### ***Par voie orale***

Peu d'informations directes sont disponibles concernant l'effet cancérigène du 1,2-dichloroéthane chez l'homme. L'équipe d'Isacson *et al.* en 1985, a examiné dans l'Etat de l'Iowa la relation existante entre la présence de composés organiques volatils et des métaux présents dans l'eau de boisson et l'augmentation de l'incidence des tumeurs. L'âge et le sexe de la population ont été pris en compte. Une association statistiquement significative a été constatée entre la présence de 1,2-dichloroéthane dans l'eau de boisson et l'augmentation de l'incidence de cancer du colon et du rectum chez les hommes âgés de 55 ans et plus. Les données issues du registre de cancer de l'Etat de l'Iowa ont été utilisées comme données contrôles. Les résultats de cette étude sont à considérer avec prudence car la population a été exposée à d'autres substances chimiques que le 1,2-dichloroéthane.

Aucune autre étude n'est disponible.

###### ***Par inhalation***

Plusieurs études épidémiologiques ont été conduites chez les travailleurs de l'industrie chimique afin d'examiner la forte incidence des tumeurs du cerveau chez les salariés (Austin et Schnatter 1983a,b ; Reeve *et al.*, 1983, Teta *et al.*, 1989, Waxweilet *et al.*, 1983). Une augmentation de l'incidence des cancers de l'estomac et des leucémies a été observée chez des salariés travaillant dans des usines utilisant du 1,2-dichloroéthane dans la production d'oxyde d'éthylène (Hogstedt *et al.*, 1979). Une augmentation de la mortalité liée aux cancers du pancréas, aux cancers lymphatiques et aux cancers hématopoïétiques a été également mise en évidence dans une cohorte de salariés travaillant dans une usine où le 1,2-dichloroéthane est un sous-produit de la production (Benson et Teta, 1993).

L'étude de Goldberg *et al.*, 1995, menée chez des individus vivants près des décharges municipales à Montréal a montré une augmentation du risque de cancer de l'estomac,

du foie, du canal biliaire, de la trachée, des bronches, des poumons et du col de l'utérus.

Aucune de ces études ne traite exclusivement de l'exposition au 1,2-dichloroéthane. De ce fait aucune conclusion concernant le risque de cancer associé au 1,2-dichloroéthane ne peut être établie.

### **3.1.2 Etudes chez l'animal**

#### ***Par voie orale***

Plusieurs études expérimentales ont montré que le 1,2-dichloroéthane était cancérigène chez le rat et la souris.

Après une exposition par gavage au 1,2-dichloroéthane pendant 78 semaines chez les rats Osborne-Mendel (47 et 95 mg/kg/j quel que soit le sexe) et chez les souris (97 et 195 mg/kg/j pour les mâles et 149 et 299 mg/kg/j pour les femelles), une augmentation significative des tumeurs multiples, malignes ou bénignes a été observée chez les deux espèces dans des tissus distants du site d'administration (NCI, 1978).

Chez les rats, une augmentation de l'incidence des fibromes des tissus sous-cutané a été mise en évidence chez les rats mâles exposés à 47 et à 95 mg/kg/j de 1,2-dichloroéthane ainsi qu'une augmentation de l'incidence des hémangiosarcomes de la rate, du foie, du pancréas et des glandes adrénales. Dans le groupe exposé à la plus forte dose (95 mg/kg/j), les rats mâles présentent une augmentation des carcinomes des cellules squameuses du pré-estomac et les rats femelles une augmentation de la fréquence des adénocarcinomes et des fibroadénomes des glandes mammaires.

Chez les souris, l'incidence des carcinomes hépatocellulaires et des adénomes pulmonaires est augmentée chez les mâles exposés à 195 mg/kg/j. Chez la souris femelle exposée à 149 et à 299 mg/kg/j, une augmentation de l'incidence des adénomes pulmonaires, des adénocarcinomes des glandes mammaires et des sarcomes de l'endomètre a été mise en évidence. Toutefois, cette étude présente quelques limites incluant le manque de l'ajustement des doses pendant les essais, le faible nombre de contrôles testés, une faible survie des animaux et aucune connaissance sur la pureté du 1,2-dichloroéthane (ATSDR, 2001). Malgré les limites de cette étude, l'ATSDR en 2001 précise qu'il est prudent de considérer la possibilité que le 1,2-dichloroéthane puisse induire des tumeurs par voie orale mais également par d'autres voies d'administration, le 1,2-dichloroéthane passant dans la circulation sanguine.

Quelques études d'initiation-promotion ont été réalisées avec le 1,2-dichloroéthane. Dans l'étude de Klaunig *et al.*, 1986, des souris mâles B6C3F1 ont été exposées à de la diéthylnitrosamine pendant 4 semaines, par l'eau de boisson, ou à de l'eau dé-ionisée seule (groupe contrôle pour l'initiation). Cette exposition a été suivie d'une exposition à du 1,2-dichloroéthane (835 mg/L et 2 500 mg/L) pendant 52 semaines ou à une exposition à de l'eau dé-ionisée seule (groupe contrôle). Le 1,2-dichloroéthane n'induit pas d'augmentation de l'incidence des tumeurs du foie et des poumons et ceci aussi bien en présence ou en absence d'une première exposition au diéthylnitrosamine. Cette étude comporte beaucoup de limites, faible temps d'exposition, forte incidence de tumeurs du foie chez les souris contrôles non exposées (20 %) et chez les souris exposées au diéthylnitrosamine (100 %), manque d'indication de la pureté de la substance utilisée, ce qui ne permet pas de conclure en ce qui concerne l'effet cancérigène du 1,2-dichloroéthane par voie orale. Une autre étude également d'initiation-promotion mais de courte durée d'exposition, réalisée chez le rat, basée sur l'utilisateur d'un marqueur de changement prénéoplastique, n'a pas permis, non plus, de conclure quant au potentiel cancérigène du 1,2-dichloroéthane (Milman *et al.*, 1988).

### ***Par inhalation***

Le potentiel cancérigène du 1,2-dichloroéthane a été évalué dans plusieurs études expérimentales à long terme menées chez le rat et la souris.

L'ATSDR, 2001 ; l'OMS/IPCS (INCHEM), 1995 et l'IARC, 1999 ont cité dans leurs monographies trois publications qui mentionnent les effets du 1,2-dichloroéthane après une exposition à long terme des animaux ainsi qu'un résumé (Matsushima *et al.*, 1998 ) d'une étude japonaise dans laquelle des rats et des souris ont été également exposés au 1,2-dichloroéthane (monographie de l'ATSDR).

Maltoni *et al.*, 1980, ont exposé des rats Sprague-Dawley (90 par concentration pour les deux sexes) et des souris Swiss (90 par concentration et pour les 2 sexes) à 5, 10, 50 et 250 ppm (20, 40, 202 et 1012 mg/m<sup>3</sup>) de 1,2-dichloroéthane (pureté 99,8 %), 7 heures par jour, 5 jours par semaine pendant 78 semaines. Au bout de quelques jours la concentration de 250 ppm a été abaissée à 150 ppm (617 mg/m<sup>3</sup>) en raison de signes prononcés de toxicité. Les animaux ont été observés jusqu'à leur mort spontanée. Aucune augmentation de l'incidence des tumeurs a été constatée chez les rats et les souris exposés. Toutefois, cette étude présente certaines limites, le temps d'exposition

est inférieur à la vie entière des animaux, mais néanmoins conforme aux lignes directrices OCDE (en générale, 18 mois chez la souris), la dose tolérable est dépassée pour la plus forte dose testée et la survie des souris est faible. L'explication possible d'un résultat négatif dans cette étude peut provenir de la différence de métabolisation du 1,2-dichloroéthane absorbé par voie orale et par inhalation et dans la quantité de toxiques qui atteint les tissus cibles (ATSDR, 2001). Ceci peut se vérifier par modélisation.

Une étude de toxicité chronique dans laquelle des rats (50 animaux par sexe et par lot) ont été exposés à 50 ppm (200 mg/m<sup>3</sup>) de 1,2-dichloroéthane, 7 heures par jour, 5 jours par semaine pendant 2 ans n'a pas mis en évidence d'effet cancérigène du 1,2-dichloroéthane (Cheever *et al.*, 1990).

Enfin, des rats mâles et femelles Sprague-Dawley (8 à 10 par sexe et par lot) ont été exposés à 0, 5, 10, 50 et 250 ppm de 1,2-dichloroéthane (20, 40, 202 et 1012 mg/m<sup>3</sup>) 7 heures par jour, 5 jours par semaine pendant 3, 6 et 18 mois. Des rats de 3 mois ont été exposés ainsi que des rats dont l'âge est compris entre 12 et 14 mois. Comme dans l'étude de Maltoni *et al.*, 1980, au bout de quelques jours, la concentration de 250 ppm a été abaissée à 150 ppm (617 mg/m<sup>3</sup>) en raison de signes prononcés de toxicité. Aucun effet cancérigène n'a été détecté chez les rats quel que soit l'âge de ces derniers et le temps d'exposition. Une atteinte non cancérigène de la fonction rénale et de hépatique a été observée à 50 et à 150 ppm (Spreafico *et al.*, 1980).

L'étude de Nagano *et al.*, 1998 est identique au résumé de Matsushima *et al.*, 1998 cité par l'ATSDR en 2001. Des rats F344 et des souris B6F1 (50 animaux par lot et par sexe) ont été exposés 6 heures par jour, 5 jours par semaine pendant 104 semaines à 0, 10, 40 et 160 ppm de 1,2-dichloroéthane pour les rats et à 0, 10, 30 et 90 ppm pour les souris. Chez les rats mâles des adénofibromes de la glande mammaire, des fibromes intradermiques et des mésothéliomes du péritoine ont été observés. Chez les rats femelles, il a été constaté la présence d'adénomes, de fibroadénomes et d'adénocarcinomes de la glande mammaire ainsi que des fibromes intradermiques. Chez la souris, des hémangiosarcomes du foie ont été mis en évidence de façon significative chez les mâles. Des adénomes et des carcinomes bronchioalvéolaires, des adénomes de la glande mammaire, des adénomes hépatocellulaires et des polypes du tissu endométrial ont été observés chez les souris femelles. Des analyses statistiques ont été faites sur les données obtenues afin de connaître la significativité des résultats. Par contre, aucune analyse de la relation dose-réponse n'a été faite.

### **3.1.3 Classification cancérogène**

L'Union européenne a classé le 1,2-dichloroéthane en catégorie 2 (doit être assimilé à une substance cancérogène pour l'homme). On dispose suffisamment d'éléments pour justifier une forte présomption que l'exposition de l'homme au 1,2-dichloroéthane peut provoquer un cancer (JOCE,1993).

L'IARC en 1999 a classé le 1,2-dichloroéthane dans le groupe 2B (cancérogène possible pour l'homme). Selon l'IARC, il y a des preuves inadéquates de l'effet cancérogène du 1,2-dichloroéthane chez l'homme et des preuves suffisantes à travers les essais chez l'animal. L'IARC cite 6 études chez l'homme qui ont examiné le risque cancérogène parmi les travailleurs en relation avec l'exposition au 1,2-dichloroéthane ainsi que l'étude du NCI, 1978, menée par gavage chez les rats et les souris et qui a montré la présence de tumeurs chez les 2 espèces. Enfin, l'IARC précise qu'aucune augmentation de l'incidence des tumeurs chez le rat (2 expériences) et chez la souris (1 expérience) n'a été constatée après exposition par inhalation au 1,2-dichloroéthane. Cependant 2 autres études, dont les références ne sont pas citées par l'IARC, ont mis en évidence l'augmentation de l'incidence des tumeurs à différents sites (foie, poumons et glandes mammaires) après une exposition par inhalation au 1,2-dichloroéthane. Ces études sont certainement les études japonaises citées ci-dessus (Nagano *et al.*, 1998 et le résumé de Matsushima *et al.*, 1998).

L'US EPA en 1991, a classé le 1,2-dichloroéthane dans la classe B2 (cancérogène probable) pour toutes les voies d'exposition. Cette classification est basée sur l'induction de plusieurs types de tumeurs chez le rat et la souris après exposition par gavage au 1,2-dichloroéthane (NCI, 1978) et sur l'augmentation de l'incidence de papillomes après application topique de 1,2-dichloroéthane chez les souris (Van Duuren *et al.*, 1979).

## **3.2 GENOTOXICITE ET MUTAGENICITE**

### **3.2.1 Etudes chez l'homme**

#### ***Par voie orale***

Aucune étude ne traite des effets génotoxiques du 1,2-dichloroéthane chez l'homme après une exposition par voie orale.

### ***Par inhalation***

Comme pour la voie orale, aucune étude ne porte sur l'effet génotoxique du 1,2-dichloroéthane chez l'homme après une exposition par inhalation.

## **3.2.2 Etudes chez l'animal**

### ***Par voie orale***

L'exposition au 1,2-dichloroéthane par voie orale produit chez l'animal un effet génotoxique.

Une dose de 100 mg/kg de 1,2-dichloroéthane (dose n'induisant pas de nécrose) induit chez les souris une détérioration de l'ADN qui a été mise en évidence par des cassures simple brin de l'ADN des hépatocytes (Storer *et al.*, 1984). Une détérioration de l'ADN des hépatocytes a également été observée chez les rats femelles ayant été exposés 2 fois consécutives par gavage à du 1,2-dichloroéthane (véhicule = huile de maïs). Les rats ont été exposés soit à 134 mg/kg (pour les deux expositions consécutives) soit à 13,4 mg/kg (également pour les deux expositions consécutives). Les atteintes de l'ADN ont été constatées à la dose de 134 mg/kg mais pas à 13,4 mg/kg (Kitchin et Brown, 1994). Une dose unique de 150 mg/kg induit un niveau élevé de liaisons covalentes entre le 1,2-dichloroéthane et l'ADN dans le foie des rats exposés (Cheever *et al.*, 1990).

### ***Par inhalation***

L'exposition des souris à 1 000 ppm de 1,2-dichloroéthane (concentration induisant une nécrose) pendant quatre heures induit une détérioration irréversible de l'ADN dans les hépatocytes, observation de cassures simple brin de l'ADN. Cet effet est observé à la concentration qui induit 80 à 100 % de mort chez les souris après 24 heures d'exposition (Storer *et al.*, 1984).

L'étude de Baertsch *et al.*, 1991, a porté sur l'investigation de la relation entre l'exposition par inhalation au 1,2-dichloroéthane et la liaison covalente à l'ADN dans le foie et les poumons de rats femelles Fisher 344 exposés soit à 80 ppm de 1,2-dichloroéthane pendant 4 heures, soit à 4 400 ppm pendant quelques minutes (pic d'exposition). Dans les deux cas, l'index de liaison covalente à l'ADN est élevé comparé au contrôle. L'effet constaté, aussi bien au niveau du poumon qu'au niveau du foie, est plus important, environ 35 fois plus, après l'exposition par pic qu'après l'exposition pendant 4 heures. Ceci suggère qu'à dose absorbée comparable, une exposition aiguë à

de fortes concentrations de 1,2-dichloroéthane induit un effet génotoxique plus important qu'une exposition prolongée à de faibles concentrations. Le résultat de cette étude est en accord avec l'hypothèse selon laquelle la toxicité du 1,2-dichloroéthane serait associée à la saturation des enzymes oxydantes (ATSDR, 2001). Cette étude supporte également le fait que l'exposition par voie orale induit des effets plus importants que l'exposition par inhalation pour des doses équivalentes et que l'effet cancérigène du 1,2-dichloroéthane est dépendant de la voie d'exposition (ATSDR, 2001).

### **Autres voies**

Aucune étude n'est disponible par voie cutanée.

**Voie intra-péritonéale :** La capacité du 1,2-dichloroéthane à se lier à l'ADN chez les rongeurs a été bien établie, dans le foie comme dans d'autres organes tels que les reins et les poumons pour la voie intra-péritonéale. Chez le rat et la souris, une administration par voie intra-péritonéale à une dose unique aussi faible que 6,35 µmol/kg, soit 0,00635 mg/kg induit une liaison du 1,2-dichloroéthane avec l'ADN (Prodi *et al.*, 1986).

Une atteinte de la structure de l'ADN sous forme de cassure simple brin ou d'un déroulement de l'ADN a été montrée chez la souris après une injection intra-péritonéale unique de 45 à 360 mg/kg de 1,2-dichloroéthane (Sasaki *et al.*, 1998 ; Storer et Conolly, 1983, 1985, Storer *et al.*, 1984 ; Taningher *et al.*, 1991). D'après Storer *et al.*, 1984, la dose de 150 mg/kg n'induit pas de nécrose. Dans une seule étude, celle de Banerjee, 1988, la liaison à l'ADN est associée à une diminution du taux de la synthèse de l'ADN et à une diminution de sa transcription.

Les essais sur les effets clastogéniques du 1,2-dichloroéthane par voie intra-péritonéale montrent des résultats variés. Un effet positif sur les échanges de chromatides sœurs (qui semble provenir des ruptures simples brins) a été constaté dans les cellules de moelle osseuse chez les souris ayant reçu une injection intra-péritonéale de 16 mg/kg de 1,2-dichloroéthane. Mais aucun effet sur la formation de micronoyaux n'a été détecté chez la souris après une injection intra-péritonéale unique de 45 à 400 mg/kg (Jenssen et Ramel, 1980 ; King *et al.*, 1979 ; Sasaki *et al.*, 1994).

### **3.2.3 Tests *in-vitro***

L'ensemble des données *in-vitro* indique que le 1,2-dichloroéthane est capable d'interagir avec l'ADN et d'induire des effets génotoxiques.

Les tests de mutations géniques sur les cellules humaines (Crespi *et al.*, 1985 ; Ferreri *et al.*, 1983), les cellules animales (Tan et Hsie, 1981) et sur les bactéries (Barber *et al.*, 1981 ; Crebelli *et al.*, 1984, 1988 ; Milman *et al.*, 1988 ; Van Bladeren *et al.*, 1981) sont tous positifs, mais l'activation métabolique est nécessaire pour induire ces effets.

Les tests sur la synthèse non programmé d'ADN (activité de réparation de l'ADN) sur les cellules humaines et animales et les tests de ségrégation mitotique induisant des phénomènes d'aneuploïdie chez les champignons sont également positifs.

Les résultats de mutagénicité chez les bactéries suggèrent que le 1,2-dichloroéthane est un faible mutagène direct qui peut être activé en présence de glutathion et de glutathions S-transférases (DeMarini et Brooks, 1992).

Des mutations récessives à la fois dans les cellules somatiques et les cellules germinales ont été observées chez les drosophiles (Nylander *et al.*, 1979 ; King *et al.*, 1979). Par contre, l'étude de Ballering *et al.*, 1993, a montré que le 1,2-dichloroéthane était non mutagène sur les cellules somatiques et sur les spermatozoïdes matures chez la drosophile *mélanogaster* suggérant l'absence d'action génotoxique *via* un mécanisme direct.

### **3.2.4 Conclusion**

Les données *in-vivo* par voie orale et par inhalation montrent que le 1,2-dichloroéthane induit des cassures simple brin de l'ADN et des liaisons covalentes entre l'ADN et le 1,2-dichloroéthane. Par voie intra-péritonéale, le 1,2-dichloroéthane induit un effet positif sur les échanges de chromatides sœurs, mais aucun effet sur la formation de micronoyaux. Les tests *in-vitro* de mutation sur bactéries, sur cellules animales et humaines sont tous positifs, mais l'activation métabolique est nécessaire pour induire ces effets.

En raison de l'ensemble des données disponibles, il nous apparaît justifié de considérer le 1,2-dichloroéthane comme génotoxique et de recommander l'utilisation d'une VTR sans seuil pour les effets cancérigènes induits par cette substance. Même, si aucun classement pour le caractère génotoxique du 1,2-dichloroéthane n'a été donné par l'Union européenne après examen de cette substance (JOCE, 1993).

### 3.3 METABOLISME ET MECANISMES D'ACTION CANCEROGENE

**Métabolisme :** le métabolisme du 1,2-dichloroéthane n'a pas fait l'objet d'étude chez l'homme et ce, quelle que soit la voie d'absorption (ATSDR, 1990). Par contre, plusieurs données expérimentales *in vivo* ou *in vitro* semblent indiquer que le métabolisme hépatique du 1,2-dichloroéthane emprunte deux voies principales. La première voie mettrait en jeu une oxydation microsomale dépendante du cytochrome P450, et conduirait à la formation de 2-chloroacétaldéhyde et de 2-chloroéthanol. Ces composés pourraient par la suite être transformés en acide chloroacétique et éliminés dans les urines ou être détoxifiés par la glutathion S-transférase (GST) pour former un complexe S-carboxyméthyl-glutathion. La seconde voie impliquerait directement une conjugaison avec le glutathion réduit pour former le S-2 chloroéthyl-glutathion, ensuite converti en ion épisulfonium-glutathion capable de former des adduits avec l'ADN, l'ARN et des protéines ou de subir une nouvelle conjugaison avec la GSH pour former de nouveaux métabolites ultérieurement excrétés dans les urines (NTP, 1991).

Plusieurs auteurs semblent privilégier cette seconde voie de transformation du 1,2-dichloroéthane, qui arriverait chez le rat à saturation pour des expositions supérieures à 600 mg/m<sup>3</sup> (150 ppm) par inhalation et à 25 mg/kg/j par gavage (Reitz *et al.*, 1982 ; Spreafico *et al.*, 1980 ; D'Souza *et al.*, 1988). Maltoni a notamment montré que lorsque la concentration sanguine de 1,2-dichloroéthane dépasse 5 à 10 µg/ml (exposition > à 150 ppm) les premières manifestations de toxicité commencent à apparaître (Maltoni *et al.*, 1980).

**Mécanisme d'action :** Il existe de nombreux indices montrant que l'effet toxique et l'effet cancérigène du 1,2-dichloroéthane sont induits par ses métabolites. Il semble que la toxicité induite par le 1,2-dichloroéthane apparaisse lorsque sa voie principale de métabolisme est saturée. Ce qui permet la circulation de taux élevé de 1,2-dichloroéthane dans le corps et ainsi la formation de conjugués avec le glutathion réduit pour former le S-2 chloroéthyl-glutathion (D'Souza *et al.*, 1987 ; Reitz *et al.*, 1982).

Concernant l'effet cancérigène du 1,2-dichloroéthane, des réponses différentes ont été observées en fonction de la voie d'exposition, gavage ou exposition par inhalation. La plupart des études par inhalation donnent des résultats négatifs (Maltoni *et al.*, 1980 ; Spreafico *et al.*, 1980 ; Cheever *et al.*, 1990) contrairement aux études par gavage. Cette différence de réponse peut être attribuée au fait que des souches différentes de

rats ont été testées et aux limites des études par inhalation (expositions intermittentes, faibles taux de survie des animaux aux doses testées). Mais également, comme le propose Reitz *et al.*, 1982, à la différence de métabolisation et de saturation du mécanisme détoxification/excrétion observée après une exposition par voie orale et par inhalation. Aux faibles doses, la saturation métabolique apparaît plus vite après une exposition par voie orale qu'après une exposition par inhalation. Les études par inhalation disponibles ne produiraient donc pas de pic de 1,2-dichloroéthane suffisamment élevé pour saturer le mécanisme de détoxification et ainsi produire des tumeurs.

### 3.4 VALEURS TOXICOLOGIQUES DE REFERENCE POUR LES EFFETS CANCEROGENES ET POUR UNE EXPOSITION PAR INHALATION

#### 3.4.1 VTR existantes

Parmi les six organismes consultés (OMS, US EPA, ATSDR, Santé Canada, RIVM et OEHHA), l'US EPA (IRIS), le RIVM et l'OEHHA ont proposé des VTR pour les effets cancérogènes induits par le 1,2-dichloroéthane, valeurs qui sont présentées dans le tableau ci-dessous :

| Source        | Voie d'exposition | Valeur de référence   | Année de révision |
|---------------|-------------------|---|-------------------|
| US EPA (IRIS) | Inhalation        | $ERU_i = 2,6 \cdot 10^{-5} (\mu\text{g}/\text{m}^3)^{-1}$       | 1991              |
| RIVM          | Inhalation        | $pCR_{\text{inhal}} = 4,8 \cdot 10^{-2} \text{ mg}/\text{m}^3*$ | 2001              |
| OEHHA         | Inhalation        | $ERU_i = 2,1 \cdot 10^{-5} (\mu\text{g}/\text{m}^3)^{-1}$       | 2002              |

\* pour un risque de cancer de  $10^{-4}$

#### Justification scientifique des valeurs toxicologiques de référence

- L'US EPA a proposé en 1991 un  $ERU_i$  de  $2,6 \cdot 10^{-5} (\mu\text{g}/\text{m}^3)^{-1}$  pour une exposition par inhalation au 1,2-dichloroéthane.

Cette valeur correspond à une concentration de  $4 \cdot 10^{-2} \mu\text{g}/\text{m}^3$  pour un excès de risque de cancers de  $10^{-6}$ , elle a été calculée à partir de l' $ERU_o$  de  $9,1 \cdot 10^{-2} (\text{mg}/\text{kg}/\text{j})^{-1}$  proposé par l'US EPA pour la voie orale. Cet  $ERU$  pour la voie orale a été établi sur la base de l'étude du NCI (1978) et à partir des données montrant une augmentation significative de l'incidence des hémangiosarcomes chez les rats mâles à 47 et à 95 mg/kg/j de 1,2-dichloroéthane après administration par gavage dans l'huile de maïs durant 78 semaines.

Un modèle linéaire multi-étapes a été utilisé pour le calcul de cet ERU<sub>o</sub>. Pour la construction de l'ERU<sub>i</sub>, l'US EPA a réalisé une extrapolation voie à voie simple à partir de l'ERU<sub>o</sub> en considérant qu'aux doses de 47 et de 95 mg/kg/j, la totalité du 1,2-dichloroéthane est absorbée et métabolisée par les animaux.

- **L'OEHHA a recommandé un ERU<sub>i</sub> de  $2,1 \cdot 10^{-5} (\mu\text{g}/\text{m}^3)^{-1}$  en 2002 pour une exposition par inhalation au 1,2-dichloroéthane**

Cette valeur a été calculée à partir de l'excès de risque pour la voie orale estimé à  $7,2 \cdot 10^{-2} (\text{mg}/\text{kg}/\text{j})^{-1}$ . Cet ERU<sub>o</sub> a été calculé sur la base des données prises en compte également par l'US EPA et montrant une augmentation de l'incidence des hémangiosarcomes chez les rats mâles après une exposition par gavage (NCI, 1978). Un modèle multi-étapes corrigé du temps (modèle de Weibull) a été utilisé pour ce calcul. La valeur de risque unitaire par inhalation découle de celle établie pour la voie orale en posant l'hypothèse que le volume respiratoire est de 20 m<sup>3</sup>/j chez un homme de 70 kg et que l'absorption du 1,2-dichloroéthane est de 100 % par inhalation.

- **Le RIVM a établi un CR<sub>inhal</sub> provisoire de  $4,8 \cdot 10^{-2} \text{ mg}/\text{m}^3$  pour une exposition par inhalation au 1,2-dichloroéthane (Baars *et al.*, 2001).**

En l'absence de données expérimentales appropriées, le CR<sub>inhal</sub> a été établi en réalisant une extrapolation voie à voie simple à partir du CR calculé pour la voie orale (données et méthodologie non précisées). Cette valeur correspond à un excès de risque de cancer de  $1 \cdot 10^{-4}$ . Selon le RIVM, la fiabilité de cette valeur est basse. De plus, elle est considérée comme provisoire car d'après le RIVM aucune étude de cancérogénèse ne permet d'estimer le risque par inhalation directement.

**Santé Canada** a élaboré une TD<sub>0,05</sub> pour une exposition par voie orale au 1,2-dichloroéthane mais ne propose pas de TC<sub>0,05</sub> car selon les experts de Santé Canada les données disponibles sont inadéquates pour élaborer une TC<sub>0,05</sub> par inhalation. **Selon l'OMS**, les études actuellement disponibles ont mis en évidence des effets cancérogènes par ingestion mais pas par inhalation. De plus, l'extrapolation voie à voie présente des difficultés. L'OMS établit donc pour l'inhalation une valeur guide de 700 mg/m<sup>3</sup> pour les effets systémiques à long terme observés chez l'animal.

## **Commentaires sur ces VTR**

Toutes les VTR proposées actuellement pour les effets cancérigènes induits par le 1,2-dichloroéthane après une exposition par inhalation sont des VTR sans seuil. Elles ont été élaborées à partir des ERU établies pour la voie orale après réalisation d'une extrapolation voie à voie simple. Or, après analyse du métabolisme et du mécanisme d'action du 1,2-dichloroéthane, il n'apparaît pas justifié de réaliser une extrapolation voie à voie simple à partir des données de cancérogénèse par voie orale pour calculer une VTR par inhalation. En effet, différentes études supportent l'hypothèse selon laquelle la toxicité du 1,2-dichloroéthane serait associée à la saturation du métabolisme et du mécanisme de détoxification. Aux faibles doses, cette saturation apparaît plus vite après une exposition par voie orale qu'après une exposition par inhalation. L'exposition par voie orale induit des effets plus importants que l'exposition par inhalation pour des doses équivalentes (ATSDR, 2001). Ainsi, une extrapolation voie à voie à partir des données de cancérogénèses par voie orale pour calculer la VTR pour les effets cancérigènes par inhalation pourrait surestimer le risque.

### **3.4.2 VTR proposée par le client**

La proposition et les arguments du client ont été repris et sont les suivants :

« *Considérant :*

- *Que la voie d'exposition de la population est l'inhalation,*
- *Que pour les raisons explicitées ci-dessus, il n'est pas possible d'extrapoler de la voie orale à l'inhalation,*
- *Que des études d'exposition chronique par inhalation chez le rat et la souris n'ont pas mis en évidence d'effet cancérogène,*
- *Qu'il n'est pas néanmoins possible d'exclure totalement un risque cancérogène par inhalation compte-tenu de certains résultats indiquant un potentiel génotoxique faible pour le DCE chez l'animal, y compris par inhalation,*
- *Que l'Agence de Sécurité Sanitaire des Aliments (EFSA, 2005) propose une approche prenant en compte la « margin of exposure » (MOE) pour l'évaluation du risque des substances cancérogènes génotoxiques, et qu'elle considère qu'une MOE de 1000 (basée sur une dose sans effet) est suffisante pour s'assurer que le risque pour la santé n'est pas préoccupant,*

- *Qu'il est possible de définir une NOAEL d'au moins 150 ppm (approximativement 600 mg/m<sup>3</sup>) pour les effets cancérogènes après une exposition prolongée par inhalation,*

*Le client propose d'utiliser la NOAEL de 150 ppm (600 mg/m<sup>3</sup>) pour les effets cancérogènes après une exposition chronique par inhalation, en l'ajustant pour une exposition de 24 heures/24, 7 jours/7 au lieu de 7 heures/24, 5 jours/7, et en appliquant un facteur d'incertitude de 1000, pour définir une VTR de 125 µg/m<sup>3</sup>.*

*En conclusion, le client recommande donc une valeur toxicologique de référence de 125 µg/m<sup>3</sup> pour la protection des populations environnantes envers les effets cancérogènes et non-cancérogènes du 1,2-dichloroéthane ».*

### **Commentaires sur cette VTR**

L'étude de Nagano *et al.*, 1998 (Voir annexe I) est la seule actuellement disponible qui montre un effet du 1,2-dichloroéthane par inhalation sur l'incidence de différentes tumeurs chez les rats et les souris (étude non prise en compte par le client). Il semble prudent de prendre en compte cette étude plutôt que de retenir les études qui ne montrent aucun effet cancérogène par inhalation. Ceci est conforté par le fait qu'il n'est pas possible d'exclure totalement un risque cancérogène par inhalation compte tenu de certains résultats indiquant un potentiel génotoxique faible du 1,2-dichloroéthane chez l'animal, y compris par inhalation et que le 1,2-dichloroéthane est cancérogène par voie orale.

Il apparaît, en effet, difficile en raison des différences de métabolisme et du mécanisme d'action du 1,2-dichloroéthane entre la voie orale et l'inhalation de réaliser une extrapolation voie à voie simple, comme ce qui a été réalisé par l'US EPA, le RIVM et l'OEHA. Par contre, une extrapolation voie à voie plus complexe prenant en compte les différences de toxicocinétiques dont le métabolisme (modèle PBPK, par exemple) et les différences de mécanisme d'action est tout à fait réalisable. Ceci aurait pu être réalisé.

Le client retient un NOAEL de 150 ppm défini dans les études de Maltoni *et al.*, 1980 et de Spreafico *et al.*, 1980 et applique un facteur de 1 000, approche proposée par l'Agence de sécurité Sanitaire des Aliments (EFSA, 2005) pour l'évaluation du risque des substances cancérogènes génotoxiques à partir d'une dose sans effet. Cette approche n'a pas été réellement justifiée par le client et était basée sur la différence d'effet entre les études par voie orale et par inhalation. De plus, même si cette approche est

conseillée pour évaluer le risque des substances cancérigènes génotoxiques, elle conduit à calculer au final une VTR à seuil. En raison des résultats des tests, il est plus justifié de construire une VTR sans seuil pour les effets cancérigènes induits par le 1,2-dichloroéthane.

### **3.4.3 Proposition de VTR et discussion**

Ce chapitre consiste à élaborer de nouvelles VTR si cela est possible et nécessaire ou de faire des propositions de choix de VTR parmi celles existantes (établies par les six organismes et par le client) en fonction de la qualité scientifique de leur élaboration.

L'étude de Nagano *et al.*, 1998 (description de cette étude en annexe I), devrait être retenue pour l'élaboration d'une VTR pour les effets cancérigènes induits par le 1,2-dichloroéthane par inhalation.

Les différents tests génotoxiques *in-vivo* et *in-vitro* ont montré que l'effet génotoxique du 1,2-dichloroéthane ne pouvait pas être exclu, y compris par inhalation. Pour cette raison, nous recommandons d'élaborer une VTR sans seuil pour les effets cancérigènes induits par inhalation de 1,2-dichloroéthane.

Avant toutes élaborations de VTR, les études permettant cette construction ont été décortiquées et la qualité scientifique de ces études a été regardée. Ces études ont été également cotées par la cotation de Klimisch *et al.*, 1997. Seules les études cotées 1 et 2 par Klimisch sont retenues pour l'établissement de VTR. L'étude de Nagano *et al.*, 1998 a été cotée : 2 e (voir annexe I).

### **Méthode de construction de la VTR**

Les données de Nagano *et al.*, 1998 concernant les effets cancérigènes du 1,2-dichloroéthane ont été analysées afin d'établir une valeur toxicologique de référence (Voir annexe I). Dans cette étude, la souris semble être plus sensible au 1,2-dichloroéthane que le rat et particulièrement la souris mâle. En effet, l'augmentation de l'incidence des hémangiosarcomes du foie observée chez la souris mâle est statistiquement significative et est détectée dès la première dose testée (10 ppm). Alors que l'augmentation de l'incidence des autres tumeurs constatées chez le rat et chez la souris femelle n'est pas statistiquement significative et apparaît pour des concentrations plus élevées (40 et surtout 160 ppm chez les rats et 90 ppm chez les souris femelles). Les données concernant l'augmentation de l'incidence des hémangiosarcomes du foie chez la souris mâle ont donc été modélisées et prises en compte pour la construction d'une VTR sans seuil pour le 1,2-dichloroéthane. Les

données sur les hémangiosarcomes du foie chez le rat après une exposition par voie orale au 1,2-dichloroéthane ont été retenues pour l'élaboration de la VTR par voie orale par l'US EPA, l'ATSDR et le RIVM.

### Modélisation statistique des données

Deux types de modélisations (modèle multi-étapes et élaboration d'une benchmark dose) ont été réalisés en intégrant les données obtenues sur les hémangiosarcomes du foie observés chez la souris mâle. Les données sont rappelées ci-dessous :

#### Données de l'étude de Nagano *et al.*, 1998 pour le 1,2-dichloroéthane

| Souris mâle  | Concentrations de 1,2-dichloroéthane testées |                                     |                                    |                                    |
|--|--|-------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
|  | 0 ppm  | 10 ppm<br>(41,1 mg/m <sup>3</sup> ) | 30 ppm<br>(123 mg/m <sup>3</sup> ) | 90 ppm<br>(370 mg/m <sup>3</sup> ) |
| Nbre de souris mâles ayant des hémangiosarcomes du foie / nbre total de souris mâles | 0/50   | 4/49                                | 6/50                               | 5/50                               |

Dans un premier temps les données ont été modélisées à l'aide d'un modèle multi-étapes linéaire.

L'équation retenue pour ce modèle est une équation de type standard qui est la suivante :

$$\text{Probabilité}_{\text{cancer}} = 1 - \exp(-Q_0 - Q_1 \times \text{Dose en ppm})$$

Q<sub>0</sub> et Q<sub>1</sub> sont des paramètres à estimer à l'aide des données.

Modèle d'erreur utilisé : distribution binomiale du nombre de cancers observés (hypothèse standard).

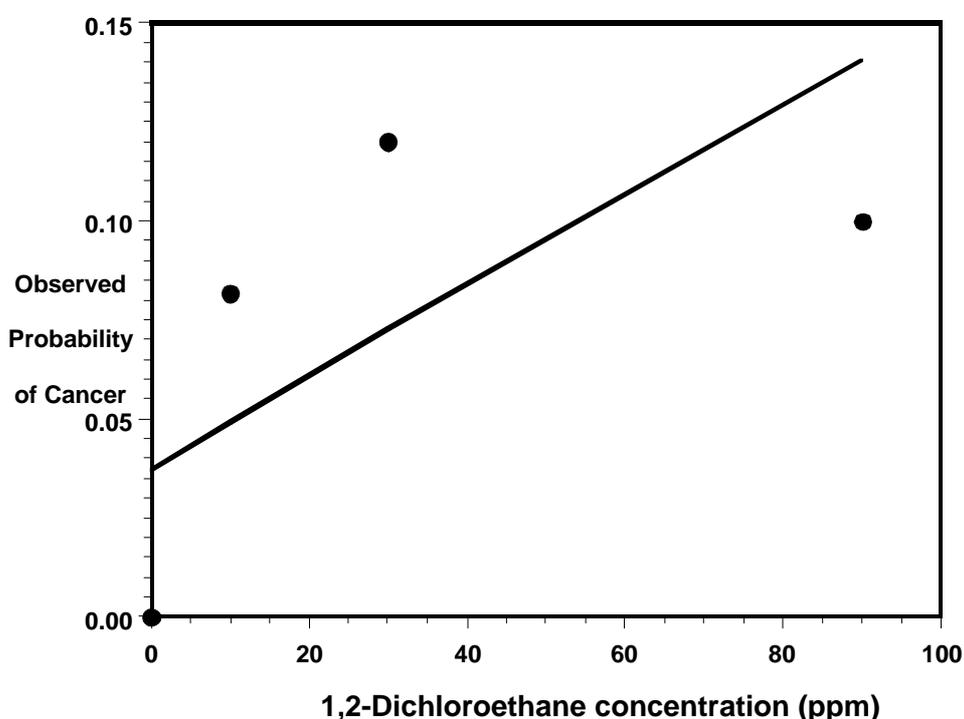
Logiciel utilisé : MCSim v 5.0.0

#### Résultats:

|           |         |                 |
|-----------|---------|-----------------|
| Paramètre | MLE     | 97,5 percentile |
| Q0(1)     | 0,0380  | 0,0992          |
| Q1(1)     | 0,00126 | 0,00309 (1/ppm) |

MLE : Estimateur du Maximum de vraisemblance

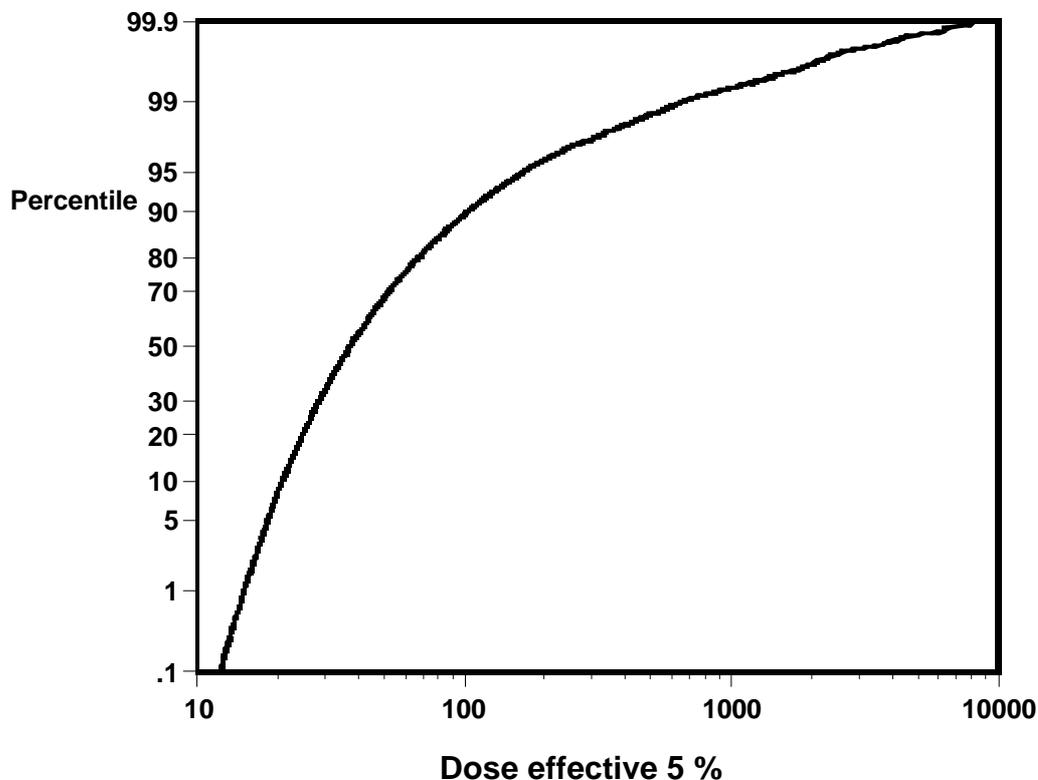
Le 97,5 percentile qui correspond à la borne supérieure de l'intervalle de confiance à 95 % a été pris en compte, ce qui est conventionnellement fait. Ainsi, la dose causant un excès de risque de cancer de  $10^{-6}$  est estimée à 0,000326 ppm soit  $1,34 \cdot 10^{-3}$  mg/m<sup>3</sup> (1,34 µg/m<sup>3</sup>).



Ajustement du modèle aux données d'hémangiosarcomes du foie chez la souris mâle exposée au 1,2-dichloroéthane (Nagano *et al.*, 1998).

La seconde approche utilisée est celle de la benchmark dose. La borne inférieure de l'intervalle de confiance à 95 % de la dose causant une augmentation de 5 % du nombre de cancers (au-delà du taux de base) (extra-risk) est de 16,59 ppm (68,18 mg/m<sup>3</sup>).

En extrapolant linéairement à partir de ce point ( $X = 16,59$  ;  $P = 0,05$ ) on arrive à ( $X = 0,0003318$  ;  $P = 1 \cdot 10^{-6}$ ). La concentration de 1,2-dichloroéthane induisant un risque de cancer de  $10^{-6}$  est donc de 0,0003318 ppm soit  $1,36 \cdot 10^{-3}$  mg/m<sup>3</sup> (1,36 µg/m<sup>3</sup>). Ce résultat est identique à celui obtenu en utilisant le modèle linéaire multi-étapes. Ce qui conforte les résultats obtenus.



Courbe de distribution cumulée de la BMD 5 %.

Les deux VTR indiquées ci-dessus ont été calculées à partir des données obtenues sur les hémangiosarcomes du foie chez la souris mâle et en prenant en compte les résultats des animaux témoins de l'étude de Nagano *et al.*, 1998. Les modélisations prennent en compte un bruit de fond de 4 %. Or, Katagiri *et al.*, 1998 rapportent une fréquence spontanée de 0 à 12 % (moyenne de 6,6 %) pour les hémangiosarcomes chez les souris BDF1 mâles. Afin de s'assurer de la fiabilité des deux VTR calculées, deux nouvelles VTR ont été élaborées à partir des données de Nagano *et al.*, 1998, mais en considérant les fibromes des tissus sous-cutanés. Comme pour les hémangiosarcomes, deux VTR ont été calculées en fonction du type de modèle utilisé. Les méthodes d'élaboration de ces deux VTR sont indiquées ci-dessous :

**Modélisation statistique des données en comptant les fibromes des tissus sous-cutanés**

Deux types de modélisations (modèle multi-étapes et élaboration de benchmark dose) ont été réalisés en intégrant les données obtenues sur les fibromes des tissus sous-cutanés observés chez le rat mâle. Les données sont rappelées ci-dessous :

| Souris mâle                                      | Concentrations de 1,2-dichloroéthane testées |        |        |         |
|--|--|--------|--------|---------|
|  | 0 ppm  | 10 ppm | 40 ppm | 160 ppm |
| Nbre de rats mâles affectés/ nbre totale de rats | 6/50   | 9/50   | 12/50  | 15/50   |

Dans un premier temps les données ont été modélisées à l'aide d'un modèle multi-étapes linéaire.

L'équation retenue pour ce modèle est une équation de type standard qui est la suivante :

$$\text{Probabilité}_{\text{cancer}} = 1 - \exp(-Q_0 - Q_1 \times \text{Dose en ppm})$$

Q<sub>0</sub> et Q<sub>1</sub> sont des paramètres à estimer à l'aide des données.

Modele d'erreur utilisé : distribution binomiale du nombre de cancer observés (hypothese standard).

Logiciel utilisé : MCSim v 5.0.0

Resultats:

| Parameter | MLE    | 2,5 percentile | 97,5 percentile |
|-----------|--------|----------------|-----------------|
| Q0(1)     | 0,17   | 0,1            | 0,26            |
| Q1(1)     | 0,0013 | 0,00026        | 0,003(1/ppm)    |

MLE : Estimateur du Maximun de vraisemblance

Le 97,5 percentile qui correspond à la borne supérieure de l'interval de confiance à 95 % a été pris en compte, ce qui est conventionnellement fait. Ainsi, la dose causant un excès de risque de cancer de  $10^{-6}$  est estimée à 0,00033 ppm soit  $1,35 \cdot 10^{-3}$  mg/m<sup>3</sup> (1,35 µg/m<sup>3</sup>).

La seconde approche utilisée est celle de la benchmark dose. La borne inférieure de l'intervalle de confiance à 95 % de la dose causant une augmentation de 5 % du nombre de cancer (au delà du taux de base) (extra-risk) est de 19,94 ppm (81,95mg/m<sup>3</sup>).

En extrapolant linéairement à partir de ce point (X = 19,94 ; P = 0,05) on arrive à (X = 0.0004 ; P = 1.10<sup>-6</sup>). La concentration de 1,2-dichloroéthane induisant un risque de cancer de 10<sup>-6</sup> est donc de 0,0004 ppm soit 1,64.10<sup>-3</sup> mg/m<sup>3</sup> (1,64 µg/m<sup>3</sup>).

Les valeurs obtenues à partir des fibromes des tissus sous-cutanés sont très proches quel que soit le modèle mathématique utilisé et sont similaires à celles obtenues en considérant les hémangiosarcomes du foie.

Les fibromes étant des près-tumeurs, nous conseillons de prendre en compte les VTR établies à partir des hémangiosarcomes du foie et de retenir la valeur la plus basse, soit une concentration de 1,34 µg/m<sup>3</sup> pour un risque de cancer de 10<sup>-6</sup>.

### Discussion et conclusion

Les différentes propositions de VTR pour le 1,2-dichloroéthane sont les suivantes :

| Organismes            | Valeur de la VTR  | Méthode de construction  |
|-----------------------|---|--|
| US EPA / RIVM / OEHHA | * 2,6.10 <sup>-5</sup> (µg/m <sup>3</sup> ) <sup>-1</sup> / 48 µg/m <sup>3</sup> pour un risque de 10 <sup>-4</sup> / * 2,1.10 <sup>-5</sup> (µg/m <sup>3</sup> ) <sup>-1</sup> | VTR sans seuil / extrapolation voie à voie à partir de la VTR par voie orale   |
| Le client             | 125 µg/m <sup>3</sup>   | VTR à seuil établie à partir d'un NOAEL pour des effets cancérigènes par inhalation et diviser par un facteur de 1 000   |
| INERIS                | 1,34 µg/m <sup>3</sup> pour un risque de 10 <sup>-6</sup> de cancer   | VTR sans seuil établie à partir de l'étude de Nagano <i>et al.</i> , 1998 avec modélisation (modèle multi-étapes et BMD tirée à l'origine) des données concernant l'augmentation des hémangiosarcomes chez la souris mâle. |

\* 2,6.10<sup>-5</sup> (µg/m<sup>3</sup>)<sup>-1</sup> et 2,1.10<sup>-5</sup> (µg/m<sup>3</sup>)<sup>-1</sup> correspondent respectivement à des concentrations de 0,038 et 0,047 µg/m<sup>3</sup> pour un risque de cancer de 10<sup>-6</sup>.

La VTR que nous proposons a été établie à partir de la seule étude disponible montrant un effet cancérigène du 1,2-dichloroéthane. Il a été décidé de construire une VTR sans seuil en raison des différents tests génotoxiques disponibles *in-vivo* et *in-vitro* qui ont montré que le 1,2-dichloroéthane pouvait induire un effet génotoxique, y compris par inhalation. Les deux types de modélisations utilisés (modèle linéaire multi-étapes et l'approche BMD) ont conduit à des résultats très proches (1,34 µg/m<sup>3</sup> et 1,36 µg/m<sup>3</sup> pour un risque de cancer de 10<sup>-6</sup>), ce qui conforte nos résultats.

Il aurait été également intéressant de partir des données par voie orale retenues par l'US EPA, le RIVM et l'OEHHA afin de réaliser une extrapolation voie à voie complexe intégrant les différences de toxicocinétiques et de mécanisme d'action du 1,2-dichloroéthane entre la voie orale et l'inhalation et entre les animaux testés et l'homme.

Les modèles que nous avons utilisés pour l'établissement de la VTR de  $1,34 \mu\text{g}/\text{m}^3$  pour un risque de cancer de  $10^{-6}$  que nous proposons peuvent être également couplés à des modèles de pharmacocinétique ce qui nous permettrait d'être encore plus précis dans le résultat donné.

Ces dernières propositions n'ayant pas été réalisées, il est conseillé de retenir la VTR de  $1,34 \mu\text{g}/\text{m}^3$  pour un risque de cancer de  $10^{-6}$  que nous venons d'établir.

## **4 TETRACHLORURE DE CARBONE (N° CAS : 56-23-5)**

### **4.1 CANCEROGENICITE**

#### **4.1.1 Etudes chez l'homme**

##### ***Par voie orale***

Aucune étude ne traite des effets cancérigènes induits par le tétrachlorure de carbone après une exposition par voie orale chez l'homme.

##### ***Par inhalation***

Deux études de cas sur les cancers du foie chez l'homme ont mis en évidence qu'une exposition aux vapeurs de tétrachlorure de carbone pouvait contribuer au développement de cancers (Tracey et Sherlock 1968 ; Johnstone, 1948). Dans la première étude, un homme âgé de 66 ans est décédé d'un carcinome hépatocellulaire, 7 ans après une intoxication aiguë au tétrachlorure de carbone ayant provoqué une jaunisse, des vomissements et une diarrhée (Tracey et Sherlock, 1968). Dans la seconde étude une femme âgée de 30 ans décéda d'un cancer du foie après 2 ou 3 ans d'exposition professionnelle au tétrachlorure de carbone à une concentration suffisante pour induire une dépression du système nerveux central. Selon l'ATSDR, 2005 ces

données sont insuffisantes pour établir une relation cause à effet entre l'exposition au tétrachlorure de carbone et le développement du cancer du foie chez l'homme.

De nombreuses études épidémiologiques ont été conduites dans le but d'évaluer la relation possible entre l'augmentation de la mortalité due à différents types de cancers et l'exposition professionnelle au tétrachlorure de carbone. Des résultats différents ont été rapportés en fonction des organes cibles. Dans ces études, les salariés ont été également exposés à d'autres substances qui peuvent être cancérigènes. Ainsi, l'association positive entre l'exposition au tétrachlorure de carbone et l'augmentation de l'incidence de la mortalité due au cancer est seulement suggestive et non conclusive selon l'ATSDR (2005). Deux études ont montré chez des salariés de sexe masculin, une association significativement positive entre l'exposition au tétrachlorure de carbone et la présence de lymphosarcomes et de leucémies lymphatiques. Un ajustement à l'âge a été effectué dans ces deux études (Checkoway *et al.*, 1984 ; Wilcosky *et al.*, 1984). Deux études de cohorte ont été réalisées chez le personnel travaillant dans l'entretien des avions depuis au moins 1 ans de 1952 à 1956 et dont 6737 salariés ont été exposés à du tétrachlorure de carbone (Blair *et al.*, 1998 et Spirtas *et al.*, 1991). Dans l'étude de Spirtas *et al.*, 1991, une association statistiquement significative avec l'exposition au tétrachlorure de carbone a été observée chez les femmes décédées à la suite de lymphomes non hodgkiniens. Dans l'étude de Blair *et al.*, 1998, une régression de Poisson a été effectuée sur les données de l'incidence de cancer afin d'évaluer le risque induit par une exposition au tétrachlorure de carbone. Parmi les hommes et les femmes, le risque relatif de mortalité due à des lymphomes non hodgkiniens ou le risque relatif d'apparition de lymphomes non hodgkiniens après une exposition au tétrachlorure de carbone n'est pas augmenté de manière significative. Une étude de cohorte réalisée sur 5 365 salariés exposés aux solvants utilisés lors du nettoyage à sec à Saint Louis dans le Missouri a mis en évidence de façon statistique un excès de mortalité due à tous les cancers, aux cancers de l'œsophage et aux cancers des cervicaux, comparé à la population générale des Etats-Unis (Blair *et al.*, 1990).

Aucune association positive n'a été trouvée entre l'exposition de salariés au tétrachlorure de carbone et l'augmentation de la mortalité due aux cancers du pancréas parmi les résidents de 24 états aux Etats-Unis (Kernan *et al.*, 1999). Ce manque d'association a été également observée pour les tumeurs du cerveau chez les salariés travaillant dans des industries de pétrochimie dans trois états différents (Heineman *et al.*, 1994), pour les cancers du rectum à Montréal (Dumas *et al.*, 2000), les carcinomes rénaux dans le Minnesota (Dosemeci *et al.*, 1999), les cancers du poumon chez les

salariés de sexe masculin travaillant dans une usine chimique au Texas (Bon *et al.*, 1986) et pour les tumeurs du système respiratoire (Checkoway *et al.*, 1984 ; Wilcosky *et al.*, 1984). Enfin, dans l'étude de Kauppinen *et al.*, 2003, aucun risque significatif de cancer n'a été détecté parmi 4 772 laborantins qui ont été exposés à différentes substances chimiques dont le tétrachlorure de carbone.

Concernant les cancers du sein, l'étude de Cantor *et al.*, 1995, a mis en évidence une faible association entre une exposition à des concentrations élevées de tétrachlorure de carbone et le risque de cancers du sein chez les femmes d'origine caucasienne, parmi les femmes travaillant dans des industries de la chimie dans 24 états différents. Toutefois, l'étude de cohorte rétrospective de Blair *et al.*, 1998 n'a pas montré d'association entre l'exposition au tétrachlorure de carbone et l'augmentation de la mortalité due aux cancers du sein chez les femmes travaillant dans l'entretien des avions.

#### **4.1.2 Etudes chez l'animal**

##### ***Par voie orale***

Les études expérimentales chez l'animal (rats, hamsters et certaines espèces de souris) ont apporté des preuves convaincantes concernant la relation entre l'exposition par voie orale au tétrachlorure de carbone et le risque de cancers du foie (Andervont 1958 ; ATSDR, 2005 ; Della Porta *et al.*, 1961 ; Edwards, 1941 ; Edwards et Dalton, 1942 ; Edwards *et al.*, 1942 ; Eschenbrenner et Miller, 1946 ; NCI, 1976a ; Weisburger, 1977).

Le tétrachlorure de carbone induit des tumeurs du foie et généralement des hépatomes ou des carcinomes hépatocellulaires après une période d'exposition comprise entre 10 et 30 semaines. Par exemple, une exposition quotidienne à 20 mg/kg induit des tumeurs hépatiques chez la souris pour une exposition de 120 jours (Eschenbrenner et Miller, 1946). Dans la plupart des cas, l'incidence des tumeurs hépatiques est élevée (75 à 100 %) chez les animaux exposés.

Des souris ont été exposées par voie orale (gavage) au tétrachlorure de carbone administré en solution dans de l'huile d'olive aux doses de 0 ; 0,16 ; 0,32 ; 0,64 ; 1,28 ou 2,5 g/kg de poids corporel (30 fois, 1 exposition tous les 1 à 5 jours selon les lots, pour une durée maximum d'exposition de 150 jours). Une augmentation significative des hépatomes est observée chez les souris exposées au moins à la dose de 0,16 g/kg de poids corporel sur une période d'au moins 90 jours. Aucun hépatome n'est observé pour une exposition à la dose de 2,5 g/kg de poids corporel sur une période de 30 jours

(Eschenbrenner et Miller, 1944).

Dans chacune de ces études, les animaux ont été exposés par gavage. Ce type d'administration exacerbe l'effet cancérigène par rapport à d'autres types d'administration par voie orale comme le mélange de la substance à la nourriture ou à l'eau de boisson (ATSDR, 2005).

Dans une autre étude plus récente, les souris ont été exposées par gavage au tétrachlorure de carbone en solution à 2 ou à 5 % dans l'huile de maïs, 5 fois par semaine aux doses de 1 250 et de 2 500 mg/kg pendant 78 semaines. Quatre vingt dix à 92 semaines après le début du traitement, la quasi-totalité des souris ont développé un carcinome hépatocellulaire (NCI, 1976a ; Weisburger, 1977). Dans une étude similaire réalisée avec le même protocole opératoire chez le rat pour des expositions aux doses de 47 et 94 mg/kg de poids corporel chez le mâle et de 80 et 160 mg/kg de poids corporel chez la femelle, une faible augmentation des carcinomes hépatocellulaires est rapportée chez les mâles et les femelles. La présence de nodules hépatiques néoplasiques est observée chez les 2 sexes (NCI, 1976a ; Weisburger, 1977).

Chez le rat, l'administration intra-gastrique de 2,6 à 510 mg/kg de poids corporel de tétrachlorure de carbone une fois par semaine pendant 30 semaines induit la survenue de carcinomes hépatocellulaires (Frezza *et al.*, 1994).

A partir de l'ensemble de ces études, l'IARC en 1987 et l'US EPA en 1993 ont conclu qu'il existe des preuves suffisantes montrant que le tétrachlorure de carbone est cancérigène chez l'animal et que cette substance est probablement ou possiblement cancérigène pour l'homme.

### ***Par inhalation***

L'exposition chronique aux vapeurs de tétrachlorure de carbone induit des tumeurs chez le rat et la souris (Japan Bioassay Research center, 1998 ; Nagano *et al.*, 1998).

Chez la souris, l'inhalation de tétrachlorure de carbone (de pureté supérieure à 99 %) aux concentrations de 0, 5, 25 ou 125 ppm (0, 32, 157 ou 787 mg/m<sup>3</sup>) 6 heures par jour 5 jours par semaine pendant 104 semaines induit une augmentation significative de l'incidence des adénomes hépatocellulaires pour les concentrations de 25 et 125 ppm (157 et 787 mg/m<sup>3</sup>) chez les mâles, et de 5 et 25 ppm (32 et 157 mg/m<sup>3</sup>) chez les femelles (Nagano *et al.*, 1998). Une augmentation significative de l'incidence des carcinomes hépatocellulaires est observée chez les animaux des deux sexes exposés aux

concentrations de 25 et 125 ppm (157 ou 787 mg/m<sup>3</sup>). Enfin, une augmentation de l'incidence des phéochromocytomes des glandes surrénales est mise en évidence chez les mâles exposés aux concentrations de 25 et 125 ppm (157 ou 787 mg/m<sup>3</sup>) et chez les femelles exposées aux concentrations de 125 ppm (787 mg/m<sup>3</sup>). Chez le rat, l'inhalation de tétrachlorure de carbone dans un protocole expérimental rigoureusement identique induit une augmentation de l'incidence des adénomes et des carcinomes hépatocellulaires chez le groupe exposé à la plus forte concentration (125 ppm)(787 mg/m<sup>3</sup>) (Nagano *et al.*, 1998) (voir annexe I).

Chez le rat, l'inhalation quotidienne de tétrachlorure de carbone pendant 7 mois induit, 2 et 10 mois après la fin du traitement, des adénocirrhoses et des nodules hépatiques (Costa *et al.*, 1963).

#### **4.1.3 Classification cancérogène**

L'Union européenne a classé le tétrachlorure de carbone dans la catégorie 3 (substances préoccupantes pour l'homme) (JOCE, 2004).

L'IARC a classé le tétrachlorure de carbone dans le groupe 2B en 1999. D'après l'IARC, il existe des preuves inadéquates chez l'homme mais des preuves suffisantes apportées par les expérimentations animales. Les données disponibles chez l'homme par inhalation ne traitent pas spécifiquement du tétrachlorure de carbone et l'association mise en évidence n'est pas fortement significative (IARC, 1999).

L'US EPA en 1991, a classé le tétrachlorure de carbone dans la classe B2 sur la base des études animales (US EPA, 1991).

## **4.2 GENOTOXICITE ET MUTAGENICITE**

### **4.2.1 Etudes chez l'homme**

Aucune étude ne traite des effets génotoxiques du tétrachlorure de carbone chez l'homme après une exposition par voie orale ou par inhalation.

### **4.2.2 Etudes chez l'animal**

#### ***Par voie orale***

Aucune mutation récessive liée au sexe n'a été détectée chez la drosophile mélanogaster exposée par la nourriture au tétrachlorure de carbone (Fouremant *et al.*, 1994). Après une exposition par gavage, aucune augmentation de la fréquence des aberrations chromosomiques, des échanges de chromatides sœurs et de la formation des micronoyaux n'a été constatée au niveau du foie chez les rats. De plus, aucune augmentation de la fréquence de formation des micronoyaux n'a été observée dans la moelle osseuse chez la souris (Sawada *et al.*, 1991 ; Suzuki *et al.*, 1997). Des études rapportent des résultats négatifs dans le foie concernant la synthèse non programmée de l'ADN chez le rat (Miralis et Butterworth ; Mirsalis *et al.*, 1982). Une dose unique et élevée de tétrachlorure de carbone induit des cassures de l'ADN au niveau du foie de souris (détectée en électrophorèse par le test des comètes chez la souris) mais pas dans les autres organes. Ces cassures ont été constatées uniquement 24 heures après l'exposition (Sasaki *et al.*, 1998). Aucune augmentation des cassures de l'ADN n'a été détectée chez les souris, 3 ou 4 heures après l'exposition à une forte dose de tétrachlorure de carbone (Sasaki *et al.*, 1998 ; Schwarz *et al.*, 1979) ou chez les rats exposés à une dose plus faible (Bermudez *et al.*, 1982). Aucun intermédiaire de la réparation de l'ADN n'a été retrouvé dans le foie des rats femelles Wistar après une hépactomie partielle et une exposition par voie orale à des doses insuffisantes pour induire une nécrose hépatique 24 heures après l'exposition. Ces résultats suggèrent que la rupture de l'ADN après une exposition par voie orale au tétrachlorure de carbone est due à une cytotoxicité hépatique (Stewart, 1981).

#### **Autres voies**

Les résultats des tests *in-vivo* après une injection intra-péritonéale sont similaires aux résultats des études par voie orale après gavage. Le tétrachlorure de carbone n'induit pas la formation de micronoyaux chez la souris (Crebelli *et al.*, 1999 ; Suzuki *et al.*, 1997). Aucune détérioration de l'ADN hépatique n'a été observée par électrophorèse chez le rat, 2 à 4 heures après l'exposition (test des comètes) (Barbin *et al.*, 1983 ; Brambilla *et al.*, 1983).

#### **4.2.3 Tests *in-vitro***

Les effets génotoxiques du tétrachlorure de carbone ont été étudiés sur les cellules eucaryotes et procaryotes.

La majorité des tests sur les bactéries après une exposition au tétrachlorure de carbone sont négatifs avec ou sans activation. Mais, la grande volatilité de cette substance peut

contribuer aux résultats négatifs de ces tests. Sur *salmonella typhimurium*, les tests de mutations après pré-incubation sur les souches BA13 et BAL13 sont négatifs (Roldan-Arjona *et al.*, 1991) ainsi que les tests de mutations reverses sur différentes souches (Araki *et al.*, 2004 ; Barber *et al.* , 1981 ; De Flora *et al.*, 1984 ; McCann *et al.*, 1975 ; Simmon *et al.*, 1977 ; Uehleke *et al.*, 1977 ; Varma *et al.*, 1988). Par contre, une augmentation de la fréquence des mutations reverses a été observée sur les souches TA15537 et TA100 avec ou sans activation et sur la souche TA98 avec activation, mais aucune relation dose-effet n'a été rapportée et une cytotoxicité a été constatée (Varma *et al.*, 1988). Un résultat de mutagénicité faiblement positif a été détecté pour la souche TA98 exposée à 10 000 ppm de vapeurs de tétrachlorure de carbone dans un système clos (Araki *et al.*, 2004).

Les tests de génotoxicité du tétrachlorure de carbone sur *Aspergillus nidulans* sont négatifs ou positifs à des doses cytotoxiques (Benigni *et al.*, 1993 ; Gualandi, 1984). Le tétrachlorure de carbone n'induit pas d'aneuploidie sur les levures *Saccharomyces cerevisiae* (souche D61.M) (Whittaker *et al.*, 1989). Une cytotoxicité est généralement observée à des concentrations où les tests génotoxiques sont positifs ou légèrement positifs sur *S.cerevisiae* (Brennan et Schiestl, 1998 ; Callen *et al.*, 1980 ; Galli et Schiestl, 1996). Galli et Schestl (1998) ont constaté que le tétrachlorure de carbone induisait des recombinaisons interchromosomiques dans les cellules en division ou dans les cellules arrêtées en phase G1 ou G2, mais pas dans les cellules en phase S. Les auteurs suggèrent que la cytotoxicité du tétrachlorure de carbone entraîne prématurément les cellules en phase G1 vers la phase S. Ceci indique que la génotoxicité peut résulter d'une insuffisance dans le mécanisme de réparation de l'ADN avant sa réplication.

Les tests de génotoxicité sur les cellules de mammifères donnent des résultats en accord avec les résultats des tests *in-vivo*. Le tétrachlorure de carbone induit un résultat légèrement positif, mais non significatif dans un test sur les cellules d'embryons de hamster sans activation (Amacher et Zelljadt, 1983). Aucune augmentation de la synthèse non programmée d'ADN n'a été observée sur les hépatocytes de rats ou sur les lymphocytes périphériques humains sans activation. Toutefois, un résultat légèrement positif a été observé sur les cellules humaines avec une activation à des concentrations cytotoxiques de tétrachlorure de carbone (Perocco et Prodi, 1981 ; Selden *et al.*, 1994). Des résultats négatifs sur les tests standards d'aberrations chromosomiques ont été rapportés sur les hépatocytes de rats, les lymphocytes périphériques humains, les lymphocytes d'agneaux et les cellules d'ovaires

de hamsters chinois (Dean et Hodson Walker, 1979 ; Garry *et al.*, 1990 et Loveday *et al.*, 1990 ). La fréquence d'échange des chromatides sœurs n'est pas élevée chez les lymphocytes périphériques humains ou chez les cellules d'ovaires de hamsters chinois avec ou sans activation métabolique (Garry *et al.*, 1990 ; Loveday *et al.*, 1990). Pour un donneur sur deux, la formation de micronoyaux est induite chez les lymphocytes périphériques humains après exposition au tétrachlorure de carbone (Tafazoli *et al.*, 1998). Une augmentation des cassures simple brin de l'ADN a été observée sur les hépatocytes de rats exposés à des concentrations cytotoxiques de tétrachlorure de carbone, mais pas chez les lymphocytes périphériques humains (Beddowes *et al.*, 2003 ; Sina *et al.*, 1983 ; Tafazoli *et al.*, 1998).

#### **4.2.4 Conclusion**

L'ensemble des tests suggère que les effets génotoxiques apparaissent pour des doses et des concentrations suffisamment importantes pour induire une toxicité hépatique. Le tétrachlorure de carbone n'apparaît pas comme étant génotoxique à des doses inférieures à celles induisant une cytotoxicité. L'effet génotoxique observé serait la conséquence de la cytotoxicité.

Le tétrachlorure de carbone a été examiné par l'Union européenne, mais aucun classement pour son caractère génotoxique n'a été donné (JOCE, 2004).

Le tétrachlorure de carbone n'est pas génotoxiques à des doses et à des concentrations inférieures auxquelles une cytotoxicité est induite. Il semble donc raisonnable de proposer une VTR à seuil pour les effets cancérigènes du tétrachlorure de carbone.

### **4.3 METABOLISME ET MECANISME D'ACTION CANCEROGENE**

**Métabolisme :** Le tétrachlorure de carbone est activé par les cytochromes P450 2E1 (Raucy *et al.*, 1993 ; Gruebele *et al.*, 1996), 2B1 ou 2B2, probablement 3A pour former un radical trichlorométhyl ( $\text{CCl}_3^*$ ). Le radical peut se fixer à des molécules cellulaires (ADN, protéines, lipides) altérant des métabolismes essentiels comme celui des lipides (dégénération graisseuse). Des adduits résultant de l'action du  $\text{CCl}_3^*$  sur l'ADN sont observés. Le radical  $\text{CCl}_3^*$  peut également réagir avec l'oxygène pour conduire à la formation d'un radical trichlorométhyl peroxyde ( $\text{CCl}_3\text{OO}^*$ ) hautement réactif.

Ce radical initie la chaîne des réactions de peroxydation lipidique. Il en résulte une destruction d'acides gras poly-insaturés, en particulier ceux associés aux phospholipides. Le radical trichlorométhyl peut aussi subir des réactions anaérobies conduisant à la formation de chloroforme, d'hexachloroéthane et de monoxyde de carbone. Enfin, ce radical peut former du trichlorométhanol précurseur de phosgène qui est rapidement hydrolysé en dioxyde de carbone.

**Mécanismes d'action :** Les résultats d'essais chez les rats et chez les souris exposés par voie orale ou par inhalation indiquent que les carcinomes hépatocellulaires sont induits à des doses provoquant une hépatotoxicité (ATSDR, 2005). Ceci suggère qu'il pourrait y avoir un seuil pour les effets cancérigènes induits par le tétrachlorure de carbone (Japan Bioassay Research Center, 1998 ; NCI, 1976a, 1977). Les résultats de ces études chez les rongeurs sont en accord avec l'hypothèse que les cancers hépatiques sont directement consécutifs à une augmentation de la réplication cellulaire produite en réponse à la létalité hépatocellulaire. Des expositions à des taux inférieurs à ceux induisant une régénération hépatique n'entraînent donc pas de cancérigenicité hépatique (ATSDR, 2005).

Les données sur les mécanismes d'action cancérigène du tétrachlorure de carbone suggèrent que les effets cancérigènes induits par le tétrachlorure de carbone seraient à seuil. Ces données sont en accord avec les résultats des tests génotoxiques montrant que le tétrachlorure de carbone est génotoxique à des doses supérieures ou égales aux doses induisant des effets cytoxiques. L'ensemble de ces données justifie la proposition d'une VTR à seuil pour les effets cancérigènes du tétrachlorure de carbone.

#### 4.4 VALEURS TOXICOLOGIQUES DE REFERENCE POUR LES EFFETS CANCEROGENES ET POUR UNE EXPOSITION PAR INHALATION

##### 4.4.1 VTR existantes

Deux VTR par inhalation pour les effets cancérigènes du tétrachlorure de carbone sont disponibles. Ces VTR sont présentées dans le tableau ci-dessous :

| Source | Voie d'exposition | Valeur de référence                                       | Année de révision |
|--------|-------------------|---|-------------------|
| US EPA | Inhalation        | $ERU_i = 1,5 \cdot 10^{-5} (\mu\text{g}/\text{m}^3)^{-1}$ | 1991              |
| OEHHA  | Inhalation        | $ERU_i = 4,2 \cdot 10^{-5} (\mu\text{g}/\text{m}^3)^{-1}$ | 2002              |

## Justification scientifique des valeurs toxicologiques de référence

- L'US EPA a proposé en 1991 un ERU<sub>i</sub> de  $1,5 \cdot 10^{-5} (\mu\text{g}/\text{m}^3)^{-1}$  pour une exposition par inhalation au tétrachlorure de carbone.

Cette valeur résulte d'une extrapolation voie à voie à partir de l'ERU<sub>o</sub> établi pour une exposition par voie orale au tétrachlorure de carbone. L'ERU<sub>o</sub> de  $1,3 \cdot 10^{-1} (\text{mg}/\text{kg}/\text{j})^{-1}$  recommandé pour la voie orale a été élaboré à partir de 4 études de cancérogenèses expérimentales par gavage, au cours desquelles une augmentation de l'incidence des tumeurs hépatiques (carcinomes hépatocellulaires et hépatomes) a été observée chez diverses espèces animales (Della Porta *et al.*, 1961 ; Edwards *et al.*, 1942 ; NCI, 1976a, 1977). Voir tableau ci-dessous :

| Espèce                     | Dose administrée (mg/j) | Incidence des tumeurs | Référence                        |
|----------------------------|-------------------------|-----------------------|----------------------------------|
| Hamster, mâles et femelles | 0                       | 0/80                  | Della Porta <i>et al.</i> , 1961 |
|                            | 0,95                    | 10/19                 |                                  |
| Souris, mâles et femelles  | 0                       | 2/152                 | Edwards <i>et al.</i> , 1942     |
|                            | 15                      | 34/73                 |                                  |
| Souris, mâles et femelles  | 0                       | 6/157                 | NCI, 1976a, 1977                 |
|                            | 21                      | 89/89                 |                                  |
|                            | 42                      | 90/93                 |                                  |
| Rat, mâles et/ou femelles  | 0 (M, F)                | 0/37                  |                                  |
|                            | 11 (M)                  | 2/45                  |                                  |
|                            | 18 (F)                  | 4/46                  |                                  |
|                            | 21 (M)                  | 2/47                  |                                  |
|                            | 36 (F)                  | 1/30                  |                                  |

Méthodologie : procédure multi-étapes linéarisée. La moyenne géométrique des 4 risques unitaires ci-dessous a été réalisée et un risque unitaire par voie orale de  $1,3 \cdot 10^{-1} (\text{mg}/\text{kg}/\text{j})^{-1}$  a été proposé.

L'ERU<sub>i</sub> de  $1,5 \cdot 10^{-5} (\mu\text{g}/\text{m}^3)^{-1}$  a été déduit de l'ERU<sub>o</sub> en considérant un volume respiratoire de  $20 \text{ m}^3/\text{j}$  et une absorption du tétrachlorure de carbone par inhalation de 40 % chez l'homme.

- L'OEHHA a établi un ERU<sub>i</sub> de  $4,2 \cdot 10^{-5} (\mu\text{g}/\text{m}^3)^{-1}$  pour une exposition par inhalation au tétrachlorure de carbone (2002).

Cet organisme a également réalisé une extrapolation voie à voie à partir de l'ERU<sub>o</sub> pour le calcul de l'ERU<sub>i</sub>.

La méthodologie utilisée par l'US EPA a été modifiée, ce qui explique une valeur d'excès de risque unitaire par inhalation 4,5 fois plus faible.

Les changements sont les suivants : 1) le facteur d'absorption par inhalation a été pris à 50 % au lieu de 40 % 2) Les résultats des études du NCI, 1976a et b menées chez les rats n'ont pas été pris en compte car lors de l'ajustement des données pour l'excès de mortalité, aucune association statistiquement significative entre la dose et la réponse de tumeur n'a été constatée pour les essais réalisés chez le rat, 3) le volume respiratoire a été pris à 18 m<sup>3</sup>/j au lieu de 20 m<sup>3</sup>/j et 4) Contrairement à l'US EPA, la moyenne géométrique des risques unitaires calculés à partir de chaque étude n'a pas été réalisée. L'ERU<sub>i</sub> finalement recommandé correspond un ERU<sub>i</sub> calculée à partir d'une seule étude (prise en compte de l' ERU<sub>i</sub> de valeur intermédiaire).

### ***Commentaires sur ces VTR***

Les deux VTR construites pour les effets cancérigènes par inhalation du tétrachlorure de carbone sont des valeurs sans seuil. Or, les études ont montré que le tétrachlorure de carbone était non génotoxique ou faiblement génotoxique à des doses pour lesquelles une cytotoxicité hépatique est observée (voir chapitre 4.2). **Il apparaît donc plus justifié d'établir une VTR à seuil qu'une VTR sans seuil pour les effets cancérigènes induits par le tétrachlorure de carbone.**

Les deux ERU<sub>i</sub> recommandés par l'US EPA (IRIS) et par l'OEHHA résultent d'une extrapolation voie à voie simple à partir de l'ERU<sub>o</sub>. Or, des études (ATSDR, 2005) ont mis en évidence des différences quantitatives dans les concentrations maximales de tétrachlorure de carbone présent au niveau des reins et du foie pour des doses d'absorption équivalentes (179 mg/kg) mais par des voies d'exposition distinctes, inhalation et voie orale. Les concentrations maximales dans les reins et dans le foie sont respectivement de 14 µg/g et de 58 µg/g après une exposition par voie orale et respectivement de 25 µg/g et de 20 µg/g après une exposition par inhalation (Sanzgiri *et al.*, 1997). **En raison de ces résultats, il est difficile de recommander la réalisation d'une extrapolation voie à voie simple pour le calcul de l'ERU<sub>i</sub>, d'autant plus que**

des études traitant des effets cancérigènes du tétrachlorure de carbone par inhalation sont disponibles.

#### **4.4.2 VTR proposée par le client**

La proposition et les arguments du client ont été repris et sont les suivants :

*« Une étude épidémiologique indique un effet hépatotoxique chez des travailleurs exposés à des concentrations de l'ordre de 1 ppm de TCM.*

*Le TCM provoque l'apparition d'hépatomes et de carcinomes hépatocellulaires chez le rat et la souris. Le TCM étant considéré comme non-génotoxique, il est admis que le mécanisme de cancérogénèse est de type « épigénétique ». En effet l'augmentation d'incidence tumorale constatée au niveau du foie chez le rongeur est secondaire aux effets cytotoxiques hépatiques chroniques qui apparaissent longtemps avant les tumeurs et qui induisent en réponse une hyperprolifération des hépatocytes (Cohen et Elwein 1990. McGregor et Lang, 1996).*

*Le client ne retient pas la valeur d'excès de risque unitaire par inhalation établi selon le modèle mathématique de l'EPA, car ce modèle surestime fortement le risque cancérogène (notamment pour les cancérogènes faibles et non génotoxiques dont les effets expérimentaux ne se sont révélés qu'à des doses franchement toxiques pour les animaux), et en plus cette valeur est extrapolée à partir de la valeur d'excès de risque unitaire par voie orale et non pas sur la base de l'étude de cancérogénèse par inhalation.*

*Dans ces conditions, la valeur de référence pour la protection de la santé des populations riveraines vis-à-vis du TCM devrait être établie pour la toxicité chronique et pour la cancérogénèse. Les seuils d'activité chez l'animal étant voisins pour les deux types d'effets, nous proposons une évaluation qui couvrira en même temps le risque cancérogène et risque toxique chronique.*

*En absence d'information sur de possibles différences de métabolisation entre l'homme et les rongeurs, les résultats de l'étude de cancérogénèse chez la souris, espèce la plus sensible, serviront de base pour l'établissement de la VTR.*

*En partant de la concentration seuil induisant un effet cancérogène par inhalation chez la souris, soit 5 ppm (32 mg/m<sup>3</sup>) (Nagano et al., 1998) en appliquant un facteur de*

sécurité de 5 pour extrapoler la dose sans effet à partir de la dose seuil (considérant la raison 5 entre les doses de l'étude), et en l'ajustant pour une exposition de 24 heures/jour, 7 jours/7, la concentration sans effet devient 1,15 mg/m<sup>3</sup>. Puis, en appliquant un facteur de sécurité de 35 (x7 pour l'extrapolation à l'homme x5 pour tenir compte de l'éventail de sensibilité de l'espèce humaine (ECETOC, 2003)), on obtient finalement une valeur de 32 µg/m<sup>3</sup>.

La valeur de référence du tétrachlorométhane retenue pour la protection de la santé des populations riveraines de l'installation est donc de :

**32 µg/m<sup>3</sup> pour une exposition vie entière. »**

#### **Commentaires sur cette VTR :**

La VTR proposée par le client est une VTR à seuil, ce qui est en accord avec les données de génotoxicité qui sont négatives à des doses inférieures à celles qui induisent une cytotoxicité et avec le mécanisme d'action du tétrachlorure de carbone, l'effet cancérigène de cette substance résultant d'une hépatotoxicité.

L'étude retenue pour la construction de la VTR recommandée par le client est une étude de cancérigène par inhalation menée sur 104 semaines (Nagano *et al.*, 1998). Etude que nous avons également retenue pour l'élaboration des VTR par inhalation pour les effets cancérigènes induits le 1,2-dichloroéthane et le chloroforme (voir annexe I).

Les facteurs d'incertitude pris en compte par le client sont un facteur 5 pour le passage d'un LOAEL à un NOAEL, un facteur 7 pour les variabilités inter-espèce (animal testé étant la souris) et un facteur 5 pour les variabilités intra-espèce. Les facteurs inter et intra-espèces appliqués par le client sont proposés par ECETOC, 2003. Le facteur 5 retenu pour les variabilités au sein de la population humaine semble faible. En effet ce facteur est plutôt recommandé par l'Union européenne pour la protection des travailleurs et non pour la population générale (TGD, 2003 et 2006).

#### **4.4.3 Proposition de VTR et discussion**

Les données de génotoxicité ainsi que celles concernant le mécanisme d'action du tétrachlorure de carbone amènent à proposer la construction d'une VTR à seuil pour les effets cancérigènes du tétrachlorure de carbone induits par inhalation.

Aucune autre étude que celle retenue par le client n'a été trouvée. Nous conseillons donc également d'établir une VTR à seuil pour les effets cancérigènes du tétrachlorure de carbone à partir de l'étude de Nagano *et al.*, 1998.

### Méthode de construction de la VTR

Enfin d'établir la VTR à seuil pour les effets cancérigènes induits par le tétrachlorure de carbone, les données de Nagano *et al.*, 1998 ont été prises en compte.

Les résultats observés pour le tétrachlorure de carbone sont résumés dans le tableau de ci-dessous. La description détaillée de l'étude de Nagano *et al.*, 1998 se trouve en annexe I.

### Données de l'étude de Nagano *et al.*, 1998 pour le tétrachlorure de carbone

| Espèces et sexes | Type de tumeurs et localisation        | * Résultats et concentration en ppm |       |        |         |
|------------------|--|-------------------------------------|-------|--------|---------|
|                  |  | 0 ppm                               | 5 ppm | 25 ppm | 125 ppm |
| Rats mâles       | Adénomes hépatocellulaires             | 0/50                                | 1/50  | 1/50   | 21/50   |
|                  | Carcinomes hépatocellulaires           | 1/50                                | 0/50  | 0/50   | 32/50   |
| Rats femelles    | Adénomes hépatocellulaires             | 0/50                                | 0/50  | 0/50   | 40/50   |
|                  | Carcinomes hépatocellulaires           | 0/50                                | 0/50  | 3/50   | 15/50   |
| Souris mâles     | Adénomes hépatocellulaires             | 0 ppm                               | 5 ppm | 25 ppm | 125 ppm |
|                  |  | 9/50                                | 10/50 | 27/50  | 16/50   |
|                  | Carcinomes hépatocellulaires           | 17/50                               | 12/50 | 44/50  | 47/50   |
|                  | Phéochromocytome de la glande adrénaie | 0/50                                | 0/50  | 16/50  | 31/50   |
| Souris femelles  | Adénomes hépatocellulaires             | 2/50                                | 8/49  | 17/50  | 5/49    |
|                  | Carcinomes hépatocellulaires           | 2/50                                | 1/49  | 33/50  | 48/49   |
|                  | Phéochromocytome de la glande adrénaie | 0/50                                | 0/49  | 0/50   | 22/49   |

| Espèces et sexes | Type de tumeurs et localisation | * Résultats et concentration en ppm |      |      |       |
|------------------|---------------------------------|-------------------------------------|------|------|-------|
|                  |                                 |                                     |      |      |       |
|                  | Carcinomes des cellules rénales | 0/50                                | 1/50 | 4/50 | 11/48 |
| Souris femelles  | Carcinomes hépatocellulaires    | 1/50                                | 1/50 | 0/50 | 3/50  |

- Résultats exprimés en nombre d'animaux ayant des tumeurs sur le nombre d'animaux totaux

Les données obtenues pour l'espèce la plus sensible (souris) et le sexe le plus sensible (souris femelle) ont été retenues pour la construction de la VTR. Ainsi un LOAEL de 5 ppm (32 mg/m<sup>3</sup>) pour l'augmentation des adénomes hépatocellulaires chez les souris femelles a été pris en compte.

### Calcul de la VTR

LOAEL = 5 ppm (32 mg/m<sup>3</sup>) chez la souris.

Ajustement à une exposition continue :  $LOAEL_{ADJ} = LOAEL \times 6h/24h \times 5j/7j = 0,8875$  ppm (5,69 mg/m<sup>3</sup>).

*Facteurs d'incertitude appliqués :*

Les facteurs que nous prenons en compte dans ce rapport sont les facteurs recommandés par l'Union européenne (TGD, 2003 et 2006).

Le facteur d'incertitude appliqué est de 210 soit,

Passage LOAEL vers un NOAEL : 3

Facteur inter-espèce : 7

Facteur intra-espèce : 10

$$VTR = LOAEL_{ADJ} \times 1/210 = 0,00271 \text{ mg/m}^3 \text{ soit une VTR} = 27 \text{ } \mu\text{g/m}^3$$

La VTR que nous proposons pour les effets cancérogènes induits après une exposition par inhalation au tétrachlorure de carbone est donc de 27 µg/m<sup>3</sup>.

Il aurait été intéressant de construire à partir de ces mêmes données, une BMD 10 ou 5 % afin de comparer la VTR ainsi obtenue à celle que nous venons d'élaborer à partir du LOAEL de 5 ppm.

## Discussion et conclusion

Les différentes propositions de VTR pour le tétrachlorure de carbone sont les suivantes :

| Organismes     | Valeur de la VTR  | Méthode de construction  |
|----------------|---|--|
| US EPA / OEHHA | $1,5 \cdot 10^{-5} (\mu\text{g}/\text{m}^3)^{-1} / 4,2 \cdot 10^{-5} (\mu\text{g}/\text{m}^3)^{-1}$ | VTR sans seuil / extrapolation voie à voie à partir de la VTR par voie orale   |
| Le client      | $32 \mu\text{g}/\text{m}^3$   | VTR à seuil établie à partir de l'étude de Nagano <i>et al.</i> , 1998<br>LOAEL = $5,69 \text{ mg}/\text{m}^3$ *FI = 175 |
| INERIS         | $27 \mu\text{g}/\text{m}^3$   | VTR à seuil établie à partir de l'étude de Nagano <i>et al.</i> , 1998<br>LOAEL = $5,69 \text{ mg}/\text{m}^3$ *FI = 210 |

\* FI : Facteur d'incertitude

La différence entre la VTR que nous avons élaborée et celle établie par le client réside dans l'utilisation des facteurs d'incertitude et plus précisément dans celui retenu pour prendre en compte la variabilité au sein de la population humaine. En effet, le client a retenu un facteur 5 comme facteur intra-espèce alors que ce facteur est plus habituellement pris en compte pour les travailleurs. L'Union européenne conseille de prendre un facteur de 10 pour la population générale si aucune donnée supplémentaire ne permet d'argumenter la prise en compte d'un facteur de 5. Ceci, est le cas pour le tétrachlorure de carbone, ce qui justifie l'application d'un facteur 10.

Le RIVM a également considéré que le tétrachlorure de carbone n'avait pas d'activité mutagène et que l'activité cancérogène n'apparaît qu'à des doses hépatotoxiques. Ainsi, le RIVM a calculé une dose sans effet pour l'activité cancérogène du tétrachlorure de carbone mais, à partir d'une étude concernant les effets systémiques sur le foie et le rein. Cette valeur est basée sur une étude par inhalation chez le rat, pour laquelle des effets hépatiques et rénaux ont été mis en évidence après exposition au tétrachlorure de carbone durant 200 jours. La référence de l'étude n'est pas précisée, mais il semblerait que ce soit l'étude de Adams *et al.*, 1952. Une LOAEC de  $63 \text{ mg}/\text{m}^3$  et une NOAEC de  $31 \text{ mg}/\text{m}^3$  ont été obtenues pour les effets hépatiques. En ajustant à une exposition continue, on obtient une NOAEC de  $6,4 \text{ mg}/\text{m}^3$ . Un facteur de 100 est appliqué (10 pour la variabilité inter-espèce et 10 pour tenir compte des différences de sensibilité de la population). Ce qui conduit à une VTR de  $6 \cdot 10^{-2} \text{ mg}/\text{m}^3$ . Cette VTR est 2,3 fois supérieure à celle que nous proposons. La VTR proposée par le RIVM pour les effets cancérogènes du tétrachlorure de carbone est basée sur une étude traitant des effets non cancérogènes. Il semble donc plus approprié de retenir l'étude de Nagano *et al.*, 1998 qui est une étude de cancérogénèse.

Pour les différentes raisons citées ci-dessus, nous conseillons de retenir la valeur de 27 µg/m<sup>3</sup> pour les effets cancérogènes induits après une exposition par inhalation au tétrachlorure de carbone.

## **5 CHLOROFORME (N° CAS : 67-66-3)**

### **5.1 CANCEROGENICITE**

#### **5.1.1 Etudes chez l'homme**

##### *Par voie orale*

Quelques études montrent une faible association entre l'exposition au chloroforme dans l'eau de boisson et certains types de cancer, tels que les cancers de la vessie, du colon, du rectum et du pancréas (Cantor *et al.*, 1978 ; Zierler *et al.*, 1988 ; Ijsselmuiden *et al.*, 1992 ; McGeehin *et al.*, 1993 ; Vena *et al.*, 1993 ; King et Marrett, 1996 ; Doyle *et al.*, 1997 ; Freedman *et al.*, 1997 ; Cantor *et al.*, 1998 ; Hildesheim *et al.*, 1998). Toutefois, les résultats de ces études ne peuvent pas être attribués spécifiquement au chloroforme, du fait d'une exposition multiple à d'autres substances qui sont les sous-produits de la désinfection de l'eau, tels que notamment, des acides haloacétiques, des aldéhydes et des cétones (ATSDR, 1998 ; US EPA, 2001). Certaines de ces substances peuvent induire des effets mutagènes et des effets cancérogènes et la proportion de chacune de ces substances dans l'eau de boisson varie en fonction des eaux consommées. L'analyse de ces études conduit l'US EPA à conclure que les données épidémiologiques disponibles sont insuffisantes pour établir une relation de cause à effet entre l'exposition au chloroforme et l'augmentation du risque de cancers (US EPA, 1998).

##### *Par inhalation*

L'IARC, 1999 a cité deux études de cas menées dans le milieu professionnel où des travailleurs ont été exposés à du chloroforme. Toutefois, les références des ces études ne sont pas précisées dans l'IARC, 1999 et n'ont pas été retrouvées dans les autres monographies (ATSDR, 1997 ; US EPA, 2001). D'après l'IARC, ces études présentent toutes les deux des limites statistiques. La première étude a mis en évidence une

relation négative entre l'exposition au chloroforme et les cancers du sein. La seconde étude a analysé différents types de cancers mais pas le cancer du sein et a montré une association entre l'exposition au chloroforme et les cancers de la prostate et des poumons, mais aucune association avec les cancers de la vessie (IARC, 1999).

### **5.1.2 Etudes chez l'animal**

#### ***Par voie orale***

Les études expérimentales montrent que le chloroforme est cancérigène à fortes doses après une exposition sub-chronique et chronique par voie orale chez différentes espèces animales. Des augmentations significatives des tumeurs du foie chez la souris mâle et femelle ont été observées ainsi qu'une augmentation de l'incidence des tumeurs des reins chez les rats mâles et chez les souris. Le développement de ces tumeurs est dépendant de l'espèce, de la souche et du sexe de l'animal testé. De plus, ces tumeurs apparaissent uniquement à des doses supérieures à celles induisant une cytotoxicité et une régénération cellulaire.

Des hyperplasies nodulaires du foie ont été observées à des faibles doses d'exposition chez les souris mâles qui ne développent pas de carcinomes hépatocellulaires. Des hépatomes se développent également chez la souris femelle après une exposition, par gavage, pendant 30 jours à 594 mg/kg/j de chloroforme présent dans de l'huile, mais pas à la dose de 297 mg/kg/j (Eschenbrenner et Miller, 1945).

Des rats Osborne-Mendel et des souris B6C3F1 ont été exposés, par gavage, au chloroforme, 5 fois par semaine pendant 78 semaines (50 animaux par lot et par sexe) (NCI, 1976). Le véhicule utilisé était de l'huile de maïs. Les rats mâles ont été exposés à 90 et à 125 mg/kg/j de chloroforme. Les rats femelles ont été initialement exposés à 125 et à 250 mg/kg/j de chloroforme pendant 22 semaines puis à 90 et à 180 mg/kg/j de chloroforme pendant les 56 semaines restantes. Une diminution du taux de survie et du gain de poids a été mise en évidence chez tous les rats traités. Une augmentation significative des tumeurs des reins a été observée chez les rats mâles (0 % chez le contrôle, 8 % à 90 mg/kg/j et 24 % à 125 mg/kg/j). Les souris mâles ont été exposées à 100 et à 200 mg/kg/j pendant les 17 premières semaines, ces doses ont été ensuite augmentées à 150 et à 300 mg/kg/j à la 18<sup>ème</sup> semaine et pour le reste de l'exposition. Les souris femelles ont été exposées à 200 et à 400 mg/kg/j de chloroforme, doses qui ont été également augmentées à la 18<sup>ème</sup> semaine d'exposition et pour le reste de l'exposition à 250 et à 500 mg/kg/j. Le taux de survie et le gain de poids sont

comparables dans tous les groupes, sauf dans le groupe de souris femelles ayant été exposées à la plus forte dose, où une diminution du taux de survie a été observée. Chez les souris, une augmentation hautement significative des carcinomes hépatocellulaires a été constatée chez les deux sexes (98 et 95 % chez les mâles et les femelles à la plus forte dose, 36 et 80 % chez les mâles et chez les femelles pour la plus faible dose et 6 % chez les rats contrôles mâles et 0 % chez les rats contrôles femelles) (NCI, 1976).

Une augmentation de l'incidence des tumeurs rénales a été observée chez des souris de souche ICI chroniquement exposées à 60 mg/kg/j, mais pas à la dose de 17 mg/kg/j. Aucun effet n'a été noté chez les souris de souche C57BL, CBA et CF-1 (Roe *et al.*, 1979).

Aucun cancer n'a été observé chez des rats exposés par gavage à 60 et 165 mg/kg/j de chloroforme dans une pâte de dentifrice durant respectivement 80 et 52 semaines (Palmer *et al.*, 1979), ni chez des chiens exposés à 30 mg/kg/j de chloroforme dans des capsules de dentifrice durant 7,5 ans (Heywood *et al.*, 1979).

Dans l'étude de Dunnick et Melnick, 1993, des rats et des souris ont été exposés par gavage (véhicule = huile de maïs), 5 jour par semaine pendant 78 semaines à du chloroforme. Chez les rats, des néoplasmes des cellules tubulaires des reins ont été observés à la dose de 90 mg/kg/j (4/50) et à la dose de 180 mg/kg/j (12/50) chez les mâles et à la dose de 200 mg/kg/j chez les femelles (2/48). Les animaux témoins n'ont pas développé de néoplasme des cellules tubulaires des reins. Chez la souris mâle, des néoplasmes hépatocellulaires ont été rarement constatés chez les animaux contrôles (1/18), mais fréquemment observés chez les souris exposées à 138 mg/kg (18/50) et à 277 mg/kg de chloroforme (44/45). Chez les souris femelles, aucun néoplasme hépatocellulaire n'a été détecté chez les animaux contrôles, mais il ont été observés dans le groupe exposé à 238 mg/kg de chloroforme (36/45) et dans celui exposé à 477 mg/kg (39/41).

Une augmentation de l'incidence des nodules néoplastiques du foie a été observée chez les rats femelles Wistar exposés de façon chronique à 200 mg/kg/j de chloroforme dans l'eau de boisson (Tumasonis *et al.*, 1987).

Des rats mâles Osborne-Mendel et des souris femelles B6C3F1 ont été exposés à du chloroforme par l'eau de boisson aux concentrations suivantes : 200, 400, 900 et 1 800 mg/L pendant 104 semaines (Jorgenson *et al.*, 1985). Selon les auteurs, ces concentrations correspondent à 19, 38, 81 et 160 mg/kg/j chez le rat et à 34, 65, 130 et à 263 mg/kg/j chez la souris. L'incidence des tumeurs rénales bénignes et malignes

chez le rat mâle sont respectivement de 2 ; 2 ; 5 ; 6 et 14 % pour les animaux contrôles et pour les doses d'exposition suivantes 19, 38, 81 et 160 mg/kg/j de chloroforme. Une augmentation significative des tumeurs du rein (14 %) a donc été constatée chez les rats mâles pour la plus forte dose testée (160 mg/kg/j). Une réévaluation de l'histopathologie des lames examinées par Jorgenson *et al.*, 1985 a été effectuée par Hard *et al.*, 2000, qui ont mis en évidence une cytotoxicité persistante et une hyperplasie régénérative chez tous les rats exposés à la plus forte dose. Des changements similaires ont été également observés chez les rats exposés à 81 mg/kg/j, mais à une incidence plus faible. Cette réexamination des lames apporte des preuves qui supportent l'hypothèse selon laquelle le développement de tumeurs rénales serait lié à une atteinte chronique des tubules rénaux. L'augmentation des tumeurs du foie chez la souris femelle n'est pas significative.

### ***Par inhalation***

Dans l'étude de Nagano *et al.*, 1998 des rats F344 et des souris BDF1 ont été exposés à des vapeurs de chloroforme 6 heures par jour, 5 jours par semaine pendant 104 semaines. Les rats mâles et femelles ont été exposés à 0, 10, 30 et 90 ppm de chloroforme et les souris ont été exposées à 0, 5, 30 et 90 ppm. Les mâles et les femelles rats ainsi que les souris exposés, quelle que soit la concentration de chloroforme, présentent une nécrose et une métaplasie de l'épithélium olfactif ainsi qu'une hyperplasie des cellules en gobelet de l'épithélium respiratoire. Une ossification de la cornée et du septum nasal des rats et des souris aux plus faibles concentrations d'exposition a été observée. Une augmentation significative de l'incidence des adénomes et des carcinomes rénaux a été constatée chez la souris mâle à 30 ppm (7/50) et à 90 ppm (12/48), comparé au groupe contrôle (0/50). Le taux d'incidence de l'ensemble des carcinomes des cellules rénales est augmenté de façon statistiquement significative chez les souris mâles exposées à 90 ppm (11/48), comparé aux animaux contrôles (0/50). Aucun changement statistiquement significatif de l'incidence des tumeurs chez la souris femelle et chez les rats mâles ou femelles n'a été détecté quelle que soit la concentration de chloroforme testée.

Templin *et al.*, 1998, ont reproduit l'étude de Nagano *et al.*, 1998, chez les souris en incluant une période d'acclimatation. Ces auteurs ont constaté une cytotoxicité et une hyperplasie des reins chez les souris mâles exposées à 30 et à 90 ppm de chloroforme pendant 90 jours. Aucune lésion et aucune hyperplasie n'a été observée chez la souris femelle. Ces observations sont en accord avec l'hypothèse selon laquelle la réponse

néoplasique induite par le chloroforme est due à une cytotoxicité et à une hyperplasie régénérative.

### **5.1.3 Classification cancérigène**

L'Union Européenne a classé le chloroforme en Catégorie 3 (substance préoccupante pour l'homme en raison d'effets cancérigènes possibles) (JOCE, 1993).

L'IARC a classé le chloroforme dans le groupe 2B (la substance pourrait être cancérigène pour l'homme) (examiné en 1999). Ce classement a été réalisé à partir de données inadéquates chez l'homme et de preuves suffisantes chez l'animal.

L'US EPA, selon sa classification de 1986, a classé le chloroforme dans le groupe 2B (Substance probablement cancérigène pour l'homme). Cette classification est basée sur des preuves suffisantes chez l'animal.

Selon la classification de 1996 et de 1999 (US EPA, 1996 et 1999), l'US EPA considère que le chloroforme pourrait être cancérigène pour l'homme pour toutes les voies d'exposition et pour des doses supérieures à celles conduisant à une cytotoxicité et à une hyperplasie régénérative dans les tissus les plus sensibles. Il ne serait pas cancérigène pour l'homme quelles que soit les voies d'exposition pour des doses inférieures à celles induisant une cytotoxicité et une hyperplasie régénérative.

## **5.2 GENOTOXICITE ET MUTAGENICITE**

### **5.2.1 Etudes chez l'homme**

Aucune étude n'est disponible chez l'homme par voie ou par inhalation.

### **5.2.2 Etudes chez l'animal**

#### ***Par voie orale***

De nombreuses études *in-vivo* par voie orale sont disponibles.

Les études analysant la liaison du chloroforme à l'ADN au niveau du foie et des reins chez les rats et chez les souris, après une exposition au chloroforme rapportent des résultats négatifs à différentes doses, 742 mg/kg, 119 mg/kg et 48 mg/kg (Diaz-Gomez et Castro, 1980 ; Reitz *et al.*, 1982 ; Pereira *et al.*, 1982).

La plupart des études ayant pour but d'analyser la détérioration de l'ADN et la détérioration de la réparation de l'ADN, sont négatives (Larson *et al.*, 1994d ; Potter *et al.*, 1996 ; Reitz *et al.*, 1982 ; Mirsalis *et al.*, 1982).

Les résultats des études menées sur les anomalies chromosomiques sont variés. Certaines montrent un effet négatif aux doses de 371 mg/kg et de 800 mg/kg (Shelby et Witt, 1995 ; Topham, 1980). Alors que d'autres études mettent en évidence un résultat positif à partir de 119 mg/kg (Fujie *et al.*, 1990). Morito et Koizumi, 1983, ont observé une augmentation de la fréquence des échanges de chromatides sœurs dans les cellules de la moelle osseuse des souris à la dose de 50 mg/kg/j. Toutefois, à la dose de 200 mg/kg/j de chloroforme, toutes les souris exposées meurent.

De nombreuses études montrent des effets négatifs sur la formation de micronoyaux chez les rats et chez les souris exposés (Gocke *et al.*, 1981 ; Salamone *et al.*, 1981 ; Le Curieux, 1995). Cependant, quelques autres études ont mis en évidence des résultats positifs pour des doses d'exposition comprises entre 400 et 600 mg/kg (San Agustin et Lim-Sylianco, 1978 ; Robbiano *et al.*, 1998 ; Sasaki *et al.*, 1998 ; Shelby et Witt, 1995). Ces dernières études montrent que le chloroforme serait clastogène, mais à des doses bien supérieures à celles qui induisent une cytotoxicité du foie et des reins dans la plupart des études par voie orale menées chez les rongeurs.

### ***Par inhalation***

Butterworth *et al.*, 1998, n'ont pas détecté d'augmentation de la fréquence de mutation chez les souris mâles exposées par inhalation à 90 ppm de chloroforme, même si cette concentration induit par ailleurs une augmentation des tumeurs dans l'étude de Nagano *et al.*, 1998.

L'exposition par inhalation de souris à 400 ppm de chloroforme pendant 5 jours, induit une augmentation du pourcentage de spermatozoïdes anormaux (Land *et al.*, 1981).

### ***Autres voies***

Pour une exposition par voie intra-péritonéale, une dose de 1,2 mg/kg de chloroforme induit, chez les rats, des anomalies chromosomiques au niveau des cellules de la moelle osseuse (Fujie *et al.*, 1990).

### 5.2.3 Tests *in-vitro*

De nombreuses données sur le potentiel génotoxique du chloroforme sont disponibles. Toutefois, ces données sont à analyser avec précaution. En effet, le chloroforme est relativement volatil, dans ce cas les tests non conçus pour éviter la volatilisation du chloroforme risquent de donner des résultats incertains. Des anciennes études ont utilisé de l'éthanol comme solvant et les résultats peuvent être faussés par la formation de carbonate d'éthyle ou de carbonate de diéthyle qui sont des agents alkylants. De plus, les études sur la clastogénicité utilisent des doses très importantes de chloroforme, induisant également une cytotoxicité sévère.

Deux études réalisées sur les cellules de thymus de veau après exposition au chloroforme, ont mis en évidence la présence de liaisons à l'ADN (DiRenzo *et al.*, 1988 ; Colacci *et al.*, 1991). Cependant, dans l'étude de DiRenzo *et al.*, 1988, de l'éthanol a été utilisé comme solvant. Dans l'étude de Colacci *et al.*, 1991, l'addition de SKF-525A inhibe la liaison à l'ADN, suggérant que la liaison du chloroforme à l'ADN se fait à travers le cytochrome P-450.

Les études de mutations sur *Salmonella typhimurium* et sur *E. Coli* (tests d'Ames) incluant également les tests permettant la réduction de l'évaporation du chloroforme donnent pratiquement toutes des résultats négatifs avec ou sans activation par des microsomes du foie ou des reins de rats ou de souris (Rapson *et al.*, 1980 ; San Agustin et Lim-Sylianco, 1978 ; Van Abbe *et al.*, 1982 ; Uehleke *et al.*, 1977 ; Gocke *et al.*, 1981 ; Roldlan-Arjona *et al.*, 1991 ; Le curieux *et al.*, 1995 ; Kirkland *et al.*, 1981). Toutefois, des études montrent des résultats positifs sur les bactéries (Varma *et al.*, 1988 ; Wecher et Scher, 1982). L'étude de Varma *et al.*, 1988, montre que le chloroforme peut induire un effet mutagène sur 5 souches de *S.typhimurium*. Mais, ces réponses positives sont observées uniquement aux plus faibles doses testées et toutes les autres doses plus élevées ne diffèrent pas du contrôle. De plus, de l'éthanol est utilisé comme diluant dans cette étude. Wecher et Scher, 1982, mettent en évidence que le chloroforme peut provoquer des mutations sur *Photobacterium phosphoreum*. Néanmoins, aucune de ces études n'indiquent les concentrations d'exposition qui induisent un effet positif.

La majorité des tests sur *S.typhimurium* et *E.coli* exposés à la phase vapeur du chloroforme sont également négatifs (Van Abbe *et al.*, 1982 ; Pegram *et al.*, 1997 ; Simmon, 1977 ; Sasaki *et al.*, 1998). Pegram *et al.* (1997), rapportent que le chloroforme est faiblement mutagène à des concentrations plus élevées que 19 2000 ppm (environ 770 mg/L dans la phase aqueuse). Après utilisation d'un modèle PBPK

(Physiologically based pharmacokinetic model), les auteurs estiment que la dose par voie orale nécessaire pour induire ce type d'effet chez la souris et chez le rat est supérieure à 2 000 mg/kg, c'est-à-dire environ 2 fois la LD<sub>50</sub>.

Les tests de génotoxicité sont également, le plus souvent, négatifs chez les champignons (Mehta et von Borstel, 1981 ; Kassinova *et al.*, 1981 et Jagannath *et al.*, 1981). Toutefois, il a été montré que le chloroforme induisait des recombinaisons intrachromosomiques chez *Saccharomyces cerevisiae* à la concentration de 6 400 mg/L (Callen *et al.*, 1980) ou à la concentration de 750 mg/L (Brennan et Schiestl, 1998). Une mauvaise ségrégation des chromosomes a été également rapportée chez *Aspergillus nidulans*, mais uniquement à la concentration de 1 600 mg/L (Crebelli *et al.*, 1988). Dans ces 3 études, les doses induisant une réponse positive provoquent également la mort cellulaire.

Les études effectuées sur les cellules de mammifères sont également, pour la plupart, négatives (Larson *et al.*, 1994 ; Perocco et Prodi, 1981 ; Butterworth *et al.*, 1989 ; Kirkland *et al.*, 1981 et White *et al.*, 1979 ). Toutefois, certaines études sont positives. Une augmentation des échanges de chromatides sœurs a été observée sur les lymphocytes humains après une exposition à 1 200 mg/L de chloroforme sans activation exogène (Morimoto et Koizumi, 1983) et à plus faible dose (12 mg/L) avec une activation exogène (Sobti, 1984). Dans l'étude de Sobti, 1984, l'augmentation est plus faible que celle observée dans l'étude de Morimoto et Koizumi, 1983 (plus de 50 % moins importante) et une augmentation de la mort cellulaire a été observée. Ceci suggère que la dose d'exposition induisant des effets mutagènes est directement toxique pour les cellules. De plus, dans cette étude de l'éthanol est utilisé comme véhicule. Mitchell *et al.*, 1988 ne détectent pas d'augmentation de mutations sur les cellules de lymphomes de souris pour une concentration de 2 100 mg/L en absence d'activation exogène, mais observent un effet à la concentration de 59 mg/L en présence d'une activation exogène.

Chez les larves de la drosophile *Melanogaster* exposées à du chloroforme sous forme de vapeur, les tests de mutations (Gocke *et al.*, 1981) et les tests de recombinaisons mitotiques (Vogel et Nivard, 1993) sont négatifs.

#### **5.2.4 Conclusion**

Sur la base des études *in-vivo* et *in-vitro* citées ci-dessus, il apparaît que la majorité des études concernant la génotoxicité du chloroforme sont négatives. Les quelques études positives présentent des limites, telles que l'utilisation de doses très fortes entraînant

une cytotoxicité, et la présence de facteurs confondants. Le chloroforme n'apparaît donc pas comme étant génotoxique ou apparaîtrait génotoxique à de fortes doses ou concentrations, aux quelles le chloroforme induit également une cytotoxicité. Cette conclusion est supportée par l'OMS/IPCS, 1994 et par l'US EPA, 2001.

Le chloroforme a été examiné par l'Union européenne, mais aucun classement pour son caractère génotoxique n'a été donné (JOCE, 1993).

L'ensemble de ces données conduit à proposer une VTR à seuil pour les effets cancérogènes induits par le chloroforme.

### **5.3 METABOLISME ET MECANISME D'ACTION CANCEROGENE**

**Métabolisme :** Environ 50 % du chloroforme est métabolisé en dioxyde de carbone chez l'homme (Fry *et al.*, 1972). Un métabolite intermédiaire toxique, le phosgène, est formé dans le foie au cours de ce processus. Une partie du phosgène formé réagit avec l'ammoniac au niveau hépatique pour être détoxiqué en urée. Le chloroforme donne aussi naissance à des radicaux libres, qui sont particulièrement toxiques au niveau des membranes des hépatocytes ou des lipides par stress oxydatif.

Chez l'animal, le métabolisme du chloroforme a été bien étudié (OMS IPCS, 1994). Il apparaît plus rapide chez la souris que chez le rat et cette activité métabolique est plus basse dans les tissus humains (foie et reins) (IARC, 1999). Le foie et le rein sont les sites principaux du métabolisme du chloroforme bien que d'autres organes ou tissus puissent aussi le transformer. La biotransformation est assurée au niveau des microsomes par des réactions d'oxydation et de réduction. Dans le foie, les cytochromes P-450 oxydent le chloroforme en trichlorométhanol qui se décompose spontanément en phosgène, en hydrogène et en chlore. Le phosgène peut réagir avec l'eau et d'autres constituants cellulaires. Il se forme du CO<sub>2</sub>, du chlore et divers adduits avec les protéines, les phospholipides polaires et très rarement avec l'ADN. La réduction enzymatique (catalysée aussi par les CYP<sub>450</sub>) conduit à la formation d'un radical dichlorométhyl qui peut réagir avec les acides gras des phospholipides membranaires. La balance entre l'oxydation et la réduction dépend de divers facteurs comme la concentration en oxygène et en chloroforme, l'espèce animale, le niveau d'induction enzymatique, le site du métabolisme. Dans la majorité des cas, c'est la voie d'oxydation qui est prépondérante.

Le chloroforme est largement distribué dans de nombreux tissus chez l'animal et il semblerait que cela soit le cas également chez l'homme. Cependant de nombreuses études montrent qu'il ne s'accumule pas dans ses tissus.

**Mécanisme d'action :** La toxicité du chloroforme, aussi bien chez l'animal que chez l'homme, peut être attribuée à la formation de un de ces métabolites directs, le trichlorométhanol, mais également au phosgène qui est formé à partir du trichlorométhanol. Le phosphène est capable de se lier de façon covalente aux macromolécules des tissus. Il est instable et forme en présence d'eau, du dioxyde de carbone et de chlorure d'hydrogène. Le foie et les reins sont les organes cibles du chloroforme aussi bien chez l'homme que chez l'animal.

Les différentes études disponibles montrent que le chloroforme n'est pas un cancérigène exerçant une action mutagène directe par réaction sur l'ADN (US EPA, 2001). En effet, les tumeurs du foie et des reins induits par le chloroforme seraient liées à une cytotoxicité prolongée et à la persistance de la prolifération cellulaire réparatrice. La prolongation de la prolifération cellulaire conduirait à une mutation spontanée des cellules par conséquent au développement de cancer.

Les données concernant le mécanisme d'action cancérigène du chloroforme laissent penser à l'existence d'un seuil pour les effets cancérigènes induits par cette substance. Ces données sont en accord avec les résultats des tests génotoxiques.

## 5.4 VALEURS TOXICOLOGIQUES DE REFERENCE POUR LES EFFETS CANCEROGENES ET POUR UNE EXPOSITION PAR INHALATION

### 5.4.1 VTR existantes

Parmi les six bases consultées, deux VTR ont été proposées pour les effets cancérigènes induits par inhalation de chloroforme. Ces VTR sont présentées dans le tableau ci-dessous :

| Source | Voie d'exposition | Valeur de référence                                       | Année de révision |
|--------|-------------------|---|-------------------|
| US EPA | Inhalation        | $ERU_i = 2,3 \cdot 10^{-5} (\mu\text{g}/\text{m}^3)^{-1}$ | 2001              |
| OEHHA  | Inhalation        | $ERU_i = 5,3 \cdot 10^{-6} (\mu\text{g}/\text{m}^3)^{-1}$ | 2002              |

## Justification scientifique des valeurs toxicologiques de référence

- L'US EPA (IRIS) propose un excès de risque unitaire par inhalation (ERU<sub>i</sub>) de  $2,3 \cdot 10^{-5} (\mu\text{g}/\text{m}^3)^{-1}$  (2001).

Cette valeur a été calculée à partir des données de l'étude du NCI (1976), qui a estimé l'incidence de carcinomes hépatocellulaires chez des souris B<sub>6</sub>C<sub>3</sub>F<sub>1</sub> mâles et femelles après gavage au chloroforme. Les valeurs d'incidence des tumeurs, détaillées ci-dessous, ont été utilisées pour établir des risques de  $3,3 \cdot 10^{-2} (\text{mg}/\text{kg}/\text{j})^{-1}$  pour les mâles et de  $2,0 \cdot 10^{-1} (\text{mg}/\text{kg}/\text{j})^{-1}$  pour les femelles. Le risque unitaire par voie orale a été calculé en considérant la moyenne géométrique de ces valeurs (voir tableau ci-dessous) :

| Administrée (mg/kg/j) | Incidence des tumeurs |
|-----------------------|-----------------------|
| Femelles              |                       |
| 0                     | 0/20                  |
| 238                   | 36/45                 |
| 477                   | 39/41                 |
| Mâles                 |                       |
| 0                     | 1/18                  |
| 138                   | 18/50                 |
| 277                   | 44/45                 |

Méthode d'extrapolation : modèle multi-étapes linéarisé. Pour le calcul de l'ERU<sub>i</sub>, il a été admis que le taux d'absorption par inhalation pour de faibles concentrations est de 100 %, que le poids moyen d'un homme est de 70 kg et que l'air respiré est en moyenne de 20 m<sup>3</sup>/j. Selon les recommandations de l'US EPA, le risque unitaire ne devrait pas être utilisé si la concentration dans l'air dépasse 400 µg/m<sup>3</sup>.

L'US EPA avertit dans sa monographie de 2001 qu'une réévaluation de l'ERU<sub>i</sub> est en cours. Cette réévaluation n'est pas encore disponible actuellement.

- L'OEHHA propose un ERU<sub>i</sub> de  $5,3 \cdot 10^{-6} (\mu\text{g}/\text{m}^3)^{-1}$  pour une exposition par inhalation (2002).

Cette valeur a été estimée à partir des données de cancérogénèse issues de 4 études par gavage chez le rat et la souris (NCI, 1976 ; Roe *et al.*, 1979 ; Jorgensen *et al.*,

1985 ; Tumasonis *et al.*, 1985), ainsi que d'une révision des données du NCI (Reuber, 1979). Les doses administrées ont été transformées en doses "vie entière" en les ajustant au nombre de jours d'exposition par semaine et au rapport de la durée de l'exposition sur la durée totale de l'expérimentation (voir tableau ci-dessous).

| Espèce/Sexe/ Souche             | Type de tumeur                            | Concentration journalière (mg/kg/j) | Incidence des tumeurs | Référence  |
|---------------------------------|---|-------------------------------------|-----------------------|--|
| Souris mâles B6C3F <sub>1</sub> | Carcinome hépatocellulaire                | 0                                   | 1 / 18                | NCI, 1976  |
|                                 |   | 83                                  | 18 / 50               |  |
|                                 |   | 167                                 | 44 / 45               |  |
| Souris femelles B6C3F1          | Carcinome hépatocellulaire                | 0                                   | 0 / 20                |  |
|                                 |   | 143                                 | 36 / 45               |  |
|                                 |   | 287                                 | 39 / 41               |  |
| Rats mâles Osborne-Mendel       | Adénocarcinome ou adénome du tubule rénal | 0                                   | 0 / 19                |  |
|                                 |   | 45                                  | 4 / 38                |  |
|                                 |   | 90                                  | 12 / 27               |  |
| Souris mâles ICI                | Adénocarcinome ou adénome du tubule rénal | 0                                   | 0 / 72                | Roe <i>et al.</i> , 1979                         |
|                                 |   | 12                                  | 0 / 37                |  |
|                                 |   | 43                                  | 8 / 37                |  |
|                                 |   | 0                                   | 6 / 237               |  |
|                                 |   | 40                                  | 9 / 49                |  |
|                                 |   | 0                                   | 1 / 49                |  |
| 42                              | 5 / 47                                    |                                     |                       |  |
| Rats mâles Osborne-Mendel       | Adénocarcinome ou adénome du tubule rénal | 0                                   | 1 / 50                | Jorgensen <i>et al.</i> , 1985                   |
|                                 |   | 42                                  | 12 / 48               |  |
|                                 |   | 0                                   | 4 / 301               |  |
|                                 |   | 18                                  | 4 / 313               |  |
|                                 |   | 38                                  | 4 / 148               |  |
| 79                              | 3 / 48                                    |                                     |                       |  |
| 155                             | 7 / 50                                    |                                     |                       |  |
| Rats mâles Wistar               | Cholangiocarcinome                        | 0                                   | 0 / 18                | Tumasonis <i>et al.</i> , 1987                   |
| Rats femelles Wistar            |   | 220                                 | 34 / 40               |  |
|                                 |   | 0                                   | 0 / 22                |  |
| Rats femelles Osborne-Mendel    | Cholangiocarcinome                        | 160                                 | 17 / 28               |  |
|                                 |   | 0                                   | 0 / 20                | Reuber <i>et al.</i> , 1979, utilisant NCI, 1976 |
|                                 |   | 50                                  | 3 / 39                |  |
| 100                             | 11 / 39                                   |                                     |                       |  |

La méthodologie suivie est disponible dans le document du "California Department of Health Services" (CDHS, 1990).

Une extrapolation voie à voie simple a ensuite été réalisée afin de calculer l'ERU<sub>i</sub>.

### **Commentaires sur ces VTR**

Les deux VTR proposées pour les effets cancérigènes induits après une exposition par inhalation au chloroforme, sont des VTR sans seuil qui ont été élaborées à partir de 2 ERU<sub>o</sub> proposés pour une exposition par voie orale au chloroforme et après une extrapolation voie à voie. En raison du mécanisme d'action cancérigène du chloroforme il n'apparaît pas justifié de proposer une VTR sans seuil pour les effets cancérigènes induits par le chloroforme. En effet, les études montrent que le mécanisme d'action cancérigène du chloroforme serait non génotoxique et que l'apparition de tumeurs serait directement consécutive à des effets cytotoxiques prolongés et à une prolifération cellulaire réparatrice. De plus, les données montrent que le chloroforme est cancérigène à des doses et à des concentrations supérieures à celles induisant une toxicité non cancérigène sur les reins et le foie. Il apparaît donc pertinent de proposer une VTR à seuil pour les effets cancérigènes induits par inhalation de chloroforme.

### **5.4.2 VTR proposée par le client**

La proposition et les arguments du client sont les suivants :

*« Sur la base des études épidémiologiques de Bomski et al., 1967 et de Li et al., 1993, il est possible de considérer une concentration de 13 mg/m<sup>3</sup> comme sans effet significatif chez l'homme dans le cadre d'une exposition professionnelle. L'extrapolation de cette valeur à la population générale implique d'utiliser des facteurs de sécurité pour tenir compte :*

- 1. d'une exposition de 24 heures/24, 7 jours/7 au lieu de 8 heures/24, 5 jours/7 (x 4,2),*
- 2. d'une exposition à long terme au lieu de moyen terme (x 3 selon ECETOC (2003),*
- 3. de la variabilité intra-espèce (x 5 selon ECETOC (2003))*

*La valeur toxicologique de référence calculée est donc de 0,2 mg/m<sup>3</sup> pour les effets non cancérigènes.*

*Considérant :*

- que le chloroforme est une substance cancérigène classée en catégorie 3 par l'Union Européenne,*
- que le mécanisme de l'activité cancérigène est non-génotoxique et à seuil,*

- que les ERU dérivés par l'US EPA et le OEHHA sont le résultat d'une extrapolation de la voie orale à l'inhalation,
- que le modèle pharmacocinétique à base physiologique utilisé par l'OMS (2004) pour les effets cancérigènes conduit à une valeur toxicologique de référence de 2,2 mg/m<sup>3</sup>,
- qu'une valeur toxicologique de référence 0,2 mg/m<sup>3</sup> a été calculée pour les effets non cancérigènes (hépatotoxicité) sur la base d'une étude épidémiologique (Li et al., 1993),

Le client recommande une **valeur toxicologique de référence de 0,2 mg/m<sup>3</sup>** pour la protection des populations environnantes envers les effets cancérigènes et non-cancérigènes du chloroforme. »

### **Commentaires sur cette VTR**

La VTR proposée par le client est une VTR à seuil, ce qui est en accord avec les données concernant le mode d'action cancérigène du chloroforme, montrant que le développement de tumeurs induit par le chloroforme serait directement consécutif à des effets cytotoxiques prolongés et à une prolifération cellulaire réparatrice.

Deux études critiques sont prises en compte pour l'élaboration de la VTR proposée par le client. L'étude de Bomski *et al.*, 1967 et une étude plus récente, Li *et al.*, 1993 qui a montré qu'aucun effet significatif n'a été détecté à la concentration de 2,6 ppm (13 mg/m<sup>3</sup>) alors que l'étude de Bomski *et al.*, 1967 a montré des effets sur le foie (25 % des personnes atteintes) à 2 ppm de chloroforme. Le client s'est d'avantage basé sur l'étude la plus récente (Li *et al.*, 1993) pour établir la VTR de 0,2 mg/m<sup>3</sup> qu'il propose. Toutefois, ces études n'ont pas regardé les effets cancérigènes pouvant être induits chez cette population, ceci n'étant pas l'objectif de ces études. Seules des atteintes non cancérigènes du foie, se traduisant par une hépatite ou un ictère ont été détectées.

Le client a retenu les facteurs d'incertitude suivants : 3 pour le passage d'une exposition de durée moyenne à une exposition à long terme, 5 Pour la prise en compte de la variabilité au sein de la population humaine. Ces facteurs sont ceux conseillés par ECETOC (2003). Nous conseillons de prendre en considération plutôt les facteurs recommandés par l'Union européenne (TGD, 2003 et 2006). Ceci amène à appliquer un facteur de 3 pour le passage d'une exposition de durée moyenne à une exposition à long

terme, mais un facteur de 10 pour la variabilité intra-espèce. Ce changement de facteur conduit à une VTR de 0,1 mg/m<sup>3</sup>.

#### **5.4.2 Proposition de VTR et discussion**

Les données de génotoxicité ainsi que celles concernant le mécanisme d'action du chloroforme amènent à proposer la construction d'une VTR à seuil pour les effets cancérigènes du chloroforme induits par inhalation.

L'étude de Nagano *et al.*, 1998, est une des seules ayant analysé le développement de différentes tumeurs chez les rats et les souris après une exposition par inhalation à long terme (104 semaines) au chloroforme. Nous proposons donc d'établir une VTR à seuil pour les effets cancérigènes du chloroforme induits par inhalation, à partir des données de cette étude (voir annexe I pour le détail de cette étude).

#### **Méthode de construction de la VTR**

Les données obtenues chez la souris, espèces la plus sensible, ont été retenues pour élaborer la VTR. Nagano *et al.*, 1998 montrent une augmentation significative de l'incidence combinée des adénomes et des carcinomes rénaux chez la souris mâle après une exposition à 30 ppm (7/50) et à 90 ppm (12/48) de chloroforme, comparé au groupe contrôle (0/50). Aucune augmentation de l'incidence des tumeurs n'a été observée chez les rats. Les résultats spécifiques du chloroforme sont présentés dans le tableau ci-dessous :

#### **Données de l'étude Nagano *et al.*, 1998 pour le chloroforme**

| Espèces et sexes | Type de tumeurs et localisation | * Résultats et concentration en ppm |       |        |        |
|------------------|---------------------------------|-------------------------------------|-------|--------|--------|
|                  |                                 | 0 ppm                               | 5 ppm | 30 ppm | 90 ppm |
| Souris mâles     | Adénomes des cellules rénales   | 0/50                                | 0/50  | 3/50   | 1/48   |
|                  | Carcinomes des cellules rénales | 0/50                                | 1/50  | 4/50   | 11/48  |
| Souris femelles  | Carcinomes hépatocellulaires    | 1/50                                | 1/50  | 0/50   | 3/50   |

\*Résultats exprimés en nombre d'animaux ayant des tumeurs sur le nombre d'animaux totaux

Un NOAEL de 5 ppm pour les effets sur les adénomes et les carcinomes rénaux chez la souris mâle a été retenu pour l'élaboration de la VTR.

### Calcul de la VTR

NOAEL = 5 ppm (24,8 mg/m<sup>3</sup>) (chez la souris mâle).

Ajustement du NOAEL pour une exposition discontinue à une exposition continue :

$$\text{NOAEL}_{\text{ADJ}} = \text{NOAEL} \times 6\text{h}/24\text{h} \times 5\text{j}/7\text{j} = 5 \times 6\text{h}/24\text{h} \times 5\text{j}/7\text{j} = 0,89 \text{ ppm (4,41 mg/m}^3\text{)}$$

*Facteurs d'incertitude appliqués :*

Les facteurs que nous prenons en compte dans ce rapport sont les facteurs recommandés par l'Union européenne (TGD, 2003 et 2006).

Le facteur d'incertitude appliqué est de 70 soit,

Facteur inter-espèce : 7

Facteur intra-espèce : 10

$$\text{VTR} = \text{NOAEL}_{\text{ADJ}} \times 1/70 = 0,063 \text{ mg/m}^3 \text{ soit une VTR} = \mathbf{0,063 \text{ mg/m}^3}$$

**Nous proposons donc une VTR de 0,063 mg/m<sup>3</sup> pour les effets cancérogènes induits par inhalation de chloroforme.**

IL aurait été également intéressant construire à partir de ces mêmes données une BMD 10 ou 5 % afin de comparer la VTR ainsi obtenue à celle que nous venons d'élaborer à partir du NOAEL de 5 ppm.

### **Discussion et conclusion**

Les différentes VTR proposées pour le chloroforme sont présentées dans le tableau ci-dessous :

| Organismes     | Valeur de la VTR  | Méthode de construction   |
|----------------|---|---|
| US EPA / OEHHA | $2,3 \cdot 10^{-5} (\mu\text{g}/\text{m}^3)^{-1} / 5,3 \cdot 10^{-5} (\mu\text{g}/\text{m}^3)^{-1}$ | VTR sans seuil / extrapolation voie à voie à partir de la VTR par voie orale  |
| Le client      | 0,2 $\mu\text{g}/\text{m}^3$  | VTR à seuil établie à partir d'études épidémiologiques et de données sur la toxicité hépatique<br>NOAEL = 13 mg/m <sup>3</sup> (effet hépatotoxique)<br>*FI = 15 après ajustement |
| INERIS         | 63 $\mu\text{g}/\text{m}^3$   | VTR à seuil établie à partir de l'étude de Nagano <i>et al.</i> , 1998<br>NOAEL = 24,8 mg/m <sup>3</sup> chez souris mâle<br>*FI = 70 après ajustement                            |

\*FI = facteur d'incertitude

La VTR de 0,063 mg/m<sup>3</sup> que nous a été établie à partir d'une étude de cancérogénèse par inhalation menée chez les rats et les souris.

Cette VTR est légèrement inférieure, mais pas très différentes de celles proposées pour les effets non cancérogènes induits par le chloroforme, valeurs comprises entre 0,1 et 0,3 mg/m<sup>3</sup> en fonction des agences. Ceci est en accord avec le mécanisme d'action cancérogène du chloroforme. Le client propose une VTR de 0,2 mg/m<sup>3</sup> à la fois pour les effets cancérogènes et les effets non cancérogènes. Cette VTR est élaborée à partir de données non cancérogènes chez les travailleurs.

La valeur de 63 µg/m<sup>3</sup> que nous avons établie est basée sur des données de cancérogénèses et il est plus justifié et plus standard de retenir cette VTR pour les effets cancérogènes du chloroforme que les autres VTR élaborées à partir des effets non cancérogènes induits par le chloroforme.

## **6 CHLORURE DE METHYLENE (N° CAS : 75-09-2)**

### **6.1 CANCEROGENICITE**

#### **6.1.1 Etudes chez l'homme**

##### ***Par voie orale***

Aucune étude n'est disponible.

##### ***Par inhalation***

Des auteurs ont examiné le potentiel cancérogène du chlorure de méthylène chez l'homme, après une exposition par inhalation.

Aucun excès de risque de mortalité lié au développement de tumeurs malignes n'a été détecté chez les travailleurs exposés à des concentrations de chlorure de méthylène allant jusqu'à 475 ppm (Friedland *et al.*, 1978 ; Hearne *et al.*, 1987, 1990 et Lanes *et al.*, 1993). Lanes *et al.*, 1990, ont rapporté un excès de risque de mortalité lié aux cancers combinés de la cavité buccale et du pharynx et aux cancers combinés du foie et du tractus biliaire chez les travailleurs exposés à 17 000 ppm de chlorure de méthylène pendant plus de 20 ans.

Tomenson *et al.*, 1997, ont étudié le taux de mortalité dû aux cancers chez des travailleurs exposés au chlorure de méthylène à la concentration moyenne de 19 ppm et sur une moyenne de 9 ans de travail dans la même usine. Les travailleurs exposés

présentaient un taux de cancers (incluant les cancers du foie, du poumon, du pancréas et du tractus biliaire) inférieur aux taux nationaux et locaux. Les auteurs suggèrent que la réduction de mortalité due au cancer du poumon serait associée à une consommation de tabac plus faible sur le lieu de travail.

Cantor *et al.*, 1995, ont réalisé une étude de cas contrôle sur 33 509 cas et 1117 794 contrôles afin d'examiner l'association entre l'exposition à différentes substances dans le milieu du travail et l'incidence de cancer du sein chez les femmes. L'exposition a été indirectement estimée en utilisant une matrice d'exposition. Après un ajustement au statut socioéconomique, l'Odds Ratio pour le groupe le plus exposé au chlorure de méthylène est légèrement supérieur à 1 et statistiquement significatif (OR = 1,46, CI = 1,2 - 1,7). Toutefois, cette étude présente des limites comme l'utilisation d'une matrice d'exposition à la place de mesures quantitatives aux postes de travail et le manque d'ajustement pour certains facteurs de risque tels que la consommation de tabac, l'obésité, l'historique familiale et la durée de l'embauche.

### **6.1.2 Etudes chez l'animal**

#### ***Par voie orale***

Les études réalisées chez l'animal montrent que l'ingestion de chlorure de méthylène peut induire une augmentation de l'incidence des cancers du foie.

Dans une étude d'exposition aiguë, deux doses de 1 275 mg/kg de chlorure de méthylène, séparées de 17 heures, induisent une augmentation de l'activité de l'ornithine décarboxylase présente dans le foie, enzyme qui contribue à la promotion du cancer du foie (Kitchin et Brown, 1989).

Des tumeurs du foie ont été également observées chez les rats femelles, mais pas chez les rats mâles après une exposition par voie orale au chlorure de méthylène (dose allant jusqu'à 250 mg/kg/j) pendant deux ans (Serota *et al.*, 1986a). Mais, le taux d'incidence de ces cancers est compris dans la fourchette des taux d'incidence des contrôles historiques. Par contre, une augmentation, hautement significative, de l'incidence des cancers du foie a été notée chez les souris mâles, mais pas chez les souris femelles (Serota *et al.*, 1986b).

Une augmentation de l'incidence des tumeurs mammaires a été observée chez les rats femelles exposées par gavage à 500 mg/kg/j de chlorure de méthylène pendant 64 semaines, mais les résultats ne sont pas statistiquement significatifs (Maltoni *et al.*, 1988). Dans les mêmes conditions d'exposition, une augmentation de l'incidence des tumeurs pulmonaires, statistiquement significative, a été constatée chez les souris mâles ( $p \leq 0,05$ ), mais uniquement lorsque l'augmentation du taux de mortalité a été prise en compte (Maltoni *et al.*, 1988).

### ***Par inhalation***

Chez des rats exposés à des faibles concentrations de chlorure de méthylène (100 ppm) pendant deux ans, aucune augmentation significative de l'incidence de tumeurs malignes n'a été observée (Maltoni *et al.*, 1988).

Chez les rats et chez les souris, l'inhalation de concentrations élevées de chlorure de méthylène induit une augmentation significative de l'incidence des tumeurs du foie et des poumons (Menear *et al.*, 1988 ; NTP, 1986) ainsi que des tumeurs bénignes des glandes mammaires (fibroadénomes et adénomes) (Menear *et al.*, 1988 ; Nitschke *et al.*, 1988a).

Dans l'étude du NTP de 1986, des rats F344/N et des souris B6C3F1 ont été exposés à du chlorure de méthylène, 6 heures par jour, 5 jours par semaine pendant 102 semaines. Les rats ont été exposés à 0, 1 000, 2 000 et 4 000 ppm de chlorure de méthylène et les souris à 0, 2 000 et 4 000 ppm. A la concentration de 2 000 ppm et pour des concentrations supérieures, l'augmentation de l'incidence des tumeurs du foie (adénomes hépatocellulaires et carcinomes) chez la souris est hautement significative, comparé aux contrôles et aux contrôles historiques (NTP, 1986). L'incidence des tumeurs combinées du foie (tumeurs malignes et bénignes) est élevée chez les souris traitées (67 à 83 %). Une augmentation significative de l'incidence des tumeurs des poumons a été également constatée ( $p < 0,001$ ) chez les souris pour des concentrations de 2 000 ppm ou supérieures. Ces tumeurs sont des adénomes et des carcinomes alvéolaires et bronchiolaires. L'incidence des tumeurs des poumons combinées (bénins et malins) est comprise entre 54 et 85 % chez les souris traitées. La survie des souris mâles et des femelles du groupe fortement exposé (4 000 ppm) est significativement diminuée (NTP, 1986).

Cinquante rats F344 et 50 souris B<sub>6</sub>C<sub>3</sub>F<sub>1</sub> des deux sexes ont été exposées 6 heures par jour, 5 jours par semaine pendant 102 semaines à des concentrations de 0, 1 000, 2 000, et 4 000 ppm pour les rats, 0, 2 000, 4 000 ppm pour les souris. Les rats étaient en permanence dans les chambres d'exposition. Dans ces conditions expérimentales, on constate chez les rats femelles une augmentation dose dépendante de l'incidence des tumeurs mammaires bénignes ( $p < 0,001$ ). Une augmentation de l'incidence des leucémies est aussi observée pour les expositions à 2 000 et 4 000 ppm, mais également chez les témoins (Mennear *et al.*, 1988).

Dans l'étude de Nitschte *et al.*, 1988, 90 rats Sprague-Dawley par sexe ont été exposés à des concentrations de 0, 50, 200 et 500 ppm de chlorure de méthylène, 6 heures par jour, 5 jours sur 7 pendant 20 semaines (mâles) et 24 semaines (femelles). La majorité des animaux ne restait dans les chambres d'exposition que 5 jours sur 7. Il n'y a pas de tumeurs particulières observées. Une incidence plus importante des tumeurs bénignes mammaires est observée chez la femelle mais n'est pas statistiquement significative.

Le NTP conclu qu'il y a quelques preuves concernant l'effet cancérigène du chlorure de méthylène chez les rats mâles et des preuves claires chez les rats femelles, basées sur l'augmentation de l'incidence des néoplasmes mammaires bénins après une exposition de 2 ans au chlorure de méthylène. Ce rapport montre également qu'il y a des preuves claires concernant le potentiel cancérigène du chlorure de méthylène chez la souris, basées sur l'augmentation de l'incidence des tumeurs alvéolaires et bronchiolaires et sur l'augmentation de l'incidence des tumeurs hépatocellulaires.

Kari *et al.*, 1993 et Maronpot *et al.*, 1995 ont examiné le développement progressif des tumeurs du foie et des poumons chez les souris B<sub>6</sub>C<sub>3</sub>F<sub>1</sub> exposées dans des chambres d'inhalation à 2 000 ppm de chlorure de méthylène, 6 heures par jours, 5 jours par semaine pendant 104 semaines. De plus, une série d'arrêt de l'exposition a été réalisée afin d'évaluer l'effet d'expositions différentes sur le développement de tumeurs. Kari *et al.* (1993), ont effectué un examen histopathologique et histologique des tumeurs du foie et des poumons alors que Maronpot *et al.* (1995), ont évalué la synthèse de l'ADN et l'expression des oncogènes lors du développement des tumeurs. L'exposition chronique à de fortes concentrations de chlorure de méthylène résulte-en : 1) une augmentation de l'incidence (8 fois plus importante) des souris ayant des adénomes et des carcinomes des poumons, comparé aux animaux contrôles ; 2) une augmentation du nombre total de tumeurs des poumons chez chaque souris exposée (13 fois plus importante) ; 3) une augmentation de l'incidence des souris ayant des adénomes et des carcinomes du foie (2,5 fois plus important), comparé aux animaux contrôles ; 4) une

augmentation du nombre de tumeurs du foie chez chaque souris exposée (3 fois plus important). Le développement de la première tumeur du poumon causée par le chlorure de méthylène chez la souris apparaît un an avant les animaux contrôles, ce qui n'est pas le cas pour les tumeurs du foie. L'incidence des tumeurs du poumon, mais pas des tumeurs du foie, continue à augmenter après l'arrêt de l'exposition. Ces deux études permettent de conclure que le potentiel cancérigène du chlorure de méthylène est supérieur au niveau du poumon qu'au niveau du foie chez les souris B6C3F1 femelles et que la différence d'incidence entre les cancers du poumons et les cancers du foie en fonction du type d'exposition au chlorure de méthylène suggère que le mécanisme d'action cancérigène est différent entre ces deux organes cibles.

### **6.1.3 Classification cancérigène**

L'Union européenne a classé le chlorure de méthylène en catégorie 3 (substance préoccupante pour l'homme en raison d'effets cancérigènes possibles) (JOCE, 1993).

L'IARC a classé en 1999 le chlorure de méthylène dans le groupe B (l'agent pourrait être cancérigène pour l'homme). Selon l'IARC, il a des preuves inadéquates chez l'homme et des preuves suffisantes chez l'animal.

L'US EPA (IRIS) a classé en 1995 le chlorure de méthylène en classe B2 : cancérigène probable pour l'homme. Cette classification est basée sur des données inadéquates chez l'homme et sur des preuves suffisantes chez l'animal.

## **6.2 GENOTOXICITE ET MUTAGENICITE**

### **6.2.1 Etudes chez l'homme**

Aucune étude n'est disponible chez l'homme quelle que soit la voie d'exposition.

### **6.2.2 Etudes chez l'animal**

#### ***Par voie orale***

Chez les rats exposés à deux doses de 1 275 mg/kg de chlorure de méthylène (séparées par 17 heures), des cassures de l'ADN ont été détectées dans le foie, 4 heures après l'exposition à la seconde dose (Kitchin et Brown, 1989). Chez la souris ayant reçu une simple dose de 1 720 mg/kg de chlorure de méthylène, des cassures de l'ADN sont constatées dans les noyaux du foie et des poumons, mais pas dans l'estomac, les reins, la vessie, le cerveau et la moelle osseuse. Les auteurs indiquent qu'il n'y a pas de

preuve que la cytotoxicité induit les effets génotoxiques observés (Sasaki *et al.*, 1998). La variabilité de l'effet génotoxique reflète la variation tissu-spécifique du métabolisme du chlorure de méthylène (ATSDR, 2000).

Le chlorure de méthylène n'induit pas d'augmentation significative des micronoyaux des érythrocytes polychromatiques chez la souris après administration d'une dose de 4 000 mg/kg (Sheldon *et al.*, 1987).

### ***Par inhalation***

Les tests de génotoxicité *in-vivo* après inhalation donnent des résultats variés.

L'exposition par inhalation de chlorure de méthylène pendant 10 jours à la concentration de 4 000 ppm ou à des concentrations supérieures, induit une augmentation significative de la fréquence des échanges des chromatides sœurs dans les cellules du poumon et dans les lymphocytes du sang périphérique. Des aberrations chromosomiques ont été observées dans les poumons et dans les cellules de la moelle osseuse ainsi que la formation de micronoyaux dans les érythrocytes du sang périphérique (Allen *et al.*, 1990). Toutefois, aucune anomalie chromosomique n'a été constatée dans les cellules de la moelle osseuse chez les rats exposés par inhalation à la concentration allant jusqu'à 3 500 ppm pendant 6 mois (Burek *et al.*, 1984). La pertinence de ces deux études dans le mécanisme clastogène chez l'homme est incertain.

Des études plus récentes ont tenté d'élucider le mécanisme d'action génotoxique du chlorure de méthyle. Casanova *et al.*, 1992, ont pré-exposé des souris mâles B6C3F1 et des hamsters chinois dorés, 6 heures par jour pendant 2 jours à 4 000 ppm de chlorure de méthylène. Au troisième jour, les animaux ont été exposés pendant 6 heures à une concentration de chlorure de méthylène radiomarqué (<sup>14</sup>C) et ont examiné la présence des Liaisons entre l'ADN et les protéines. Ces liaisons ont été détectées dans le foie des souris mais pas dans les poumons, ni dans le foie ou les poumons des hamsters. Des résultats similaires ont été observés lors d'une seconde expérience (Casanova *et al.*, 1996). De plus, les souris exposées, 6 heures par jour pendant 3 jours aux concentrations comprises entre 1 500 et 4 000 ppm présentent une augmentation du taux de synthèse de l'ADN dans les poumons, indiquant la prolifération cellulaire, mais l'augmentation du turn-over des cellules n'a pas été détectée dans les poumons des souris aux concentrations suivantes : de 150 et 500 ppm. Chez les hamsters, aucune prolifération cellulaire n'a été observée dans les poumons et aucune prolifération cellulaire n'a été détectée dans le foie pour les deux espèces, souris et hamsters.

Devereux *et al.*, 1993, ont analysé les tumeurs du foie et des poumons induits chez les souris femelles B6C3F1 après une exposition par inhalation à 2 000 ppm de chlorure de méthylène, 6 heures par jour, 5 jours par semaine, jusqu'à 104 semaines. Ils ont recherché la présence de l'activation du pro-oncogène *ras*. Au niveau du foie, des mutations ont été détectées et sont similaires à celles observées pour le gène *H-ras* dans la formation des tumeurs spontanées du foie. Des mutations ont également été identifiées dans les poumons. Le profil d'activation du gène *K-ras* dans le développement de tumeurs induits par le chlorure de méthylène n'est pas significativement différent de celui observé lors de l'apparition de tumeurs spontanées.

Maronpot *et al.*, 1995, ont étudié la synthèse répliquative de l'ADN après 13, 26, 52 et 78 semaines d'exposition par inhalation chez des souris femelles B6C3F1 exposées à 2 000 ppm de chlorure de méthylène, 6 heures par jour, 5 jours par semaine. Une diminution statistiquement significative de la prolifération cellulaire a été observée dans les hépatocytes, 13 semaines après l'exposition. Aucune augmentation de la synthèse répliquative de l'ADN n'a donc été observée dans les cellules du foie ni dans les cellules parenchymateuses du poumon. L'activation du gène *K-ras* dans les tumeurs du foie et l'activation du gène *H-ras* dans les tumeurs du poumon n'est pas différente entre les souris exposées et les souris contrôles. Les auteurs concluent que ces oncogènes ne sont pas impliqués dans le développement des tumeurs induites par le chlorure de carbone.

#### ***Par d'autres voies***

Aucune étude n'est disponible.

### **6.2.3 Tests *in-vitro***

Les tests de génotoxicité menés sur les bactéries donnent des résultats variables. Chez *Salmonella typhimurium*, le chlorure de méthylène induit des mutations sur les souches TA98 et TA100 avec et sans activation. Par contre, aucune mutation n'a été notée sur les souches TA1535, TA1538 et TA1537 avec ou sans activation (Gocke *et al.*, 1981). Des tests *in-vitro* menés sur *Salmonella typhimurium* en présence ou en absence de l'expression de la glutathion-S-transférase (GST) révèle que le chlorure de méthylène serait mutagène par au moins deux voies (DeMarini *et al.*, 1997). Deux souches de bactéries ont été étudiées, la souche TA100 et la souche RSJ100, cette dernière dérive de la souche TA1535 (souche ne développant pas de mutation en présence de chlorure de méthylène) contient l'enzyme GST T1-1 de rat. Sur la souche RSJ100, le chlorure de

méthylène est mutagène à des doses modérées et produit une seule classe de mutation. Le chlorure de méthylène est également mutagène sur la souche TA100, mais à des doses beaucoup plus élevées que celles induisant des effets mutagènes sur la souche RSJ100 et plusieurs types de mutations et de lésions sont induites. Cette étude montre que l'effet génotoxique du chlorure de méthylène est différents en fonction du phénotype GST. En absence du gène GST, des effets génotoxiques sont induits chez *Salmonella typhimurium* après exposition à de fortes doses de chlorure de méthylène et en présence de ce gène, les souches sont vulnérables à des doses beaucoup plus faibles (DeMarini *et al.*, 1997).

Chez les cellules de mammifères, certaines études réalisées sur des cellules de hamsters chinois et sur des lymphomes L5178Y de souris mettent en évidence des aberrations chromosomiques avec ou sans activation (Thilagar *et al.*, 1984).

La synthèse non programmée d'ADN ne semble pas être activée par le chlorure de méthylène. En effet, les tests réalisés sur des cellules V79 de hamsters chinois, sur des fibroblastes humains et sur des lymphocytes périphériques humains sont négatifs avec ou sans activation (Jongen *et al.*, 1981 ; Perocco et Prodi, 1981). Des tests sur les échanges des chromatides sœurs ont été effectués sur des cellules de hamsters chinois et ces tests sont légèrement positifs (Thilagar *et al.*, 1984).

#### **6.2.4 Conclusion**

Le caractère génotoxique du chlorure de méthylène semble être tissus et espèces dépendant. Le chlorure de méthylène semble être génotoxique sur les cellules du foie et des poumons de souris.

Le chlorure de méthylène a été examiné par l'Union européenne, mais aucun classement n'a été donnée pour son caractère génotoxique (JOCE, 1993).

### **6.3 METABOLISME ET MECANISME D'ACTION CANCEROGENE**

**Métabolisme :** Le chlorure de méthylène est actif par deux voies métaboliques : la voie du cytochrome P-420 2E1 et celle du glutathion. Ces deux voies métaboliques ont été retrouvées aussi bien chez le rongeur que chez l'homme (ATSDR, 2000). La voie métabolique oxydative semble identique chez tous les rongeurs étudiés et chez l'homme (Green, 1997). Il s'agit de la voie prédominante aux faibles doses, mais cette voie est saturée à des concentrations supérieures à 500 ppm (Green, 1997). La seconde voie métabolique faisant intervenir une glutathion-S-transférase (GST) semble ne prendre de

l'importance que lorsque les doses dépassent la valeur de 'saturation' de la voie oxydative. Green, (1997), a montré que cette voie métabolique devient majeure chez la souris aux concentrations testées dans les études de cancérogenèses.

**Mécanisme d'action :** L'étude de Kanno *et al.*, 1993, a montré que l'augmentation de la prolifération cellulaire n'est pas impliquée dans le développement de tumeurs du foie chez la souris. Ceci est en accord avec le résultat de l'étude de Maronpot *et al.*, 1995b, contrairement à l'étude de Casanova *et al.*, 1996 qui montre une augmentation de la prolifération cellulaire dans les poumons à 1 500 et à 4 000 ppm mais pas à 150 et à 500 ppm.

Graves et Green, 1996, montrent que le mécanisme tumorigène du chlorure de méthylène au niveau du foie des souris serait vraisemblablement génotoxique et médié par l'enzyme glutathion-S-transférase (GST). La différence d'effet tumorigène au niveau du foie entre les différentes espèces testées (souris et rats) semble résulter d'une différence dans le taux de glutathion.

L'ensemble des études mécanistiques ont donc établi un lien entre le métabolisme du chlorure de méthylène médié par la glutathion-S-transférase et les effets génotoxiques et cancérogènes induits par le chlorure de méthylène chez la souris.

**Transposition animal-homme :** Les tumeurs observées de façon prédominante dans les études sont les tumeurs du foie et des poumons chez les souris. Les différences observées concernant l'effet tumorigène et génotoxique du chlorure de méthylène entre les rongeurs sont aussi importantes que celles notées entre la souris et l'homme.

Graves, 1997, qui a montré que le mécanisme tumorigène du chlorure de méthylène au niveau du foie des souris était vraisemblablement génotoxique et médié par l'enzyme glutathion-S-transférase (GST), indique que la différence d'effet tumorigène observée au niveau du foie entre les différentes espèces testées (souris et rats) semble résulter d'une différence dans le taux de conjugaison au glutathion. Ce taux de conjugaison est plus important dans le foie et les poumons de souris que chez le rat, le hamster et l'homme. La glutathion-S-transférase responsable du métabolisme du chlorure de méthylène est exprimée de façon beaucoup plus importante dans les tissus de souris que dans les tissus de rats, de hamsters et d'humains (IARC, 1999). Les études de Green, 1997, de Ruch *et al.*, 1989 et de Steinmetz *et al.*, 1988 montrent que la souris serait l'espèce la plus efficace pour l'activation de la voie métabolique *via* la GST et l'homme apparaît comme étant l'espèce la moins efficace.

D'après l'ATSDR, 2000, plusieurs études *in-vitro* menées sur des cellules de souris, de rats, de hamsters et des cellules humaines suggèrent que l'homme n'est vraisemblablement pas plus sensible que les rongeurs en ce qui concerne les cancers du foie.

Toutefois, d'autres études suggèrent que le chlorure de méthylène peut être cancérigène chez l'homme. Mainwararing *et al.*, 1996b, ont analysé la distribution du mRNA et des protéines pour les deux enzymes GST T1-1 et GST T2-2 chez la souris, les rats et sur les cellules humaines. Le taux des mRNA et des protéines de ces deux enzymes est globalement, dans l'ensemble des tissus humains, plus faible que chez la souris. Par contre, une immunodétection a localisé une forte concentration de l'enzyme GST T2-2 sur les cellules épithéliales humaines du canal biliaire. Ceci, est en accord avec les données épidémiologiques de Lanes *et al.*, 1990 qui rapportent un excès de risque de mortalité lié aux cancers combinés du foie et du tractus biliaire chez les travailleurs exposés à 17 000 ppm de chlorure de méthylène pendant plus de 20 ans.

## 6.4 VALEURS TOXICOLOGIQUES DE REFERENCE POUR LES EFFETS CANCEROGENES ET POUR UNE EXPOSITION PAR INHALATION

### 6.4.1 VTR existantes

Trois VTR ont été établies pour les effets cancérigènes du chlorure de méthylène induits par inhalation parmi les six bases consultées. Voir tableau ci-dessous :

| Source       | Voie d'exposition | Valeur de référence                                       | Année de révision |
|--------------|-------------------|---|-------------------|
| US EPA       | Inhalation        | $ERU_i = 4,7 \cdot 10^{-7} (\mu\text{g}/\text{m}^3)^{-1}$ | 1995              |
| Santé Canada | Inhalation        | $CT_{0,05} = 2,2 \cdot 10^{-3} \text{ mg}/\text{m}^3$     | 1993              |
| OEHHA        | Inhalation        | $ERU_i = 10^{-6} (\mu\text{g}/\text{m}^3)^{-1}$           | 2002              |

## Justification scientifique des valeurs toxicologiques de référence

- L'US EPA (IRIS) propose une valeur d'excès de risque unitaire par inhalation (ERU<sub>i</sub>) de  $4,7 \cdot 10^{-7} (\mu\text{g}/\text{m}^3)^{-1}$  (1995).

Cette valeur a été calculée à partir d'une étude du NTP qui avait pour but de déterminer l'incidence de tumeurs malignes chez des rats F344/N et des souris B6C3F1 des deux sexes, exposés par inhalation à différentes concentrations de chlorure de méthylène pendant deux ans (NTP, 1986). Seuls les résultats chez la souris femelle ont été exploités. Voir tableau ci-dessous indiquant les données chez la souris femelle :

| Type de tumeurs | Dose Administrée (ppm) | Incidence des tumeurs |
|-----------------|------------------------|-----------------------|
| Hépatiques      | 0                      | 3/45                  |
|                 | 2 000                  | 16/46                 |
|                 | 4 000                  | 40/46                 |
| Pulmonaires     | 0                      | 3/45                  |
|                 | 2 000                  | 30/46                 |
|                 | 4 000                  | 41/46                 |

Méthode d'extrapolation : modèle multi-étapes linéarisé avec incorporation des informations sur la pharmacocinétique et le métabolisme du chlorure de méthylène. La dose interne estimée est basée sur le métabolisme du chlorure de méthylène *via* la voie de la glutathion-S-transférase en utilisant le modèle de Anderson *et al.*, 1987. La dose interne est ensuite corrigée en prenant en compte les différences de sensibilité inter-espèces en utilisant un facteur de correction par la surface.

L'ERU<sub>i</sub> proposé par l'US EPA n'est pas à utiliser pour des concentrations de chlorure de méthylène dans l'air supérieures à  $2 \cdot 10^4 \mu\text{g}/\text{m}^3$  car au dessus de cette concentration, le risque unitaire peut être différent de celui calculé ci-dessus. Ceci est dû au fait que ce risque unitaire a été calculé à partir d'un modèle pharmacocinétique.

Selon, l'US EPA, des incertitudes dans la valeur proposée résident dans l'utilisation du modèle de Anderson *et al.*, 1987, pour le calcul de la dose interne. Des incertitudes importantes existent concernant la pharmacocinétique, la pharmacodynamie et le mécanisme d'action cancérigène du chlorure de méthylène.

- Santé Canada propose une  $CT_{0,05}$  de  $2,2 \cdot 10^3 \text{ mg/m}^3$  pour une exposition par inhalation (1993).

Cette valeur correspond à la concentration qui induit une augmentation de 5 % de l'incidence des cancers.

Cette valeur est issue des données de cancérogenèses d'une étude par inhalation chez la souris (NTP, 1986). Les souris mâles ou femelles ont été exposées à 0, 2 000 ou 4 000 ppm (0, 6 940 ou 13 880  $\text{mg/m}^3$ ) de chlorure de méthylène durant 102 semaines. Une augmentation de l'incidence des carcinomes et adénomes hépatiques et pulmonaires a été observée chez les mâles et les femelles. Voir tableau ci-dessous :

| Espèce, sexe     | Type de tumeurs | Dose (ppm) | Incidence des tumeurs |
|------------------|-----------------|------------|-----------------------|
| Souris, mâles    | Pulmonaires     | 0          | 5/50                  |
|                  |                 | 2 000      | 27/50                 |
|                  |                 | 4 000      | 40/50                 |
|                  | Hépatiques      | 0          | 22/50                 |
|                  |                 | 2 000      | 24/49                 |
|                  |                 | 4 000      | 33/49                 |
| Souris, femelles | Pulmonaires     | 0          | 3/45                  |
|                  |                 | 2 000      | 30/46                 |
|                  |                 | 4 000      | 41/46                 |
|                  | Hépatiques      | 0          | 3/45                  |
|                  |                 | 2 000      | 16/46                 |
|                  |                 | 4 000      | 40/46                 |

A l'aide d'une modélisation multi-étapes, l'intervalle de valeurs pour les concentrations tumorigènes a été établie, de 94 ppm pour les adénocarcinomes pulmonaires chez les femelles à 1 030 ppm pour les adénocarcinomes hépatiques chez les mâles. Dans la mesure où le chlorure de méthylène n'est pas un cancérigène direct, une correction du rapport surface corporelle/masse n'a pas été effectuée. Ces valeurs ont été ensuite affinées par l'utilisation d'un modèle pharmacocinétique (PBPK) prenant en compte les variations interspécifiques des taux de métabolisation, notamment par la voie GST. Le modèle utilisé est le même que celui retenu par l'US EPA, Anderson *et al.*, 1987. D'après Santé Canada, 1993, il est important de noter que les résultats donnés par le modèle de Anderson *et al.*, 1987, peuvent varier en fonction des paramètres physiologiques que l'on incorpore dans le modèle. Les constantes cinétiques et métaboliques incorporées par Santé Canada dans le modèle PBPK ont été déterminées à partir d'études *in vivo* réalisées chez plusieurs espèces, y compris des volontaires sains

exposés à plusieurs doses de chlorure de méthylène et à partir d'études *in-vitro* menées sur des tissus provenant de différentes espèces animales et sur des tissus humains (Reitz *et al.*, 1988, 1989 ; Anderson *et al.*, 1987, 1991). Les constantes  $V_{max}$ ,  $K_m$  de la voie oxydative ont également été prises en compte dont celles déterminées chez l'homme.

L'intervalle de valeurs pour les  $CT_{0,05}$  corrigées est de 465 ppm (2 238  $mg/m^3$ ) à 4 106 ppm (14 248  $mg/m^3$ ). La plus petite valeur de la fourchette a été retenue comme  $CT_{0,05}$  soit 2238  $mg/m^3$ .

- L'OEHHA propose un  $ERU_i$  de  $10^{-6}$  ( $\mu g/m^3$ )<sup>-1</sup> pour une exposition par inhalation (2002).

Cette valeur est issue des données de cancérogenèse de l'étude du NTP (1986). Seules les tumeurs pulmonaires observées chez les souris femelles ont été prises en compte, car elles représentent l'indicateur le plus sensible. Un modèle multi-étapes linéarisé a été utilisé ainsi qu'un modèle PBPK (le type du modèle utilisé n'a pas été spécifié par l'OEHHA) apparemment celui de Anderson *et al.*, 1987, pour l'estimation de la dose interne en prenant en compte la différence de métabolisme par la voie GST.

#### Commentaires sur ces VTR

Les trois VTR proposées ont été élaborées à partir de l'étude du NTP, 1986, montrant une augmentation des tumeurs hépatiques et pulmonaires chez la souris. Les trois organismes utilisent un modèle multi-étapes et un modèle pharmacocinétique (PBPK), le modèle de Anderson *et al.*, 1987. pour le calcul de leurs VTR. La différence réside dans les types de tumeurs ou le sexe des animaux utilisés comme données de cancérogénèses et dans les valeurs de paramètres incorporés dans le modèle. L'US EPA et l'OEHHA estiment la dose interne et les différences entre les espèces en se basant sur le métabolisme du chlorure de méthylène *via* la voie de la glutathion-S-transférase alors que Santé Canada prend en compte également d'autres paramètres, comme les paramètres de la voie oxydative.

**D'autres organismes ont évalué le risque cancérogène du chlorure de méthylène pour l'homme.** Dans tous les cas, les données du NTP, 1986 ont été pris en compte et un modèle multi-étapes a été couplé à un modèle PBPK afin de prendre en compte les différences métaboliques entre la souris et l'homme.

L'OSHA en 1997 a estimé chez les travailleurs qu'une exposition à 25 ppm (88,25  $mg/m^3$ ) de chlorure de méthylène, 8 heures par jour, 5 jours par semaine pendant 45 ans induisait un risque de  $3,62 \cdot 10^{-3}$  (95<sup>ème</sup> percentile de la distribution), ce qui correspond à

un ERU<sub>i</sub> de  $4,10 \cdot 10^{-8}$  ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )<sup>-1</sup>. Les statistiques bayésiennes ont été intégrées dans les modèles utilisés par l'OSHA. Toutefois, cette valeur n'est pas utilisable pour la population générale car tous les paramètres humains retenus sont ceux pour le travailleur.

Marino *et al.*, 2006 et David *et al.*, 2006, ont repris le modèle PBPK développé par l'OSHA et ont intégré de nouvelles données. Un ERU<sub>i</sub> de  $2,70 \cdot 10^{-9}$  ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )<sup>-1</sup> pour la population générale a été ainsi calculée. Ces études sont nouvelles et aucune validation n'a été faite de la valeur ainsi proposée.

#### **6.4.2 VTR proposée par le client**

La proposition et les arguments du client ont été repris et sont les suivants :

« *Considérant que:*

- *le chlorure de méthylène apparaît comme globalement non génotoxique in vivo,*
- *les valeurs d'excès de risque unitaire par inhalation proposées par l'US EPA et le OEHHA surestiment largement le risque cancérigène pour l'homme compte-tenu du caractère spécifique d'espèce des effets cancérigènes observés chez la souris,*
- *les effets hépatiques observés chez les rongeurs, servant de base pour l'établissement d'une MRL par l'ATSDR, n'ont jamais été observés chez l'homme,*
- *la valeur guide du WHO repose sur des critères analytiques plutôt que physiologiques,*

*et considérant que :*

- *le chlorure de méthylène est métabolisé chez l'homme en monoxyde de carbone,*
- *les principaux effets toxiques chez l'homme liés à l'exposition au chlorure de méthylène incluent des effets réversibles sur le système nerveux central secondaires à la production de carboxyhémoglobine,*
- *la quantité de carboxyhémoglobine formée dépend de la concentration d'exposition au chlorure de méthylène et de la durée de l'exposition,*
- *la norme physiologique de carboxyhémoglobine pour des non-fumeurs, est de 0,3-0,7 % et de 3-8% chez les fumeurs,*

- *l'IPCS recommande que le taux de carboxyhémoglobine ne dépasse pas 2,5 %, même si le sujet se livre à une activité physique légère ou modérée,*
- *une augmentation de 0,1% de la carboxyhémoglobinémie est sans conséquence toxicologique, même pour les populations particulièrement sensibles (femmes enceintes, insuffisants cardio-respiratoires),*
- *l'étude de Di Vincenzo permet de calculer qu'une augmentation de 0,1% de la carboxyhémoglobinémie correspond à une exposition à 1 ppm (3 mg/m<sup>3</sup>) de chlorure de méthylène pendant 24 heures,*
- *la formation de carboxyhémoglobine est un processus réversible; avec une demi-vie d'élimination de 2 à 6,5 h, et qu'à ce niveau d'exposition il n'y a pas d'effet cumulatif prévisible,*

***Le client propose une valeur toxicologique de référence pour la protection de la santé des populations riveraines de l'installation de 3000 µg/m<sup>3</sup> pour une exposition vie entière. »***

#### **Commentaire sur cette VTR**

La VTR que propose le client est une valeur à seuil établie pour les effets systémiques. Le client retient comme effet critique les effets réversibles sur le système nerveux central secondaires à la production de carboxyhémoglobine. Ce choix a été réalisé car le client précise que le chlorure de méthylène apparaît comme globalement non génotoxique *in-vivo* et que les effets tumorigènes au niveau du foie et du poumon induits par le chlorure de méthylène chez la souris n'est pas transposable à l'homme.

En effet, les études mécanistiques ont montré un lien entre le métabolisme du chlorure de méthylène *via* la glutathion-S-transférase et les effets tumorigènes du foie et des poumons induits par le chlorure de méthylène chez la souris, mais l'expression et l'activité de la glutathion-S-transférase étaient significativement plus élevées chez la souris que chez les autres rongeurs et que chez l'homme. De plus, chez la souris, la voie du GST devient la voie principale lorsque la dose est suffisamment élevée. En revanche, chez d'autres espèces comme le hamster et l'homme, elle est peu utilisée, quelle que soit la dose (OMS/IPCS, 1996). Ceci montre que l'homme serait beaucoup moins sensible que la souris.

En partant de ces données, le client conclut qu'il est donc improbable que l'homme possède une activité enzymatique suffisante pour que l'exposition au chlorure de méthylène présente un risque cancérigène. Les données montrent bien que l'activité

enzymatique GST est plus faible dans les tissus humains que dans les tissus de souris et que l'homme serait alors moins sensible que la souris. Mais, rien n'indique clairement que l'activité enzymatique GST chez l'homme est insuffisante pour que l'exposition au chlorure de méthylène n'induisse pas un risque cancérigène.

Pour les raisons citées ci-dessus, il est difficile de conclure que le chlorure de méthylène n'est pas cancérigène pour l'homme et de proposer uniquement une VTR à seuil pour les effets non cancérigènes induits par le chlorure de méthylène à moins que cette VTR soit plus basse que celle élaborée pour les effets cancérigènes.

Nous conseillons donc de retenir l'hypothèse généralement admise (IARC, US EPA, OSHA) que le chlorure de méthylène pourrait être cancérigène pour l'homme et de proposer une VTR à partir des données du NTP, 1986, chez la souris. Par exemple, à l'aide d'un modèle prenant en compte les différences métaboliques entre la souris et l'homme.

#### **6.4.2 Proposition d'une VTR et discussion**

Nous conseillons donc d'utiliser une VTR pour les effets cancérigènes du chlorure de méthylène construite à partir des données du NTP, 1986 montrant une augmentation de l'incidence des adénomes et des carcinomes du foie et du poumon chez la souris.

Les études mécanistiques ont montré que le mécanisme d'action tumorigène du chlorure de méthylène chez la souris serait génotoxique (Graves et Green, 1996), il est donc conseillé de proposer une VTR sans seuil. De plus, la plupart des tests génotoxiques *in-vitro* donnent des résultats positifs pour le chlorure de méthylène.

Toutefois, les données ont également montré que la voie métabolique *via* la GST qui conduit au développement des tumeurs du foie et des poumons observées chez la souris est beaucoup moins activée chez les autres rongeurs et chez l'homme par rapport aux souris, ceci indiquant que l'homme serait beaucoup moins sensible que la souris. Il est donc indispensable que toutes ces données soient intégrées dans l'élaboration de la VTR.

Ces renseignements ont été pris en compte par l'US EPA, l'OEHHA et Santé Canada dans l'établissement de leur VTR. Santé Canada, retient l'ensemble des données concernant la pharmacocinétique, le métabolisme et le mécanisme d'action cancérigène du chlorure de méthylène observé dans les différentes espèces et chez l'homme (études *in-vivo* et *in-vitro*). Alors que, l'US EPA et l'OEHHA ont pris en compte la différence

métabolique du chlorure de méthylène entre les espèces, uniquement par la voie GST qui est la voie principale. La voie oxydative qui est secondaire, mais qui pourrait jouer un rôle dans l'effet cancérigène du chlorure de méthylène (Foster *et al.*, 1992) n'a pas été intégrée, contrairement à ce qui a été fait par Santé Canada.

Pour ces différentes raisons, il est recommandé de retenir la  $TC_{0,05}$  de  $2,2 \cdot 10^3 \text{ mg/m}^3$  proposée par Santé Canada. Cette  $TC_{0,05}$  correspond à un  $ERU_i$  de  $2,3 \cdot 10^{-8} \text{ } \mu\text{g/m}^3$ .

Néanmoins, il serait intéressant d'analyser dans le détail le modèle PBPK proposé par Marino *et al.*, 2006 et David *et al.*, 2006 et de voir les différences que propose ce modèle par rapport à celui développé par l'OSHA, ces deux modèles étant des modèles PBPK bayésiens. De plus, les paramètres pour la population générale pourraient être intégrés dans le modèle utilisé par l'OSHA.

## **7 REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUES**

1. Adams E., Spencer H., Rowe V., *et al.* Vapor toxicity of carbon tetrachloride determined by experiments on laboratory animals. *Arch Ind Hyg Occup Med*, 1952; 6: 50-66.
2. Allen J., Kligerman A., and Campell J. Cytogenetic analyses of mice exposed to dichloromethane. *Environ Mol Mutagen*, 1990; 15: 221-228.
3. Amacher D.E. and Zelljadt I. The morphological transformation of Syrian hamster embryo cells by chemicals reportedly nonmutagenic to Salmonella typhimurium. *Carcinogenesis*, 1983; 4(3): 291-296.
4. Andervont H.B. Induction of hepatomas in strain C3H mice with 4-o-tolylazo-o-toluidine and carbon tetrachloride. *J Natl Cancer Inst*, 1958; 20: 431-438.
5. Andresen M.E., Clewell H.J., Gargas M.L., *et al.* Physiologically based pharmacokinetics and the risk assessment process for methylene chloride. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1987; 87 (2): 185-205.
6. Araki A., Kamigaito N., and Sasaki T. Mutagenicity of carbon tetrachloride and chloroform in salmonella typhimurium TA98, TA100, TA1535, and TA1537, and Escherichia coli WP2/pKM101, using a gas exposure method. *Environ Mol Mutagen*, 2004; 43: 128-133.
7. ATSDR, *Toxicological Profile for Chloroform*. 1997, Agency for Toxic substances and Disease Registry: Research Triangle Institute.
8. ATSDR, *Toxicological profile for methylene chloride*. 2000, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta, GA: U.S department of Health and Human Services, Public Health Services: Atlanta.
9. ATSDR, *Toxicological Profiles for 1,2-dichloroethane*. 2001, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta, GA: US department of Health and Human Services, Public Health Services.

10. ATSDR, *Toxicological Profiles for Carbon Tetrachloride*. 2005, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta, GA: U.S Department of Health and Human Services, Public Health Services.
11. Austin S.G. and Schnatter A.R. A case-control study of chemical exposures and brain tumors in petrochemical workers. *J Occup Med*, 1983a; 25: 313-320.
12. Austin S.G. and Schnatter A.R. A cohort mortality study of petrochemical workers. *J Occup Med*, 1983b; 25: 304-312.
13. Azri S., Mata H.P., Gandolfi A.J., *et al.* CCL4-induced cytochrome P-450 loss and lipid peroxidation in rat liver slices. *Biol Reactive Intermediates*, 1991: 669-674.
14. Baars A.J., Theelen R.M.C., Janssen P.J.C.M., *et al.*, *Re-evaluation of human-toxicological maximum permissible risk levels*. 2001, RIVM, Rijksinstituut voor volksgezondheid en milieu.
15. Baertsch A., Lutz W.K., and Schlatter C. Effect of inhalation exposure regimen on DNA binding potency of 1,2-dichloroethane in the rat. *Arch Toxicol*, 1991; 65: 169-176.
16. Ballering L.A., Nivard M.J.M., and Vogel E.W. Characterization of the genotoxic action of three structurally related 1,2-dihaloalkanes in *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res*, 1993; 285: 209-217.
17. Banerjee S. DNA damage in rodent liver by 1,2-dichloroethane, a hepatocarcinogen. *Cancer Biochem Biophys*, 1988; 10: 165-173.
18. Barber E.D., Donish W., and Mueller K.R. A procedure for the quantitative measurement of the mutagenicity of volatile liquids in the Ames Salmonella/microsome assay. *Mut Res*, 1981; 90: 31-48.
19. Barbin A., Bereziat J.C., and Bartsch H. Evaluation of DNA damage by the alkaline elution technique in liver, kidneys and lungs of rats and hamsters treated with N-nitrosodialkylamines. *Carcinogenesis*, 1983; 4(5): 541-545.
20. Beddowes E.J., Faux S.P., and Chipman J.K. Chloroform, carbon tetrachloride and glutathione depletion induce secondary genotoxicity in liver cells via oxidative stress. *Toxicology*, 2003; 187: 101-115.
21. Benigni R., Andreoli C., and Conti L. Quantitative structure-activity relationship models correctly predict the toxic and aneuploidizing properties of six halogenated methanes in *Aspergillus nidulans*. *Mutagenesis*, 1993; 8(4): 301-305.
22. Benson J.M., Tibbetts B.M., and K.D. T. Uptake, tissue distribution, and fate of inhaled carbon tetrachloride: Comparison of rat, mouse, and hamster. *Inhal Toxicol*, 2001; 13: 207-217.
23. Benson L.O. and Teta M.J. Mortality due to pancreatic and lymphoproliferative cancers in chloroform production workers. *Br J Ind Med*, 1993; 50: 710-716.
24. Bermudez E., Mirsalis J.C., and Eales H.C. Detection of DNA damage in primary cultures of rat hepatocytes following in vivo and in vitro exposure to genotoxic agents. *Environ Mutagen*, 1982; 4: 667-679.
25. Blair A., Hartge P., Stewart P.A., *et al.* Mortality and cancer incidence of workers at an aircraft maintenance facility exposed to trichloroethylene and other organic solvents and chemicals : Extended follow-up. *Occup Environ Med*, 1998; 55: 161-171.
26. Blair A., Stewart P.A., Tolbert P.E., *et al.* Cancer and other causes of death among a cohort of dry cleaners. *Br J Ind Med*, 1990; 47: 162-168.

27. Bomski H., Sobolewska A., and Strakowski A. Toxic damage of the liver by chloroform in chemical industry workers. *Int Arch Gewerbepathol Gewerbehyg*, 1967; 24: 127-34 [in German].
28. Bond G.G., Flores G.H., Shellenberger R.J., *et al.* Nested case-control study of lung cancer among chemical workers. *Am J Epidemiol*, 1986; 124: 53-66.
29. Brambilla G., Carlo P., and Finollo R. Viscometric detection of liver DNA in rats treated with minimal doses of chemical carcinogens. *Cancer Res*, 1983; 43: 202-209.
30. Brennan R.J. and Schiestl R.H. Chloroform and carbon tetrachloride induce intrachromosomal recombination and oxidative free radicals in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res*, 1998; 397: 271-278.
31. Burek J.D., Nitschke K.D., Bell T.J., *et al.* Methylene chloride: a two-year inhalation toxicity and oncogenicity study in rats and hamsters. *Fundam Appl Toxicol*, 1984; 4: 30-47.
32. Butterworth B.E., Smith-Oliver T., and Earle L. Use of primary cultures of human hepatocytes in toxicology studies. *Cancer Res*, 1989; 49: 1075-108.
33. Butterworth B.E., Templin M.V., and Constan A.A. Long-term mutagenicity studies with chloroform and dimethylnitrosamine in female lacI transgenic B6C3F1 mice. *Environ Mol Mutagen*, 1998; 31: 248-256.
34. Callen D.F., Wolf C.R., and Philpot R.M. Cytochrome P-450 mediated genetic activity and cytotoxicity of seven halogenated aliphatic hydrocarbons in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res*, 1980; 77: 55-63.
35. Cantor K.P., Hoover R., and Mason T.J. Association of cancer mortality with halomethanes in drinking water. *J Natl Cancer Inst*, 1978; 61: 979-985.
36. Cantor K.P., Lunch C.F., and Hildesheim M. Drinking water source and chlorination byproducts.I. Risk of bladder cancer. *Epidemiology*, 1998; 9: 21-28.
37. Cantor K.P., Stewart P.A., Brinton L.A., *et al.* Occupational exposures and female breast cancer mortality in the United States. *J Occup Environ Med*, 1995; 37: 336-348.
38. Casanova M. Are you a man or a mouse ? *Regul Toxicol Pharmacol*, 1996; 24: 106.
39. Casanova M., Deyo D.F., and Heck H.A. Dichloromethane (Methylene chloride): Metabolisme to formaldehyde and formation of DNA-protein cross-links in B6C3F1 mice and Syrian golden hamsters. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1992; 114: 162-165.
40. CDHS, *Health effects of chloroforme*. 1990, California Department of Health Services. Air Toxicology and Epidemiology Section: Berkeley, CA.
41. Checkoway H., Wilcosky T., Wolf P., *et al.* An evaluation of the associations of leukemia and rubber industry solvent exposures. *Am J Ind Med*, 1984; 5: 239-249.
42. Cheever K.L., Cholakis J.M., el Hawari A.M., *et al.* Ethylene dichloride: the influence of disulfiram or ethanol on oncogenicity, metabolism, and DNA covalent binding in rats. *Fundam Appl Toxicol*, 1990; 14: 243-61.
43. Costa A., Weber G., Bartoloni St Omer F., *et al.* Experimental cancer of carbon tetrachloride in the rat. *Arch De Vicchi Anat Pat*, 1963; 39: 303.
44. Crebelli R., Benigini R., and Franekic J. Induction of chromosomes malsegregation by halogenated organic solvents in *Aspergillus nidulans*: unspecific or specific mechanism ,. *Mutat Res*, 1988; 101: 401-411.

45. Crebelli R., Carere A., and Leopardi P. Evaluation of 10 aliphatic halogenated hydrocarbons in the mouse bone marrow micronucleus test. *Mutagenesis*, 1999; 14(2): 207-215.
46. Crebelli R., Conti G., and Conti L. Induction of somatic segregation by halogenated aliphatic hydrocarbons in *Aspergillus nidulans*. *Mutat Res*, 1984; 138: 33-38.
47. Crespi C.L., Seixas G.M., and Rurner T.R. Mutagenicity of 1,2-dichloroethane and 1,2-dibromoethane in two human lymphoblastoide cell lines. *Mutat Res*, 1985; 142: 133-140.
48. David M., Clewell H.J., Gentry P., *et al.* Revised assessment of cancer risk to dichloromethane II. Application of probabilistic methods to cancer risk determinations. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2006; 45: 55-65.
49. De Flora S., Zancacchi P., and Camoirano A. Genotoxic activity and potency of 135 compounds in the Ames reversion test and in a bacterial DNA-repair test. *Mutat Res*, 1984; 133: 161-198.
50. Dean B.J. and Hodson-Walker G. An in vitro chromosome assay using cultured rat-liver cells. *Mutat Res*, 1979; 64: 329-337.
51. Della Porta G., Terracini B., and Shubik P. Induction with carbon tetrachloride of liver cell carcinomas in hamsters. *J Natl Cancer Inst*, 1961; 26: 855-863.
52. DeMarini D.M. and Brooks H.G. Induction of prophage lamdba by chlorinated organics: Detection of some single-species/single-site carcinogens. *Environ Mol Mutagen*, 1992; 19: 98-111.
53. DeMarini D.M., Shelton M.L., and Warren S.H. Glutathione S-transferase-mediated induction of GC AT transitions by halomethanes in *Salmonella*. *Environ Mol Mutagen*, 1997; 30: 440-447.
54. Devrereux T.R., Foley J.F., and Maronpot R.R. Ras proto-oncogene activation in liver and lung tumors from B6C3F1 mice exposed chronically to methylene chloride. *Carcinogenesis*, 1993; 14 (5): 795-801.
55. Diaz-Gomez M.I. and Castro J.A. Covalent binding of chloroform metabolites to nuclear proteins: No evidence for binding to nucleic acids. *Cancer Lett*, 1980; 9: 213-218.
56. DiRenzo A.B., Gandolfi A.J., and Spies I.G. Microsomal bioactivation and covalent binding of aliphatic halides to DNA. *Tox Lett*, 1982; 11: 243-252.
57. Dosemeci M., Cocco P., and Chow W.H. Gender differences in risk of renal cell carcinoma and occupational exposures to chlorinated aliphatic hydrocarbons. *Am J Ind Med*, 1999; 36: 54-59.
58. Doyle T.J., Sheng W., and Cerhan J.R. The association of drinking water source and chlorination by-products with cancer incidence among postmenopausal women in Iowa: a prospective cohort study. *Am J Public Health*, 1997; 87: 7.
59. D'Souza R.W., Fransis W.R., and Bruce R.D. *Physiologically based pharmacokinetic model for ethylene dichloride and its application in risk assessment.* in *Pharmacokinetics in risk assessment: Drinking water and health*. 1987; National Research Council: Washington. p. 286-301.
60. Dumas S., Parent M.E., and Siemiatycki J. Rectal cancer and occupational risk factors: A hypothesis-generating, exposure-based case-control study. *Int J Cancer*, 2000; 87: 874-879.

61. Dunnick J.K. and Melnick R.L. Assessment of the carcinogenic potential of chlorinated water: experimental studies of chlorine, chloramine, and trihalomethanes. *J Natl Cancer Inst*, 1993; 85: 817-22.
62. ECB, *Technical Guidance Document on Risk Assessment. Human Health Risk Characterisation. Revised Chapter, Final Draft*. 2006: Ispra.
63. ECTOC, *Derivation of Assessment Factors for human Risk Assessment*. 2003, Technical report n° 86.
64. Edwards J.E. Hepatomas in mice induced with carbon tetrachloride. *J Natl Cancer Inst*, 1941; 2: 197-199.
65. Edwards J.E. and Dalton A.J. Induction of cirrhosis of the liver of hepatomas in mice with caebon tetrachloride. *J Natl Cancer Inst*, 1942; 3: 19-41.
66. Edwards J.E., Heston W.E., and Dalton H.A. Induction of the carbon tetrachloride hepatoma in strain L. mice. *J Natl Cancer Inst*, 1942; 3: 297-301.
67. Eschenbrenner A.B. and Miller E. Studies on hepatomas-Size and spacing of multiple doses in the induction of carbon tetrachloride hepatomas. *J Natl Cancer Inst*, 1944; 4: 385-388.
68. Eschenbrenner A.B. and Miller E. Induction of hepatomas in mice by repeated oral administration of chloroform, with observations on sexe differences. *J Natl Cancer Inst*, 1945; 5: 251-255.
69. Eschenbrenner A.B. and Miller E. Studies on hepatomas - Size and spacing of multiple doses in the induction of carbon tetrachloride hepatomas. *J Natl Cancer Inst*, 1946; 4: 385-388.
70. Ferreri A.M., Rocchi P., and Capucci A. Induction of diphtheria toxin-resistant mutants in human cells by halogenated compounds. *Cancer Res and Clin Oncol*, 1983; 105: 111-112.
71. Foster J.R., Green T., Smith L.L., *et al*. Methylene chloride-an inhalation study to investigate pathological and biochemical events occurring in the lungs of mice over an exposure period of 90 days. *Fundam Appl Toxicol*, 1992; 18: 376-388.
72. Foureman P., Mason J.M., and Valencia R. Chemical mutagenesis testing in Drosophila.X. Rulsults of 70 coded chemicals tested for national toxicology program. *Environ Mol Mutagen*, 1994; 23 (3): 208-227.
73. Freedman M., Cantor K.P., and Lee N.L. Bladder cancer and drinking water: a population-based case-control study in washington Country, Maryland (United States). *Cancer Causes Control*, 1997; 8: 738-744.
74. Frezza E.E., Gerunda G.E., Farinati F., *et al*. CCl<sub>4</sub>-induced liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma in rats : relation to plasma zinc, copper and estradiol levels. *Hepatogastroenterology*, 1994; 41: 367-369.
75. Friedlander B.R., Hearne T., and Hall S. Epidemiologic investigation of employees chronically exposed to methylene chloride. Mortality analysis. *J Occup Med*, 1978; 20: 657-666.
76. Fry B.J., Taylor T., and Hathway D.E. Pulmonary elimination of chloroform and its metabolite in man. *Arch Int Pharmacodyn Ther*, 1972; 196: 98-111.
77. Fujie K., Aoki T., and Wada M. Acute and subacute cytogenetic effects of the trihalomethanes on rats bone marrow cells in vivo. *Mutat Res*, 1990; 242: 111-119.

78. Galli A. and Schiestl R.H. Effects of Salmonella assay negative and positive carcinogens on intrachromosomal recombination in G1-arrested yeast cells. *Mutat Res*, 1996; 370: 209-221.
79. Galli A. and Schiestl R.H. Effects of Salmonella assay negative and positive carcinogens on intrachromosomal recombination in S-phase arrested yeast cells. *Mutat Res*, 1998; 419: 53-68.
80. Garry V.F., Nelson R.L., and Griffith J. Preparation for human study pesticide applicators: Sister chromatid exchanges and chromosome aberrations in cultured human lymphocytes exposed to selected fumigants. *Teratog Carcinog Mutagen*, 1990; 10: 21-29.
81. Gocke E., King M.T., and Eckhardt K. Mutagenicity of cosmetics ingredients licensed by the European communities. *Mutat Res*, 1981; 90: 91-109.
82. Gocke E., King M.T., and Eckhardt K. Mutagenicity of cosmetic ingredient licensed by European Communities. *Mutat Res*, 1981; 90: 91-109.
83. Goldberg M.S., Al-Homsi N., and Goulet L. Incidence of cancer among persons living near a municipal solid landfill site in Montreal, Quebec. *Arch Environ Health*, 1995; 50: 416-424.
84. Graves R.J., Coutts C., and Green T. Methylene chloride-induced DNA damage: An interspecies comparison. *Carcinogenesis*, 1995; 16 (8): 1919-1926.
85. Graves R.J. and Green T. Mouse liver glutathione S-transferase mediated metabolism of methylene chloride to a mutagen in the CHO/HPRT assay. *Mutat Res*, 1996; 367: 143-150.
86. Green T. Methylene chloride induced mouse liver and lung tumours: An overview of the role of mechanistic studies in human safety assessment. *Hum Exp Toxicol*, 1997; 16: 3-13.
87. Gualandi G. Genotoxicity of the free-radical producers of CCL4 and lipoperoxide in *Aspergillus nidulans*. *Mutat Res*, 1984; 136: 109-114.
88. Haehner B.D., Gorski J.C., and Vandenbranden M. Bimodal distribution of renal cytochrome P450 3A activity in humans. *Mol Pharmacol*, 1996; 50: 52-59.
89. Hansen J. Elevated risk for male breast cancer after occupational exposure to gasoline and vehicular combustion products. *Am J Ind Med*, 2000; 37 (4): 349-52.
90. Hard G.C., Boorman G.A., and Wolf D.C. Re-evaluation of the 2 year chloroforme drinking water carcinogenicity bioassay in Osborne Mendel rats supports chronic renal tubule injury as the mode of action underlying renal tumor response. *Toxicol Sci*, 2000; 53: 237-244.
91. Hearne F.T., Grose F., Pifer J.W., et al. Methylene chloride mortality study: dose-response characterization and animal model comparison. *J Occup Med*, 1987; 29: 217-228.
92. Heywood R., Sortwell R.J., Noel P.R., et al. Safety evaluation of toothpaste containing chloroform. III. Long-term study in beagle dogs. *J Environ Pathol Toxicol*, 1979; 2: 835-51.
93. Hildesheim M.E., Cantor K.P., Lynch C.F., et al. Drinking water sources and chlorination byproducts: risk of colon and rectal cancers. *Epidemiology*, 1998; 9(1): 29-35.
94. Hogstedt C., Rohlen O., and Berndtsson B.S. A cohort study of mortality and cancer incidence in ethylene oxide production workers. *Br J Ind Med*, 1979; 36: 276-280.

95. IARC. *Carbon Tetrachloride - Evaluation of some organic chemicals, hydrazine and hydrogen peroxide*. IARC Monographs on the Evaluation of carcinogenic risks to humans. Vol. 71. 1987, Lyon: International Agency for Research on Cancer: 401-432.
96. IARC, *Chloroform*. 1999, International Agency for Research on Cancer.
97. IARC. *Carbon Tetrachloride - Reevaluation of some organic chemicals, hydrazine and hydrogen peroxide*. IARC Monographs on the Evaluation of carcinogenic risks to humans. Vol. 71. 1999, Lyon: International Agency for Research on Cancer: 401-432.
98. IARC. *Dichloromethane - Re-evaluation of some organic chemicals, hydrazine and hydrogen peroxide*. IARC Monographs on the Evaluation on Carcinogenic Risks to Humans. Vol. 71 (part 1). 1999, Lyon, France: World Health Organization - International Agency for Research on Cancer: 251-315.
99. IARC. *1,2-Dichloroethane. In: Some Halogenated Hydrocarbons*. IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, ed. International Agency for Research on Cancer. Vol. 20. 1999, Lyon: 429-448.
100. Ijsselmuiden C.B., Gaydos C., and Feighner B. Cancer of the pancreas and drinking water: A population based case control study in Washington County, Maryland. *American journal of Epidemiology*, 1992; 136(7): 836-842.
101. Isacson P., Bean J.A., Splinter R., *et al.* Drinking water and cancer incidence in Iowa. III. Association of cancer with indices of contamination. *Am J Epidemiol*, 1985; 121: 856-69.
102. Jagannath D.R., Vultaggio D.M., and Brusick D.J., *Genetic activity of forty-two coded compounds in the mitotic gene conversion assay using saccharomyces cerevisiae strain D4*, in *Evaluation of short-term tests for carcinogens*. 1981, Report of the International Collaborative Program.
103. Japan Bioassay Research Center, *Subchronic inhalation toxicity and carcinogenicity studies of carbon tetrachloride in F344 rats and B6C3F1 mice*. 1998, Japan Industrial Safety and Health Association., Japan Bioassay Research Center (Unpublished report to the Ministry of Labor). Hirasawa Hadano Kanagawa,.
104. Janssen D. and Ramel C. The micronucleus test as part of a short-term mutagenicity test program for the prediction of carcinogenicity evaluated by 143 agents tested. *Mutat Res*, 1980; 75: 191-202.
105. JOCE. Commission Directive 93/101/EC, 20<sup>th</sup> time Council directive 67/548EEC. *Official Journal of the European Communities*, 1993.
106. JOCE. Commission Directive 2004/73/EC, 29<sup>th</sup> time Council directive 67/548EEC. *Official Journal of the European Communities*, 2004.
107. Johnstone R.T. Occupational medicine and industrial hygiene. *St. Louis, MO : CV Mosby Co*, 1948: 148-158.
108. Jongen W.M.F., Lohman P.H.M., and Kottenhagen M.J. Mutagenicity testing of dichloromethane in short-term mammalian test systems. *Mutat Res*, 1981; 81: 203-213.
109. Jorgenson T.A., Meierhenry E.F., Rushbrook C.J., *et al.* Carcinogenicity of chloroform in drinking water to male Osborne-Mendel rats and female B6C3F1 mice. *Fundam Appl Toxicol*, 1985; 5: 760-9.
110. Kanno J., Foley J.F., and Kari F.W. Effect of methylene chloride inhalation on replicative DNA synthesis in the lungs of female B6C3F1 mice. *Environ Health Perspect*, 1993; 101 (suppl 5): 271-276.

111. Kari F.W., Foley J.F., Seilkop S.K., *et al.* Effect of varying exposure regimens on methylene chloride-induced lung and liver tumors in female B6C3F1 mice. *Carcinogenesis*, 1993; 14: 819-826.
112. Kassinova G.V., Kovaltsova S.V., and Marfin S.V. Activity of 40 coded compounds in differential inhibition and mitotic crossing-over assays in yeast. *Environmental Health Criteria*, 1981; 163.
113. Kauppinen T., Pukkaka E., and Saalo A. Exposure to chemical carcinogens and risk of cancer among Finnish laboratory workers. *Am J Ind Med*, 2003; 44: 343-350.
114. Kernan G.J., Ji B.T., Dosemeci M., *et al.* Occupational risk factors for pancreatic cancer: a case-control study based on death certificates from 24 U.S. states. *Am J Ind Med*, 1999; 36: 260-70.
115. King M.T., Beikirch H., and Eckhardt K. Mutagenicity studies with X-ray-contrast media, analgesics, antipyretics, antirheumatics and some other pharmaceutical drugs in bacterial, Drosophila and mammalian test systems. *Mutat Res*, 1979; 66: 33-43.
116. King W.D. and Marrett L.D. Case control study of water sources and bladder cancer. *Cancer Causes Control*, 1996; 7: 596-604.
117. Kirkland D.J., Smith K.L., and Van Abbe N.J. Failure of chloroform to induce chromosome damage or sister chromatid exchanges in cultured human lymphocytes and failure to induce reversion in Escherichia coli. *Food Cosmet Toxicol*, 1981; 19: 651-656.
118. Kitchin K.T. and Brown J.L. Biochemical effects of three carcinogenic chlorinated methanes in rat liver. *Teratog Carcinog Mutagen*, 1989; 9: 61-69.
119. Kitchin K.T. and Brown J.L. Biochemical effects of three carcinogenic chlorinated methanes in rat liver. *Teratogenesis Carcinog Mutagen*, 1989; 9: 61-69.
120. Kitchin K.T. and Brown J.L. Dose-response relationship for rat liver DNA damage caused by 49 rodent carcinogens. *Toxicology*, 1994; 88: 31-49.
121. Klaunig J.E., Ruch R.J., and Pereira M.A. Carcinogenicity of chlorinated methane and ethane compounds administered in drinking water to mice. *Environ Health Perspect*, 1986; 69: 89-95.
122. Klimisch H.-J., Andreae M., and Tillmann U. A systematic approach for evaluating the quality of experimental toxicological and ecotoxicological data. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 1997; 25: 1-5.
123. Koch I., Weil R., and Wolbold R. Interindividual variability and tissue-specificity in the expression of cytochrome P450 3A mRNA. *Drug Metab Dispos*, 2002; 30 (10): 1108-1114.
124. Land P.C., Owen E.L., and Linde H.W. Morphologic changes in mouse spermatozoa after exposure to inhalational anesthetics during early spermatogenesis. *Anesthesiology*, 1981; 54: 53-6.
125. Lanes S.F., Chen A., and Rothman K.J. Mortality of cellulose fiber production workers. *Scand J Work Environ Health*, 1990; 16: 247-251.
126. Lanes S.F., Rothman K.J., Dreyer N.A., *et al.* Mortality update of cellulose fiber production workers. *Scand J Work Environ Health*, 1993; 19: 426-428.
127. Larson J.L., Sprankle C.S., and Butterworth B.E. Lack of chloroform-induced DNA repair in vitro and in vivo in hepatocytes of female B6C3F1 mice. *Environ Mol Mutagen*, 1994; 23: 132-136.

128. LeCurieux F., Gauthier L., and Efb F. Use of the SOS chromotest, the Ames-fluctuation test and the newt micronucleus test to study the genotoxicity of four trihalomethanes. *Mutagenesis*, 1995; 10: 333-341.
129. Li L.H., Jiang X.Z., and Liang Y.X. Studies on the toxicity and maximum allowable concentration of chloroform. *Biomed Environ Sci*, 1993; 6 (2): 179-186.
130. Loveday K.S., Andersen B.E., and Resnick M.A. Chromosome aberration and sister chromatid exchange tests in Chinese hamster ovary in vitro. results with 46 chemicals. *Environ Mol Mutagen*, 1990; 16: 272-303.
131. Mainwaring G.W., Williams S.M., and Foster J.R. The distribution of theta-class glutathione S-transferase in the liver and lung of mouse, rat and human. *Biochem J*, 1996; 318: 297-303.
132. Maltoni C., Cotti G., and Perino G. Long-term carcinogenicity bioassays on methylene chloride administered by ingestion to Sprague-Dawley rats and Swiss mice and by inhalation to Sprague-Dawley rats. *Ann N Y Acad Sci*, 1988; 534: 352-366.
133. Maltoni C., Valgimigli L., and Scarnato C. *Long-term carcinogenic bioassays on ethylene dichloride administered by inhalation to rats and mice*. Ethylene dichloride: A potential health risk? Banbury report N° 5, ed. Ames B.N., Infante P., and Reitz R. 1980: Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory: 3-33.
134. Marino J., Harvey J., Clewell P., *et al.* Revised assessment of cancer risk to dichloromethane: Part I Bayesian PBPK and dose-response modeling in mice. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2006; 45: 44-54.
135. Maronpot R.R., Devereux T.R., and Hegi M. Hepatic and pulmonary carcinogenicity of methylene chloride in mice: A search of mechanisms. *Toxicol*, 1995; 102: 73-81.
136. Matsushima T. Inhalation carcinogenesis study of chloroform. *Letter summary from T. Matsushima (Japan Bioassay Labory) to A. Chiu (U.S. EPA)*, 1994.
137. McCann J., Choi E., and Yamasaki E. Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: Assay of chemicals. *Proc Nat Acad*, 1975; 72: 5135-5139.
138. McGeehin M.A. and al e. Case-control study of bladder cancer and water disinfection methods in Colorado. *Am j Epidemiol*, 1993; 138: 492-501.
139. Mehta R.D. and Von Borstel R.C., *Mutagenic activity of forty two encoded compounds in the haploid yeast reversion assay, strain XV18514C*, in *Evaluation of short-term tests for carcinogens*. 1981, Report of the International Collaborative Programm.
140. Mennear J.H., McConnell E.E., Huff J.E., *et al.* Inhalation toxicity and carcinogenesis studies of methylene chloride (dichloromethane) in F344/N rats and B6C3F1 mice. *Ann N Y Acad Sci*, 1988; 534: 343-351.
141. Milman H.A., Story D.L., and Riccio E.S. *Rat liver foci in vitro assays to detect initiating and promoting effects of chlorinated ethanes and ethylenes*. Annals of the New York academy of Sciences. Living in a chemical world. Occupational and Environmental Significance of Industrial Carcinogens International Conference., ed. Maltoni C S., I.J. 1988, Bologna, Italy: 521-530.
142. Mirsalis J., Tyon K., and Butterworth B. Detection of genotoxic carcinogens in the vivo-vitro hepatocyte DNA repair assay. *Environ Mutagen*, 1982; 4: 553-562.

143. Mirsalis J.C. and Butterworth B.E. Detection of unscheduled DNA synthesis in hepatocytes isolated from rats treated with genotoxic agents: An in vivo-in vitro assay for potential carcinogens and mutagens. *Carcinogenesis*, 1980; 1: 621-625.
144. Mitchell A., Myhr B., and Rudd C. Evaluation of the L5178Y mouse lymphoma cell mutagenesis assay: Intra-laboratory results for sixty-three coded chemicals tested at SRI International. *Environ Mol Mutagen*, 1988; 12 (Suppl 13): 37-101.
145. Morimoto K. and Koizumi A. Trihalomethanes induce sister chromatid exchanges in human lymphocytes in vitro and mouse bone marrow cells in vivo. *Environ Res*, 1983; 32: 72-79.
146. Nagano K., Nishizawa T., and Yamamoto S. Inhalation carcinogenesis studies of six halogenated hydrocarbons in rats and mice. *Elsevier Science B.V.*, 1998.
147. NCI, *Report on carcinogenesis bioassay of chloroform*. 1976, National Cancer Institute - Carcinogenesis Program: Bethesda, MD.
148. NCI, *Carcinogenesis bioassay of trichloroethylene*. 1976, National Cancer Institute: Bethesda, MD.
149. NCI, *Bioassay of 1,1,1-Trichloroethane for possible carcinogenicity*. 1977, National Cancer Institute: Bethesda, MD.
150. NCI, *Bioassay of technical grade 1,2-dichloroethane for possible carcinogenicity*. 1978, National Cancer Institute, Division of Cancer Cause and Prevention, Carcinogenesis Testing program: Bethesda, MD.
151. Nitschke K.D., Burek J.D., Bell T.J., et al. Methylene chloride: a 2-year inhalation toxicity and oncogenicity study in rats. *Fundam Appl Toxicol*, 1988; 11: 48-59.
152. NTP, *Technical report on the toxicology and carcinogenesis studies of dichloromethane (methylene chloride) (CAS N° 75-09-2) in F344/N rats and B6C3F1 mice (inhalation studies)*. 1986, National Toxicology Program. U.S. Department of Health and Human Services: Research Triangle Park, NC.
153. Nylander P.O., Olofsson H., and Rasmuson B. Mutagenic effects of petrol in *Drosophila melanogaster*: I. Effects of benzene and 1,2-dichloroethane. *Mutat Res*, 1978; 57: 163-167.
154. Oda Y., Yamazaki H., and Thier R. A new *Salmonella typhimurium* NM5004 strain expressing rat glutathione S-transferase 5-5: Use in detection of genotoxicity of dihaloalkanes using an SOS/umu test system. *Carcinogenesis*, 1996; 17: 297-302.
155. OEHHA, *REL Chloroforme*. 2002, Office of Environmental Health Hazard Assessment.
156. OEHHA, *ERU; Chloroforme*. 2002, Office of Environmental Health Hazard Assessment.
157. OEHHA, *ERU; methylene chloride*. 2002, Office of Environmental Health Hazard Assessment.
158. OEHHA, *ERU; 1,2-dichloroethane*. 2002, Office of Environmental Health Hazard Assessment.
159. OMS. *Air Quality Guidelines for Europe*. 2nd ed. World Health Organization. 2000, Copenhagen.

160. OMS, *International Programme on chemical Safety. Chloroform*. 2004, Concise International Chemical Assessment Document (CICAD) n° 58 World Health Organization.
161. OMS IPCS, *Environmental Health Criteria 163:Chloroform*. 1994, World Health Organisation, International Program on Chemical Safety (IPCS).
162. OMS IPCS, *Environmental Health Criteria n°176 : 1,2-Dichloroethane - 2nd Ed.* 1995, World Health Organisation, International Programme on chemical Safety.
163. OMS IPCS, *Methylene chloride - Environmental Health Criteria 164*. 1996, World Health organisation - International Programme on Chemical Safety.
164. OSHA, *Occupational Exposure to Methylene chloride. Part II*. 1997, Occupational Safety and Health Administration.
165. Palmer A.K., Street A.E., Roe F.J., *et al.* Safety evaluation of toothpaste containing chloroform. II. Long term studies in rats. *J Environ Pathol Toxicol*, 1979; 2: 821-33.
166. Pegram R.A., Andersen M.E., and Warren S.H. Glutathione S-transferase mediated mutagenicity of trihalomethanes in Salmonella typhimutium: contrastong results with bromodichloromethane and chloroform. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1997; 144: 183-188.
167. Pereira M.A., Lin L.H., Lippitt J.M., *et al.* Trihalomethanes as initiators and promoters of carcinogenesis. *Environ Health Perspect*, 1982; 46: 151-156.
168. Perocco P. and Prodi G. DNA damage by haloalkanes in human lymphocytes cultured in vitro. *Cancer Lett*, 1981; 13: 213-218.
169. Potter C.L., Chang L.W., and DeAngelo A.B. Effects of four trihalomethanes on DNA strand breaks, renal hyaline droplet formation and serum testosterone in male F-344 rats. *ancer Lett*, 1996; 106: 235-242.
170. Prager J.C. *Environmental contaminant Reference Databook*. Vol. 1. 1995: Van Nostrand Reinhold: 453-457.
171. Prodi G., Arfellini G., and Colacci A. Interaction of halocompounds with nucleic acids. *Toxicol Pathol*, 1986; 14: 438-444.
172. Rapson W.H., Nazar M.A., and Butsky W. Mutagenicity produced by aqueous chlorination of organic compounds. *Bull Environ Contam Toxicol*, 1980; 24: 590-596.
173. Raucy J.L., Kraner J.C., and Lasker J.M. Bioactivation of halogenated hydrocarbons by cytochrome P4502E1. *Crit Rev Toxicol*, 1993; 23: 1-20.
174. Reeve G.R., Bond G.G., and Lloyd j.W. An investigation of brain tumors among chemical plant employees using a sample-based cohort method. *J Occup Med*, 1983; 25: 387-393.
175. Reitz R.H., Fox T.R., and Quast J.F. Mechanistic considerations for carcinogenic risk estimation: Chloroforme. *Environ Health Perspect*, 1982; 45: 163-168.
176. Reitz R.H., Fox T.R., Ramsey J.C., *et al.* Pharmacokinetics and macromolecular interactions of ethylene dichloride in rats after inhalation or gavage. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1982; 62: 190-204.
177. Reitz R.H., Fox T.R., Ramsey J.C., *et al.* Pharmacokinetics and macromolecular interactions of ethylene dichloride in rats after inhalation or gavage. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1982; 62: 190-204.

178. Reuber M.D. Carcinogenicity of chloroform. *Environ Health Perspect*, 1979; 31: 171-82.
179. Robbiano L., Meretoe E., and Migliazza Morando A. Increased frequency of micronucleated kidney cells in rats exposed to halogenated anaesthetics. *Mutat Res*, 1998; 413: 1-6.
180. Roe F.J., Palmer A.K., Worden A.N., *et al.* Safety evaluation of toothpaste containing chloroform. I. Long-term studies in mice. *J Environ Pathol Toxicol*, 1979; 2: 799-819.
181. Roldlan-Arjona T., Garcia-Pedrajas M.D., and Luque-Romero F.L. An association between mutagenicity of ARA test of Salmonella typhimurium and carcinogenicity in rodents for 16 halogenated aliphatic hydrocarbons. *Mutagen*, 1991; 6(3): 199-205.
182. Ruch R.J., Crist K.A., and Klaunig J.E. Effects of cultured duration on hydrogen peroxide-induced hepatocyte toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1989; 100: 451-464.
183. Ruddick J.A., Villeneuve D.C., Chu I., *et al.* A teratological assessment of four trihalomethanes in the rat. *J Environ Sci Health [B]*, 1983; 18: 333-49.
184. Salamone M.F., Heddle J.A., and Katz M. Mutagenic activity of 41 compounds in the in vivo micronucleus assay, in : Evaluation of short-term tests for carcinogens : report of the international Collaborative Program. *Prog Mutat Res*, 1981; 1: 686-697.
185. San Agustin J. and Lim-Sylianco C.Y. Mutagenic and clastogenic effects of chloroform. *Bull Phil Biochem Soc*, 1978; 1: 17-23.
186. Santé Canada, *Methylene chloride*. 1993.
187. Sanzgiri U.Y., Kim H.J., Muralidhara S., *et al.* Effect of route and pattern of exposure on the pharmacokinetics and acute hepatotoxicity of carbon tetrachloride. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1995; 134: 148-154.
188. Sanzgiri U.Y., Srivattan V., and Muralidhara S. Uptake, distribution, and elimination of carbon tetrachloride in rat tissue following inhalation and ingestion exposures. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1997; 143: 120-129.
189. Sasaki T.M., Sakaguchi M., and Yamada H. Evaluation of micronucleus induction in mice by four organochlorine pesticides: 1,2-dibromo-3-chloropropane, 1,3-dichloropropene, 1,2-dichloroethane, and nitrofen. *MMS Com*, 1994; 2: 87-93.
190. Sasaki T.M., Suzuki K., and Noda T. Mutagenicity study of carbon tetrachloride and chloroform with microbial mutagenicity test and rat liver micronucleus test. *J Toxicol Sci*, 1998; 23 (suppl. II): 305.
191. Sasaki Y.F., Saga A., and Akasaka M. Detection of in vivo genotoxicity of haloalkanes and haloalkenes carcinogenic to rodents by the alkaline single cell gel electrophoresis (comet) assay in multiple mouse organs. *Mutat Res*, 1998; 419: 13-20.
192. Sawada S., Yamanaka T., and Yamatsu K. Chromosome aberrations, micronuclei and sister-chromatid exchange (SCEs) in liver induced in vivo by hepatocarcinogens including heterocyclic amines. *Mutat Res*, 1991; 251: 59-69.
193. Schwarz M., Hummel J., and Appel K.E. DNA damage induced in vivo evaluated with a non-radioactive alkaline elution technique. *Cancer Lett*, 1979; 6: 221-226.
194. Selden J.R., Dolbeare F., and Miller J.E. Validation of a flow cytometric in vitro DNA repair (UDS) assay in rat hepatocytes. *Mutat Res*, 1994; 315 (2): 147-167.
195. Serota D.G., Thakur A.K., Ulland B.M., *et al.* A two-year drinking-water study of dichloromethane in rodents. II. Mice. *Food Chem Toxicol*, 1986a; 24: 959-963.

196. Serota D.G., Thakur A.K., Ulland B.M., *et al.* A two-year drinking-water study of dichloromethane in rodents. I. Rats. *Food Chem Toxicol*, 1986b; 24: 951-958.
197. Shelby M.D. and Witt K.L. Comparaison of results from mouse bone marrow chromosome aberration and micronucleus tests. *Environ Mol Mutagen*, 1995; 25: 302-313.
198. Sheldon T., Richardson C.R., and Hamilton K., *Methylene chloride: An evaluation in the mouse micronucleus test*. 1986, ICI Central Toxicology Laboratory: OTS.
199. Sheratt P.J., Pulford D.J., and Harrison D.J. Evidence that human class Theta glutathion S-transferase T1-1 can catalyse the activation of dichloromethane, a liver and lung carcinogen in the mouse: Comparison of the tissue distribution of GST T1-1 with that of classes alpha, mu and pi GSTin human. *Biochem J*, 1997; 326: 837-846.
200. Simmon V.F., Kauhanen K., and Tardiff R.G. *Mutagenic activity of chemicals identified in drinking water*. in *Progress in genetic toxicology*, Scott D., Bridges D.A., and Sobels, Editors. 1977; Biomedical Press: Elsevier/North Holland. p. 249-258.
201. Sina J.F., Bean C.L., and GR D. Evaluation of the alkaline elution/rat hepatocyte assay as a predictor of carcinogenic/mutagenic potentiel. *Mutat Res*, 1983; 113: 357-391.
202. Sobti R.C. Sister chromatid exchange induction potentiel of the halogenated hydrocarbone produced during water chlorination. *Chloroform Information Service*, 1984; 37: 17-19.
203. Spirtas R., Stewart P.A., and Lee J.S. Retrospective cohort mortality study of workers at an aircraft maintenance facility. I. Epidemiological results. *Br J Ind Med*, 1991; 48: 515-530.
204. Spreafico F., Zuccato E., Marcucci F., *et al.* *Pharmacokinetics of ethylene dichloride in rats treated by different routes and its long-term inhalatory toxicity*. Etylene dichloride: A potential health risk?, ed. Ames B.N., Infante P., and Reitz R. Vol. (Banbury reportN°5). 1980, New York: Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory: 107-133.
205. Steinmetz K.L., Green C.E., and Bakke J.P. Induction of unscheduled DNA synthesis in primary cultures of rats, mouse, hamster, monkey, and human hepatocytes. *Mutat Res*, 1988; 206: 91-102.
206. Stewart B.W. Generation and persistence of carcinogen-induced repair intermediates in rat liver DNA in vivo. *Cancer Res*, 1981; 41: 3238-3243.
207. Storer R.D. and Conolly R.B. Comparative in vivo genotoxicity and acute hepatotoxicity of three 1,2-dihaloethanes. *Carcinogenesis*, 1983; 4: 1491-1494.
208. Storer R.D. and Conolly R.B. An investigation of the role of microsomal oxidative metabolism in the in vivo genotoxicity of 1,2-dichloroethane.. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1985; 77: 36-46.
209. Storer R.D., Jackson N.M., and Conolly R.B. In vivo genotoxicity and acute hepatotoxicity of 1,2-dichloroethane in mice: Comaparaison of oral, interperitoneal, and inhalation routes of exposure. *Cancer Res*, 1984; 44: 4267-4271.
210. Suzuki H., Hirano N., and Watanabe C. Carbon tetrachloride does not induce micronucleus in either mouse bone marrow or peripheral blood. *Mut Res*, 1997; 394 (1-3): 77-80.

211. Tafazoli M., Baeten A., and Geerlings P. In vitro mutagenicity and genotoxicity of a number of short-chain chlorinated hydrocarbons using the micronucleus test and the alkaline single cell gel electrophoresis technique (Comet assay) in human lymphocytes: A structure-activity relationship (QSAR) analysis of the genotoxic and cytotoxic potential. *Mutagenesis*, 1998; 13 (2): 115-126.
212. Tan E.L. and Hsie A.W. Mutagenicity and cytotoxicity of haloethanes as studies in the CHO/HGPRT system. *Mutat Res*, 1981; 90: 183-191.
213. Taningher M., Parodi S., and Grilli S. Lack of correlation between alkaline DNA fragmentation and DNA covalent binding induced by polychloroethanes after in vivo administration: Problems related to the assessment of a carcinogenic hazard. *Cancer Detect Prevent*, 1991; 15: 35-39.
214. Templin M.V., Constan A.A., and Wolf D.C. Patterns of chloroform-induced regenerative cell proliferation in BDF<sub>1</sub> mice correlate with organ specificity and dose-response of tumor formation. *Carcinogenesis*, 1998; 19: 187-193.
215. Teta M.J., Ott M.G., and Schnatter A.R., *An update of mortality due to brain neoplasms and other causes among employees of petrochemical facility.*, in *Union Carbide Corporation*,. 1989, CT: OTS 0000743: Danbury.
216. Thilagar A.K., Back A.M., and Kirby P.E. Evaluation of dichloromethane in short term in vitro genetic toxicity assays. *Environ Mutagen*, 1984; 6: 418-419.
217. Thrall K.D., Vucelick M.E., and Gies R.A. Comparative metabolism of carbon tetrachloride in rats, mice and hamsters using gas uptake and PBPK modeling. *J Toxicol Environ Health*, 2000; 60: 531-548.
218. Tomenson J.A., Bonner S.M., Heijne C.G., *et al.* Mortality of workers exposed to methylene chloride employed at a plant producing cellulose triacetate film base. *Occup Environ Med*, 1997; 54: 470-476.
219. Topham J.C. Do induced sperm-head abnormalities in mice specifically identify mammalian mutagens rather than carcinogens? *Mut Res*, 1980; 74: 379-387.
220. Torkelson T.R., Oyen F., and Rowe V.K. The toxicity of chloroform as determined by single and repeated exposure of laboratory animals. *Am Ind Hyg Assoc J*, 1976; 37: 697-705.
221. Tracey J.P. and Sherlock P. Hepatoma following carbon tetrachloride poisoning. *NYJ Med*, 1968; 68: 2202-2204.
222. Tumasonis C.F., McMartin D.N., and Bush B. Toxicity of chloroform and bromodichloromethane when administered over a lifetime in rats. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, 1987; 7: 55-63.
223. Uehleke H., Werner T., and Greim H. Metabolic activation of haloalkanes and tests in vitro for mutagenicity. *Xenobiotica*, 1977; 7: 393-400.
224. US EPA, *Toxics in the community: National and local perspectives*. 1991, US Environmental Protection Agency, Office of toxic Substances: Washington.
225. US EPA, *Reference guide to odor thresholds for hazardous air pollutants listed in the clean air act amendments of 1990*. 1993, U.S. Environmental Protection Agency, Environmental Criteria and Assessment Office.: Washinton.
226. US EPA, *Proposed guidelines for carcinogen risk assessment*. 1996, U.S. Environmental Protection Agency, Office of Health and Environmental Assessment: Washington. p. 17960-18011.

227. US EPA, *Health risk assessment/characterization of drinking water disinfection byproduct chlorofome*. Prepared for Health and ecological Criteria Division, Office of Science and Technology. 1998, U.S. Environmental Protection Agency, Risk: Washington.
228. US EPA, *Guidelines for carcinogenic risk assessment*. 1999, U.S. Environmental Protection Agency, Risk Assessment Forum.: Review Draft.
229. US EPA, *Toxicological review of chloroforme*. 2001, U.S. Environmental Protection Agency, Risk Assessment Forum: Washington.
230. US EPA (IRIS), *1,2-dichloroethane*. 1991, U.S. Environmental Protection Agency - Integrated Risk Information System - Carcinogenicity Assessment for lifetime exposure.
231. US EPA (IRIS), *Methylene chloride - Carcinogenicity Assessment for lifetime exposure (ERUi)*, in *U.S. Environmental Protection Agency - Integrated Risk Information System - Carcinogenicity Assessment for lifetime exposure*. 1995.
232. US EPA (IRIS), *Chloroform - Reference dose for chronic oral exposure assessment (RfD) - Carcinogenicity Assessment for lifetime exposure (ERUi)*, in *U.S. Environmental Protection Agency - Integrated Risk Information System*. 2001.
233. Van Abbe N.J., Green T.J., and Richold M. Bacterial mutagenicity studies on chloroform in vitro. *Food Chem Toxicol*, 1982; 20: 557-561.
234. Van Bladeren P.J. Metabolic activation of xenobiotics: Ethylene dibromide and structural analog. *J Am Coll Toxicol*, 1983; 2: 73-83.
235. Van\_Duuren B.L., Goldschmidt B.M., Loewengart G., *et al.* Carcinogenicity of halogenated olefinic and aliphatic hydrocarbons in mice. *J Natl Cancer Inst*, 1979; 63: 1433-9.
236. Varma M.M., Ampy F.R., and Verma K. In vitro mutagenicity of water contaminants in complex mixtures. *J Appl Toxicol*, 1988; 8: 243-248.
237. Vena J.E., Graham S., and Freudenheim J.O. Drinking water, fluid intake, and bladder cancer in Western New York. *Archives of Environmental Health*, 1993; 48 : (8).
238. Volgel E.W. and Nivard M.J.M. Performance of 181 chemicals in a Drosophila assay predominantly monitoring interchromosomal mitotic recombination. *Mutagenesis*, 1993; 8: 57-81.
239. Wauthier V., Verbeeck R.K., and Calderon P.B. Age-related changes in the protein and mRNA levels of CYP2E1 and CYP3A isoforms as well as in the hepatic activities in Wistar rats. what role for oxidative stress ? *Arch Toxicol*, 2004; 78: 131-138.
240. Waxweiler R.J., Alexander V., and Leffingwell S.S. Mortality from brain tumor and other causes in a cohort of petrochemical workers. *J Natl Cancer Inst*, 1983; 70: 75-81.
241. Wecher R.A. and Scher S. *Bioassay procedures for identifying genotoxic agents using light-emitting bacteria as indicator organisms*. in *Luminescent assays: perspectives in endocrinology and clinical chemistry.*, Seno M. and Pazzagli M., Editors. 1982; Raven Press: New York. p. 109-113.
242. Weisburger E.K. Carcinogenicity studies on halogenated hydrocarbons. *Environ Health Perspect*, 1977; 21: 7-16.

243. White A.E., Takehisa S., and Eger E.I. Sister chromatid exchanges induced by inhaled anesthetics. *Anesthesiology*, 1979; 50: 426-430.
244. Wilcosky T.C., Checkoway H., Marshall E.G., *et al.* Cancer mortality and solvent exposures in the rubber industry. *Am Ind Hyg Assoc J*, 1984; 45: 809-811.
245. Wittaker S.G., Zimmermann F.K., Dicus B., *et al.* Detection of induced mitotic chromosome loss in *Saccharomyces cerevisiae*- an interlaboratory study. *Mutat Res*, 1989; 224: 31-78.
246. Zangar R.C., Benson J.M., and Burnett V.L. Cytochrome P450 E1 is the primary enzyme responsible for low-dose carbon tetrachloride metabolism in human liver microsomes. *Chem Biol Interact*, 2000; 125: 233-243.
247. Zierler S., Feingold L., and Danley R.A. Bladder cancer in Massachusetts related to chlorinated chloraminated drinking water: A case control study. *Archives of Environmental Health*, 1988; 43 (2): 195-200.

## **8 ANNEXES :**

### **ANNEXE 1 :Description et analyse de la qualité scientifique de l'étude de Nagano *et al.*, 1998**

L'étude de Nagano *et al.*, 1998 a pour but d'examiner le possible effet cancérigène de six hydrocarbures halogénés (bromure de méthylène, tétrachlorure de carbone, chloroforme, tétrachloroéthylène, 1,2-dichloroéthane et p-dichlorobenzène chez les rats F344 et chez les souris BDF1. Le détail de cette étude et l'évaluation de sa qualité scientifique est présentée ci-dessous.

- **Substances testées et % de pureté :** bromure de méthylène et p-dichlorobenzène (> 99,9 % de pureté). Tétrachlorure de carbone, chloroforme, tétrachloroéthylène et 1,2-dichloroéthane (> 99 % de pureté).
- **Espèces étudiées :** rats mâles et femelles F344 et souris mâles et femelles BDF1
- **Sexe et nombre d'animaux par lot :** 50 par lot et par sexe pour les deux espèces.
- **Voie d'exposition :** inhalation en chambre d'exposition.
- **Temps et fréquence d'exposition :** 6 h/j, 5 jour par semaine pendant 104 semaines
- **Concentrations d'exposition :** différentes en fonction des substances et des espèces testées (voir tableau des résultats page suivante).
- **Groupe témoin :** 50 pour les deux espèces (exposition à de l'air, dans les chambres d'exposition).

- **Informations supplémentaires sur le protocole :** des études préliminaires ont été réalisées chez les 2 espèces sur 2 et 13 semaines afin de déterminer la concentration tolérable maximale. Pour l'étude principale cette concentration maximale correspond à la concentration la plus élevée. Les animaux ont été observés tous les jours en ce qui concerne les signes cliniques et une fois par jour pour la mortalité. Ils ont été pesés toutes les semaines pendant les 13 premières semaines et ensuite toutes les 4 semaines. A la semaine 105, tous les animaux vivants ont été sacrifiés et une autopsie complète a été réalisée sur chaque animal. Une autopsie a été également pratiquée sur les animaux morts au cours de l'exposition ou sacrifiés car ils étaient moribonds.
- **Effet(s) observé(s) et résultats :** seules les résultats obtenus pour les substances d'intérêt pour ce travail sont indiqués dans le tableau suivant. Les substances sont le tétrachlorure de carbone, le chloroforme et le 1,2-dichloroéthane.

| Substances               | Espèces et sexes | Type de tumeurs et localisation        | * Résultats et concentration en ppm |       |        |         |
|--------------------------|------------------|--|-------------------------------------|-------|--------|---------|
|                          |                  |  | 0 ppm                               | 5 ppm | 25 ppm | 125 ppm |
| Tétrachlorure de carbone | Rats mâles       | Adénomes hépatocellulaires             | 0 ppm                               | 5 ppm | 25 ppm | 125 ppm |
|                          |                  |  | 0/50                                | 1/50  | 1/50   | 21/50   |
|                          |                  | Carcinomes hépatocellulaires           | 1/50                                | 0/50  | 0/50   | 32/50   |
|                          | Rats femelles    | Adénomes hépatocellulaires             | 0/50                                | 0/50  | 0/50   | 40/50   |
|                          |                  | Carcinomes hépatocellulaires           | 0/50                                | 0/50  | 3/50   | 15/50   |
|                          | Souris mâles     | Adénomes hépatocellulaires             | 0 ppm                               | 5 ppm | 25 ppm | 125 ppm |
|                          |                  |  | 9/50                                | 10/50 | 27/50  | 16/50   |
|                          |                  | Carcinomes hépatocellulaires           | 17/50                               | 12/50 | 44/50  | 47/50   |
|                          |                  | Phéochromocytome de la glande adrénaie | 0/50                                | 0/50  | 16/50  | 31/50   |
|                          | Souris femelles  | Adénomes hépatocellulaires             | 2/50                                | 8/49  | 17/50  | 5/49    |
|                          |                  | Carcinomes hépatocellulaire            | 2/50                                | 1/49  | 33/50  | 48/49   |
|                          |                  | Phéochromocytome de la glande adrénaie | 0/50                                | 0/49  | 0/50   | 22/49   |
|                          | Rats mâles       |  | 0 ppm                               | 5 ppm | 25 ppm | 125 ppm |

| Substances         | Espèces et sexes             | Type de tumeurs et localisation       | * Résultats et concentration en ppm            |        |        |         |
|--------------------|------------------------------|---------------------------------------|--|--------|--------|---------|
|                    |                              |                                       | Aucune augmentation de l'incidence des tumeurs |        |        |         |
|                    | Rats femelles                |                                       | Aucune augmentation de l'incidence des tumeurs |        |        |         |
|                    | Souris mâles                 | Adénomes des cellules rénales         | 0 ppm  | 5 ppm  | 30 ppm | 90 ppm  |
|                    |                              |                                       | 0/50   | 0/50   | 3/50   | 1/48    |
|                    |                              | Carcinomes des cellules rénales       | 0/50   | 1/50   | 4/50   | 11/48   |
| Souris femelles    | Carcinomes hépatocellulaires | 1/50                                  | 1/50   | 0/50   | 3/50   |         |
| 1,2-Dichloroéthane | Rats mâles                   | Fibroadénome de la glande mammaire    | 0 ppm  | 10 ppm | 40 ppm | 160 ppm |
|                    |                              |                                       | 0/50   | 0/50   | 1/50   | 5/50    |
|                    |                              | Fibromes des tissus sous-cutanés      | 6/50   | 9/50   | 12/50  | 15/50   |
|                    |                              | Mésothélium du péritoine              | 1/50   | 1/50   | 1/50   | 5/50    |
|                    | Rats femelles                | Adénomes des glandes mammaires        | 3/50   | 5/50   | 5/50   | 11/50   |
|                    |                              | Fibroadénomes des glandes mammaires   | 4/50   | 1/50   | 6/50   | 13/50   |
|                    |                              | Adénocarcinomes des glandes mammaires | 1/50   | 2/50   | 0/50   | 5/50    |
|                    |                              | Fibromes des tissus sous-cutanées     | 0/50   | 0/50   | 1/50   | 5/50    |
|                    | Souris mâles                 | Hémangiosarcomes du foie              | 0 ppm  | 10 ppm | 30 ppm | 90 ppm  |
|                    |                              |                                       | 0/50   | 4/49   | 6/50   | 5/50    |
|                    | Souris femelles              | Adénomes hépatocellulaires            | 1/49   | 1/50   | 1/50   | 6/50    |
|                    |                              | Adénomes bronchio-alvéolaires         | 4/49   | 1/50   | 3/50   | 8/50    |
|                    |                              | Carcinomes bronchio-alvéolaires       | 1/49   | 0/50   | 1/50   | 3/50    |
|                    |                              | Adénocarcinomes des glandes mammaires | 1/49   | 2/50   | 1/50   | 6/50    |
|                    |                              | Polypes de l'endomètre de l'utérus    | 2/49   | 0/50   | 1/50   | 5/50    |

\* Résultats exprimés en nombre d'animaux ayant des tumeurs sur le nombre d'animaux totaux

- **Qualité de l'étude (BPL ou Klimisch)** . Des tests statistiques ont été réalisés par les auteurs. Par contre, aucune étude de la relation dose-réponse n'a été faite. La conclusion porte sur les différents types de tumeurs observés chez les rats et les souris sans préciser la significativité de l'augmentation de chaque type de tumeurs en fonction de la concentration testée.

Cotation de Klimisch retenue : 2 e.