

anses

agence nationale de sécurité sanitaire
alimentation, environnement, travail



Valeur toxicologique de référence des acides haloacétiques

Avis de l'Anses
Rapport d'expertise collective

Novembre 2011

Édition scientifique

anses

agence nationale de sécurité sanitaire
alimentation, environnement, travail



Valeur toxicologique de référence des acides haloacétiques

Avis de l'Anses
Rapport d'expertise collective

Novembre 2011

Édition scientifique

Le directeur général

Maisons-Alfort, le 10 novembre 2011

AVIS de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

relatif à « l'élaboration de valeurs toxicologiques de référence par voie orale
fondées sur les effets reprotoxiques pour l'acide dichloroacétique, l'acide
trichloroacétique et l'acide dibromoacétique »

L'Anses met en œuvre une expertise scientifique indépendante et pluraliste.

L'Anses contribue principalement à assurer la sécurité sanitaire dans les domaines de l'environnement, du travail et de l'alimentation et à évaluer les risques sanitaires qu'ils peuvent comporter.

Elle contribue également à assurer d'une part la protection de la santé et du bien-être des animaux et de la santé des végétaux et d'autre part l'évaluation des propriétés nutritionnelles des aliments.

Elle fournit aux autorités compétentes toutes les informations sur ces risques ainsi que l'expertise et l'appui scientifique technique nécessaires à l'élaboration des dispositions législatives et réglementaires et à la mise en œuvre des mesures de gestion du risque (article L.1313-1 du code de la santé publique).

Ses avis sont rendus publics.

L'Afsset s'est auto-saisie le 24 juillet 2009 afin d'élaborer une valeur toxicologique de référence par voie orale pour l'acide dichloroacétique, l'acide trichloroacétique et l'acide dibromoacétique.

1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE

Le Directeur général de la santé (DGS) du ministère de la santé et des sports, le Directeur général de la prévention des pollutions et des risques (DGPR) et le Directeur de l'eau et de la biodiversité du ministère de l'écologie, de l'énergie, du développement durable et de l'aménagement du territoire ont saisi l'agence le 22 décembre 2006 d'une demande d'évaluation des risques sanitaires liés aux baignades publiques non encadrées par la réglementation en vigueur. Dans le cadre de la saisine « **Évaluation des risques sanitaires liés à la présence de dangers chimiques et/ou biologiques dans l'eau, l'air et les surfaces des piscines réglementées** » menée par le groupe de travail d'experts « Évaluation des risques sanitaires liés à la qualité des eaux et des produits et procédés de traitement des eaux de piscines », la construction de valeurs toxicologiques de référence spécifiques (VTR) pour protéger des effets reprotoxiques avérés des acides haloacétiques (AHA) a été envisagée.

Les acides haloacétiques constituent, avec l'hydrate de chloral, les principaux sous-produits chlorés de désinfection présents dans l'eau potable et dans les eaux de piscine où ils se trouvent généralement aux concentrations les plus élevées. Ils sont produits par réaction du chlore avec les matières organiques naturelles.

L'acide dichloroacétique (DCA) est l'AHA le plus représenté dans les eaux de piscines françaises et internationales (de l'ordre de 600 µg/L, OMS, 2006). L'acide trichloroacétique (TCA) est le deuxième AHA le plus représenté dans les eaux de piscines françaises et internationales (de l'ordre de 150 µg/L, OMS, 2006). Quant à l'acide dibromoacétique (DBA), on le retrouve dans les eaux de piscines françaises et internationales à des concentrations de l'ordre de 10 µg/L (OMS, 2006).

L'Agence a confié en juillet 2009 au groupe de travail « Valeurs toxicologiques de référence » l'élaboration de valeurs toxicologiques de référence (VTR) pour ces substances.

Une VTR, est un indice toxicologique qui permet de qualifier ou de quantifier un risque pour la santé humaine. Elle établit le lien entre une exposition à une substance toxique et l'occurrence d'un effet sanitaire indésirable. Les VTR sont spécifiques d'une durée d'exposition (aiguë, subchronique ou chronique) et d'une voie d'exposition (orale ou respiratoire). La construction des VTR diffère en fonction des connaissances ou des hypothèses formulées sur les mécanismes d'action des substances. Actuellement, l'hypothèse par défaut est de considérer une relation monotone entre l'exposition ou la dose, et l'effet ou la réponse. En l'état actuel des connaissances et par défaut, on considère généralement que, pour les effets non cancérogènes, la toxicité ne s'exprime qu'au-delà d'un seuil de dose (US EPA, 1998). La construction d'une VTR est donc définie de la manière suivante :

VTR= Dose critique/UF

avec *Dose critique* = NOAEC, LOAEC ou BMDL

UF = facteur d'incertitude global appliqué

En pratique, la construction de la VTR comprend les quatre étapes suivantes :

- choix de l'effet critique ;
- choix d'une étude de bonne qualité scientifique permettant généralement d'établir une relation dose-réponse ;
- choix ou construction d'une dose critique à partir des doses expérimentales et/ou des données épidémiologiques ;
- application de facteurs d'incertitude à la dose critique pour tenir compte des incertitudes.

L'élaboration des VTR suit une approche très structurée et exigeante qui implique des évaluations collectives par des groupes de spécialistes.

2. ORGANISATION DE L'EXPERTISE

L'expertise a été réalisée dans le respect de la norme NF X 50-110 « Qualité en expertise – Prescriptions générales de compétence pour une expertise (Mai 2003) » avec pour objectif de respecter les points suivants : compétence, indépendance, transparence, traçabilité.

L'expertise relative à la construction de la relève du domaine de compétences du Comité d'Experts Spécialisés (CES) « Évaluation des risques liés aux substances chimiques ». L'Anses a confié l'expertise au groupe de travail « Valeurs toxicologiques de référence ». Les travaux ont été soumis régulièrement au CES tant sur les aspects méthodologiques que scientifiques entre le 22 octobre 2009 et le 18 février 2010. Ils ont été adoptés par le

CES « Évaluation des risques liés aux substances chimiques » réuni le 7 janvier 2010 pour l'acide dichloroacétique et l'acide trichloroacétique et le 18 février 2010 pour l'acide dibromoacétique.

Le présent avis se fonde pour les aspects scientifiques sur le rapport final issu de cette expertise collective « Élaboration de VTRs par voie orale fondées sur les effets reprotoxiques pour l'acide dichloroacétique, l'acide trichloroacétique et l'acide dibromoacétique » daté d'avril 2010.

3. ANALYSE ET CONCLUSIONS DU CES

L'acide dichloroacétique (DCA), l'acide trichloroacétique (TCA) et l'acide dibromoacétique (DBA) sont des substances chimiques non volatiles, très polaires et très solubles. La voie d'exposition majoritaire est l'ingestion. Des VTR ont ainsi été construites pour la voie orale.

■ VTR de l'acide dichloroacétique (CAS 79-43-6)

1. VTR pour les effets sur le développement

• *Choix de l'effet critique*

Des malformations cardio-vasculaires sont observées dans 3 études chez le rat. D'autres malformations sont également observées (urogénitales, oculaires). Ces malformations surviennent en présence d'une toxicité maternelle. Le caractère cependant modéré de la toxicité maternelle, le type de malformations (atteinte cardio-vasculaire), leur survenue lors d'étude *in vitro* ne plaident cependant pas en faveur d'un rôle déterminant de la maternotoxicité. D'autre part, le choix de la gamme de doses retenue dans ces études ne permet pas de considérer ces effets maternels comme survenant avant les effets cardiaques.

Les experts ont retenu l'augmentation de l'incidence des malformations cardiaques comme effet critique pour construire une VTR orale.

• *Choix de l'étude*

Parmi les études, l'étude Smith *et al.* (1992)¹ a été considérée de bonne qualité (classée Klimisch 1). Elle comprend 4 doses testées et montre une relation dose-effet (tableau 1).

¹ Smith MK *et al.*, 1992. Developmental toxicity of dichloroacetate in the rat. *Teratology* 46(3), 217-223.

Tableau 1 : Incidence des malformations fœtales suite à une exposition maternelle au DCA aux jours 6 à 15 de gestation (rat Long Evans)

Dose mg/kg p.c/j	Nombre de portées atteintes	Nombre de portées
0	0	39
14	1	18
140*	2	19
400*	6	19

* significatif $p < 0,05$

- *Choix de la dose critique*

Conformément aux recommandations de l'Agence concernant la méthode de construction de VTR fondées sur des effets sur la reproduction et le développement², elle est utilisable pour calculer une VTR aiguë pour les effets sur le développement. Il a été proposé la construction d'une Benchmark Dose (BMD) à partir des résultats présentés dans le tableau 1.

Les données disponibles ont été modélisées avec le logiciel Proast 18.2 du RIVM afin d'élaborer une Benchmark Dose. Il apparaît dans l'étude clé une relation dose-réponse significative entre l'augmentation des malformations cardiaques et la dose journalière d'exposition au DCA (tableau 1) (test de Kruskal Wallis).

L'objectif de la démarche est d'estimer la dose correspondant à un niveau de réponse défini ou à un pourcentage défini de réponse supplémentaire par rapport au témoin. Ce niveau ou ce pourcentage est appelé BMR pour Benchmark Response level. C'est majoritairement la BMDL, autrement dit la limite inférieure de l'intervalle de confiance de la BMD, qui est considérée comme dose repère. Les données expérimentales ont été ajustées par les modèles développés par le RIVM pour des données dichotomiques (modèles gamma, logistique, multi-étapes, probit, Weibull, etc.)

Le choix du modèle s'est fait sur celui qui s'ajustait le mieux aux données expérimentales par la méthode du maximum de vraisemblance (Log Likelihood) : le modèle log-logist a été retenu pour l'estimation de la limite inférieure de l'intervalle de confiance à 90%³ d'une dose correspondant à une augmentation de l'incidence des malformations fœtales par rapport au groupe non exposé de 5%. Ce modèle est celui dont le maximum de vraisemblance se rapprochait le plus du modèle « full ». Les $BMD_{5\%}$ et $BMD_{L_{90\%}}$ ont été calculées, car le seuil de 5% est généralement retenu dans les études de reprotoxicité. La $BMD_{5\%}$ est égale à **45,2 mg/kg p.c/j**, la $BMD_{5\%L_{90\%}}$ à **24,6 mg/kg p.c/j**.

- *Choix des facteurs d'incertitude et ajustement allométrique*

Pour tenir compte de la variabilité inter-espèces, un ajustement allométrique a été réalisé, et a permis de calculer une HED (Human Equivalent Dose), à l'aide de l'équation suivante (US EPA, 2006) :

$$\text{Dose équivalente homme} = \text{Dose animal} \times \left(\frac{\text{Poids animal}}{\text{Poids homme}} \right)^{1/4}$$

² Afsset, 2007 Construction d'une valeur toxicologique de référence pour les substances reprotoxiques»

³ La limite inférieure de l'intervalle de confiance à 95% (one-side ou « un côté ») utilisée par l'US EPA, est équivalente à la limite inférieure de l'intervalle de confiance à 90% (two-side ou « deux coté ») utilisée par le RIVM.

Le poids moyen des rats a été déterminé d'après les données décrites dans l'étude et mesurées au jour 20. Il est égal à 339 g. Celui de l'homme est estimé à 70 kg. Les doses sont exprimées en mg/kg/j.

Soit, dose équivalente chez l'homme = dose animale*0,26 (ce qui reviendrait à appliquer un facteur qui tient compte de la variabilité toxicocinétique de 3,8).

Pour tenir compte de la variabilité toxicodynamique et d'incertitudes résiduelles, un facteur d'incertitude a été fixé à 2,5 selon les recommandations du document de référence pour « la construction d'une valeur toxicologique de référence pour les substances reprotoxiques » (Afsset, 2007). La valeur du facteur d'incertitude pour la variabilité inter-espèces est donc de 2,5.

Une valeur finale de 2,5 par défaut a été choisie pour la variabilité intra-espèces, $UF_H = 10$ (variabilité intra-espèces ou interindividuelle).

2. VTR pour les effets sur la fertilité

- *Choix de l'effet critique*

Les experts ont retenu les effets observés sur les organes reproducteurs mâles, et plus particulièrement la diminution du nombre de spermatozoïdes pour construire une VTR orale.

- *Choix de l'étude*

L'étude de Toth *et al.*⁴ sur le rat peut-être classée Klimisch 2e. Des atteintes sont montrées au niveau testiculaire à toutes les doses (tableau 2). Elle est donc utilisable pour calculer une VTR chronique sur les effets sur le développement.

Tableau 2 : Diminution du nombre de spermatozoïdes ($10^6/g$) au niveau de l'épididyme suite à une exposition au DCA chez des rats males Long Evans)

Dose (mg/kg p.c/j)	Moyenne (nombre de spermatozoïdes ($10^6/g$) au niveau de l'épididyme)	Écart type	Nombre d'animaux
0	630.0	204.8	19
31,25	582.5	137.0	18
62,5*	502.6	163.5	18
125 *	367.8	91.6	19

* significatif $p < 0,05$

- *Choix de la dose critique*

Conformément aux recommandations de l'Agence concernant la méthode de construction de VTR fondées sur des effets sur la reproduction et le développement, il a été proposé la construction d'une benchmark dose.

Les données disponibles ont été modélisées avec le logiciel Proast du RIVM afin d'élaborer d'une Benchmark Dose (BMD). Il apparaît dans l'étude clé une relation dose-

⁴ Toth GP *et al.*, 1992. Adverse male reproductive effects following subchronic exposure of rats to sodium dichloroacetate. *Fundamental and Applied Toxicology: Official Journal of the Society of Toxicology* 19(1), 57-63.

réponse significative entre la diminution de spermatozoïdes et la dose journalière d'exposition au DCA (tableau 2).

L'objectif de la démarche est d'estimer la dose correspondant à un niveau de réponse défini ou à un pourcentage défini de réponse supplémentaire par rapport au témoin. Ce niveau ou ce pourcentage est appelé BMR pour Benchmark Response level. C'est majoritairement la BMDL, autrement dit la limite inférieure de l'intervalle de confiance de la BMD, qui est considérée comme dose repère.

Les données expérimentales ont été ajustées par les modèles développés par le RIVM pour des données continues.

Le choix du modèle s'est fait sur celui qui s'ajustait le mieux aux données expérimentales par la méthode du maximum de vraisemblance (Log Likelihood) et correspond au modèle exponentiel. Ce modèle est celui dont le maximum de vraisemblance se rapprochait le plus du modèle « full ». Le modèle a été retenu pour l'estimation de la limite inférieure de l'intervalle de confiance à 90% d'une dose correspondant à une diminution de 32,5% de spermatozoïdes (soit une fois l'écart type, EC⁵). Les BMD_{1xEC}⁶ et BMD_{1xEC}L_{90%} ont été calculées et sont égales à **91,1 mg/kg p.c/j** et **72,1 mg/kg p.c/j** respectivement.

- *Choix des facteurs d'incertitude et ajustement allométrique*

Pour tenir compte de la variabilité inter-espèces, un ajustement allométrique a été réalisé, et a permis de calculer une HED (Human Equivalent Dose), à l'aide de l'équation suivante⁷ :

$$\text{Dose équivalente homme} = \text{Dose animal} \times \left(\frac{\text{Poids animal}}{\text{Poids homme}} \right)^{1/4}$$

Le poids moyen du rat a été déterminé d'après les données décrites dans l'étude, et avant sacrifice. Il est de 484 g. Celui de l'homme est estimé à 70 kg. Les doses sont exprimées en mg/kg/j.

Soit dose équivalent chez l'homme = dose animale*0.29 (ce qui revient à appliquer un facteur qui tient compte de la variabilité toxicocinétique de 3,5).

Pour tenir compte de la variabilité toxicodynamique et d'incertitudes résiduelles, un facteur d'incertitude supplémentaire a été fixé à 2,5 selon les recommandations du document de référence pour « la construction d'une valeur toxicologique de référence pour les substances reprotoxiques » (Afsset, 2007).

Une valeur finale de 10 par défaut a été choisie pour la variabilité intra-espèces, UF_H = 10 (variabilité intra-espèces ou interindividuelle).

⁵ Cette approche a été proposée par l'US EPA comme approche par défaut lorsqu'aucun élément n'est disponible concernant le choix du niveau d'effet observé lors d'analyse biochimiques et biologiques dans le groupe témoin.

⁶ Cela revient à considérer comme valeur seuil la moyenne (nombre de spermatozoïdes chez le groupe non traité) moins une fois l'écart type du groupe non traité et correspond à une diminution de 32,5% de spermatozoïdes.

⁷ Cette équation est issue des recommandations de l'US EPA (US EPA, 2006).

Conclusions et recommandation de l'expertise collective relatives aux VTR du DCA

- **VTR développement**

Le CES propose une VTR par voie orale spécifique aux effets du DCA sur le développement foetal (effets tératogènes) applicable **pour une exposition aiguë**.

Effet critique	Dose critique*	Facteur d'incertitude	VTR
Augmentation des malformations cardiaques chez le rat Long Evans Smith <i>et al.</i> , 1992	BMD _{5%} L _{90%} =24,6 mg/kg p.c/j <u>Ajustement allométrique</u> BMD _{5%} L _{90%} HED = 6,5 mg/kg p.c/j	UF 25 UF _A 2,5 UF _H 10	VTR = 260 µg/kg p.c/j

*HED : Human Equivalent Dose ; il a été calculé à partir de l'équation précédente ;
 Afin de tenir compte de la variabilité toxicodynamique, un facteur d'incertitude UF_A été fixée à 2,5.

- **VTR fertilité**

Le CES propose une VTR par voie orale spécifique aux effets du DCA sur la fertilité applicable **pour une exposition chronique**.

Effet critique	Dose critique*	Facteur d'incertitude	VTR
Diminution de spermatozoïdes chez le rat Long Evans Toth <i>et al.</i> , 1992	BMD _{1xEC} L _{90%} = 72 mg/kg p.c/j <u>Ajustement allométrique</u> BMD _{1xEC} L _{90%} HED = 21 mg/kg p.c/j	UF 25 UF _A 2,5 UF _H 10	VTR = 840 µg/kg p.c/j

*HED, Human Equivalent Dose ; il a été calculé à partir de l'équation précédente ;
 Afin de tenir compte de la variabilité toxicodynamique, un facteur d'incertitude UF_A a été fixé à 2,5.

Le CES a attiré l'attention de l'Agence sur le fait que les VTR proposées pour les effets reprotoxiques (toxicité sur le développement et la fertilité) ne protégeaient pas des autres effets toxiques du DCA, notamment du cancer. Le CES recommande donc une analyse critique des VTR existantes, VTR fondées sur les effets cancérrogènes du DCA, et le cas échéant, l'élaboration d'une VTR spécifique pour les effets cancérrogènes.

■ VTR de l'acide trichloroacétique (CAS 76-03-9)

- *Choix de l'effet critique*

La synthèse des études préalablement détaillées permet de retenir comme effet critique les malformations cardiaques consécutives à une exposition maternelle au TCA pendant l'organogénèse. Les études de Singh (2006)⁸ mettent également en évidence des effets neurologiques et testiculaires en l'absence de toxicité maternelle significative mais le choix de la fourchette de doses retenues dans ces études ne permet pas de considérer ces effets comme survenant avant les effets cardiaques.

Les experts ont donc retenu l'augmentation de l'incidence des malformations cardiaques comme effet critique.

- *Choix de l'étude*

L'étude la plus appropriée pour calculer une valeur toxicologique de référence, mettant en évidence l'effet critique est l'étude de Smith *et al.* (1989)⁹ pour les raisons suivantes :

- qualité méthodologique générale et notamment le nombre d'animaux par groupe, le régime de doses et l'étude des fœtus,
- transparence des résultats permettant une exploitation statistique complète.

Cette étude a été considérée de bonne qualité (classé Klimisch 1).

- *Choix de la dose critique*

Il a été proposé la construction d'une Benchmark Dose à partir des résultats présentés dans le tableau 3.

Tableau 3 : Incidence des malformations fœtales suite à une exposition maternelle au TCA aux jours 6 à 15 de gestation (rat Long Evans)

Dose (mg/kg p.c/j)	Nombre de portées atteintes	Nombre de portées
0	1	26
330*	6	19
800*	12	17
1200*	11	14
1800*	8	8

* significatif $p < 0,05$

Les données disponibles ont été modélisées avec le logiciel Proast 18.2 du RIVM afin d'élaborer une Benchmark Dose (BMD). Il apparaît dans l'étude clé une relation dose-réponse significative entre l'augmentation des malformations cardiaques et la dose journalière d'exposition au TCA (tableau 1) (test de Kruskal Wallis).

L'objectif de la démarche est d'estimer la dose correspondant à un niveau de réponse défini ou à un pourcentage défini de réponse supplémentaire par rapport au témoin. Ce

⁸ Singh R. 2006 Neuroembryopathic effect of trichloroacetic acid in rats exposed during organogenesis.

⁹ Smith MK et al., 1989. Teratogenic activity of trichloroacetic acid in the rat. *Teratology* 40(5), 445-451.

niveau ou ce pourcentage est appelé BMR pour Benchmark Response level. C'est majoritairement la BMDL, autrement dit la limite inférieure de l'intervalle de confiance de la BMD, qui est considérée comme dose repère. Les données expérimentales ont été ajustées par les modèles développés par le RIVM pour des données dichotomiques (modèles gamma, logistique, multi-étapes, probit, Weibull...)

Le choix du modèle s'est fait sur celui qui s'ajustait le mieux aux données expérimentales par la méthode du maximum de vraisemblance (Log Likelihood): le modèle gamma a été retenu pour l'estimation de la limite inférieure de l'intervalle de confiance à 90% ¹⁰d'une dose correspondant à une augmentation de la réponse par rapport au groupe non exposé de 5%. Ce modèle est celui dont le maximum de vraisemblance se rapprochait le plus du modèle « full ». La **BMD_{5%}** est égale à **80,2 mg/kg p.c/j**, la **BMD_{5%}L_{90%}** à **28,6 mg/kg p.c/j**

- *Choix des facteurs d'incertitude et ajustement allométrique*

Pour tenir compte de la variabilité inter-espèces, un ajustement allométrique a été réalisé, et a permis de calculer une HED (Human Equivalent Dose), à l'aide de l'équation suivante (US EAP, 2006) :

$$\text{Dose équivalente homme} = \text{Dose animal} \times \left(\frac{\text{Poids animal}}{\text{Poids homme}} \right)^{1/4}$$

Le poids moyen des rats a été déterminé d'après les données décrites dans l'étude, et mesuré aux jours 20. Il est égal à 320 g. Celui de l'homme est estimé à 70 kg. Les doses sont exprimées en mg/kg p.c/j .

Soit dose équivalent chez l'homme = dose animale*0,26 (ce qui reviendrait à appliquer un facteur qui tient compte de la variabilité toxicocinétique, de 3,8).

Pour tenir compte de la variabilité toxicodynamique et d'incertitudes résiduelles, un facteur d'incertitude a été fixé à 2,5 selon les recommandations du document de référence pour « la construction d'une valeur toxicologique de référence pour les substances reprotoxiques » (Afsset 2007). La valeur du facteur d'incertitude pour la variabilité inter-espèces est donc de 2,5.

Une valeur finale de 10 par défaut a été choisie pour la variabilité intra-espèces (Afsset 2007), $UF_H = 10$ (variabilité intra-espèce ou interindividuelle).

¹⁰ La limite inférieure de l'intervalle de confiance à 95% (one-sided ou « un coté ») utilisée par l'US EPA, est équivalente à la limite inférieure de l'intervalle de confiance à 90% (two-sided ou « deux coté ») utilisée par le RIVM

Conclusions et recommandation de l'expertise collective

Le CES propose une VTR par voie orale spécifique aux effets du TCA sur le développement applicable pour une exposition aiguë :

Type de VTR	Effet critique	Dose critique	UF**	VTR
VTR aiguë à seuil pour le développement, voie orale	Augmentation des malformations cardiaques chez le rat Long Evans Etude de Smith <i>et al.</i> , 1989	BMD _{5%} L _{90%} = 28,6 mg/kg p.c/j* <u>Ajustement allométrique</u> BMD _{5%} L _{90%} HED = 7,4 mg/kg p.c/j	UF 25 UF _A 2,5 UF _H 10	VTR = 300 µg/kg p.c/j

* BMD_{5%}L_{90%} : limite inférieure de l'intervalle de confiance à 90% de la benchmark dose correspondant à une augmentation de la réponse par rapport au groupe non exposé de 5%.

**UF : facteur d'incertitude global (appliqué), UFA : variabilité inter-espèces ; UFH : variabilité individuelle

*** BMD_{5%}L_{90%} HED : BMD_{5%}L_{90%} ajustée (ajustement allométrique), HED : Human Equivalent Dose ; afin de tenir compte de la variabilité toxicodynamique, un facteur d'incertitude UFA été fixé à 2,5.

Le CES a attiré l'attention de l'Agence sur le fait qu'aucune donnée chez homme et chez l'animal ne mette en évidence des effets du TCA sur la fertilité.

■ VTR de l'acide dibromoacétique (CAS 631-64-1)

- *Choix de l'effet critique*

Les effets du DBA constatés lors des expérimentations animales concernent essentiellement la fertilité masculine :

- Effets sur la spermiation et sur le développement des spermatozoïdes,
- Diminution du nombre de spermatozoïdes et de leur motilité,
- Morphologie anormale des spermatozoïdes,
- Anomalies épидидymaires et testiculaires.

L'altération de la spermatogénèse (rétention des spermatozoïdes à l'étape 19 dans les tubules au-delà du stade VIII) est un effet qui se retrouve dans plusieurs études, et à des doses du même ordre de grandeur.

Les experts ont retenu les altérations de la spermatogénèse comme effet critique du DBA.

- *Choix de l'étude*

L'étude la plus appropriée pour calculer une valeur toxicologique de référence, mettant en évidence l'effet critique, est l'étude de Christian *et al.* (2002)¹¹ pour les raisons suivantes :

- qualité méthodologique générale et notamment le nombre d'animaux par groupe, le régime de doses et l'étude sur deux générations,
- transparence des résultats permettant une exploitation statistique complète.

Cette étude a été considérée de bonne qualité (classée Klimisch 1). Christian *et al.* (2002) ont réalisé une étude sur deux générations dans laquelle des groupes de rats Sprague-Dawley (30 par sexe et par dose) ont reçu du DBA en continu dans leur eau de boisson à des concentrations de 0, 50, 250 ou 650 mg/L). La gamme de doses avait été calculée à partir d'une précédente étude des mêmes auteurs (Christian *et al.*, 2001).

Dans l'étude de 2002, les auteurs ont constaté une réduction de la consommation d'eau à toutes les doses et pour chaque génération F1. Chez les sujets du groupe exposés à la dose la plus forte des générations P et F1, des signes cliniques associés à la réduction de la consommation d'eau ont été décrits (baisse du poids corporel, réduction de la consommation d'aliments). Toutes les doses administrées à la génération F1 pendant la lactation ont entraîné une diminution du poids corporel, ce qui a nécessité le report du sevrage au jour 29.

Cette étude décrit des altérations de la spermatogénèse avec des spermatozoïdes à l'étape 19 retenus dans les tubules séminifères aux stades IX et X, accompagnés de changements au niveau des tubules de l'épididyme (augmentation de la quantité de cellules exfoliées et de corps résiduels dans les tubules de l'épididyme, atrophie et hypospermie) chez les rats des deux générations P et F1 exposés à 250 et 650 ppm.

Le tableau 4 regroupe les résultats de l'étude de deux générations de Christian *et al.* et résume les incidences des altérations de la spermatogénèse (à savoir, les spermatozoïdes à

¹¹ Christian MS *et al.*, 2002. Oral (drinking water) two-generation reproductive toxicity study of dibromoacetic acid (DBA) in rats. *International Journal of Toxicology* 21(4), 237-276

l'étape 19 retenus dans les tubules séminifères) de la génération parentale. Selon un test de Fisher, la dose de 22,4 mg/kg p.c/j est statistiquement significative (avec $p=0,01$) et constitue ainsi le LOAEL. Par conséquent, le NOAEL est de 4,5 mg/kg p.c/j.¹²

Tableau 4 : Incidence des altérations de la spermatogénèse (spermatides à l'étape 19 retenus dans les tubules séminifères)-génération parentale

Dose (mg/kg p.c/j)	Nombre de testicules examinés	Nombre de testicules atteints
0	30	4
4,5	30	3
22,4*	30	13
52,4	30	23

*statistiquement significatif, test de Fisher (un coté), avec $p=0,01$

Plusieurs études ont montré une toxicité sur le système mâle reproducteur (des altérations de la spermatogénèse, diminution de la motilité du sperme, anormalité morphologique du sperme). Ces effets se retrouvent à des doses du même ordre de grandeur que le NOAEL identifié dans l'étude de Christian *et al.* (2002).

- *Choix de la dose critique*

Les données disponibles ont été modélisées avec le logiciel Proast du RIVM afin d'élaborer une Benchmark Dose (BMD). Il apparaît dans l'étude clé une relation dose-réponse significative entre la rétention des spermatides à l'étape 19 et la dose journalière d'exposition au DBA (cf tableau 4).

L'objectif de la démarche est d'estimer la dose correspondant à un niveau de réponse défini ou à un pourcentage défini de réponse supplémentaire par rapport au témoin. Ce niveau ou ce pourcentage est appelé BMR pour Benchmark Response Level. C'est majoritairement la BMDL, autrement dit la limite inférieure de l'intervalle de confiance de la BMD, qui est considérée comme dose repère.

Les données expérimentales ont été ajustées par les modèles développés par le RIVM pour des données continues

Le choix du modèle s'est fait sur celui qui s'ajustait le mieux aux données expérimentales par la méthode du maximum de vraisemblance (Log Likelyhood) et correspond au modèle logProbit. Ce modèle est celui dont le maximum de vraisemblance se rapprochait le plus du modèle « full ». Le modèle a été retenu pour l'estimation de la limite inférieure de l'intervalle de confiance à 90% d'une dose correspondant à une augmentation de la réponse par rapport au groupe non exposé de 5 %. Les $BMD_{5\%}$ et $BMDL_{5\%}$ ont été calculées, car le seuil de 5% est généralement retenu dans les études de reprotoxicité. La $BMD_{5\%}$ est égale à **8,0 mg/kg/j**, la $BMD_{5\%L_{90\%}}$ à **2,7 mg/kg/j**.

¹² Les effets sur la toxicité générale (par exemple sur l'augmentation significative du nombre de macrophages dans la rate) sont observés à partir de 68-73 mg/kg p.c. et par jour, soit à des doses plus élevées

- *Choix des facteurs d'incertitude et ajustement allométrique*

Pour tenir compte de la variabilité inter-espèces, un ajustement allométrique a été réalisé, et a permis de calculer une HED (Human Equivalent Dose), à l'aide de l'équation suivante (US EPA, 2006) :

$$\text{Dose équivalente homme} = \text{Dose animal} \times \left(\frac{\text{Poids animal}}{\text{Poids homme}} \right)^{1/4}$$

Le poids moyen terminal des rats a été déterminé d'après les données décrites dans l'étude, et mesuré à la fin de l'étude. Il est égal à 549 g. Celui de l'homme est estimé à 70 kg. Les doses sont exprimées en mg/kg p.c/j.

Soit dose équivalent chez l'homme = dose animale*0,30 (ce qui reviendrait à appliquer un facteur qui tient compte de la variabilité toxicocinétique, de 3,3).

Pour tenir compte de la variabilité toxicodynamique et d'incertitudes résiduelles, un facteur d'incertitude a été fixé à 2,5 selon les recommandations du document de référence pour « La construction d'une valeur toxicologique de référence pour les substances reprotoxiques » (Afsset 2007). La valeur du facteur d'incertitude pour la variabilité inter-espèces est donc de 2,5.

Une valeur finale de 10 par défaut a été choisie pour la variabilité intra-espèces, UF_H = 10 (variabilité intra-espèce ou interindividuelle).

Conclusions et recommandation de l'expertise collective

Les experts proposent une VTR par voie orale spécifique aux effets du DBA sur la fertilité¹³ applicable pour une exposition chronique

Type de VTR	Effet critique	Dose critique	UF*	VTR
VTR chronique à seuil pour la fertilité, voie orale	Augmentation des altérations de la spermatogenèse chez le rat Sprague Dawley Étude de Christian <i>et al.</i> 2002	BMD _{5%} L _{90%} = 2,7 mg/kg p.c/j <u>Ajustement allométrique</u> BMD _{5%} L _{90%} HED = 0,8 mg/kg p.c/j	UF 25 UF _A 2.5 UF _H 10	VTR = 30 µg/kg p.c/j

* BMD_{5%}L_{90%} : limite inférieure de l'intervalle de confiance à 90% de la benchmark dose correspondant à une augmentation de la réponse par rapport au groupe non exposé de 5%.

**UF : facteur d'incertitude global (appliqué), UFA : variabilité inter-espèces ; UFH : variabilité individuelle

*** BMD_{5%}L_{90%} HED : BMD_{5%}L_{90%} ajustée (ajustement allométrique), HED : Human Equivalent Dose ; afin de tenir compte de la variabilité toxicodynamique, un facteur d'incertitude UFA été fixé à 2,5.

Le DBA est une substance chimique qui peut entraîner chez l'animal, un effet sur le développement du fœtus. Des effets sur d'autres organes ont également été observés :

¹³ Dans l'étude de Christian et al 2002, les effets sur la spermatogenèse retenus ne sont pas associés à une diminution de la fertilité. Cependant, le CES estime que ces effets peuvent être précurseurs d'effet sur la fertilité

variation du poids de certains organes (foie, reins, glandes pituitaires, glandes surrénales et thymus) Christian *et al.* (2002). Le CES recommande donc une analyse critique des effets sur le développement fœtal, et le cas échéant, l'élaboration d'une telle VTR.

Le CES a attiré l'attention de l'Agence sur le fait que les VTR proposées pour les effets reprotoxiques ne protègent pas des autres effets toxiques, notamment cancérigènes. Le CES recommande ainsi une analyse critique des VTR existantes, et notamment celles fondées sur les effets cancérigènes du DBA, et le cas échéant, l'élaboration d'une VTR spécifique pour ces effets.

4. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail endosse les conclusions et les recommandations du CES « Évaluation des risques liés aux substances chimiques » qui portent sur l'élaboration de valeurs toxicologiques de référence par voie orale pour l'acide dichloroacétique, l'acide trichloroacétique et l'acide dibromoacétique.

Conformément aux conclusions du rapport d'expertise collective, l'agence propose les VTR par voie orale suivantes :

Acide dichloroacétique				
Type de VTR	Effet critique	Dose critique	UF**	VTR
VTR aigue à seuil pour le développement, voie orale	Augmentation des malformations cardiaques chez le rat Long Evans Etude de Smith <i>et al.</i> , 1992	BMD _{5%} L _{90%} * = 24,6 mg/kg p.c/j <u>Ajustement allométrique</u> BMD _{5%} L _{90%} HED*** = 6,5 mg/kg p.c/j	UF 25 UF _A 2,5 UF _H 10	VTR = 260 µg/kg p.c/j
VTR chronique à seuil pour la fertilité, voie orale	Diminution de spermatozoïdes chez le rat Long Evans Etude de Toth <i>et al.</i> , 1992	BMD _{1xEC} L _{90%} *** = 72 mg/kg p.c/j <u>Ajustement allométrique</u> BMD _{1xEC} L _{90%} HED = 21 mg/kg p.c/j	UF 25 UF _A 2,5 UF _H 10	VTR = 840 µg/kg p.c/j

* BMD_{5%}L_{90%} : limite inférieure de l'intervalle de confiance à 90% de la benchmark dose correspondant à une augmentation de la réponse par rapport au groupe non exposé de 5%.

**UF : facteur d'incertitude global (appliqué), UFA : variabilité inter-espèces ; UFH : variabilité individuelle

*** BMD_{5%}L_{90%} HED : BMD_{5%}L_{90%} ajustée (ajustement allométrique), HED : Human Equivalent Dose ; afin de tenir compte de la variabilité toxicodynamique, un facteur d'incertitude UFA été fixé à 2,5.

****BMD_{1xEC}L_{90%}, le niveau d'effet choisi correspond à une fois l'écart type : ce qui revient à considérer comme valeur seuil, la moyenne (nombre de spermatozoïdes chez le groupe non traité) moins une fois l'écart type du groupe non traité et correspond à une diminution de 32,5% de spermatozoïdes.

Acide trichloroacétique

Type de VTR	Effet critique	Dose critique	UF**	VTR
VTR aigue à seuil pour le développement, voie orale	Augmentation des malformations cardiaques chez le rat Long Evans Etude de Smith <i>et al.</i> , 1989	BMD _{5%} L _{90%} = 28,6 mg/kg p.c/j* <u>Ajustement allométrique</u> BMD _{5%} L _{90%} HED = 7,4 mg/kg p.c/j	UF 25 UF _A 2,5 UF _H 10	VTR = 300 µg/kg p.c/j

* BMD_{5%}L_{90%} : limite inférieure de l'intervalle de confiance à 90% de la benchmark dose correspondant à une augmentation de la réponse par rapport au groupe non exposé de 5%. **UF : facteur d'incertitude global (appliqué), UF_A : variabilité inter-espèces ; UF_H : variabilité individuelle *** BMD_{5%}L_{90%} HED : BMD_{5%}L_{90%} ajustée (ajustement allométrique), HED : Human Equivalent Dose ; afin de tenir compte de la variabilité toxicodynamique, un facteur d'incertitude UFA été fixé à 2,5.

Acide dibromoacétique

Type de VTR	Effet critique	Dose critique	UF*	VTR
VTR chronique à seuil pour la fertilité, voie orale	Augmentation des altérations de la spermatogenèse chez le rat Sprague Dawley Etude de Christian <i>et al.</i> 2002	BMD _{5%} L _{90%} = 2,7 mg/kg p.c/j <u>Ajustement allométrique</u> BMD _{5%} L _{90%} HED = 0,8 mg/kg p.c/j	UF 25 UF _A 2,5 UF _H 10	VTR = 30 µg/kg p.c/j

* BMD_{5%}L_{90%} : limite inférieure de l'intervalle de confiance à 90% de la benchmark dose correspondant à une augmentation de la réponse par rapport au groupe non exposé de 5%.

**UF : facteur d'incertitude global (appliqué), UFA : variabilité inter-espèces ; UFH : variabilité individuelle

*** BMD_{5%}L_{90%} HED : BMD_{5%}L_{90%} ajustée (ajustement allométrique), HED : Human Equivalent Dose ; afin de tenir compte de la variabilité toxicodynamique, un facteur d'incertitude UFA été fixé à 2,5.

Fait en six exemplaires,

Le Directeur général

Marc Mortureux

MOTS-CLÉS

Acide dichloroacétique, acide trichloroacétique, acide dibromoacétique, reprotoxicité, développement, fertilité, valeurs toxicologiques de référence, dose critique, facteurs d'incertitude, effets santé, population générale

**Elaboration de VTRs par voie orale
fondées sur les effets reprotoxiques
pour l'acide dichloroacétique,
l'acide trichloroacétique et l'acide dibromoacétique**

**Saisine « 2009-SA-0343 »
Saisine liée « 2007-SA-0409 »**

**RAPPORT
d'expertise collective**

**Comité d'Experts Spécialisés « Evaluation des risques liés aux substances
chimiques »**

Groupe de Travail « Valeurs Toxicologiques de Référence »

Avril 2010

Mots clés

Acide dichloroacétique, acide trichloroacétique, acide dibromoacétique, reprotoxicité, développement, fertilité, valeurs toxicologiques de référence, dose critique, facteurs d'incertitude, effets santé, population générale.

Présentation des intervenants

PRÉAMBULE : les experts externes, membres de comités d'experts spécialisés, de groupes de travail ou désignés rapporteurs sont tous nommés à titre personnel, *intuitu personae*, et ne représentent pas leur organisme d'appartenance.

GROUPE DE TRAVAIL « VALEURS TOXICOLOGIQUES DE RÉFÉRENCE »

Président

M. Dominique LAFON – Médecin toxicologue, évaluation des risques liés à la femme enceinte en entreprise, Institut National de Recherche et de Sécurité

Membres

Mme Magali BOIZE – EDF- Service des études médicales. Démission en mars 2011

M. Radhouane CHAKROUN – Institut de Santé et de Sécurité au travail, Tunisie

M. Dany CHEVALIER – Université de Lille

M. Frédéric DOR – Institut de veille sanitaire

Mme Fatiha EL-GHISSASSI – Centre International de Recherche sur le Cancer

M. Michel FALCY – Institut National de Recherche et de Sécurité

M. Sébastien GIRAULT – Cephalon France

Mme Cécile KAIRO - Institut de veille sanitaire

Mme Bénédicte LA ROCCA – Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques. Démission en mars 2011

M. Rémi MAXIMILIEN – Commissariat à l'Energie Atomique

Mme Bette MEEK - Université d'Ottawa, Canada

M. Jean-Ulrich MULLOT – Service de santé des Armées

M. Mostafa OULD-ELKHIM – Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé

M. Alain-Claude ROUDOT – Université de Brest

Mme Sylvie TISSOT - Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques. Démission en mars 2011

Mme Laurence VIAN – Université de Montpellier. Démission en avril 2010.

RAPPORTEURS

M. Dany CHEVALIER – Université de Lille

M. Dominique LAFON – Médecin toxicologue, évaluation des risques liés à la femme enceinte en entreprise, Institut National de Recherche et de Sécurité

COMITE D'EXPERTS SPÉCIALISÉ « EVALUATION DES RISQUES LIÉS AUX SUBSTANCES CHIMIQUES »

Les travaux, objets du présent rapport ont été suivis et adoptés par le CES suivant :

- « Evaluation des risques liés aux substances chimiques » – 22 octobre et 26 novembre 2009, 7 janvier, 18 février et 1^{er} avril 2010

Président

M. Michel GUERBET – Professeur des Universités en toxicologie

Membres

M. Pierre-Marie BADOT – Professeur des Universités en biologie environnementale

Mme Claire BEAUSOLEIL – Pharmacien toxicologue, évaluations des risques professionnels des substances chimiques, INRS, démission en octobre 2009

M. Luc BELZUNCES – Directeur de recherche, responsable du laboratoire de toxicologie environnementale à l'INRA

Mme Christine CEZARD – Pharmacien toxicologue en centre anti-poison

M. Michel DESLAURIERS – Médecin toxicologue, pôle de toxicologie industrielle

M. Pascal EMPEREUR-BISSONNET – Evalueur de risque en santé environnement

Mme Brigitte ENRIQUEZ – Pharmaco-toxicologue

M. Olivier FARDEL – Professeur des Universités en toxicologie

Mme Hélène FENET – Pharmacien, Maître de conférence en sciences de l'environnement et santé publique

M. Luc FERRARI – Pharmacien toxicologue

M. Luc FONTANA – Maître de Conférences des Universités – Praticien hospitalier, Médecine, Santé au travail

Mme Nathalie FOUILHE SAM-LAI – Pharmacien toxicologue en centre anti-poison

Mme Barbara GOUGET – Chercheur en toxicologie des contaminants physico-chimiques – démission en juillet 2009

Mme Dominique GUENOT – Chercheur en cancérologie et neurosciences

M. Cong Khanh HUYNH – Docteur ès Science, ingénieur chimiste spécialisé en santé au travail

M. Dominique LAFON – Médecin toxicologue, évaluation des risques liés à la femme enceinte en entreprise

Mme Béatrice LALERE – Docteur en chimie analytique et en environnement

Mme Annie LAUDET-HESBERT – Pharmacien toxicologue, retraitée de l'INRS

M. Jean-Pierre LEPOITTEVIN – Professeur des Universités en dermatochimie

Mme Anne-Christine MACHEREY – Docteur en toxicologie, spécialisée dans la prévention du risque chimique

Mme Florence MENETRIER – Pharmacien, chef de projet dans le domaine de la toxicologie nucléaire, CEA

Mme Annie PFOHL-LESZKOWICZ – Professeur des Universités en toxicologie et sécurité alimentaire, Pharmacien-Toxicologue

M. Daniel PICART – Retraité de l'enseignement et de la recherche en chimie structurale

M. Alain-Claude ROUDOT – Enseignant chercheur en statistique et analyse de risque

Mme Béatrice SECRETAN – Docteur en toxicologie spécialisée dans l'évaluation de la cancérogénicité des substances

Mme Anne STEENHOUT – Chimiste, spécialiste en évaluation intégrée des risques sanitaires

M. Robert TARDIF – Chimiste et toxicologue, spécialisé en santé environnement et santé au travail

M. Eric THYBAUD – Ecotoxicologue

Après prise en compte des commentaires, le rapport a été approuvé par les membres du groupe de travail le 12 mars 2010.

Il a été adopté par le CES « Evaluation des risques liés aux substances chimiques » le 1 avril 2010.

PARTICIPATION ANSES

Coordination scientifique

M Laurent BODIN - Chef de projet scientifique – toxicologue – Anses

Contribution scientifique

Mlle Vanessa LURIENNE— Chargée de projet scientifique - Anses

Relecture

M Christophe ROUSSELLE – Responsable unité toxicologie /DER - Anses

Mme Aurélie MATHIEU – Chargée de projet scientifique – Unité Évaluation des Dangers et des risques des substances/DER – Anses

Secrétariat administratif

Mme Séverine BOIX - Anses

SOMMAIRE

Présentation des intervenants	3
Sigles et abréviations	43
Liste des tableaux	44
Liste des figures	44
1 Contexte, objet et modalités de traitement de la saisine.....	45
1.1 Contexte	45
1.2 Objet de la saisine	46
1.3 Modalités de traitement : moyens mis en œuvre et organisation	46
2 Acide dichloroacétique (CAS 79-43-6)	47
2.1 Recueil de données toxicologiques	47
2.1.1 Identification de la substance	47
Généralités	47
Propriétés chimiques.....	47
Plausibilité d'exposition humaine	48
2.1.2 Toxicocinétique par voie orale	48
Absorption 48	
Distribution	48
Métabolisme	48
Élimination 49	
2.1.3 Effets sanitaires	50
Effets sur la toxicité générale	50
Cancérogénicité et génotoxicité	50
Effets reprotoxiques	50
2.1.4 Mécanisme d'action	52
2.2 Analyse et évaluation des choix pour la construction de la VTR sur le développement	52
2.2.1 Choix de l'effet critique.....	52
2.2.2 Choix de l'étude et de la dose critique.....	52
2.2.3 Ajustement allométrique et choix des facteurs d'incertitude.....	54
2.2.4 Choix des facteurs d'incertitudes.....	55
Variabilité inter-espèces	55
Variabilité intra-espèce.....	55
2.2.5 Calcul de la VTR	55
2.3 Analyse et évaluation des choix pour la construction de la VTR sur la fertilité	56
2.3.1 Choix de l'effet critique.....	56
2.3.2 Choix de l'étude et de la dose critique.....	56
2.3.3 Ajustement allométrique et choix des facteurs d'incertitude.....	58
2.3.4 Choix des facteurs d'incertitudes	58
Variabilité inter-espèces	58
Variabilité intra-espèce.....	58
2.3.5 Calcul de la VTR	59
3 Acide trichloroacétique (CAS 76-03-9).....	60
3.1 Recueil des données toxicologiques du TCA	60

3.1.1	Identification de la substance	60
	Généralités	60
	Propriétés chimiques	60
	Plausibilité d'exposition humaine	61
3.1.2	Toxicocinétique	61
	Absorption 61	
	Distribution	61
	Métabolisme	62
	Élimination 62	
3.1.3	Effets sanitaires	62
	Toxicité générale	62
	Cancérogénicité et génotoxicité	62
	Effets reprotoxiques	63
3.2	Mécanisme d'action	66
3.3	Analyse et évaluation des choix pour la construction de la VTR.....	66
3.3.1	Choix de l'effet critique.....	66
3.3.2	Choix de l'étude	66
3.3.3	Choix de la dose critique.....	66
3.3.4	Ajustement allométrique et choix des facteurs d'incertitude.....	69
3.3.5	Choix des facteurs d'incertitude.....	69
	Variabilité inter-espèces	69
	Variabilité intra-espèce.....	69
3.3.6	Calcul de la VTR	70
4	Acide dibromoacétique (CAS 631-64-1)	71
4.1	Recueil des données toxicologiques du DBA.....	71
4.1.1	Identification de la substance	71
	Généralités	71
	Propriétés chimiques.....	71
4.1.2	Plausibilité d'exposition humaine.....	72
4.1.3	Toxicocinétique	72
	Absorption 72	
	Distribution	72
	Métabolisme	72
	Excrétion 73	
4.1.4	Effets sanitaires	73
	Effets sur la toxicité générale	73
	Cancérogénicité et génotoxicité	73
	Effet reprotoxique.....	73
4.2	Mécanisme d'action	76
4.3	Analyse et évaluation des choix pour la construction de la VTR.....	77
4.3.1	Choix de l'effet critique.....	77
4.3.2	Choix de l'étude	77
4.3.3	Choix de la dose critique.....	77
4.3.4	Ajustement allométrique	80
4.3.5	Choix des facteurs d'incertitude.....	80
	Variabilité inter-espèces	80
	Variabilité intra-espèce.....	81
4.3.6	Calcul de la VTR	81
5	Bibliographie	82

5.1 Acide dichloroacétique.....	82
5.2 Acide trichloroacétique	83
5.3 Acide dibromoacétique	85
ANNEXES.....	88
Annexe 1 : Synthèse des déclarations publiques d'intérêts des experts par rapport au champ de la saisine	89
Annexe 2 : Grille d'analyse critique d'études toxicologiques pour le DCA	96
Annexe 3 : Grille d'analyse critique d'études toxicologiques pour le TCA.....	108
Annexe 2 : Grille d'analyse critique d'études toxicologiques pour le DBA	112



EXPERTISE COLLECTIVE : SYNTHÈSE ET CONCLUSIONS

Relative à l'élaboration de VTRs par voie orale fondées sur les effets reprotoxiques de l'acide dichloroacétique

Saisine Afsset n° « 2010-SA-0343 »

Ce document synthétise d'une part les travaux du groupe de travail « Valeurs toxicologiques de référence » et présente d'autre part les éventuels compléments du Comité d'Experts Spécialisés.

Ce document synthétise les travaux du prestataire, du groupe de travail « Valeurs Toxicologiques de Référence » et présente les compléments du Comité d'Experts Spécialisés.

Présentation de la question posée

Dans le cadre de la saisine « **Evaluation des risques sanitaires liés à la présence de dangers chimiques et/ou biologiques dans l'eau, l'air et les surfaces des piscines réglementées** » menée par le groupe de travail d'experts « *Evaluation des risques sanitaires liés à la qualité des eaux et des produits et procédés de traitement des eaux de piscines* », une construction de VTR reprotoxique pour les acides haloacétiques a été envisagée car aucune VTR n'existent pour les effets reprotoxiques, effets pourtant avérés de ces substances.

Organisation de l'expertise

L'Afsset a confié au Comité d'Experts Spécialisés (CES) « Evaluation des risques liés aux substances chimiques » la validation de ces VTR. Ce dernier a mandaté le groupe de travail « Valeurs toxicologiques de référence » pour l'expertise du rapport du groupe de travail et la construction de la VTR reprotoxique de l'acide dichloroacétique (DCA). Deux rapporteurs du groupe de travail ont été nommés. Le rapport produit par le groupe de travail tient compte des observations et éléments complémentaires transmis par les membres du CES.

Ces travaux d'expertise sont ainsi issus d'un collectif d'experts aux compétences complémentaires. Ils ont été réalisés dans le respect de la norme NF X 50-110 « qualité en expertise » avec pour objectif de respecter les points suivants : compétence, indépendance, transparence, traçabilité.

Description de la méthode

Sur la base du document « Méthode de construction de VTR fondées sur des effets sur la reproduction et le développement » réalisé par l'Afsset, les rapporteurs du groupe de travail VTR ont effectué une analyse toxicologique en vue de sélectionner l'effet critique et l'étude source à

exploiter. Ils ont ensuite donné leur avis sur les choix effectués au regard des données disponibles.

La construction des VTR diffère en fonction de l'hypothèse formulée ou des données acquises sur le mode d'action toxique de la substance. En l'état actuel des connaissances et des conventions, on considère généralement que pour les effets reprotoxiques, la toxicité ne s'exprime qu'au-delà d'un seuil de dose (à l'exception des effets mutagènes sur cellules germinales). Ce postulat peut néanmoins être remis en cause si les données disponibles le justifient.

La construction d'une VTR est donc définie de la manière suivante :

$$VTR = \frac{Dose \cdot critique}{UF} \quad \text{avec} \quad \begin{array}{l} Dose \text{ critique} = NOAEL, LOAEL \text{ ou } BMDL^2 \\ UF = \text{facteur d'incertitude global appliqué} \end{array}$$

En pratique, la construction de la VTR implique les considérants suivants :

- choix de l'effet critique ;
- choix d'une étude de bonne qualité scientifique permettant d'établir une relation dose – réponse (ou dose – effet) ;
- choix ou construction d'une dose critique à partir des données obtenues chez l'animal et/ou chez l'homme ;
- application de facteurs pour tenir compte de la variabilité et des incertitudes.

Une discussion au sein du CES a permis de se prononcer sur le choix de la dose critique et des facteurs d'incertitude. Le CES a insisté sur la nécessité de restituer les études complémentaires qui, si elles ne sont pas directement exploitées pour l'identification de la dose critique, sont utiles au choix des facteurs d'incertitudes (études de toxicocinétique, disponibilité d'autres NOAEL ou LOAEL, etc.).

Résultat de l'expertise collective

Recueil des données toxicologiques

Cette partie est fondée sur le document technique de Santé Canada publié en juillet 2008 : « Recommandations pour la qualité de l'eau potable au Canada : les acides haloacétiques ».

Une recherche bibliographique complémentaire *via* Pubmed concernant les effets reprotoxiques de l'acide dichloroacétique a été réalisée, couvrant la période 2004-début 2009. Les mots clés utilisés étant « haloacetic acids », « dichloroacetic acid », « swimming pool », « disinfection by-products mixtures », et « drinking water ». Ainsi, quinze articles concernant la toxicité générale du DCA et la toxicité sur la reproduction du DCA ont été identifiés. Parmi ces quinze articles, seulement 8 articles portaient sur les effets reprotoxiques et ont donc été retenus.

Toxicocinétique

A la suite d'une exposition par voie orale Le DCA est absorbé tant chez les rats que chez l'Homme (Stacpoole *et al.*, 1987, 1998a ; James *et al.*, 1998 ; Schultz *et al.*, 1999). L'absorption cutanée chez l'Homme est mineure comme l'attestent des études *in vivo* (Kim et Weisel, 1998) et *in vitro* (lorsqu'on utilise des chambres de diffusion et une solution tamponnée de DCA) (Xu *et al.*, 2002).

Lorsqu'il est administré par gavage, le DCA atteint le foie d'où il rejoint la circulation générale : on le retrouve dans les muscles et d'autres organes cibles : tissus adipeux, reins (Evans, 1982 ; James *et al.*, 1998).

Tong *et al.* (1998a et 1998b) ont identifié chez le rat une enzyme hépatique, la glutathion-S-transférase Zeta (GST Zeta), qui catalyse la conversion du DCA en glyoxylate. Le glyoxylate serait ensuite transformé 1) en oxalate (par oxydation), 2) en glycine (par transamination) et, par la suite, en glycyconjugués ou 3) en glycolate (par réduction), tous ces métabolites étant excrétés en quantités variables dans l'urine (Stacpoole *et al.*, 1989 ; James *et al.*, 1998 ; Stacpoole *et al.*, 1998a ; US EPA, 2003c). Une partie du DCA est aussi dégradée en dioxyde de carbone et éliminée par l'air exhalé (James *et al.*, 1998). Le DCA peut également être métabolisé par réduction pour former du MCA (acide monochloroacétique et, ensuite du thiodiacétate (James *et al.*, 1998).

L'élimination du DCA administré à faible dose s'effectue essentiellement sous forme de métabolites par voie rénale. Le DCA est aussi éliminé par les poumons sous forme de dioxyde de carbone, mais les concentrations respectives en métabolites peuvent différer entre les espèces.

À des doses plus fortes ou répétées, le pourcentage de DCA non métabolisé est plus élevé (Lukas *et al.*, 1980 ; Lin *et al.*, 1993 ; Gonzalez-Leon *et al.*, 1997 ; Cornett *et al.*, 1999), ce qui peut être attribuable à l'inhibition de son métabolisme.

Classement

Le DCA a été classé par l'Union Européenne C ; R35 - N ; R50

Effets sanitaires

- *Toxicité chronique*

Cicmanec *et al.* (1991) ont réalisé une étude chez des chiens beagle mâles et femelles âgés de 5 mois exposés durant 90 jours à des doses d'exposition de 0, 12,5, 39,5 et 72 mg/kg p.c./j.

Les auteurs rapportent une toxicité au niveau de certains organes avec une augmentation de du poids, des reins, du foie, et des poumons à 72 mg/kg p.c./j.

Chez l'homme, il n'y a pas d'études relatées.

- *Cancérogénicité et génotoxicité*

Le CIRC classe, dans sa monographie volume 84, le DCA 2B comme « cancérogène possible pour l'homme ». Le DCA est considéré comme génotoxique par le CIRC (CIRC, 2004) et génotoxique à fortes doses, pour l'US EPA (EPA, 2006).

L'exposition prolongée de rongeurs au DCA (de 0,5 à 5 g/L dans l'eau de boisson) pendant 52 à 114 semaines, augmente l'incidence des tumeurs du foie. Les tumeurs principalement retrouvées sont des adénomes et des carcinomes hépatocellulaires (NTP, 2007). Contrairement à ce qui a été observé pour le TCA, les tumeurs hépatiques décrites pour le DCA ne sont pas reliées à une prolifération des peroxysomes¹.

¹ Des VTR cancérogènes sans seuil de doses ont été élaborées par l'US EPA et Santé Canada

- *Effets reprotoxiques (effets toxiques pour la reproduction et le développement)*
 - Effets sur le développement

- Chez l'homme

Aucune donnée humaine sur les effets sur le développement du DCA n'est disponible quelle que soit la voie d'exposition.

- Chez l'animal

L'étude de Sidney *et al.* (1996), réalisée chez des souris CD-1 gravides, met en évidence des effets du DCA sur le développement foetal, avec des malformations foetales du tube neural (750 mg/L), du pharynx, du cœur (950 mg/L), et de l'œil (1500 mg./L).²

L'étude de Smith *et al.* (1992) a été réalisée chez des rates Long-Evans gravides exposées du 6ème au 15ème jour de gestation, pour un groupe d'animaux à des concentrations de 900, 1400, 1900, 2400 mg/kg p.c./j et pour le second groupe à des concentrations de 14, 140, 400 mg/kg p.c./j.

A 400 mg/kg /j, les auteurs reportent une toxicité maternelle, avec une diminution du gain de poids des mères. Le LOAEL est donc de 400 mg/kg p.c./j mais il n'y a pas de NOAEL reportée.

Chez les foetus, on observe un retard de croissance des malformations cardiaques majeures, voire une létalité avec un LOAEL de 140 mg/kg p.c./j et un NOAEL de 14 mg/kg p.c./j. Le DCA avait dans cette étude comme organe cible le cœur et les gros vaisseaux du foetus.

L'étude d'Epstein *et al.* (1992) a été réalisée chez des rates gravides Long-Evans avec des doses beaucoup plus élevées, 1900, 2400 et 3500 mg/kg p.c./j, que dans les autres études. Cette étude permet de confirmer que l'organe cible du DCA lors du développement foetal est le cœur. On observe ainsi des malformations cardiaques pour toutes les doses testées mais seulement à des jours spécifiques de la gestation : 1900 mg/kg p.c./j à partir de J9, 2400 mg/kg p.c./j à J10 et J12 seulement, et à 3500 mg/kg p.c./j à J9, J10, et J12. Ces malformations cardiaques foetales retrouvées à partir de 1900 mg/kg p.c./j durant la période de gestation J9 à J15, peuvent constituer un LOAEL. Aucune toxicité maternelle importante n'a été relevée dans cette étude.

L'étude de Fischer *et al.* (2001) a été réalisée durant la gestation chez des rates gravides Sprague–Dawley. Des doses orales quotidiennes de 300 mg/kg p.c./j ont été administrés de J6 à J15. L'examen des foetus au 21^{ème} jour de gestation, ne montre aucune malformation cardiaque mais une diminution significative du poids du foetus est observée à J21. On observe aussi une toxicité maternelle avec une diminution du gain du poids de la mère.

- Etudes sur la fertilité

- Chez l'homme

Aucune donnée humaine sur les effets sur la fertilité du DCA n'est disponible quelle que soit la voie d'exposition.

- Chez l'animal

L'étude de Toth *et al.* (1992) a été réalisée chez des rats mâles Long-Evans exposés par gavage quotidien pendant 10 semaines à 31,25, 62,5 et 125 mg/kg p.c./j. Les auteurs décrivent une spermatotoxicité se traduisant par une diminution du nombre de spermatozoïdes et des modifications du développement du spermatozoïde.

Les auteurs observent une réduction du poids absolu des organes reproducteurs mâles à partir de 31,25 mg/kg p.c./j (épididymes et des glandes préputiales inclus). Les auteurs proposent ainsi un

² La consommation de DCA en mg/kg n'a pas été fournie par les auteurs.

LOAEL de 31,25 mg/kg p.c./jour, basée sur la diminution du poids absolu des organes reproducteurs males (glandes préputiales et épидидyme compris).

L'étude de Linder *et al.*, (1997) a été réalisée chez des rats mâles Sprague-Dawley en deux temps. Un premier groupe de rats a été exposé à 1500, 3000 mg/kg p.c./j en dose unique, mais aucune toxicité n'est observée chez les rats. Un deuxième groupe de rats a été exposé aux doses 18, 54, 160, 480, 1440 mg/kg p.c./j de manière répétée pour des durées d'exposition de 2, 5, 9 et 14 jours. Lors de cette deuxième étude des effets sur la fertilité sont mis en évidence. Les effets sont retrouvés au niveau du système reproducteur mâle, essentiellement des effets de spermatotoxicité (morphologie anormale des spermatozoïdes) Ainsi, on observe à 160 mg/kg p.c./j, des anomalies de morphologie, tandis qu'aux doses plus fortes on observe des anomalies de la motilité des spermatozoïdes. Un NOAEL de 54 mg/kg p.c./j et un LOAEL de 160 mg/kg p.c./j pourraient être déduites de ces effets.

Mécanisme d'action

Aucune étude n'a permis de faire un lien mécanistique entre l'exposition au DCA et les effets décrits chez l'animal. Concernant la fertilité, le DCA pourrait interférer avec le métabolisme énergétique au niveau des cellules spermatiques ou des cellules de Sertoli.

Concernant les effets sur le développement fœtal, le DCA pourrait se concentrer dans les cellules cardiaques, et interférer avec le métabolisme énergétique mitochondrial.

Analyse et évaluation des choix pour la construction de la VTR

VTR pour les effets sur le développement

- *Choix de l'effet critique*

Des malformations cardio-vasculaires sont observées dans 3 études chez le rat. D'autres malformations sont également observées (urogénitales, oculaires). Ces malformations surviennent en présence d'une toxicité maternelle. Le caractère cependant modéré de la toxicité maternelle, le type de malformations (atteinte cardio-vasculaire), leur survenue lors d'étude *in vitro* ne plaident cependant pas en faveur d'un rôle déterminant de la maternotoxicité. D'autre part, le choix de la gamme de doses retenue dans ces études ne permet pas de considérer ces effets maternels comme survenant avant les effets cardiaques.

Le CES retient l'augmentation de l'incidence des malformations cardiaques comme effet critique.

- *Choix de l'étude*

Parmi les études, l'étude Smith *et al.* (1992) est classée Klimisch 1. Elle comprend un certain nombre de doses testées et montre une relation dose-effet. Conformément aux recommandations de l'Afsset « Méthode de construction de VTR fondées sur des effets sur la reproduction et le développement », elle est utilisable pour calculer une VTR aiguë pour les effets sur le développement. Il a été proposé la construction d'une Benchmark Dose (BMD) à partir des résultats présentés dans le tableau 1.

- *Choix de la dose critique*

Les données disponibles ont été modélisées avec le logiciel Proast 18.2 du RIVM afin d'élaborer une Benchmark Dose. Il apparaît dans l'étude clé une relation dose-réponse significative entre l'augmentation des malformations cardiaques et la dose journalière d'exposition au DCA (tableau 1) (test de Kruskal Wallis).

L'objectif de la démarche est d'estimer la dose correspondant à un niveau de réponse défini ou à un pourcentage défini de réponse supplémentaire par rapport au témoin. Ce niveau ou ce pourcentage est appelé BMR pour Benchmark Response level. C'est majoritairement la BMDL,

autrement dit la limite inférieure de l'intervalle de confiance de la BMD, qui est considérée comme dose repère. Les données expérimentales ont été ajustées par les modèles développés par le RIVM pour des données dichotomiques (modèles gamma, logistique, multi-étapes, probit, Weibull, etc.)

Le choix du modèle s'est fait sur celui qui s'ajustait le mieux aux données expérimentales par la méthode du maximum de vraisemblance (Log Likelihood) : le modèle log-logist a été retenu pour l'estimation de la limite inférieure de l'intervalle de confiance à 90%³ d'une dose correspondant à une augmentation de la réponse par rapport au groupe non exposé de 5%. Ce modèle est celui dont le maximum de vraisemblance se rapprochait le plus du modèle « full ». Les BMD_{5%} et BMDL_{5%} ont été calculées, car le seuil de 5% est généralement retenu dans les études de reprotoxicité. La BMD_{5%} est égale à **45,2 mg/kg p.c./j**, la BMD_{5%}L_{90%} à **24,6 mg/kg p.c./j**

Tableau 1 : Incidence des malformations fœtales suite à une exposition maternelle au DCA aux jours 6 à 15 de gestation (rat Long Evans)

Dose mg/kg p.c./j	Nombre de portées atteintes	Nombre de portées
0	0	39
14	1	18
140*	2	19
400*	6	19

* significatif $p < 0,05$

- *Choix des facteurs d'incertitude et ajustement allométrique*

Pour tenir compte de la variabilité inter-espèces, un ajustement allométrique a été réalisé, et a permis de calculer une HED (Human Equivalent Dose), à l'aide de l'équation suivante⁴ :

$$\text{Dose équivalente homme} = \text{Dose animal} \times \left(\frac{\text{Poids animal}}{\text{Poids homme}} \right)^{1/4}$$

Le poids moyen des rats a été déterminé d'après les données décrites dans l'étude et mesurées au jour 20. Il est égal à 339 g. Celui de l'homme est estimé à 70 kg. Les doses sont exprimées en mg/kg/j.

Soit dose équivalente chez l'homme = dose animale*0,26 (ce qui reviendrait à appliquer un facteur qui tient compte de la variabilité toxicocinétique de 3,8).

Pour tenir compte de la variabilité toxicodynamique et d'incertitudes résiduelles, un facteur d'incertitude a été fixé à 2,5 selon les recommandations du document de référence pour « la construction d'une valeur toxicologique de référence pour les substances reprotoxiques » (Afsset, 2007). La valeur du facteur d'incertitude pour la variabilité inter-espèces est donc de 2,5.

Une valeur finale de 2,5 par défaut a été choisie pour la variabilité intra-espèces (Afsset 2007), UF_H = 10 (variabilité intra-espèces ou interindividuelle).

³ La limite inférieure de l'intervalle de confiance à 95% (one-side ou « un coté ») utilisée par l'US EPA, est équivalente à la limite inférieure de l'intervalle de confiance à 90% (two-side ou « deux coté ») utilisée par le RIVM.

⁴ Cette équation est issue des recommandations de l'US EPA (US EPA, 2006).

Effet critique	Dose critique*	Facteur d'incertitude	VTR
Augmentation des malformations cardiaques chez le rat Long Evans Smith <i>et al.</i> , 1992	BMD _{5%} L _{90%} =24,6 mg/kg p.c./j <u>Ajustement allométrique</u> BMD _{5%} L _{90%} HED = 6,5 mg/kg p.c./j	UF 25 UF _A 2,5 UF _H 10	VTR = 260 µg/kg p.c./j

*HED : Human Equivalent Dose ; il a été calculé à partir de l'équation précédente ;
Afin de tenir compte de la variabilité toxicodynamique, un facteur d'incertitude UF_A été fixée à 2,5.

VTR pour les effets sur la fertilité

- *Choix de l'effet critique*

L'atteinte au niveau du développement du spermatozoïde est l'effet critique qui peut être retenu. Il est retrouvé dans plusieurs études, plusieurs espèces. Son mécanisme n'est pas clairement établi.

Le CES retient donc les effets sur les organes reproducteurs mâles, et plus particulièrement une diminution du nombre de spermatozoïdes pour construire une VTR orale.

- *Choix de l'étude*

L'étude de Toth sur le rat peut-être classée Klimisch 2e. Des atteintes sont montrées au niveau testiculaire à toutes les doses. Elle est donc utilisable pour calculer une VTR chronique sur les effets sur le développement. Conformément aux recommandations de l'Afsset « Méthode de construction de VTR fondées sur des effets sur la reproduction et le développement », il a été proposé la construction d'une benchmark dose.

- *Choix de la dose critique*

Les données disponibles ont été modélisées avec le logiciel Proast du RIVM afin d'élaborer d'une Benchmark Dose (BMD). Il apparaît dans l'étude clé une relation dose-réponse significative entre la diminution de spermatozoïdes et la dose journalière d'exposition au DCA (tableau 2).

L'objectif de la démarche est d'estimer la dose correspondant à un niveau de réponse défini ou à un pourcentage défini de réponse supplémentaire par rapport au témoin. Ce niveau ou ce pourcentage est appelé BMR pour Benchmark Response level. C'est majoritairement la BMDL, autrement dit la limite inférieure de l'intervalle de confiance de la BMD, qui est considérée comme dose repère.

Les données expérimentales ont été ajustées par les modèles développés par le RIVM pour des données continues

Le choix du modèle s'est fait sur celui qui s'ajustait le mieux aux données expérimentales par la méthode du maximum de vraisemblance (Log Likelihood) et correspond au modèle exponentiel. Ce modèle est celui dont le maximum de vraisemblance se rapprochait le plus du modèle « full ». Le modèle a été retenu pour l'estimation de la limite inférieure de l'intervalle de confiance à 90% d'une dose correspondant à une diminution de 32,5% de spermatozoïdes (soit une fois l'écart type, EC⁵). Les BMD_{1xEC}⁶ et BMD_{1xEC}L_{90%} ont été calculées et sont égales à **91,1 mg/kg p.c./j** et **72,1 mg/kg p.c./j respectivement**.

⁵ Cette approche a été proposée par l'US EPA comme approche par défaut lorsqu'aucun élément n'est disponible concernant le choix du niveau d'effet observé lors d'analyse biochimiques et biologiques dans le groupe témoin.

Tableau 2 : Diminution du nombre de spermatozoïdes (10⁶/g) au niveau de l'épididyme suite à une exposition au DCA chez des rats males Long Evans)

Dose (mg/kg p.c./j)	Moyenne (nombre de spermatozoïdes (10 ⁶ /g) au niveau de l'épididyme	Ecart type	Nombre d'animaux
0	630.0	204.8	19
31,25	582.5	137.0	18
62,5*	502.6	163.5	18
125 *	367.8	91.6	19

* significatif p<0,05

- *Choix des facteurs d'incertitude*

Pour tenir compte de la variabilité inter-espèces, un ajustement allométrique a été réalisé, et a permis de calculer une HED (Human Equivalent Dose), à l'aide de l'équation suivante ⁷:

$$\text{Dose équivalente homme} = \text{Dose animal} \times \left(\frac{\text{Poids animal}}{\text{Poids homme}} \right)^{1/4}$$

Le poids moyen du rat a été déterminé d'après les données décrites dans l'étude, et avant sacrifice. Il est de 484 g. Celui de l'homme est estimé à 70 kg. Les doses sont exprimées en mg/kg/j.

Soit dose équivalent chez l'homme = dose animale*0.29 (ce qui revient à appliquer un facteur qui tient compte de la variabilité toxicocinétique de 3,5).

Pour tenir compte de la variabilité toxicodynamique et d'incertitudes résiduelles, un facteur d'incertitude supplémentaire a été fixée à 2,5 selon les recommandations du document de référence pour « la construction d'une valeur toxicologique de référence pour les substances reprotoxiques » (Afsset, 2007).

Une valeur finale de 10 par défaut a été choisie pour la variabilité intra-espèces (Afsset, 2007), UF_H = 10 (variabilité intra-espèces ou interindividuelle).

⁶ Cela revient à considérer comme valeur seuil la moyenne (nombre de spermatozoïdes chez le groupe non traité) moins une fois l'écart type du groupe non traité et correspond à une diminution de 32,5% de spermatozoïdes.

⁷ Cette équation est issue des recommandations de l'US EPA (US EPA, 2006).

Effet critique	Dose critique*	Facteur d'incertitude	VTR
Diminution de spermatozoïdes chez le rat Long Evans Toth <i>et al.</i> , 1992	BMD _{1xEC} L _{90%} = 72 mg/kg p.c./j <u>Ajustement allométrique</u> BMD _{1xEC} L _{90%^{HED}} = 21 mg/kg p.c./j	UF 25 UF _A 2,5 UF _H 10	VTR = 840 µg/kg p.c./j

*HED, Human Equivalent Dose ; il a été calculé à partir de l'équation précédente ; Afin de tenir compte de la variabilité toxicodynamique, un facteur d'incertitude UF_A a été fixé à 2,5.

Conclusions et recommandation de l'expertise collective

Le DCA est une substance chimique qui entraîne chez l'animal, des effets sur les organes reproducteurs mâles ainsi que des malformations cardiaques sur le fœtus.

- **VTR développement**

Le CES propose une VTR par voie orale spécifique aux effets sur le développement fœtal (effets tératogènes) applicable pour une exposition aiguë.

Effet critique	Dose critique*	Facteur d'incertitude	VTR
Augmentation des malformations cardiaques chez le rat Long Evans Smith <i>et al.</i> , 1992	BMD _{5%} L _{90%} = 24,6 mg/kg p.c./j <u>Ajustement allométrique</u> BMD _{5%} L _{90%^{HED}} = 6,4 mg/kg p.c./j	UF 25 UF _A 2,5 UF _H 10	VTR = 260 µg/kg p.c./j

BMD = Benchmark Dose ; UF = uncertainty factors (facteurs d'incertitude). UF : facteur d'incertitude global (appliqué), UF_A : variabilité inter-espèce, UF_H : variabilité individuelle,

*HED : Human Equivalent Dose ; il a été calculé à partir de l'équation précédente ; Afin de tenir compte de la variabilité toxicodynamique, un facteur d'incertitude UF_A a été fixé à 2,5.

- **VTR fertilité**

Le CES propose une VTR par voie orale spécifique aux effets sur la fertilité applicable pour une exposition chronique.

Effet critique	Dose critique*	Facteur d'incertitude	VTR
Diminution de spermatozoïdes chez le rat Long Evans Toth <i>et al.</i> , 1992	BMD _{1xEC} L _{90%} = 72 mg/kg p.c./j <u>Ajustement allométrique</u> BMD _{1xEC} L _{90%^{HED}} = 21 mg/kg p.c./j	UF 25 UF _A 2,5 UF _H 10	VTR = 840 µg/kg p.c./j

BMD = Benchmark Dose ; UF = uncertainty factors (facteurs d'incertitude). UF : facteur d'incertitude global (appliqué), UFA : variabilité inter-espèce, UFH : variabilité individuelle,

*HED, Human Equivalent Dose ; il a été calculé à partir de l'équation précédente ; Afin de tenir compte de la variabilité toxicodynamique, un facteur d'incertitude UF_A a été fixé à 2,5.

Le CES attire l'attention sur le fait que les VTR proposées pour les effets reprotoxiques (toxicité sur le développement et la fertilité) ne protègent pas des autres effets toxiques, en l'occurrence d'effets cancérogènes, et ne sont donc pas protectrice vis-à-vis du cancer. Le CES recommande

donc une analyse critique des VTR existantes, VTR fondées sur les effets cancérigènes du DCA, et le cas échéant, l'élaboration d'une telle VTR.

Le Comité d'Experts Spécialisés « Evaluation des risques liés aux substances chimiques » adopte le rapport d'expertise collective lors de sa séance du 7 janvier 2010 et fait part de cette adoption à la direction générale de l'Afsset.

Maisons-Alfort, le 1 avril 2010

Au nom des experts du CES
« Evaluation des risques liés aux substances chimiques »,

le président du CES

M. Michel Guerbet

BIBLIOGRAPHIE

Fin de la revue bibliographique : Avril 2009

Budavari *et al.*, 1996. The merck index : an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. Merck and Co., Inc., Whitehorse, NJ. P. 2158, 3095, 9757-9758.

CIRC, 2004. Some drinking-water disinfectants and contaminants, including arsenic. Monographies du CIRC sur l'évaluation des risques de cancérogénicité pour l'homme, vol 84 ; CIRC, Lyon.

Cornett *et al.*, 1999. Inhibition of glutathione S-transferase and tyrosine metabolism by dichloroacetate : A potential unifying mechanism for its altered biotransformation and toxicity. *Biochem. Res. Commun.*, 262 :752-756.

Curry, S.H., Chu, P.I., Baumgartner, T.G. et Stacpoole, P.W. (1985) Plasma concentrations and metabolic effects of intravenous sodium dichloroacetate. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 37: 89-93.

Epstein, D.L., Nolen, G.A., Randall, J.L., Christ, S.A., Read, E.J., Stober, J.A. et Smith, M.K 1992. Cardiopathic effects of dichloroacetate in the fetal Long-Evans rat. *Teratology*, 46(3) : 225-235.

Evans, O.B. 1982. Dichloroacetate tissue concentrations and its relationship to hypolactatemia and pyruvate dehydrogenase activation. *Biochem. Pharmacol.*, 31(19) : 3124-3126.

Fisher, J.W., Channel, S.R., Eggers, J.S., Johnson, P.D., MacMahon, K.L., Goodyear, C.D., Sudberry, G.L., Warren, D.A., Latendresse, J.R. et Graeter, L.J. 2001. Trichloroethylene, trichloroacetic acid, and dichloroacetic acid: do they affect fetal rat heart development? *Int. J. Toxicol.*, 20 : 257-267.

Gonzalez-Leon A *et al.*, 1997. Pharmacokinetics and metabolism of dichloroacetate in the F344 rat after prior administration in drinking water. *Toxicology and Applied Pharmacology* 146(2), 189-195.

Hansch, C., Leo, A., Hoekman, D.H. et Heller, S. 1995. Exploring QSAR. Hydrophobic, electronic, and steric constants. ACS Professional Reference Book. American Chemical Society, Washington, DC.14C] dichloroacetate in male Sprague-Dawley rats. Identification of glycine conjugates, including hippurate, as urinary metabolites of dichloroacetate. *Drug Metab. Dispos.*, 26(11) : 1134-1143 [cité dans USUSUS EPA, 2003c].

Hunter ES *et al.*, 1996. Comparative effects of haloacetic acids in whole embryo culture. *Teratology* 54(2), 7-64.

Keys, D.A., Schultz, I.R., Mahle, D.A. et Fisher, J.W. 2004. A quantitative description of suicide inhibition of dichloroacetic acid in rats and mice. *Toxicol. Sci.*, 82 : 381-393.

Kim, H. et Weisel, C.P. 1998. Dermal absorption of dichloro- and trichloroacetic acids from chlorinated water. *J. Expos. Anal. Environ. Epidemiol.*, 8(4) : 555-575.

Koenig, G., Lohmar, E. et Rupprich, N. 2002. Chloroacetic acids. Dans : Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry. John Wiley & Sons, Inc. Disponible sur : http://www.mrw.interscience.wiley.com/ueic/articles/a06_537/sect2-fs.html.

Lide, D.R. (dir.). 2003-2004. CRC handbook of chemistry and physics. 84e éd. CRC Press Inc., Boca Raton, FL.

Lin, E.L., Mattox J.K. et Daniel, F.B. 1993. Tissue distribution, excretion and urinary metabolites of dichloroacetic acid in the male Fischer 344 rat. *J. Toxicol. Environ. Health*, 38(1) : 19-32.

Linder RE *et al.*, Spermatotoxicity of dichloroacetic acid. *Reproductive Toxicology* (Elmsford, N.Y.) 1(5), 681-688.

Lukas, G., Vyas, K.H., Brindle, S.D., LeSher, A.R. et Wagner, W.E., Jr. 1980. Biological disposition of sodium dichloroacetate in animals and humans after intravenous administration. *J. Pharmacol. Sci.*, 69(4) : 419-421.

Martin JW *et al.*, 2003. Airborne haloacetic acids. *Environmental Science & Technology* 37(13), 2889-2897

Morris, E.D. et Bost, J.C. 2002. Acetic acid, halogenated derivatives. Dans : Kirk-Othmer encyclopedia of chemical technology. 5e éd. John Wiley & Sons, Inc. Disponible sur : http://www.mrw.interscience.wiley.com/kirk/articles/halomorr.a01/sect1_2-fs.html.

Nikolaou, A.D., Kostopoulou, M.N. et Lekkas, T.D. 1999. Organic by-products of drinking water chlorination. *Global Nest: Int. J.*, 1(3) : 143-156.

Rapport OMS, 2006 Guidelines for safe recreational waters Volume 2 - Swimming pools and similar recreational-water environments.

Smith MK *et al.*, 1992. Developmental toxicity of dichloroacetate in the rat. *Teratology* 46(3), 217-223.

Schultz, I.R., Merdink, J.L., Gonzalez-Leon, A. et Bull, R.J. 1999. Comparative toxicokinetics of chlorinated and brominated haloacetates in F344 rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 158(2) : 103-114.

Schultz IR *et al.*, 2002. Dichloroacetate toxicokinetics and disruption of tyrosine catabolism in B6C3F1 mice: dose-response relationships and age as a modifying factor. *Toxicology* 173(3), 229-247.

Stacpoole, P.W., Henderson, G.N., Yan, Z. et James, M.O. 1998a. Clinical pharmacology and toxicology of dichloroacetate. *Environ. Health Perspect.*, 106 (Suppl. 4) : 989-994.

Stacpoole, P.W., Henderson, G.N., Yan, Z., Cornett, R. et James, M.O. 1998b. Pharmacokinetics, metabolism, and toxicology of dichloroacetate. *Drug Metab. Rev.*, 30(30) : 499-539.

Tong, Z., Board, P.G. et Anders, M.W. 1998a. Glutathione transferase zeta-catalyzed biotransformation of dichloroacetic acid and other alpha-haloacids. *Chem. Res. Toxicol.*, 11 : 1332-1338.

Tong, Z., Board, P.G. et Anders, M.W. 1998b. Glutathione transferase zeta catalyzes the oxygenation of the carcinogen DCA to glyoxylic acid. *Biochem. J.*, 331(2) : 371-374.

Toth GP *et al.*, 1992. Adverse male reproductive effects following subchronic exposure of rats to sodium dichloroacetate. *Fundamental and Applied Toxicology: Official Journal of the Society of Toxicology* 19(1), 57-63.

US EPA (Environmental Protection Agency des États-Unis). 2003c. Toxicological review of dichloroacetic acid (CAS No. 79-43-6). In support of summary information on the Integrated Risk Information System (IRIS). EPA 635/R-03/007. National Center for Environmental Assessment, US EPA, Washington, DC. Août. Disponible sur : <http://www.epa.gov/iris/toxreviews/0654-tr.pdf>.

US EPA (2006) Harmonization in Interspecies Extrapolation: Use of BW^{3/4} as a Default Method in Derivation of the Oral RfD (external review draft, EPA/630/R-06/001). 2006. Ref Type: Report

Warren DA *et al.*, 2006 Trichloroethylene, trichloroacetic acid, and dichloroacetic acid: do they affect eye development in the Sprague-Dawley rat? *International Journal of Toxicology* 25(4), 279- 284.

Xu, X., Mariano, T.M., Laskin, J.D. et Weisel, C.P. 2002. Percutaneous absorption of trihalomethanes, haloacetic acids, and haloketones. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 184(1) : 19-26.

Communication personnelle d'un expert du GT « piscine », laboratoire LCME de Poitiers

Recommandations pour la qualité de l'eau potable au Canada : document technique. Les acides haloacétiques », préparé par le Comité fédéral-provincial-territorial sur l'eau potable du Comité fédéral-provincial-territorial sur la santé et l'environnement, Ottawa (Ontario), juillet 2008.



EXPERTISE COLLECTIVE : SYNTHÈSE ET CONCLUSIONS

Relative à l'élaboration de VTRs par voie orale fondées sur les effets reprotoxiques de l'acide trichloroacétique

Saisine Afsset n° « 2006/011 »

Ce document synthétise les travaux du prestataire, du groupe de travail « Valeurs Toxicologiques de Référence » et présente les compléments du Comité d'Experts Spécialisés.

Présentation de la question posée

Dans le cadre de la saisine « **Evaluation des risques sanitaires liés à la présence de dangers chimiques et/ou biologiques dans l'eau, l'air et les surfaces des piscines réglementées** » menée par le groupe de travail d'experts « *Evaluation des risques sanitaires liés à la qualité des eaux et des produits et procédés de traitement des eaux de piscines* », une construction de VTR reprotoxique pour les acides haloacétiques a été envisagée car aucune VTR n'existent pour les effets reprotoxiques, effets pourtant avérés de ces substances.

Organisation de l'expertise

L'Afsset a confié au Comité d'Experts Spécialisés (CES) « Evaluation des risques liés aux substances chimiques » la validation de ces VTR. Ce dernier a mandaté le groupe de travail « Valeurs toxicologiques de référence » pour l'expertise du rapport du groupe de travail et la construction de la VTR reprotoxique de l'acide trichloroacétique (TCA). Deux rapporteurs du groupe de travail ont été nommés. Le rapport produit par le groupe de travail tient compte des observations et éléments complémentaires transmis par les membres du CES.

Ces travaux d'expertise sont ainsi issus d'un collectif d'experts aux compétences complémentaires. Ils ont été réalisés dans le respect de la norme NF X 50-110 « qualité en expertise » avec pour objectif de respecter les points suivants : compétence, indépendance, transparence, traçabilité.

Description de la méthode

Sur la base du document « Méthode de construction de VTR fondées sur des effets sur la reproduction et le développement » réalisé par l'Afsset, les rapporteurs du groupe de travail VTR ont effectué un profil toxicologique en vue de sélectionner l'effet critique et l'étude source à exploiter. Ils ont ensuite donné leur avis sur les choix effectués au regard des données disponibles.

La construction des VTR diffère en fonction de l'hypothèse formulée ou des données acquises sur le mode d'action toxique de la substance. En l'état actuel des connaissances et des conventions, on considère généralement que pour les effets reprotoxiques, la toxicité ne s'exprime qu'au-delà d'un seuil de dose (à l'exception des effets mutagènes sur cellules germinales). Ce postulat peut néanmoins être remis en cause si les données disponibles le justifient.

La construction d'une VTR est donc définie de la manière suivante :

$$VTR = \frac{Dose \cdot critique}{UF} \quad \text{avec} \quad \begin{array}{l} Dose \text{ critique} = NOAEL, LOAEL \text{ ou } BMDL^2 \\ UF = \text{facteur d'incertitude global appliqué} \end{array}$$

En pratique, la construction de la VTR implique les considérants suivants :

- choix de l'effet critique ;
- choix d'une étude de bonne qualité scientifique permettant d'établir une relation dose – réponse (ou dose – effet) ;
- choix ou construction d'une dose critique à partir des données obtenues chez l'animal et/ou chez l'homme ;
- application de facteurs pour tenir compte de la variabilité et des incertitudes.

Une discussion au sein du CES a permis de se prononcer sur le choix de la dose critique et des facteurs d'incertitude. Le CES a insisté sur la nécessité de restituer les études complémentaires qui, si elles ne sont pas directement exploitées pour l'identification de la dose critique, sont utiles au choix des facteurs d'incertitudes (études de toxicocinétique, disponibilité d'autres NOAEL ou LOAEL, etc.).

Résultat de l'expertise collective

Recueil des données toxicologiques

Cette partie est fondée sur le document technique de Santé Canada publié en juillet 2008 : « Recommandations pour la qualité de l'eau potable au Canada : les acides haloacétiques ».

Une recherche bibliographique complémentaire via Pubmed concernant les effets reprotoxiques de l'acide trichloroacétique a été réalisée, couvrant la période 2004-début 2009. Les mots clés utilisés étant « haloacetic acids », « trichloroacetic acid », « swimming pool », « disinfection by-products mixtures », et « drinking water ». Ainsi, quinze articles concernant la toxicité générale du TCA et la toxicité sur la reproduction du TCA ont été identifiés. Parmi ces quinze articles, seulement 8 articles portaient sur les effets reprotoxiques et ont donc été retenus.

Toxicocinétique

Le TCA est facilement absorbé à partir du tractus gastro-intestinal après une exposition par voie orale, tant chez les rats que chez l'Homme (Kim et Weisel, 1998 ; Schultz *et al.*, 1999). Chez des rats F344, la concentration sanguine de TCA à la suite d'une ingestion orale de 500 µg/kg a atteint son maximum à 350 µg/kg environ deux heures après l'administration de la dose (Schultz *et al.*, 1999).

Aucun signe d'absorption importante de TCA par voie cutanée n'est relaté chez les humains que ce soit in vivo ou in vitro. (Kim et Weisel, 1998, Xu *et al.*, 2002).

Administré par voie orale ou en intraveineuse chez des rats, le TCA se fixe à hauteur de 47% aux protéines plasmatiques (Templin *et al.*, 1993 ; Schultz *et al.*, 1999 ; Yu *et al.*, 2000). Du fait de

cette fixation, seul le TCA libre est éliminé (Yu *et al.*, 2000). La fixation aux protéines plasmatiques varie entre les espèces mais serait plus important chez l'Homme (Lumpkin *et al.*, 2003).

Le TCA serait peu métabolisé par le foie. On a observé la formation de dioxyde de carbone, d'acide glyoxylique, d'acide oxalique, d'acide glycolique et de DCA chez les rats et les souris à la suite de l'administration par voie orale de TCA (neutralisé) radiomarqué. Le TCA serait métabolisé par déshalogénéation réductrice en DCA (Larson et Bull, 1992). On a proposé comme voie métabolique une déshalogénéation réductrice plus poussée du DCA en MCA et, finalement, en thiodiglycolate (Bull, 2000).

L'urine est la principale voie d'excrétion du TCA administré par voie orale ou intraveineuse (Templin *et al.*, 1993 ; Schultz *et al.*, 1999 ; Yu *et al.*, 2000). Le TCA est excrété sous forme inchangée (30 % de la dose) ou sous forme de métabolites.

Classement

Le TCA est classé par l'Union Européenne C ; R35 - N ; R50-53

Effets sanitaires

- *Pouvoir irritant sur la peau et les muqueuses*

Le TCA peut provoquer des lésions cutanées, oculaires et digestives lors d'ingestion. Les signes cliniques rapportés en milieu professionnel sont des rougeurs, enflure, douleur et brûlures au niveau de la peau, des irritations sévères ou des lésions corrosives au niveau de l'œil et des lésions gastro-intestinales. (CHEMINFO, 2003 d, e).

- *Toxicité chronique*

L'étude de DeAngelo *et al.* (1997) a été réalisée chez 50 rats mâles F344 exposés à des doses de 0,05, 0,5 et 5 g/L pendant deux ans. Les auteurs rapportent une diminution significative du poids du corps et une augmentation de l'activité des enzymes hépatiques. Les auteurs proposent un NOAEL de 32,5 mg/kg p.c./jour pour ces effets.

- *Cancérogénicité et génotoxicité*

Le TCA n'est pas recensé comme produit mutagène ou génotoxique (CIRC, 2004).

L'exposition prolongée de souris pendant 52 à 114 semaines au TCA, augmente l'incidence des tumeurs du foie pour des concentrations de TCA comprises entre 0,5 et 5 g/L dans l'eau de boisson. Les tumeurs principalement retrouvées sont des adénomes et des carcinomes hépatocellulaires (⁸Santé Canada, 2009). Cependant cet effet est non pertinent chez l'homme et donc non transposable à l'homme puisque la prolifération des peroxyosomes y est corrélée à l'incidence tumorale hépatique.

- *Effets reprotoxiques (effets toxiques pour la reproduction et le développement)*

Chez l'homme, aucune étude ne rapporte des effets reprotoxiques associés spécifiquement à une exposition subchronique ou chronique au TCA.

Chez l'animal, la recherche bibliographique a permis d'identifier 7 études de reprotoxicité sur le TCA. Le TCA est reprotoxique sur le développement fœtal. Les principaux effets observés sont une diminution du poids fœtal et du poids de certains organes (comme la rate) et des malformations cardiaques et oculaires.

Concernant la fertilité, aucune étude animale rapportant spécifiquement des effets sur la fertilité attribuables au TCA n'a pu être identifiée.

⁸ Santé Canada se base sur plusieurs études dont : Bull *et al.* (1990) ; De Angelo et Daniel (1990) ; US EPA (2001) ; Pereira (1995, 1996).

- Effets sur le développement

- Chez l'homme

Aucune donnée humaine sur les effets sur le développement du TCA n'est disponible quelle que soit la voie d'exposition.

- Chez l'animal

L'étude de Sidney *et al.* (1996) a été réalisée sur des embryons de souris CD-1 cultivés in-vitro en présence de TCA dans le milieu de culture rapporte des effets du TCA sur le développement fœtal, en mettant en évidence des malformations du tube neural (2000µM) mais aussi au niveau pharyngé, oculaire et cardiaque (3000 µM). L'objectif principal de cette étude était de comparer le potentiel de plusieurs sous produits de chloration vis-à-vis des manifestations toxiques neurologiques (en relation avec le développement du tube neural) : le TCA ne fait pas partie des sous-produits les plus actifs pour ces effets. Toutefois, cette étude montre le large spectre des manifestations toxiques associées à une exposition de l'embryon au TCA, parmi lesquelles les malformations cardiaques.

Cette étude *in vitro* ne permet pas d'identifier de dose repère permettant la construction d'une VTR mais apporte une confirmation expérimentale de la plausibilité des effets constatés dans d'autres études.

L'étude de Fischer *et al.* (2001) a été réalisée durant la gestation de rates gravides Sprague-Dawley. Des doses quotidiennes de mg/kg p.c./j de TCA ont été administrées par gavage de GD 6 à 15 (groupes de 20 animaux). L'examen des fœtus au 21ème jour de gestation (examen microscopique approfondi du tissu cardiaque et pesées), ne montre aucune différence significative au niveau des malformations cardiaques tandis qu'une diminution significative du poids du fœtus est observée à GD 15.

Il est possible que les résultats négatifs rapportés dans cette étude soient partiellement expliqués par un problème de puissance : 7 portées sur 19, soit 37%, présentaient des malformations cardiaques dans le groupe témoin (eau). Tous les groupes d'animaux différents des témoins présentaient un taux de malformations supérieur, sans atteindre le seuil de significativité statistique.

L'étude de Warren *et al.* (2006) a été réalisée chez des rates gravides Sprague-Dawley Crl : CDR BR âgées de trois mois. Ces rates ont été exposées par gavage à 300 mg/kg p.c./j de TCA durant la période de gestation du 6^{ème} jour au 15^{ème} (étude a posteriori d'une partie des fœtus examinés dans l'étude de Fischer *et al.*, 2001). Les effets mis en évidence par les auteurs sont des diminutions du poids fœtal et des malformations oculaires (seules malformations étudiées précisément dans cette étude) pour cette dose. Selon les auteurs, les malformations oculaires rapportées ne sont pas la simple conséquence de la diminution de poids des fœtus. La principale limite de cette étude est méthodologique : pour des raisons de préparation initiale incorrecte (coupe non franche entre les deux yeux), seuls 48% des fœtus initialement étudiés par Fischer *et al.* ont pu faire l'objet de l'examen approfondi des lésions oculaires utilisées dans cette étude et ceci limite la puissance des tests statistiques réalisés.

L'étude de Smith *et al.* (1989) a été réalisée chez des rates Long-Evans gravides, âgées de 65 à 80 jours et exposées par voie orale (gavage) durant l'organogénèse (6ème au 15ème jour de gestation) à des doses de TCA variant de 0, 330, 800, 1200, et 1800 mg/kg p.c./j.

Les auteurs rapportent une toxicité au niveau des fœtus avec une diminution de la taille et du poids des fœtus liés à la dose et ceci quelle que soit la dose, une augmentation de la mort embryonnaire (LOAEL : 800mg/kg p.c./j) et des malformations fœtales au niveau des tissus mous

(cardiaques majoritairement avec un LOAEL de 330 mg/kg p.c./j) et des malformations des tissus squelettiques (dont orbites oculaires à 1200 mg/kg p.c./j).

Les auteurs mettent également en évidence que le TCA augmente significativement le nombre d'implantations embryonnaires (mais aussi le nombre de résorptions post implantatoires) à partir de la dose 800 mg/kg p.c./j. On notera également une augmentation non significative du nombre de fœtus par portée pour la dose à 330 mg/kg p.c./j. Ces observations pourraient traduire un effet de l'exposition au TCA sur la fertilité mais aucune conclusion définitive n'est possible sur ce point en raison de la conception des études. Les auteurs considèrent un LOAEL de 330 mg/kg p.c./j pour le développement mais n'identifient aucun NOAEL.

L'étude de Johnson *et al.* (1998) a été réalisée chez 11 rats Sprague-Dawley exposés par voie orale au TCA (eau de boisson contenant du TCA neutralisé) à une dose de 291 mg/kg p.c./j au cours des jours de gestation 1 à 22. Les auteurs ne relatent aucune toxicité maternelle à cette dose (diminution non significative de la prise de poids).

En revanche, ils rapportent des effets reprotoxiques observés chez les fœtus qui sont :

- une augmentation significative du nombre de site d'implantation et du nombre de résorptions,
- une tératogénicité cardiaque avec un taux de malformations des tissus cardiaques plus élevé (lévocardie). Cette étude a porté une attention particulière à l'étude du tissu cardiaque des fœtus afin de caractériser le mieux possible les malformations et de dépasser certaines limites méthodologiques de l'étude de Smith *et al.* par exemple sur ce point (étude du cœur perfusé vs. étude de lames fixées). En raison de choix méthodologiques (exposition J1 à J22, eau de boisson partagée par plusieurs animaux), cette étude n'avait pas spécifiquement pour but d'identifier une dose repère pour la toxicité sur le développement cardiaque des fœtus suite à une exposition maternelle au TCA mais de confirmer le lien entre cette exposition et la survenue des malformations.

L'étude de Singh (2005) a été réalisée chez des rates Charles Foster gravides, âgées de 85 à 120 jours, exposées par groupes de 6 animaux à des doses de TCA de 1000 à 1800 mg/kg p.c./j du 6^{ème} au 15^{ème} jour de gestation (gavage). Au 19^{ème} jour de gestation, les rates et leurs fœtus (et organes annexes) ont été examinés pour rechercher des signes de toxicité générale ainsi que d'éventuelles anomalies testiculaires. Les fœtus ont fait l'objet d'une recherche plus approfondie des anomalies ou malformations testiculaires avec notamment un examen macroscopique et microscopique.

Le taux de pertes post-implantatoires est significativement augmenté à toutes les doses par rapport au groupe témoin avec une relation dose-effet relativement claire (LOAEL = 1000 mg/kg p.c./j). La prise de poids maternelle a été significativement diminuée à partir de la dose à 1200 mg/kg p.c./j, également avec une relation dose-effet relativement claire (NOAEL = 1000 mg/kg p.c./j ; LOAEL = 1200 mg/kg p.c./j). Les altérations macroscopiques (diminution de poids) et microscopiques (diminution de diamètre des tubes séminifères, signes d'apoptose) observées sur les testicules sont significatives à partir de la dose de 1200 mg/kg p.c./j (LOAEL = 1000 mg/kg p.c./j).

L'étude de Singh (2006) a été réalisée chez des rates Charles Foster gravides, âgées de 85 à 120 jours, exposées par groupes de 25 animaux à des doses de TCA de 1000 à 2000 mg/kg p.c./j du 6^{ème} au 15^{ème} jour de gestation (gavage). Au 19^{ème} jour de gestation, les rates et leurs fœtus ont été examinés pour rechercher des signes de toxicité générale ainsi que d'éventuelles anomalies morphologiques. Les fœtus ont fait l'objet d'une recherche plus approfondie des altérations ou malformations neurologiques avec notamment un examen microscopique de coupes cérébrales. Le groupe exposé à 2000 mg/kg p.c./j a montré une résorption totale des sites d'implantation embryonnaires, ne permettant pas l'analyse approfondie de la descendance. Le taux de pertes

post-implantatoires est significativement augmenté à toutes les doses par rapport au groupe témoin avec une relation dose-effet relativement claire (LOAEL = 1000 mg/kg p.c./j). La prise de poids maternelle a été significativement diminuée à partir de la dose à 1200 mg/kg p.c./j, également avec une relation dose-effet relativement claire (NOAEL = 1000 mg/kg p.c./j ; LOAEL = 1200 mg/kg p.c./j).

Les altérations macroscopiques cérébrales fœtales sont significatives à partir de la dose de 1600 mg/kg p.c./j pour la diminution de taille du cerveau et à partir de la dose de 1200 mg/kg p.c./j pour la diminution de poids du cerveau. Le taux de lésions cérébrales fœtales, incluant hydrocéphalies, hémorragies cérébrales, avec à l'histologie des images de vacuolisation cérébrale et d'apoptose cellulaire est significativement élevé pour toutes les doses (LOAEL = 1000 mg/kg p.c./j).

Mécanisme d'action

Le mécanisme d'action associé à la survenue de malformations après exposition *in utero* n'est pas élucidé. Singh 2005 et 2006 évoque des effets anoxiques et de stress oxydant associés au TCA qui pourraient contribuer à augmenter les phénomènes apoptotiques et par là même expliquer une partie des altérations du développement observées chez les fœtus.

Analyse et évaluation des choix pour la construction de la VTR

VTR pour les effets sur le développement

- *Choix de l'effet critique*

La synthèse des études préalablement détaillées converge vers un effet critique constitué par les malformations cardiaques consécutives à une exposition maternelle au TCA pendant l'organogénèse. Les études de Singh en 2005 et 2006 mettent également en évidence des effets neurologiques et testiculaires en l'absence de toxicité maternelle significative mais le choix de la fourchette de doses retenues dans ces études ne permet pas de considérer ces effets comme survenant avant les effets cardiaques.

Le CES retient l'augmentation de l'incidence des malformations cardiaques comme effet critique.

- *Choix de l'étude*

L'étude la plus appropriée pour calculer une valeur toxicologique de référence, mettant en évidence l'effet critique est l'étude de Smith *et al.* (1989) pour les raisons suivantes :

- qualité méthodologique générale et notamment le nombre d'animaux par groupe, le régime de doses et l'étude des fœtus,
- transparence des résultats permettant une exploitation statistique complète.

Cette étude a été classé Klimisch 1. Il a été proposé la construction d'une Benchmark Dose à partir des résultats présentés dans le tableau 1.

- *Choix de la dose critique*

Les données disponibles ont été modélisées avec le logiciel Proast 18.2 du RIVM afin d'élaborer une Benchmark Dose (BMD). Il apparaît dans l'étude clé une relation dose-réponse significative entre l'augmentation des malformations cardiaques et la dose journalière d'exposition au TCA (tableau 1) (test de Kruskal Wallis).

L'objectif de la démarche est d'estimer la dose correspondant à un niveau de réponse défini ou à un pourcentage défini de réponse supplémentaire par rapport au témoin. Ce niveau ou ce pourcentage est appelé BMR pour Benchmark Response level. C'est majoritairement la BMDL, autrement dit la limite inférieure de l'intervalle de confiance de la BMD, qui est considérée comme dose repère. Les données expérimentales ont été ajustées par les modèles développés par le

RIVM pour des données dichotomiques (modèles gamma, logistique, multi-étapes, probit, Weibull...)

Le choix du modèle s'est fait sur celui qui s'ajustait le mieux aux données expérimentales par la méthode du maximum de vraisemblance (Log Likelihood): le modèle gamma a été retenu pour l'estimation de la limite inférieure de l'intervalle de confiance à 90% ⁹d'une dose correspondant à une augmentation de la réponse par rapport au groupe non exposé de 5%. Ce modèle est celui dont le maximum de vraisemblance se rapprochait le plus du modèle « full ». La **BMD_{5%}** est égale à **80,2 mg/kg p.c./j**, la **BMD_{5%}L_{90%}** à **28,6 mg/kg p.c./j**.

Tableau 1 : Incidence des malformations fœtales suite à une exposition maternelle au TCA aux jours 6 à 15 de gestation (rat Long Evans)

Dose (mg/kg p.c./j)	Nombre de portées atteintes	Nombre de portées
0	1	26
330*	6	19
800*	12	17
1200*	11	14
1800*	8	8

* significatif $p < 0,05$

- *Choix des facteurs d'incertitude et ajustement allométrique*

Pour tenir compte de la variabilité inter-espèces, un ajustement allométrique a été réalisé, et a permis de calculer une HED (Human Equivalent Dose), à l'aide de l'équation suivante ¹⁰:

$$\text{Dose équivalente homme} = \text{Dose animal} \times \left(\frac{\text{Poids animal}}{\text{Poids homme}} \right)^{1/4}$$

Le poids moyen des rats a été déterminé d'après les données décrites dans l'étude, et mesuré aux jours 20. Il est égal à 320 g. Celui de l'homme est estimé à 70 kg. Les doses sont exprimées en mg/kg p.c./j .

Soit dose équivalent chez l'homme = dose animale*0,26 (ce qui reviendrait à appliquer un facteur qui tient compte de la variabilité toxicocinétique, de 3,8).

Pour tenir compte de la variabilité toxicodynamique et d'incertitudes résiduelles, un facteur d'incertitude a été fixé à 2,5 selon les recommandations du document de référence pour « la construction d'une valeur toxicologique de référence pour les substances reprotoxiques » (Afsset 2007). La valeur du facteur d'incertitude pour la variabilité inter-espèces est donc de 2,5.

Une valeur finale de 10 par défaut a été choisie pour la variabilité intra-espèces (Afsset 2007), $UF_H = 10$ (variabilité intra-espèce ou interindividuelle).

⁹ La limite inférieure de l'intervalle de confiance à 95% (one-sided ou « un coté ») utilisée par l'US EPA, est équivalente à la limite inférieure de l'intervalle de confiance à 90% (two-sided ou « deux coté ») utilisée par le RIVM

¹⁰ Cette équation est issue des recommandations de l'US EPA (US EPA, 2006).

Effet critique	Dose critique*	Facteur d'incertitude	VTR
Augmentation des malformations cardiaques chez le rat Long Evans Smith <i>et al.</i> , 1989	BMD _{5%} L _{90%} = 28,6 mg/kg p.c./j <u>Ajustement allométrique</u> BMD _{5%} L _{90%^{HED}} = 7,4 mg/kg p.c./j	UF 25 UF _A 2,5 UF _H 10	VTR = 300 µg/kg p.c./j

*HED, Human Equivalent Dose; il a été calculé à partir de l'équation précédente; Afin de tenir compte de la variabilité toxicodynamique, un facteur d'incertitude UFA été fixé à 2,5.

Conclusions et recommandation de l'expertise collective

Le TCA est une substance chimique qui entraîne chez l'animal, des malformations cardiaques sur le fœtus.

Le CES propose une VTR par voie orale spécifique aux effets sur le développement applicable pour une exposition aiguë.

Effet critique	Dose critique*	Facteur d'incertitude	VTR
Augmentation des malformations cardiaques chez le rat Long Evans Smith <i>et al.</i> , 1989	BMD _{5%} L _{90%} = 28,6 mg/kg p.c./j <u>Ajustement allométrique</u> BMD _{5%} L _{90%^{HED}} = 7,4 mg/kg p.c./j	UF 25 UF _A 2,5 UF _H 10	VTR = 300 µg/kg p.c./j

BMD = Benchmark Dose; UF = uncertainty factors (facteurs d'incertitude). UF : facteur d'incertitude global (appliqué), UFA : variabilité inter-espèces, UF_H : variabilité individuelle,

*HED, Human Equivalent Dose; il a été calculé à partir de l'équation précédente; Afin de tenir compte de la variabilité toxicodynamique, un facteur d'incertitude UFA été fixé à 2,5.

Le Comité d'Experts Spécialisés « Evaluation des risques liés aux substances chimiques » adopte le rapport d'expertise collective lors de sa séance du 7 janvier 2010 et fait part de cette adoption à la direction générale de l'Afsset.

Maisons-Alfort, le 1 avril 2010

Au nom des experts du CES

« Evaluation des risques liés aux substances chimiques »,

le président du CES

M. Michel Guerbet

BIBLIOGRAPHIE

Fin de la revue bibliographique : Avril 2009

Allen, B.C. et Fisher, J.W. 1993. Pharmacokinetic modeling of trichloroethylene and trichloroacetic acid in humans. *Risk Anal.*, 13(1) : 71-86.

Ashford, R.D. 1994. *Ashford's dictionary of industrial chemicals*. Wavelength Publications Ltd., Londres, Royaume-Uni.

Bader, E.L., Hrudehy, S.E. et Froese, K.L. 2005. Urinary excretion half life of trichloroacetic acid as a biomarker of exposure to chlorinated drinking water disinfection by-products. *Occup. Environ. Med.*, 61 : 715-716.

Budavari et al., 1996. *The Merck index : an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals*. Merck and Co., Inc., Whitehorse, NJ. P. 2158, 3095, 9757-9758.

Bull, R.J. 2000. Mode of action of liver tumor induction by trichloroethylene and its metabolites, trichloroacetate and dichloroacetate. *Environ. Health Perspect.*, 108 (Suppl. 2) : 241-259.

CHEMINFO, 2003 d. Trichloroacetic acid solutions. No CAS 76-03-9. Registre no 766, volume 80. Profils chimiques établis par le Centre canadien d'hygiène et de sécurité au travail, Hamilton, Ontario.

CHEMINFO. 2003 e. Trichloroacetic acid solid. No CAS 76-03-9. Registre no 539, volume 80. Profils chimiques établis par le Centre canadien d'hygiène et de sécurité au travail, Hamilton, Ontario.

Fisher, J.W., Channel, S.R., Eggers, J.S., Johnson, P.D., MacMahon, K.L., Goodyear, C.D., Sudberry, G.L., Warren, D.A., Latendresse, J.R. et Graeter, L.J. 2001. Trichloroethylene, trichloroacetic acid, and dichloroacetic acid: do they affect fetal rat heart development? *Int. J. Toxicol.*, 20 : 257-267

Grant, W.M. et Schuman, J.S. 1993. *Toxicology of the eye: effects on the eyes and visual system from chemicals, drugs, metals and minerals, plants, toxins and venoms*. 4e éd. C.C. Thomas, Springfield, IL. p. 993.

Hansch, C., Leo, A., Hoekman, D.H. et Heller, S. 1995. *Exploring QSAR. Hydrophobic, electronic, and steric constants*. ACS Professional Reference Book. American Chemical Society, Washington, DC.

Heithersay, G.S. et Wilson, D.F. 1988. Tissue responses in the rat to trichloroacetic acid – an agent used in the treatment of invasive cervical resorption. *Aust. Dental J.*, 33(6): 451-461.

Johnson PD, Dawson, BV, Goldberg, SJ 1998. Cardiac teratogenicity of trichloroethylenemetabolites. *Journal of the American College of Cardiology* 32(2), 540-545.

Hunter ES et al., 1996. Comparative effects of haloacetic acids in whole embryo culture. *Teratology* 54(2), 7-64.

Kim, H. et Weisel, C.P. 1998. Dermal absorption of dichloro- and trichloroacetic acids from chlorinated water. *J. Expos. Anal. Environ. Epidemiol.*, 8(4) : 555-575

Koenig, G., Lohmar, E. et Rupprich, N. 2002. Chloroacetic acids. Dans : *Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry*. John Wiley & Sons, Inc. Disponible sur : http://www.mrw.interscience.wiley.com/ueic/articles/a06_537/sect2-fs.html.

Larson, J.L. et Bull, R.J. 1992. Metabolism and lipoperoxidative activity of trichloroacetate and dichloroacetate in rats and mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 115 : 268-277.

Lewis, R.J., Sr. (dir.). 2001. *Hawley's condensed chemical dictionary*. 14e éd. John Wiley & Sons, Inc., New York, NY. p. 251, 361, 1124.

Lewinstein, I. et Rotstein, I. 1992. Effect of trichloroacetic acid on the microhardness and surface morphology of human dentin and enamel. *Endodont. Dent. Traumatol.*, 8 : 16-20.

Lide, D.R. (dir.). 2003-2004. *CRC handbook of chemistry and physics*. 84e éd. CRC Press Inc., Boca Raton, FL.

Lumpkin, M.H., Bruckner, J.V., Campbell, J.L., Dallas, C.E., White, C.A. et Fisher, J.W. 2003. Plasma binding of trichloroacetic acid in mice, rats, and humans under cancer bioassay and environmental exposure conditions. *Drug Metab. Dispos.*, 31(10): 1203-1207.

- Martin JW et al., 2003. Airborne haloacetic acids. *Environmental Science & Technology* 37(13), 2889-2897.
- Meister, R.T. (dir.). 2002. *Farm chemicals handbook*. Vol. 88. Meister Publishing Co., Willoughby, OH. p. C-380.
- Muller, G., Spassovski, M. et Henschler, D. 1974. Metabolism of trichloroethylene in man.II. Pharmacokinetics of metabolites. *Arch. Toxicol.*, 32 : 283-295.
- Nikolaou, A.D., Kostopoulou, M.N. et Lekkas, T.D. 1999. Organic by-products of drinking water chlorination. *Global Nest: Int. J.*, 1(3) : 143-156.
- NTP (National Toxicology Program). 2003a. Dichloroacetic acid (sommaire). Clinical Evaluation Committee -
- Rapport préliminaire soumis par Arthur D. Little, Inc. NTP, National Institutes of Health, Public Health Service, USUS Department of Health and Human Services. Disponible sur :
- <http://ntp.niehs.nih.gov/index.cfm?objectid=03DADAD8-DFB8-5274-3E46A0CEA167B37D>.
- Rapport OMS, 2006 Guidelines for safe recreational waters
Volume 2 - Swimming pools and similar recreational-water environments.
- Schultz, I.R., Merdink, J.L., Gonzalez-Leon, A. et Bull, R.J. 1999. Comparative toxicokinetics of chlorinated and brominated haloacetates in F344 rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 158(2): 103-114.
- Smith MK et al., 1989. Teratogenic activity of trichloroacetic acid in the rat. *Teratology* 40(5), 445-451.
- Templin, M.V., Parker, J.C. et Bull, R.J. 1993. Relative formation of dichloroacetate and trichloroacetate from trichloroethylene in male B6C3F1 mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 123 : 1-8.
- Verschuere, K. 2001. *Handbook of environmental data on organic chemicals*. 4e éd. John Wiley & Sons, Inc., New York, NY.
- Volkel, W., Friedewald, M., Lederer, E., Pahler, A., Parker, J. et Dekant, W. 1998. Biotransformation of perchloroethene: Dose-dependent excretion of trichloroacetic acid, dichloroacetic acid, and N-acetyl-S-(trichlorovinyl)-L-cysteine in rats and humans after inhalation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 153 : 20-27.
- Warren DA et al., Trichloroethylene, trichloroacetic acid, and dichloroacetic acid: do they affect eye development in the Sprague-Dawley rat? *International Journal of Toxicology* 25(4), 279-284.
- Weast, R.C. (dir.). 1973. *Handbook of chemistry and physics*. 54e éd. CRC Press Inc., Cleveland, OH.
- Xu, X., Mariano, T.M., Laskin, J.D. et Weisel, C.P. 2002. Percutaneous absorption of trihalomethanes, haloacetic acids, and haloketones. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 184(1) : 19-26.
- US EPA (2006) Harmonization in Interspecies Extrapolation: Use of BW3/4 as a Default Method in Derivation of the Oral RfD (external review draft, EPA/630/R-06/001). 2006. Ref Type: Report
- Yu, K.O., Barton, H.A., Mahle, D.A. et Frazier, J.M. 2000. In vivo kinetics of trichloroacetate in male Fischer 344 rats. *Toxicol. Sci.*, 54 : 302-311.
- Communication personnelle d'un expert du GT « piscine », laboratoire LCME de Poitiers.
- Recommandations pour la qualité de l'eau potable au Canada : document technique. Les acides haloacétiques », préparé par le Comité fédéral-provincial-territorial sur l'eau potable du Comité fédéral-provincial-territorial sur la santé et l'environnement, Ottawa (Ontario), juillet 2008.



EXPERTISE COLLECTIVE : SYNTHÈSE ET CONCLUSIONS

Relative à l'élaboration de VTR par voie orale fondée sur les effets reprotoxiques de l'acide dibromoacétique

Saisine Afsset n° « 2006/011 »

Ce document synthétise les travaux du prestataire, du groupe de travail « Valeurs Toxicologiques de Référence » et présente les compléments du Comité d'Experts Spécialisés.

Présentation de la question posée

Dans le cadre de la saisine « **Evaluation des risques sanitaires liés à la présence de dangers chimiques et/ou biologiques dans l'eau, l'air et les surfaces des piscines réglementées** » menée par le groupe de travail d'experts « *Evaluation des risques sanitaires liés à la qualité des eaux et des produits et procédés de traitement des eaux de piscines* », une construction de VTR reprotoxique pour les acides haloacétiques a été envisagée car aucune VTR n'existent pour les effets reprotoxiques, effets pourtant avérés de ces substances.

Organisation de l'expertise

L'Afsset a confié au Comité d'Experts Spécialisés (CES) « Evaluation des risques liés aux substances chimiques » la validation de ces VTR. Ce dernier a mandaté le groupe de travail « Valeurs toxicologiques de référence » pour l'expertise du rapport du groupe de travail et la construction de la VTR reprotoxique de l'acide dibromoacétique DBA. Deux rapporteurs du groupe de travail ont été nommés. Le rapport produit par le groupe de travail tient compte des observations et éléments complémentaires transmis par les membres du CES.

Ces travaux d'expertise sont ainsi issus d'un collectif d'experts aux compétences complémentaires. Ils ont été réalisés dans le respect de la norme NF X 50-110 « qualité en expertise » avec pour objectif de respecter les points suivants : compétence, indépendance, transparence, traçabilité.

Description de la méthode

Sur la base du document « Méthode de construction de VTR fondées sur des effets sur la reproduction et le développement » réalisé par l'Afsset, les rapporteurs du groupe de travail VTR ont effectué un profil toxicologique en vue de sélectionner l'effet critique et l'étude source à exploiter. Ils ont ensuite donné leur avis sur les choix effectués au regard des données disponibles.

La construction des VTR diffère en fonction de l'hypothèse formulée ou des données acquises sur le mode d'action toxique de la substance. En l'état actuel des connaissances et des conventions, on considère généralement que pour les effets reprotoxiques, la toxicité ne s'exprime qu'au-delà d'un seuil de dose (à l'exception des effets mutagènes sur cellules germinales). Ce postulat peut néanmoins être remis en cause si les données disponibles le justifient.

La construction d'une VTR est donc définie de la manière suivante :

$$VTR = \frac{Dose \cdot critique}{UF} \quad \text{avec} \quad \begin{array}{l} Dose \text{ critique} = NOAEL, LOAEL \text{ ou } BMDL^2 \\ UF = \text{facteur d'incertitude global appliqué} \end{array}$$

En pratique, la construction de la VTR implique les considérants suivants :

- choix de l'effet critique ;
- choix d'une étude de bonne qualité scientifique permettant d'établir une relation dose – réponse (ou dose – effet) ;
- choix ou construction d'une dose critique à partir des données obtenues chez l'animal et/ou chez l'homme ;
- application de facteurs pour tenir compte de la variabilité et des incertitudes.

Une discussion au sein du CES a permis de se prononcer sur le choix de la dose critique et des facteurs d'incertitude. Le CES a insisté sur la nécessité de restituer les études complémentaires qui, si elles ne sont pas directement exploitées pour l'identification de la dose critique, sont utiles au choix des facteurs d'incertitudes (études de toxicocinétique, disponibilité d'autres NOAEL ou LOAEL, etc.).

Résultat de l'expertise collective

Identification de la substance

N° CAS = 631-64-1

Formule brute : Br₂CHCOOH

Recueil des données toxicologiques

Cette partie est fondée sur le document technique de Santé Canada publié en juillet 2008 : « Recommandations pour la qualité de l'eau potable au Canada : les acides haloacétiques ».

Une recherche bibliographique complémentaire (via Pubmed) concernant les effets reprotoxiques de l'acide dibromoacétique a été réalisée, couvrant la période 2004-début 2009. Les mots clés utilisés étant « haloacetic acids », « dibromoacetic acid », « toxicity », « swimming pool », « disinfection by-products mixtures », et « drinking water ». Ainsi, dix huit articles concernant la toxicité générale du DBA et la toxicité sur la reproduction du DBA ont été identifiés. Parmi ces dix huit articles, seulement 12 articles portaient sur les effets reprotoxiques et ont été par conséquent retenus.

Toxicocinétique

Chez le rat, le DBA est absorbé rapidement dans le sang à partir du tractus gastro-intestinal à la suite d'une exposition par voie orale. Sa concentration dans le sang atteint son maximum environ une heure après l'administration de la dose (Schultz *et al.*, 1999). Schultz *et al.* (1999) ont estimé

la biodisponibilité orale du DBA à 30 % seulement, ce qui est peut-être attribuable, selon les auteurs, à un effet de premier passage hépatique.

Des concentrations détectables et quantifiables de DBA ont été relevées dans le placenta, le liquide amniotique et le lait (Christian *et al.*, 2001). Le DBA a également été détecté dans le liquide interstitiel testiculaire lorsqu'on a administré à des rats Sprague-Dawley mâles (dont le nombre n'était pas précisé), par gavage pendant cinq jours, 250 mg de DBA/kg p.c. (neutralisé) (Holmes *et al.*, 2001).

Une étude sur le métabolisme *in vitro* réalisée par Tong *et al.* (1998a) a démontré que l'enzyme GST-zêta catalysait l'oxygénation du DBA en acide glyoxylique, voie qui est semblable à celle du DCA. L'OMS (2004c) a signalé que l'acide glyoxylique pouvait être métabolisé en glycine, glycolate, dioxyde de carbone ou acide oxalique, selon une étude réalisée par Stacpoole *et al.* (1998b).

Une seule étude a porté sur l'excrétion du DBA. Schultz *et al.* (1999) ; les auteurs ont exposé des rats à une seule dose de 109 mg de DBA/kg p.c. administrée par voie intraveineuse et ont estimé que la biotransformation constituait la principale voie d'élimination.

Classement

Le DBA est n'est pas classé par l'Union Européenne pour le risque reprotoxique.

Effets sanitaires

- *Toxicité chronique*

Linder *et al.* (1995) ont réalisé une étude sur des rats mâles Sprague-Dawley exposés à des doses de 2, 10, 50 et 250 mg/kg p.c./j sur une durée maximale de 42 jours. A la dose la plus forte, les auteurs rapportent une toxicité neurologique avec comme signes cliniques des postures anormales, des tremblements légers, et des mouvements atypiques et/ou difficiles des membres postérieurs.

L'étude du NTP (1999) a mis en évidence des effets immunotoxiques chez la souris B6C3F1 femelle qui avaient été exposés au DBA dans l'eau potable à des concentrations de 0, 125, 250, 500, 1 000 ou 2 000 mg/L par jour pendant 28 jours. Une augmentation significative du nombre de macrophages au niveau splénique a été observée à partir de la dose de 500 mg/L et plus (soit à partir de 68-73 mg/kg p.c..et par jour).

Dans une étude de 13 semaines qui a porté sur des souris B6C3F1 et des rats F344 exposés à des doses de 0, 125, 250, 500, 1 000 ou 2 000 mg/L de DBA dans l'eau de boisson, le NTP (2007) a montré les effets suivants :

-une diminution significative du poids corporel moyen final chez les deux espèces et les deux sexes exposés à la dose la plus forte, mais non liée à une baisse de la consommation d'eau. Le poids du foie a augmenté en fonction de la dose chez les souris des deux sexes exposées à 500 mg/L et plus et chez les rats exposés à 125 mg/L et plus.

-une augmentation significative de l'incidence de l'hypertrophie cellulaire au niveau de l'hypophyse était visible chez les rats mâles exposés à la dose élevée, mais ces effets étaient considérés comme secondaires à une atrophie testiculaire.

- *Cancérogénicité et génotoxicité*

Etant donné le faible nombre d'étude de génotoxicité, il n'est pas possible de conclure quant au potentiel mutagène ou génotoxiques du DBA. L'étude de cancérogénèse du NTP (2007) a montré une augmentation de l'incidence de tumeurs hépatocellulaires chez les souris B6C3F1 (mâle et femelle), ainsi qu'une augmentation d'hépatoblastomes (chez les mâles). Cependant, l'CIRC et l'US EPA ont indiqué que les données concernant le DBA étaient considérées « inadéquates pour

une évaluation du potentiel cancérigène chez l'être humain ». Le DBA n'est classé ni par l'USEPA, ni par l'CIRC.

- *Effets reprotoxiques (effets toxiques pour la reproduction et le développement)*
 - Chez l'homme

Chez l'homme, aucune étude n'a été effectuée pour rechercher des effets reprotoxiques associés spécifiquement à une exposition subchronique ou chronique au DBA.

- Chez l'animal

Les effets reprotoxiques du DBA sont décrits chez l'animal dans plusieurs espèces. Des études réalisées sur différentes espèces mettent en évidence des effets du DBA sur la fertilité « féminine ». Une première étude réalisée chez des lapins femelles rapporte une diminution de la population de follicules primordiaux à 50 mg/kg p.c./j, tandis que deux autres études réalisées chez des rates rapportent une augmentation de la concentration du 17 β -œstradiol sérique à 250 mg/kg p.c./j et une augmentation des hormones estrone (E1) et œstradiol (E2) circulantes à une dose de 150 mg/kg p.c./j.

Concernant les effets du DBA sur la fertilité « masculine », des études réalisées chez des rats, rapportent une spermatotoxicité. Ainsi, des anomalies du tractus reproducteur et de la spermatogénèse sont rapportées par Christian, 2002 et Klinefelter, 2004 à partir de 22,4 mg/kg p.c./j, des altérations de la spermiation, une réduction du nombre de spermatozoïdes normaux, et une morphologie anormale sont observées par Linder, 1993, 1994, 1995 et Tsuchiya, 2000 pour une dose de 50 mg/kg p.c./j.

A partir de la revue de la littérature, plusieurs études réalisées chez l'animal ont été retenues, et seules les études les mieux cotées selon la classification de Klimisch sont synthétisées ci-après.

Chez l'animal

Etudes de fertilité

Etude de Christian *et al.*, 2001

Cette étude a été réalisée chez des rats mâles et femelles Sprague Dawley, exposés via l'eau de boisson à des doses de 16,525 ; 33,05 et 66,1 mg/kg p.c./j. Cette étude met en évidence une diminution significative de l'accouplement à la dose de 66,1 mg/kg p.c./j.

Etude de Cummings *et al.*, 1998

Cette étude a été réalisée chez des rates Holtzman mâtures au début de leur gestation exposées pendant 10 semaines à des doses de 62,5, 125, et 250 mg/kg p.c./j par gavage au cours des jours 1 à 8 de la gestation. L'effet observé est une augmentation de la concentration du 17 β -œstradiol sérique à la dose la plus élevée chez des femelles sacrifiées au jour 9 de la gestation. Ainsi un LOAEL de 250 mg/kg p.c./j et un NOAEL de 125 mg/kg p.c./j peuvent être déduites de cette étude pour cet effet (augmentation de la concentration du 17 β -œstradiol sérique).

Etude de Bodensteiner *et al.*, 2004

Cette étude a été réalisée chez des lapines gravides Dutch-belted âgés de six mois. Ces lapines ont été exposés via l'eau de boisson à des doses de 1, 5 et 50 mg/kg p.c./j. Cette étude met en évidence des effets sur la fertilité avec des effets retrouvés au niveau du développement folliculaire. Les auteurs rapportent ainsi une réduction de la population de follicules primaires et de follicules pré-antral à 1 mg/kg p.c./j ainsi qu'une réduction de la population de follicules primordiaux et des follicules matures en période pré-pubertaire à 50 mg/kg p.c./j, dès la première exposition in

utéro, à compter du jour 15 de la gestation et durant la vie entière. La réduction de la population de follicules primordiaux pourra être retenue comme l'effet critique avec le couple LOAEL/NOAEL de 50 mg/kg p.c./j et 5 mg/kg p.c./j.

Etude de Goldman *et al.*, 2006 :

Cette étude a été réalisée sur des rates Sprague-Dawley, âgées de 60 jours, exposées à une dose de 150 mg/kg p.c./j. Les effets retrouvés sont une augmentation des hormones estrone (E1) et œstradiol (E2) circulantes à cette dose d'exposition.

Etudes réalisées via l'eau de boisson

Etude de Christian *et al.*, 2002 :

Cette étude a été réalisée sur des rats Sprague Dawley sur deux générations P, F1 et F2. Aucune toxicité chez les rats femelles (P et F1) n'est rapportée au niveau de la reproduction, en revanche on observe chez les rats mâles une altération de la production et de la morphologie des spermatozoïdes ainsi que des changements morphologiques au niveau du tractus reproducteur (tubules épидидymaires, diminution de la taille des épидидymes et des testicules) aux doses moyennes de 22,4-55,6 mg/kg p.c./j.

Les anomalies du tractus reproducteur et de la spermatogenèse retrouvées pour deux générations (P et F1) aux doses moyennes de 22,4-55,6 mg/kg p.c./j pourraient constituer pour les deux générations un couple LOAEL/NOAEL de 22,4-55,6 mg/kg p.c./j et 4,4-11,6 mg/kg p.c./j.

Etude de Linder *et al.*, 1994 :

Cette étude a été réalisée chez des rats Sprague Dawley âgés de 3 à 4 mois. Ces rats ont été exposés à des doses de 10, 30, 90 et 270 mg/kg p.c./j durant 14 jours. Elle met en évidence des effets spermatotoxiques à partir de 10 mg/kg p.c./j tels qu'une altération de la spermiation et une réduction du nombre de spermatozoïdes pouvant constituer une LOAEL.

Etude de Klinefelter *et al.*, 2004

Cette étude a été réalisée sur deux générations (P et F1) de rats Sprague Dawley mâles et femelles. Ces rats ont été exposés de la puberté à la vie adulte à des doses de 0,6 ; 3,6 et 76,3 mg/kg p.c./j. Les effets observés à la puberté sont une altération de la capacité stéroïdogénique du parenchyme testiculaire¹¹ la dose de 0,6 mg/kg p.c./j.

Etudes réalisées par gavage

Etude de Tsuchiya *et al.*, 2000

Cette étude a été réalisée chez des rats mâles Sprague Dawley âgés de 5 semaines durant 2 ou 4 semaines à des doses de 5, 50 et 250 mg/kg p.c./j. Les auteurs rapportent une spermatotoxicité à partir de 50 mg/kg p.c./j dès deux semaines. Il y a une augmentation significative du nombre d'anomalies de la tête et du col des spermatozoïdes ainsi que du nombre de spermatozoïdes

¹¹ Chez le groupe exposé de GD15 à PND56, une augmentation significative de la production de testostérone stimulée par hCG à 0,6 et 76,3 mg/kg p.c./j est observée. A la dose intermédiaire (3,6 mg/kg p.c./j), l'augmentation n'est pas significative.

fusionnés ($p < 0,05$). Le LOAEL et le NOAEL qui peuvent être déduits de cette étude sont respectivement 50 et 5 mg/kg p.c./j.

Etude de Linder *et al.*, 1993

Cette étude a été réalisée en deux étapes chez des rats mâles Sprague-Dawley âgés de 3,5 à 4 mois durant 28 jours. Les rats ont été exposés aux doses de 1000 et 2000 mg/kg p.c./j. Les effets observés sont une toxicité au niveau du système reproducteur mâle avec une morphologie anormale des spermatozoïdes, une altération leur motilité ainsi qu'une atrophie des testicules.

Etude de Linder *et al.*, 1995

Cette étude a été réalisée sur des rats mâles Sprague-Dawley âgés de 81 jours. Ces rats ont été exposés à des doses de 2, 10, 50 et 250 mg/kg p.c./j sur une durée maximale de 42 jours. Cette étude met en évidence plusieurs effets toxiques au niveau de l'appareil reproducteur mâle tels qu'une diminution du nombre de spermatozoïdes normaux, et une anomalie des spermatides à la dose de 50 mg/kg p.c./j. A la dose de 10 mg/kg p.c./j, des effets sur la spermatogénèse ont été observés (Linder *et al.*, 1994). Ils concernent l'augmentation significative ($p < 0,05$) du nombre de spermatides à l'étape 19 retenus au-delà du stade VIII. D'après ces effets de spermatotoxicité une LOAEL de 50 mg/kg p.c./j pourrait être déduite ainsi qu'un NOAEL de 10 mg/kg p.c./j.

Etude de Linder *et al.*, 1996 :

Cette étude a été réalisée chez des rats mâles Sprague-Dawley âgés de 105 jours. Ces rats ont été exposés à des doses de 2, 10, 50 et 250 mg/kg p.c./j. Dès 10 mg/kg p.c./j, des effets spermatotoxiques sont rapportés tels que des changements histopathologiques au niveau des spermatides provoquant une altération du comportement sexuel masculin reproducteur. On note qu'à la dose maximale de l'étude de 250 mg/kg p.c./j, de nombreux effets spermatotoxiques sont observés au niveau de la forme du sperme (anomalie de l'acrosome et de constituants de la tête des spermatozoïdes, fusion de cellules, atrophie tubulaire, présence de corps résiduels atypiques).

Etude de Holmes *et al.*, 2001

Cette étude a été réalisée chez des rats mâles adultes Sprague-Dawley, âgés de 110 à 130 jours. Cette étude se déroule en deux parties : *in vitro* et *in vivo*. L'étude *in vivo* met en évidence des effets de spermatotoxicité avec une altération de la spermatogénèse à une dose d'exposition de 250 mg/kg p.c./j. Tandis que l'étude *in vitro* met en évidence des altérations morphologiques des tubules séminifères.

Etudes sur le développement

Etudes réalisées via l'eau de boisson

Etude de Christian *et al.*, 2002

Cette étude a été réalisée sur des rats Sprague Dawley sur deux générations P, F1 et F2. Elle met en évidence des effets sur le développement des rats mâles à des doses supérieures à celles entraînant des effets sur la fertilité. Les auteurs énoncent ainsi un NOAEL parentale de 4,4 -11,6 mg/kg p.c./j en se fondant sur une augmentation du poids absolu et relatif des reins et du foie, en l'absence d'histopathologie. Seules les générations P et F1 sont touchées. D'autres effets sont rapportés tels qu'une augmentation du poids des glandes pituitaires et surrénales pour l'ensemble des générations (P, F1) aux doses de 52,4-132 mg/kg p.c./j pour P et à 22,4-55,6 mg/kg p.c./j pour F1 et F2, mais cette augmentation ne semble pas être liée à l'exposition car il n'y a pas de relation dose réponse. Pour ce qui concerne les anomalies unilatérales des épидидymes (épидидymes petits

ou absents), l'incidence observée chez les rats mâles de la génération F1 exposée à 650 ppm de DBA par rapport aux témoins est statistiquement significative. Ces anomalies sont probablement liées à l'exposition in utéro et/ou pendant la période de lactation. Ainsi la plus faible dose pourrait constituer le LOAEL (LOAEL pour F1 et F2 à 22,4-55,6 mg/kg p.c./j) et un NOAEL de 4,4-11,6 mg/kg p.c./j pourrait également être déduite pour ces deux populations.

Mécanisme d'action

Etude de Holmes *et al.*, 2001

Cette étude a été réalisée chez des rats mâles adultes Sprague-Dawley, âgés de 110 à 130 jours. Cette étude se déroule en deux parties : *in vitro* et *in vivo*.

In vitro, le DBA entraîne une vacuolisation des cellules de Sertoli avec dégénération des cellules germinales avec pour conséquence des altérations morphologiques des testicules.

In vivo, l'exposition au DBA altère le développement des tubules séminifères en perturbant la synthèse de la protéine cytosolique 4.

Analyse et évaluation des choix pour la construction de la VTR

VTR pour les effets sur la fertilité

- *Choix de l'effet critique*

Les effets du DBA constatés lors des expérimentations animales concernent essentiellement la fertilité masculine :

- Effets sur la spermiation et sur le développement des spermatozoïdes
- Diminution du nombre de spermatozoïdes et de leur motilité
- Morphologie anormale des spermatozoïdes
- Anomalies épидидymaires et testiculaires

L'altération de la spermatogénèse (rétention des spermatozoïdes à l'étape 19 dans les tubules au-delà du stade VIII, est un effet qui se retrouve dans plusieurs études, et à des doses du même ordre de grandeur.

Le CES retient les altérations de la spermatogénèse comme effet critique.

- *Choix de l'étude*

L'étude la plus appropriée pour calculer une valeur toxicologique de référence, mettant en évidence l'effet critique, est l'étude de Christian *et al.* (2002) pour les raisons suivantes :

- qualité méthodologique générale et notamment le nombre d'animaux par groupe, le régime de doses et l'étude sur deux générations,
- transparence des résultats permettant une exploitation statistique complète.

Cette étude a été classée Klimisch 1

Christian *et al.* (2002) ont réalisé une étude sur deux générations dans laquelle des groupes de rats Sprague-Dawley (30 par sexe et par dose) ont reçu du DBA en continu dans leur eau de boisson à des concentrations de 0, 50, 250 ou 650 mg/L. (équivalant à 0, 4,4-11,6, 22,4-55,6 et 52,4-132,0 mg/kg p.c./j respectivement). La gamme de dose avait été calculée à partir d'une précédente étude des mêmes auteurs (Christian *et al.*, 2001).

Dans l'étude de 2002, les auteurs ont constaté une réduction de la consommation d'eau à toutes les doses et pour chaque génération F1. Chez les sujets du groupe exposés à la dose la plus forte

des générations P et F1, des signes cliniques associés à la réduction de la consommation d'eau ont été décrits (baisse du poids corporel, réduction de la consommation d'aliments). Toutes les doses administrées à la génération F1 pendant la lactation ont entraîné une diminution du poids corporel, ce qui a nécessité le report du sevrage au jour 29.

Cette étude décrit des altérations de la spermatogénèse avec des spermatides à l'étape 19 retenus dans les tubules séminifères aux stades IX et X, accompagnés de changement au niveau des tubules de l'épididyme (augmentation de la quantité de cellules exfoliées et de corps résiduels dans les tubules de l'épididyme, atrophie et hypospermie) chez les rats des deux générations P et F1 exposés à 250 et 650 ppm (22,4 – 55,6 et 52,4 - 132 mg/kg p.c./j).

- *Choix de la dose critique*

Les données disponibles ont été modélisées avec le logiciel Proast du RIVM afin d'élaborer une Benchmark Dose (BMD). Il apparaît dans l'étude clé une relation dose-réponse significative entre la rétention des spermatides à l'étape 19 et la dose journalière d'exposition au DBA (tableau 1).

L'objectif de la démarche est d'estimer la dose correspondant à un niveau de réponse défini ou à un pourcentage défini de réponse supplémentaire par rapport au témoin. Ce niveau ou ce pourcentage est appelé BMR pour Benchmark Response Level. C'est majoritairement la BMDL, autrement dit la limite inférieure de l'intervalle de confiance de la BMD, qui est considérée comme dose repère.

Les données expérimentales ont été ajustées par les modèles développés par le RIVM pour des données continues

Le choix du modèle s'est fait sur celui qui s'ajustait le mieux aux données expérimentales par la méthode du maximum de vraisemblance (Log Likelihood) et correspond au modèle logProbit. Ce modèle est celui dont le maximum de vraisemblance se rapprochait le plus du modèle « full ». Le modèle a été retenu pour l'estimation de la limite inférieure de l'intervalle de confiance à 90% d'une dose correspondant d'une dose correspondant à une augmentation de la réponse par rapport au groupe non exposé de 5 %. Les BMD_{5%} et BMDL_{5%} ont été calculées, car le seuil de 5% est généralement retenu dans les études de reprotoxicité. La BMD_{5%} est égale à 8,0 mg/kg/j, la BMD_{5%L90%} à 2,7 mg/kg/j.

Le tableau 1 regroupe les résultats de l'étude de deux générations de Christian *et al.* et résume les incidences des altérations de la spermatogénèse (à savoir, les spermatides à l'étape 19 retenus dans les tubules séminifères) de la génération parentale. Selon un test de Fisher, la dose de 22,4 mg/kg p.c./j est statistiquement significative (avec p=0,01) et constitue ainsi le LOAEL. Par conséquent, le NOAEL est de 4,5 mg/kg p.c./j¹².

Plusieurs études (cf. études de fertilité précédemment citées) ont montré une toxicité sur le système mâle reproducteur (des altérations de la spermatogénèse, diminution de la motilité du sperme, anomalie morphologique du sperme). Ces effets se retrouvent à des doses du même ordre de grandeur que le NOAEL identifié dans l'étude de Christian *et al.* (2002).

¹² Les effets sur la toxicité générale (par exemple sur l'augmentation significative du nombre de macrophages dans la rate) sont observés à partir de 68-73 mg/kg p.c. et par jour, soit à des doses plus élevées

Tableau 1 : Incidence des altérations de la spermatogénèse (spermatides à l'étape 19 retenus dans les tubules séminifères)-génération parentale

Dose (mg/kg p.c./j)	Nombre de testicules examinés	Nombre de testicules atteints
0	30	4
4,5	30	3
22,4*	30	13
52,4	30	23

*statistiquement significatif, test de Fisher (un coté), avec $p=0,01$

- *Choix des facteurs d'incertitude et ajustement allométrique*

Pour tenir compte de la variabilité inter-espèces, un ajustement allométrique a été réalisé, et a permis de calculer une HED (Human Equivalent Dose), à l'aide de l'équation suivante¹³ :

$$\text{Dose équivalente homme} = \text{Dose animal} \times \left(\frac{\text{Poids animal}}{\text{Poids homme}} \right)^{1/4}$$

Le poids moyen terminal des rats a été déterminé d'après les données décrites dans l'étude, et mesuré à la fin de l'étude. Il est égal à 549 g. Celui de l'homme est estimé à 70 kg. Les doses sont exprimées en mg/kg p.c./j .

Soit dose équivalent chez l'homme = dose animale*0,30 (ce qui reviendrait à appliquer un facteur qui tient compte de la variabilité toxicocinétique, de 3,3).

Pour tenir compte de la variabilité toxicodynamique et d'incertitudes résiduelles, un facteur d'incertitude a été fixé à 2,5 selon les recommandations du document de référence pour « La construction d'une valeur toxicologique de référence pour les substances reprotoxiques » (Afsset 2007). La valeur du facteur d'incertitude pour la variabilité inter-espèces est donc de 2,5.

Une valeur finale de 10 par défaut a été choisie pour la variabilité intra-espèces (Afsset 2007), $UF_H = 10$ (variabilité intra-espèce ou interindividuelle).

¹³ Cette équation est issue des recommandations de l'US EPA (US EPA, 2006).

Conclusions et recommandation de l'expertise collective

Le CES propose une VTR par voie orale spécifique aux effets sur la fertilité ¹⁴ applicable pour une exposition chronique

Effet critique	Dose critique*	Facteur d'incertitude	VTR
Augmentation des altérations de la spermatogenèse chez le rat Sprague Dawley Christian <i>et al.</i> 2002	BMD _{5%} L _{90%} = 2,7 mg/kg p.c./j <u>Ajustement allométrique</u> BMD _{5%} L _{90%} HED = 0,8 mg/kg p.c./j	UF 25 UF _A 2.5 UF _H 10	VTR = 30 µg/kg p.c./j

UF = uncertainty factors (facteurs d'incertitude). UF : facteur d'incertitude global (appliqué), UF_A : variabilité inter-espèces, UF_H : variabilité individuelle,

*HED, Human Equivalent Dose ; il a été calculé à partir de l'équation précédente ; Afin de tenir compte de la variabilité toxicodynamique, un facteur d'incertitude UFA été fixé à 2,5.

Le DBA est une substance chimique qui peut entraîner chez l'animal, un effet sur le développement du fœtus. Des effets sur d'autres organes ont également été observés : variation du poids de certains organes (foie, reins, glandes pituitaires, glandes surrénales et thymus) Christian *et al.* (2002).

Le CES recommande donc une analyse critique des effets sur le développement fœtal, et le cas échéant, l'élaboration d'une telle VTR.

Le CES attire l'attention sur le fait que les VTR proposées pour les effets reprotoxiques ne protègent pas des autres effets toxiques, en l'occurrence d'effets cancérogènes. Le CES recommande ainsi une analyse critique des VTR existantes, et notamment celles fondées sur les effets cancérogènes du DBA, et le cas échéant, l'élaboration d'une telle VTR.

Le Comité d'Experts Spécialisés « Evaluation des risques liés aux substances chimiques » adopte le rapport d'expertise collective lors de sa séance du 18 Février 2010 et fait part de cette adoption à la direction générale de l'Afsset.

Maisons-Alfort, le 1 avril 2010

Au nom des experts du CES

« Evaluation des risques liés aux substances chimiques »,

le président du CES

M. Michel Guerbet

¹⁴ Dans l'étude de Christian et al 2002, les effets sur la spermatogenèse retenus ne sont pas associés à une diminution de la fertilité. Cependant, le CES estime que ces effets peuvent être précurseurs d'effet sur la fertilité

BIBLIOGRAPHIE

Fin de la revue bibliographique : Avril 2009

Allen, B.C. et Fisher, J.W. 1993. Pharmacokinetic modeling of trichloroethylene and trichloroacetic acid in humans. *Risk Anal.*, 13(1) : 71-86.

Ashford, R.D. 1994. *Ashford's dictionary of industrial chemicals*. Wavelength Publications Ltd., Londres, Royaume-Uni.

Bader, E.L., Hrudey, S.E. et Froese, K.L. 2005. Urinary excretion half life of trichloroacetic acid as a biomarker of exposure to chlorinated drinking water disinfection by-products. *Occup. Environ. Med.*, 61 : 715-716.

Budavari et al., 1996. *The Merck index : an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals*. Merck and Co., Inc., Whitehorse, NJ. P. 2158, 3095, 9757-9758.

Bull, R.J. 2000. Mode of action of liver tumor induction by trichloroethylene and its metabolites, trichloroacetate and dichloroacetate. *Environ. Health Perspect.*, 108 (Suppl. 2) : 241-259.

CHEMINFO, 2003 d. Trichloroacetic acid solutions. No CAS 76-03-9. Registre no 766, volume 80. Profils chimiques établis par le Centre canadien d'hygiène et de sécurité au travail, Hamilton, Ontario.

CHEMINFO. 2003 e. Trichloroacetic acid solid. No CAS 76-03-9. Registre no 539, volume 80. Profils chimiques établis par le Centre canadien d'hygiène et de sécurité au travail, Hamilton, Ontario.

Fisher, J.W., Channel, S.R., Eggers, J.S., Johnson, P.D., MacMahon, K.L., Goodyear, C.D., Sudberry, G.L., Warren, D.A., Latendresse, J.R. et Graeter, L.J. 2001. Trichloroethylene, trichloroacetic acid, and dichloroacetic acid: do they affect fetal rat heart development? *Int. J. Toxicol.*, 20 : 257-267

Grant, W.M. et Schuman, J.S. 1993. *Toxicology of the eye: effects on the eyes and visual system from chemicals, drugs, metals and minerals, plants, toxins and venoms*. 4e éd. C.C. Thomas, Springfield, IL. p. 993.

Hansch, C., Leo, A., Hoekman, D.H. et Heller, S. 1995. *Exploring QSAR. Hydrophobic, electronic, and steric constants*. ACS Professional Reference Book. American Chemical Society, Washington, DC.

Heithersay, G.S. et Wilson, D.F. 1988. Tissue responses in the rat to trichloroacetic acid – an agent used in the treatment of invasive cervical resorption. *Aust. Dental J.*, 33(6): 451-461.

Johnson PD, Dawson, BV, Goldberg, SJ 1998. Cardiac teratogenicity of trichloroethylenemetabolites. *Journal of the American College of Cardiology* 32(2), 540-545.

Hunter ES et al., 1996. Comparative effects of haloacetic acids in whole embryo culture. *Teratology* 54(2), 7-64.

Kim, H. et Weisel, C.P. 1998. Dermal absorption of dichloro- and trichloroacetic acids from chlorinated water. *J. Expos. Anal. Environ. Epidemiol.*, 8(4) : 555-575

Koenig, G., Lohmar, E. et Rupprich, N. 2002. Chloroacetic acids. Dans : *Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry*. John Wiley & Sons, Inc. Disponible sur : http://www.mrw.interscience.wiley.com/ueic/articles/a06_537/sect2-fs.html.

Larson, J.L. et Bull, R.J. 1992. Metabolism and lipoperoxidative activity of trichloroacetate and dichloroacetate in rats and mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 115 : 268-277.

Lewis, R.J., Sr. (dir.). 2001. *Hawley's condensed chemical dictionary*. 14e éd. John Wiley & Sons, Inc., New York, NY. p. 251, 361, 1124.

Lewinstein, I. et Rotstein, I. 1992. Effect of trichloroacetic acid on the microhardness and surface morphology of human dentin and enamel. *Endodont. Dent. Traumatol.*, 8 : 16-20.

Lide, D.R. (dir.). 2003-2004. *CRC handbook of chemistry and physics*. 84e éd. CRC Press Inc., Boca Raton, FL.

Lumpkin, M.H., Bruckner, J.V., Campbell, J.L., Dallas, C.E., White, C.A. et Fisher, J.W. 2003. Plasma binding of trichloroacetic acid in mice, rats, and humans under cancer bioassay and environmental exposure conditions. *Drug Metab. Dispos.*, 31(10): 1203-1207.

- Martin JW et al., 2003. Airborne haloacetic acids. *Environmental Science & Technology* 37(13), 2889-2897.
- Meister, R.T. (dir.). 2002. *Farm chemicals handbook*. Vol. 88. Meister Publishing Co., Willoughby, OH. p. C-380.
- Muller, G., Spassovski, M. et Henschler, D. 1974. Metabolism of trichloroethylene in man.II. Pharmacokinetics of metabolites. *Arch. Toxicol.*, 32 : 283-295.
- Nikolaou, A.D., Kostopoulou, M.N. et Lekkas, T.D. 1999. Organic by-products of drinking water chlorination. *Global Nest: Int. J.*, 1(3) : 143-156.
- NTP (National Toxicology Program). 2003a. Dichloroacetic acid (sommaire). Clinical Evaluation Committee -
- Rapport préliminaire soumis par Arthur D. Little, Inc. NTP, National Institutes of Health, Public Health Service, USUS Department of Health and Human Services. Disponible sur :
- <http://ntp.niehs.nih.gov/index.cfm?objectid=03DADAD8-DFB8-5274-3E46A0CEA167B37D>.
- Rapport OMS, 2006 Guidelines for safe recreational waters
Volume 2 - Swimming pools and similar recreational-water environments.
- Schultz, I.R., Merdink, J.L., Gonzalez-Leon, A. et Bull, R.J. 1999. Comparative toxicokinetics of chlorinated and brominated haloacetates in F344 rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 158(2): 103-114.
- Smith MK et al., 1989. Teratogenic activity of trichloroacetic acid in the rat. *Teratology* 40(5), 445-451.
- Templin, M.V., Parker, J.C. et Bull, R.J. 1993. Relative formation of dichloroacetate and trichloroacetate from trichloroethylene in male B6C3F1 mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 123 : 1-8.
- Verschuere, K. 2001. *Handbook of environmental data on organic chemicals*. 4e éd. John Wiley & Sons, Inc., New York, NY.
- Volkel, W., Friedewald, M., Lederer, E., Pahler, A., Parker, J. et Dekant, W. 1998. Biotransformation of perchloroethene: Dose-dependent excretion of trichloroacetic acid, dichloroacetic acid, and N-acetyl-S-(trichlorovinyl)-L-cysteine in rats and humans after inhalation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 153 : 20-27.
- Warren DA et al., Trichloroethylene, trichloroacetic acid, and dichloroacetic acid: do they affect eye development in the Sprague-Dawley rat? *International Journal of Toxicology* 25(4), 279-284.
- Weast, R.C. (dir.). 1973. *Handbook of chemistry and physics*. 54e éd. CRC Press Inc., Cleveland, OH.
- Xu, X., Mariano, T.M., Laskin, J.D. et Weisel, C.P. 2002. Percutaneous absorption of trihalomethanes, haloacetic acids, and haloketones. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 184(1) : 19-26.
- US EPA (2006) Harmonization in Interspecies Extrapolation: Use of BW3/4 as a Default Method in Derivation of the Oral RfD (external review draft, EPA/630/R-06/001). 2006. Ref Type: Report
- Yu, K.O., Barton, H.A., Mahle, D.A. et Frazier, J.M. 2000. In vivo kinetics of trichloroacetate in male Fischer 344 rats. *Toxicol. Sci.*, 54 : 302-311.
- Communication personnelle d'un expert du GT « piscine », laboratoire LCME de Poitiers.
- Recommandations pour la qualité de l'eau potable au Canada : document technique. Les acides haloacétiques », préparé par le Comité fédéral-provincial-territorial sur l'eau potable du Comité fédéral-provincial-territorial sur la santé et l'environnement, Ottawa (Ontario), juillet 2008.

Sigles et abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
Afsset	Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail
AHA	Acide haloacétique
Anses	Agence nationale de sécurité sanitaire alimentation, environnement, travail
DBA	Acide dibromoacétique (Dibromoacetic acid)
DCA	Acide dichloroacétique (Dichloroacetic acid)
DGS	Direction générale de la santé
BMD	Benchmark Dose
BMDL	Limite inférieure de l'intervalle de confiance de la Benchmark Dose
BMR	Benchmark Response level
DBA	Acide dibromoacétique (Dibromoacetic acid)
CES	Comité d'Experts Spécialisés
CIRC	Centre International de Recherche sur le cancer (IARC = International Agency for Research on Cancer)
E1	oestrone
E2	oestradiol
GD	Jour de gestation (Gestational Day)
GT	Groupe de travail
GST Zeta	Glutathion-S-transférase Zeta
HED	Dose équivalente humaine (ou Human Equivalent Dose)
Kg p.c.	Kilogramme de poids corporel
LOAEL	Dose minimale entraînant un effet néfaste observe (« Lowest Observed Adverse Effect Level »)
NIOSH	National Institute for Occupation Safety and Health
NOAEL	Dose maximale n'entraînant pas d'effet néfaste observé (« No Observed Adverse Effect Level »)
OMS	Organisation mondiale de la santé
pH	Potentiel hydrogène
RfD	Reference Dose
RIVM	Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (Institut national hollandais pour la santé publique et l'environnement)
TCA	Acide trichloroacétique (Trichloroacetic acid)
UF	Facteur d'incertitude (« Uncertainty Factor »)
US EPA	United States Environmental Protection Agency (Etats-Unis)
VTR	Valeur Toxicologique de Référence

Liste des tableaux

Tableau 1 : Propriétés physicochimiques du DCA _____	48
Tableau 2 : Incidence des malformations fœtales suite à une exposition maternelle au DCA aux jours 6 à 15 de gestation (rat Long Evans) _____	52
Tableau 3 : Résultats de calcul de BMD et BMDL à partir du logiciel Proast _____	54
Tableau 4 : Résumé des BMD et BMDL pour la construction de la VTR reprotoxique à seuil pour le développement de l'acide dichloroacétique _____	55
Tableau 6 : Diminution du nombre de spermatozoïdes ($10^6/g$) au niveau de l'épididyme suite à une exposition au DCA chez des rats males Long Evans) _____	56
Tableau 7 : Résumé des BMD et BMDL pour la construction de la VTR reprotoxique à seuil pour la fertilité de l'acide dichloroacétique _____	58
Tableau 9 : Propriétés physicochimiques du TCA _____	61
Tableau 10 : Incidence des malformations fœtales suite à une exposition maternelle au TCA aux jours 6 à 15 de gestation (rat Long Evans) _____	66
Les données expérimentales ont été ajustées par les modèles développés par le RIVM pour des données dichotomiques (modèles gamma, logistique, multi-étapes, probit, Weibull...) (Tableau 11 et figure 4).	67
Tableau 12 : Résultats de calcul de BMD et BMDL à partir du logiciel Proast _____	67
Tableau 13 : Résumé des BMD et BMDL pour la construction de la VTR reprotoxique à seuil sur le développement de l'acide trichloroacétique _____	69
Tableau 15 : Propriétés physicochimiques du DBA _____	71
Tableau 16 : Incidence des altérations de la spermatogénèse (spermatides à l'étape 19 retenus dans les tubules séminifères)-génération parentale _____	78
Tableau 17 : Résultats de calcul de BMD et BMDL à partir du logiciel Proast _____	79
Tableau 18 : Résumé des BMD et BMDL pour la construction de la VTR reprotoxique à seuil sur la fertilité de l'acide dibromoacétique _____	80

Liste des figures

Figure 1 : Schéma du métabolisme du DCA (US EPA, 2003) _____	49
Figure 2 : Représentation graphique de la relation dose réponse issus des différentes équations utilisées du logiciel Proast pour la construction de la VTR du DCA _____	53
Figure 3 : Représentation graphique de la relation dose réponse utilisée du logiciel Proast pour la construction de la VTR du DCA _____	57
Figure 4 : Représentation graphique de la relation dose réponse issus des différentes équations utilisées du logiciel Proast pour la construction de la VTR du TCA _____	68
Figure 5 : Représentation graphique de la relation dose réponse issus des différentes équations utilisées du logiciel Proast pour la construction de la VTR du DBA _____	79

1 Contexte, objet et modalités de traitement de la saisine

1.1 Contexte

Le Directeur général de la santé (DGS), le Directeur général de la prévention des pollutions et des risques et le Directeur de l'eau et de la biodiversité ont saisi l'Afsset le 22 décembre 2006 d'une demande d'évaluation des risques sanitaires liés aux baignades publiques non encadrées par la réglementation en vigueur.

Cette demande s'applique aux bassins de natation et de cure ainsi qu'aux eaux captives soumises ou non à un traitement de désinfection. Compte tenu de la diversité des baignades concernées et de leurs problématiques sanitaires associées et à la demande du CES « Evaluations des risques liées aux eaux et agents biologiques », la Direction générale de la santé (DGS) a proposé de scinder en deux parties l'expertise et d'en limiter le champ, d'une part aux piscines, d'autre part aux « eaux captives soumises ou non à traitement et artificiellement séparées des eaux de surface ou souterraines » (dénommé baignade artificielle). Cette seconde partie, relative à l'évaluation des risques liés aux « baignades artificielles » a donc été traitée séparément et fait l'objet d'un rapport spécifique.

Concernant les piscines, la DGS a exprimé un besoin de connaissances relatives aux piscines dites « atypiques » en raison de leur usage (thérapeutique, détente) et/ou en raison des caractéristiques de l'eau d'alimentation (eau de mer, eau minérale naturelle, etc.) et pour laquelle la réglementation est mal adaptée.

Il est demandé à l'Afsset de réaliser un inventaire des types de piscines existant et d'identifier les risques sanitaires qui leur sont associés.

La DGS demande également une évaluation globale des risques sanitaires liés aux piscines en prenant en compte les dangers de nature microbiologique et physicochimique liés à l'eau, à l'air et au sol, les expositions selon les usages, la vulnérabilité des populations et les traitements utilisés.

L'objectif de la saisine est d'établir, en fonction du type de piscine :

- les valeurs limites de qualité des eaux ;
- les modalités de surveillance et de contrôle ;
- les règles d'hygiène, de conception et de maintenance des installations ;
- la liste des produits et procédés de traitements autorisés, ainsi que leurs modalités d'utilisation.

Dans le cadre de la saisine « Evaluation des risques sanitaires liés à la présence de dangers chimiques et/ou biologiques dans l'eau, l'air et les surfaces des piscines réglementées » menée par le groupe de travail « Evaluation des risques sanitaires liés à la qualité des eaux et des produits et procédés de traitement des eaux de piscines », une construction de VTR reprotoxiques pour les acides haloacétiques a été envisagée car aucune VTR n'existe pour les effets reprotoxiques, effets pourtant avérés de ces substances.

Une valeur toxicologique de référence, ou VTR, est un indice toxicologique qui permet de qualifier ou de quantifier un risque pour la santé humaine. Elle établit le lien entre une exposition à une

substance toxique et l'occurrence d'un effet sanitaire indésirable. Les VTR sont spécifiques d'une durée d'exposition (aiguë, subchronique ou chronique) et d'une voie d'exposition (orale ou respiratoire). La construction des VTR diffère en fonction des connaissances ou des hypothèses formulées sur les mécanismes d'action biologiques des substances. Ainsi, si une substance est connue comme ayant une action directe sur le matériel génétique humain (ADN), alors on considère que les effets indésirables que peut engendrer une exposition à cette substance (qui sont généralement des cancers, sauf si le matériel génétique atteint est celui des cellules germinales) peuvent se produire même pour la plus petite dose reçue. On parle dans ce cas de « VTR sans seuil d'effet ». En revanche, si une substance n'a pas d'action directe sur le matériel génétique humain, alors on considère en général que l'effet indésirable survient au-delà d'une certaine dose reçue et que c'est la gravité de l'effet qui croît avec la dose plutôt que la probabilité de survenue. On parle alors de « VTR à seuil d'effet ».

1.2 Objet de la saisine

En réponse à une demande de l'unité « Eaux et agents biologiques » de l'Afsset, le groupe de travail (GT) « Valeurs toxicologiques de référence » a été saisi le 24 juillet 2009 afin d'élaborer des valeurs toxicologiques de référence pour 3 acides haloacétiques (AHAs) (acide dichloroacétique, acide dibromoacétique et acide trichloroacétique) les plus retrouvés dans les eaux de piscine.

1.3 Modalités de traitement : moyens mis en œuvre et organisation

L'instruction de la saisine a été menée conformément aux exigences de la norme NF X 50-110 relative à la qualité en expertise, avec l'appui du comité d'experts spécialisé (CES) « Evaluation des risques liés aux eaux et aux agents biologiques », nommé le 12 avril 2007.

Le CES « Eaux et agents biologiques » a choisi de confier l'expertise à deux groupes de travail, l'un dédié aux « baignades artificielles », l'autre dédié aux « piscines atypiques ».

Concernant la construction de VTR reprotoxique sur les AHA, celle-ci a été confiée au Comité d'Experts Spécialisés (CES) « Evaluation des risques liés aux substances chimiques ». Ce dernier a mandaté le groupe de travail « Valeurs toxicologiques de référence » pour la réalisation des travaux d'expertise. Messieurs Radhouane Chakroun, Jean-Ulrich Mullot et Dominique Lafon ont été nommés rapporteurs pour la construire la VTR reprotoxique de l'acide dichloroacétique, l'acide trichloroacétique et l'acide dibromoacétique, respectivement. Monsieur Dany Chevalier a été nommé rapporteur pour relire l'ensemble des rapports.

Les travaux d'expertise du groupe de travail « Valeurs toxicologiques de référence » ont été soumis régulièrement au CES. Le rapport produit par le groupe de travail tient compte des observations et éléments complémentaires transmis par les membres du CES. Ces travaux sont ainsi issus d'un collectif d'experts aux compétences complémentaires.

L'expertise a été réalisée dans le respect de la norme NF X 50-110 « qualité en expertise » avec pour objectif de respecter les points suivants : compétence, indépendance, transparence, traçabilité.

2 Acide dichloroacétique (CAS 79-43-6)

2.1 Recueil de données toxicologiques

Cette partie s'appuie sur le document technique de Santé Canada publié en juillet 2008 : « Recommandations pour la qualité de l'eau potable au Canada : les acides haloacétiques » (Santé Canada, 2008).

Une recherche bibliographique complémentaire via Pubmed concernant les effets reprotoxiques de l'acide dichloroacétique a été réalisée, couvrant la période 2004-début 2009. Les mots clés utilisés étant « haloacetic acids », « dichloroacetic acid », « swimming pool », « disinfection by-products mixtures », et « drinking water ». Ainsi, quinze articles concernant la toxicité générale du DCA et la toxicité sur la reproduction du DCA ont été identifiés. Parmi ces quinze articles, seulement 8 portaient sur les effets reprotoxiques et ont donc été retenus.

2.1.1 Identification de la substance

Généralités

L'acide dichloroacétique (DCA) est une substance chimique qui fait partie de la famille des acides haloacétiques (AHA). Les acides haloacétiques sont l'un des deux principaux groupes de sous-produits chlorés de désinfection présents dans l'eau potable et dans les eaux de piscine où ils se trouvent généralement aux concentrations les plus élevées. Ils se forment lors de la réaction du chlore avec les matières organiques naturelles. L'acide dichloroacétique est l'AHA le plus représenté dans les eaux de piscines françaises et internationales de l'ordre de 600 µg/L (OMS, 2006 et communication personnelle d'un expert du GT « piscine », laboratoire LCME de Poitiers). L'OMS recommande une valeur guide de 50 µg/L pour cet AHA dans l'eau potable.

On l'utilise aussi comme astringent topique, fongicide et désinfectant médicinal, comme réactif d'essai dans des mesures analytiques, et comme agent dans le traitement de l'acidose lactique et la synthèse de matières organiques, y compris de produits pharmaceutiques (Budavari *et al.*, 1996 ; Koenig *et al.*, 2002 ; Morris et Bost, 2002).

Propriétés chimiques

L'acide dichloroacétique (DCA) est une substance chimique non volatile, très polaire et très soluble (Martin, 2003).

Le DCA est un liquide dont la couleur varie d'incolore à légèrement jaune et qui a une odeur piquante (CIRC, 1995 ; Budavari *et al.*, 1996).

Tableau 1 : Propriétés physicochimiques du DCA

Formule	Cl ₂ CHCOOH
Numéro CASRN	79-43-6
Poids moléculaire	128,942
Point d'ébullition (°C)	193-194
Point de fusion (°C)	13,5 ²
Masse volumique (g.cm ⁻³)	1,56 à 20°C
Pression de vapeur (mm Hg)	0,179 à 25°C
Constante de dissociation (pKa) à 25°C	1,26
Solubilité dans l'eau (g.mL ⁻¹)	Miscible
Coefficient de partage octanol/eau	0,925

Plausibilité d'exposition humaine

Compte tenu de ces propriétés physico-chimiques :

- non volatilité ;

La voie d'inhalation serait négligeable. De plus, il existe peu de données dans l'air. A ce titre, la voie d'inhalation n'est donc pas considérée.

- de sa forme ionique (avec pka = 1,26) dans les eaux de piscine maintenues à un pH neutre car pH > pKa ;

L'absorption cutanée est très basse de 1 à 3 10⁻³ cm.h⁻¹ à pH 7 (Xu *et al.*, 2002). Ainsi la voie cutanée peut être négligée. A ce titre, la voie cutanée n'est donc pas considérée.

- leur forte polarité et solubilité. Ces substances sont majoritairement retrouvées dans les eaux.

La voie d'exposition majoritaire est l'**ingestion** et sera la seule considérée pour la proposition de VTR.

2.1.2 Toxicocinétique par voie orale

Absorption

Le DCA est absorbé dans le sang à partir du tractus gastro-intestinal à la suite d'une exposition par voie orale, tant chez les rats que chez l'Homme. L'absorption cutanée chez l'Homme est mineure tant *in vivo* (Kim et Weisel, 1998) qu'*in vitro* (lorsqu'on utilise des chambres de diffusion et une solution tamponnée de DCA) (Xu *et al.*, 2002).

Distribution

Lorsqu'il est administré par gavage, le DCA atteint le tractus gastro-intestinal puis le foie et les muscles et passe ensuite à d'autres organes cibles : tissus adipeux, reins (Evans, 1982 ; James *et al.*, 1998). La concentration sanguine du DCA diminue exponentiellement (Schultz *et al.*, 1998).

Métabolisme

Tong *et al.* (1998a, 1998b) ont identifié chez le rat une enzyme hépatique, le glutathion-S-transférase Zeta (GST Zeta), qui catalyse la conversion du DCA en glyoxylate. Le glyoxylate serait

ensuite transformé : 1) en oxalate (par oxydation), 2) en glycine (par transamination) et, par la suite, en conjuguats de glycine, ou 3) en glycolate (par réduction), tous ces métabolites étant excrétés en quantités variables dans l'urine (Stacpoole *et al.*, 1989 ; James *et al.*, 1998 ; Stacpoole *et al.*, 1998a ; USUS EPA, 2003c). Une partie du DCA est aussi convertie en dioxyde de carbone et éliminée par l'air exhalé (James *et al.*, 1998). Le DCA peut également être métabolisé par déchloration réductrice pour former du MCA et, par la suite, du thiodiacétate (James *et al.*, 1998).

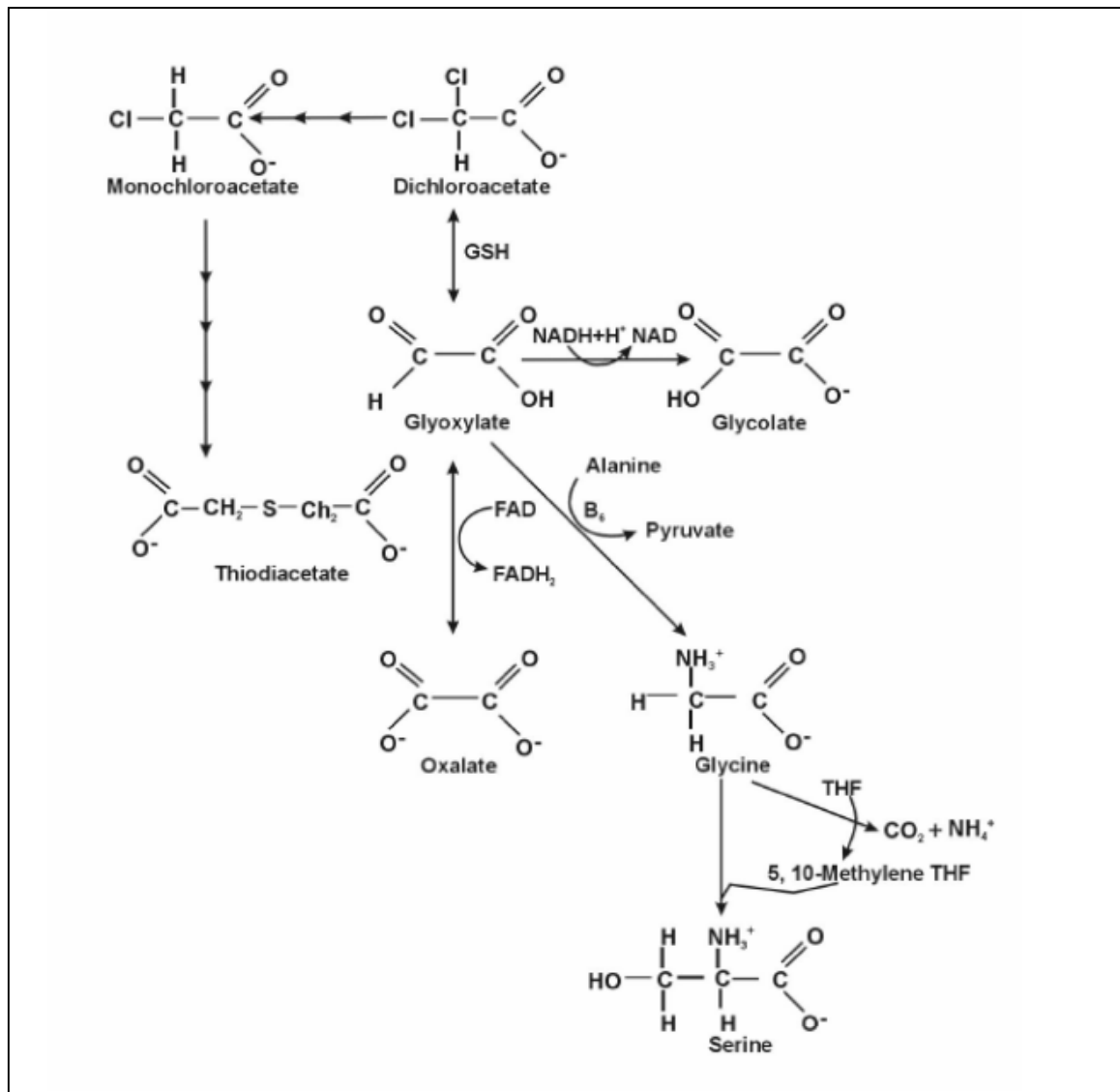


Figure 1 : Schéma du métabolisme du DCA (US EPA, 2003)

Des études de toxicocinétique indiquent que le DCA peut inhiber son propre métabolisme en inactivant de façon irréversible l'enzyme GST-zêta (USUSUS EPA, 2003c ; Keys *et al.*, 2004). On a démontré qu'un pré-traitement au DCA ou une exposition répétée inhibait la clairance métabolique de DCA chez les rats (James *et al.*, 1998), les souris (Schultz *et al.*, 2002) et l'Homme (Curry *et al.*, 1985 ; Stacpoole *et al.*, 1998a).

Élimination

Le mécanisme principal d'élimination du DCA est la biotransformation, effectuée majoritairement par le foie. Le DCA est aussi éliminé par les poumons sous forme de dioxyde de carbone, mais les concentrations peuvent différer entre les espèces.

Une part du DCA éliminé dans l'urine est inchangée (3% de la dose). À faible dose, le DCA est éliminé presque complètement dans l'urine sous forme de métabolites. A des doses plus fortes ou répétées, le pourcentage de DCA non métabolisé est plus élevé (Lukas *et al.*, 1980 ; Lin *et al.*, 1993 ; Gonzalez-Leon *et al.*, 1997 ; Cornett *et al.*, 1999), ce qui peut être attribuable à l'inhibition de son métabolisme. Chez les rongeurs et les êtres humains, les concentrations de métabolites dans l'urine varient.

Chez l'Homme, il existe une relation dose-dépendante entre l'augmentation de DCA et la diminution de la clairance totale, probablement due à une saturation du métabolisme (Curry *et al.*, 1991).

Le DCA, métabolite du trichloroéthylène (TCE) chez l'Homme, peut être détectée dans le sperme de certains travailleurs exposés au TCE (Forkert *et al.*, 2003).

2.1.3 Effets sanitaires

Effets sur la toxicité générale

Dans l'étude de toxicité subchronique de Cicmanec *et al.* (1991) réalisée chez des chiens beagle mâles et femelles âgés de 5 mois exposés durant 90 jours à des doses d'exposition de 0, 12,5, 39,5 et 72 mg/kg p.c./j. Les auteurs rapportent une toxicité au niveau de certains organes avec une augmentation du poids des reins, du foie et des poumons à 72 mg/kg p.c./j.

Cancérogénicité et génotoxicité

Le CIRC classe, dans sa monographie volume 84, le DCA 2B comme « cancérogène possible pour l'homme ». Le DCA est considéré comme génotoxique par le CIRC (CIRC, 2004) et génotoxique à fortes doses pour l'USUS EPA (EPA, 2006).

L'exposition prolongée de rongeurs au DCA (de 0,5 à 5 g/L dans l'eau de boisson) pendant 52 à 114 semaines, augmente l'incidence des tumeurs du foie. Les tumeurs principalement retrouvées sont des adénomes et des carcinomes hépatocellulaires (NTP, 2007). Contrairement à ce qui a été observé pour le TCA, les tumeurs hépatiques décrites pour le DCA ne sont pas reliées à une prolifération des peroxysomes¹⁵.

Effets reprotoxiques

- **Chez l'Homme**

Chez l'Homme, il n'y a pas d'étude relatée.

- **Chez l'animal**

Les effets reprotoxiques du DCA sont décrits chez le rat, pour lequel l'exposition au DCA entraîne majoritairement des effets sur le développement foetal. Le DCA serait à l'origine de malformations fœtales au niveau oculaire (Warren *et al.*, 2006), au niveau des paramètres spermatologiques et au niveau cardiaque. Il serait aussi à l'origine d'une diminution du poids foetal (Warren *et al.*, 2006) et d'un retard de croissance (Smith *et al.*, 1992).

Concernant les effets sur la fertilité, plusieurs études mettent en évidence des effets significatifs chez le rat tels qu'une diminution significative du poids de l'épididyme à 31,25 mg/kg p.c./j. (Toth *et al.*, 1992), des dommages testiculaires (Smith *et al.*, 1992) et une spermatotoxicité (morphologie anormale du sperme) (Linder *et al.*, 1997).

A partir de la revue de la littérature, plusieurs études réalisées chez l'animal ont été retenues. Seules les études les mieux cotées selon la classification de Klimisch sont synthétisées ci-après.

¹⁵ Des VTR cancérogènes sans seuil de doses ont été élaborées par l'US EPA et Santé Canada.

Etudes sur la fertilité

Etude de Toth *et al.*, 1992

Cette étude a été réalisée chez des rats mâles Long-Evans exposés par gavage quotidien pendant 10 semaines à 31,25 - 62,5 et 125 mg/kg p.c./j. Les auteurs décrivent une spermatotoxicité se traduisant par une diminution du nombre de spermatozoïdes et une atteinte au niveau du développement des spermatozoïdes à 62,5 mg/kg p.c./j.

Les auteurs observent une réduction du poids absolu des organes reproducteurs mâles à partir de 31,25 mg/kg p.c./j (épididymes et des glandes préputiales). Les auteurs proposent ainsi un LOAEL de 31,25 mg/kg p.c./j, basée sur la diminution du poids absolu des organes reproducteurs males (glandes préputiales et épididyme).

Etude de Linder *et al.*, 1997

Cette étude a été réalisée chez des rats mâles Sprague-Dawley en deux temps.

Un premier groupe de rats a été exposé à 1500 et 3000 mg/kg p.c./j en dose unique, mais aucune toxicité n'a été observée chez les rats. Un deuxième groupe de rats a été exposé aux doses 18, 54, 160, 480, 1440 mg/kg p.c./j de manière répétée pour des durées d'exposition de 2, 5, 9 et 14 jours. Lors de cette deuxième étude, des effets sur la fertilité sont mis en évidence. Des effets sont retrouvés au niveau du système reproducteur mâle, essentiellement une spermatotoxicité. Des anomalies de morphologie du sperme sont ainsi observées à 160 mg/kg p.c./j, tandis qu'aux doses plus fortes, on observe des anomalies au niveau de leur motilité. Un NOAEL de 54 mg/kg p.c./j et un LOAEL de 160 mg/kg p.c./j pourraient être déduits de ces effets.

Etudes sur le développement

L'étude de Sidney *et al.* (1996), réalisée chez des souris CD-1 gravides, met en évidence des effets du DCA sur le développement foetal, avec des malformations foetales du tube neural (750 mg/L), du pharynx, du cœur (950 mg/L) et de l'œil (1500 mg/L)¹⁶.

Etude de Smith *et al.*, 1992

Cette étude a été réalisée chez des rates Long-Evans gravides du 6^{ème} au 15^{ème} jour de gestation, exposées à deux gammes de concentrations de 900, 1400, 1900, 2400 mg/kg p.c./j et à des concentrations de 14, 140, 400 mg/kg p.c./j.

A 400 mg/kg p.c./j, les auteurs reportent une toxicité maternelle, avec une diminution du gain de poids des mères. Le LOAEL est donc de 400 mg/kg p.c./j mais aucun NOAEL n'est reporté.

Chez les foetus, on observe une toxicité sur le développement avec des malformations cardiaques majeures, une mort foetale et un retard de croissance avec un LOAEL de 140 mg/kg p.c./j et un NOAEL de 14 mg/kg p.c./j.

Le DCA avait dans cette étude comme organe cible le cœur et les gros vaisseaux du foetus.

Etude d'Epstein *et al.*, 1992

Cette étude a été réalisée chez des rates gravides Long-Evans avec des doses plus élevées que dans les autres études : 1900, 2400 et 3500 mg/kg p.c./j. Cette étude permet de confirmer que l'organe cible du DCA lors du développement foetal est le cœur. On observe ainsi des malformations cardiaques pour toutes les doses testées mais seulement à des jours spécifiques de la gestation : 1900 mg/kg p.c./j à partir de J9, 2400 mg/kg p.c./j à J10 et J12 seulement, et à 3500 mg/kg p.c./j à J9, J10 et J12. Une exposition de 1900 mg/kg p.c./j durant la période de gestation J9 à J12 mettant en évidence des malformations cardiaques foetales peut constituer un LOAEL.

Aucune toxicité maternelle importante n'a été relevée dans cette étude.

¹⁶ La consommation de DCA en mg/kg n'a pas été fournie par les auteurs.

Etude de Fischer *et al.*, 2001

Cette étude a été réalisée durant la gestation chez des rates gravides Sprague Dawley. Une dose quotidienne de 300 mg/kg p.c./j a été administrée par gavage de J6 à J15. L'examen des fœtus au 21^{ème} jour de gestation, ne présente aucune différence significative au niveau du cœur tandis qu'une diminution significative du poids du fœtus est observée à J21. On observe aussi une toxicité maternelle avec une diminution du gain du poids de la mère.

Il se peut que cette étude n'ait pas été suffisamment sensible, vu le niveau élevé de malformations cardiaques par portée observées aussi chez les témoins.

Etude de Warren *et al.*, 2006

Cette étude a été réalisée chez des rates gravides Long-Evans âgées de trois mois. Ces rates ont été exposées à 300 mg/kg p.c./j par gavage durant la période de gestation du 6^{ème} jour au 15^{ème}. Les effets mis en évidence par les auteurs sont des diminutions du poids fœtal et des malformations oculaires pour cette dose d'exposition.

2.1.4 Mécanisme d'action

Aucune étude n'a permis d'établir un lien mécanistique entre l'exposition au DCA et les effets décrits chez l'animal. Concernant la fertilité, le DCA pourrait interférer avec le métabolisme énergétique au niveau des cellules spermatiques ou des cellules de Sertoli.

Concernant les effets sur le développement, le DCA pourrait se concentrer dans les cellules cardiaques, et interférer avec le métabolisme énergétique au niveau mitochondrial.

2.2 Analyse et évaluation des choix pour la construction de la VTR sur le développement**2.2.1 Choix de l'effet critique**

Des **malformations cardio-vasculaires** sont observées dans 3 études chez le rat. D'autres malformations sont également observées (urogénital, oculaire). L'ensemble de ces malformations survient en présence d'une toxicité maternelle. Le caractère, cependant modéré, de la toxicité maternelle, le type de malformations (atteinte cardio-vasculaire), leur survenue lors d'étude *in vitro* ne plaident pas en faveur d'un quelconque rôle étiologique.

Les malformations cardiaques sont retenues comme effet critique par le GT.

2.2.2 Choix de l'étude et de la dose critique

Parmi les études, l'étude Smith *et al.* 1992 est classée Klimisch 1. Elle comprend un certain nombre de doses testées et montre une relation dose-effet. Conformément aux recommandations de l'Afsset « Méthode de construction de VTR fondées sur des effets sur la reproduction et le développement », elle est utilisable pour établir une VTR pour les effets sur le développement. Il a été proposé d'effectuer une construction d'une benchmark dose à partir des résultats présentés dans le tableau 2.

Tableau 2 : Incidence des malformations fœtales suite à une exposition maternelle au DCA aux jours 6 à 15 de gestation (rat Long Evans)

Dose (mg/kg p.c./j)	Nombre de portées atteintes	Nombre de portées
0	0	39
14	1	18
140*	2	19
400*	6	19

* significatif $p < 0,05$

Les données disponibles ont été modélisées avec le logiciel Proast 18.2 du RIVM : élaboration d'une Benchmark Dose (BMD). Il apparaît dans l'étude clé une relation dose-réponse significative entre l'augmentation des malformations cardiaques et la dose journalière d'exposition au DCA (test de Kruskal Wallis).

L'objectif de la démarche est d'estimer la dose correspondant à un niveau de réponse défini ou à un pourcentage défini de réponse supplémentaire par rapport au témoin. Ce niveau ou ce pourcentage est appelé BMR pour Benchmark Response level. C'est majoritairement la BMDL, autrement dit la limite inférieure de l'intervalle de confiance de la BMD, qui est considérée comme dose repère.

Les données expérimentales ont été ajustées par les modèles développés par le RIVM pour des données dichotomiques (modèles gamma, logistique, multi-étapes, probit, Weibull,...) et sont représentées sur la figure 2.

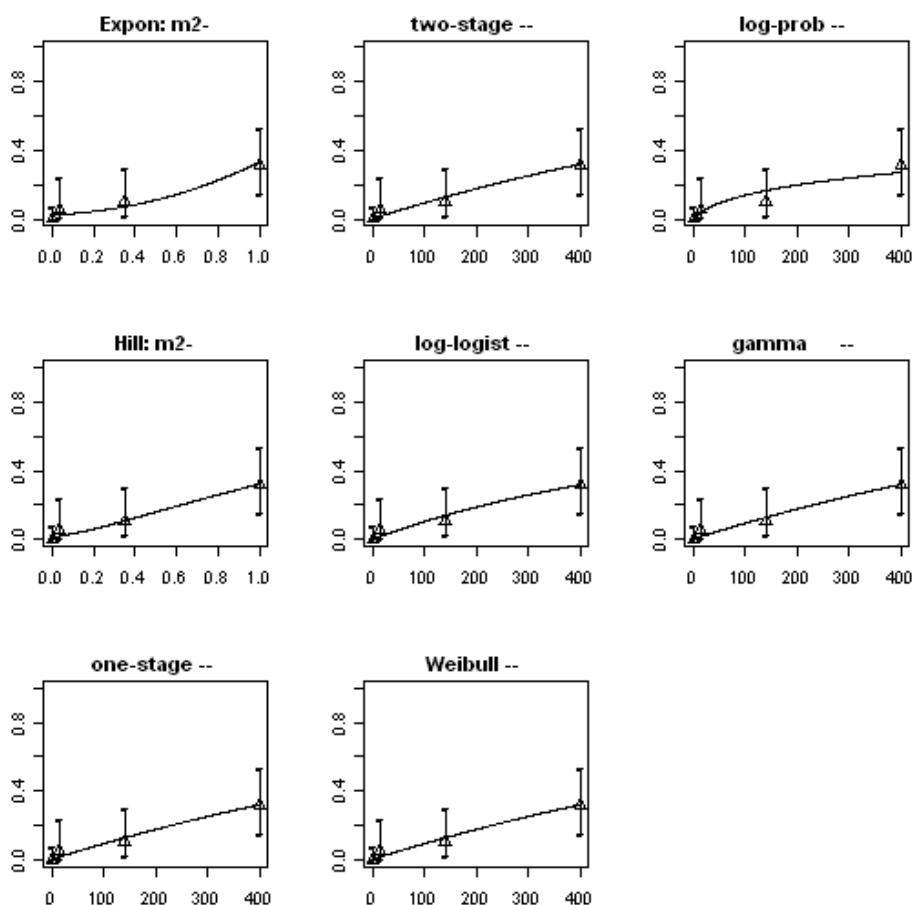


Figure 2 : Représentation graphique de la relation dose réponse issues des différentes équations utilisées du logiciel Proast pour la construction de la VTR du DCA

Le choix du modèle s'est fait sur celui qui s'ajustait le mieux aux données expérimentales par la méthode du maximum de vraisemblance (Log Likelihood) : le modèle log-logist a été retenu pour l'estimation de la limite inférieure de l'intervalle de confiance à 90%¹⁷ d'une dose correspondant à

¹⁷ La limite inférieure de l'intervalle de confiance à 95% (one-sided ou « un coté ») utilisée par l'US EPA, est équivalente à la limite inférieure de l'intervalle de confiance à 90% (two-sided ou « deux coté ») utilisée par le RIVM.

une augmentation de la réponse par rapport au groupe non exposé de 5%. Ce modèle est celui dont le maximum de vraisemblance se rapprochait le plus du modèle « full ». Les BMD_{5%} et BMD_{5%}L_{90%} ont été calculées, car le seuil de 5% est généralement retenu dans les études de reprotoxicité (tableau 3).

Tableau 3 : Résultats de calcul de BMD et BMDL à partir du logiciel Proast

Modèle	Nombre de paramètres (npar)	Maximum de vraisemblance (loglik)	BMD _{5%}	BMD _{5%} L _{90%} (mg/kg p.c./j)
null	1	-29,77	NA*	NA
full	4	-22,11	NA	NA
one-stage	2	-22,8	53,5	31,3
two-stage	3	-22,8	53,5	NA
log-logist	3	-22,75	45,2	24,6
Weibull	3	-22,8	53,5	31,3
log-prob ¹⁸	3	-22,54	19,4	0,0045
gamma	3	-22,8	53,5	31,3
E2	2	-23,38	138	NA
H2	2	-23,04	82,3	NA

*NA : non accepté

Sur la base des résultats présentés et de discussions internes, le groupe de travail propose de retenir la limite inférieure de l'intervalle de confiance à 90% de la BMD construite :

- pour l'effet critique retenu : malformations cardiaques,
- pour un niveau d'effet correspondant à 5% du niveau d'effet observé dans le groupe témoin,
- par portées (données disponibles),
- calculée à partir du modèle log logistic,

$$\text{BMD}_{5\%} = 45,2 \text{ mg/kg p.c./j}$$

$$\text{BMD}_{5\%L_{90\%}} = 24,6 \text{ mg/kg p.c./j}^{19}$$

2.2.3 Ajustement allométrique et choix des facteurs d'incertitude

L'objectif est de déterminer une dose équivalente humaine (ou HED : Human Equivalent Dose).

Cet ajustement allométrique peut être réalisé indifféremment, sans altérer les résultats, avant ou après le calcul de la BMD. Il a été réalisé selon les recommandations de l'USUS EPA (US EPA 2006) :

$$\text{Dose équivalente homme} = \text{Dose animal} \times \left(\frac{\text{Poids animal}}{\text{Poids homme}} \right)^{1/4}$$

Le poids moyen du rat a été déterminé d'après les données décrites dans l'étude, et mesurées aux jours 20. Il est égal à 339 g, celui de l'homme est estimé à 70 kg. Les doses sont exprimées en mg/kg p.c./j.

¹⁸ Une BMDL a été calculée par le logiciel, mais la valeur est aberrante, vu le rapport BMD/ BMDL très largement supérieur à 3.

¹⁹ Le calcul de BMD et BMDL et prenant en compte les malformations sur les tissus mous, aboutissent à des résultats du même ordre de grandeur.

Soit, dose équivalent chez l'homme = dose animale*0,26 (ce qui revient à appliquer un facteur de 3,8 qui tient compte de la variabilité toxicocinétique).

Le tableau 4 suivant présente les résultats obtenus avec le modèle qui s'ajuste le mieux aux données expérimentales.

Tableau 4 : Résumé des BMD et BMDL pour la construction de la VTR reprotoxique à seuil pour le développement de l'acide dichloroacétique

BMR	Modèle le mieux ajusté	BMD chez le rat (mg/kg p.c./j)	BMDL chez le rat (mg/kg p.c./j)	BMD équivalente chez l'homme (mg/kg p.c./j)	BMDL équivalente chez l'homme (mg/kg p.c./j)
5%	Loglogistic	45,2	24,6	11,9	6,5

2.2.4 Choix des facteurs d'incertitudes

Variabilité inter-espèces

Pour tenir compte de la variabilité inter-espèces, un ajustement allométrique a été réalisé et a permis de calculer une HED (Human Equivalent Dose), à l'aide de l'équation précédente. Pour tenir compte de la variabilité toxicodynamique et d'incertitudes résiduelles, un facteur d'incertitude supplémentaire a été fixé à 2,5 selon les recommandations du document de référence « Construction d'une valeur toxicologique de référence pour les substances reprotoxiques » (Afsset 2007).

$$UF_A = 2,5$$

Variabilité intra-espèce

En l'absence de connaissance sur l'existence de sous population sensible, une valeur finale de 10 par défaut a été choisie pour la variabilité intra-espèces (Afsset 2007) :

$$UF_H = 10$$

2.2.5 Calcul de la VTR

Cette VTR est spécifique aux effets sur le développement, et s'applique pour une exposition aiguë par voie orale pour tenir compte de l'absence de connaissance sur le mécanisme d'action et de la période critique de sensibilité.

Tableau 5 : Conclusion sur la VTR reprotoxique à seuil pour le développement de l'acide dichloroacétique

Effet critique	Dose critique*	Facteur d'incertitude	VTR
Augmentation des malformations cardiaques chez le rat Long Evans Etude de Smith <i>et al.</i> , 1992	BMD _{5%} L _{90%} = 24,6 mg/kg p.c./j* <u>Ajustement allométrique</u> BMD _{5%} L _{90%} HED ** = 6,5 mg/kg p.c./j	UF 25 UF _A 2,5*** UF _H 10	VTR = 260 µg/kg p.c./j

* Le calcul de BMD et BMDL et prenant en compte la diminution du poids à la naissance et/ou les malformations sur les tissus mous, aboutissent à des résultats du même ordre de grandeur.

** HED : Human Equivalent Dose. Il a été calculé à partir de l'équation précédente ;

*** Afin de tenir compte de la variabilité toxicodynamique, un facteur d'incertitude UF_A a été fixé à 2,5.

2.3 Analyse et évaluation des choix pour la construction de la VTR sur la fertilité

2.3.1 Choix de l'effet critique

L'atteinte morphologique du **spermatozoïde** est l'effet critique qui peut être retenu. Il est retrouvé dans plusieurs études et chez plusieurs espèces. Son mécanisme n'est pas clairement établi.

2.3.2 Choix de l'étude et de la dose critique

Dans l'étude de Toth *et al.* sur le rat classée Klimisch 2e, des atteintes sont montrées au niveau testiculaire à toutes les doses. Cette étude est utilisable pour calculer une VTR pour les effets sur la fertilité. Conformément aux recommandations de l'Afsset « Méthode de construction de VTR fondées sur des effets sur la reproduction et le développement », il a été proposé la construction d'une benchmark dose à partir des résultats présentés dans le tableau 6.

Tableau 6 : Diminution du nombre de spermatozoïdes ($10^6/g$) au niveau de l'épididyme suite à une exposition au DCA chez des rats males Long Evans)

Dose (mg/kg p.c./j)	Moyenne (nombre de spermatozoïdes ($10^6/g$) au niveau de l'épididyme)	Ecart type	Nombre d'animaux
0	630,0	204,8	19
31,25	582,5	137,0	18
62,5*	502,6	163,5	18
125 *	367,8	91,6	19

* significatif $p < 0,05$

Les données disponibles ont été modélisées avec le logiciel Proast du RIVM : élaboration d'une Benchmark Dose (BMD). Il apparaît dans l'étude clé une relation dose-réponse significative entre la diminution de spermatozoïdes et la dose journalière d'exposition au DCA.

L'objectif de la démarche est d'estimer la dose correspondant à un niveau de réponse défini ou à un pourcentage défini de réponse supplémentaire par rapport au témoin. Ce niveau ou ce pourcentage est appelé BMR pour Benchmark Response level. C'est majoritairement la BMDL, autrement dit la limite inférieure de l'intervalle de confiance de la BMD, qui est considérée comme dose repère.

Les données expérimentales ont été ajustées par les modèles développés par le RIVM pour des données continues.

Le choix du modèle s'est fait sur celui qui s'ajustait le mieux aux données expérimentales par la méthode du maximum de vraisemblance (Log Likelihood) et correspond au modèle exponentiel. Ce modèle est celui dont le maximum de vraisemblance se rapprochait le plus du modèle « full ». Il a été retenu pour l'estimation de la limite inférieure de l'intervalle de confiance à 90% d'une dose correspondant à une diminution de 32,5% de spermatozoïdes (soit une fois l'écart type). Les $BMD_{1 \times EC}$ et $BMD_{1 \times EC L_{90\%}}$ ont été calculées.

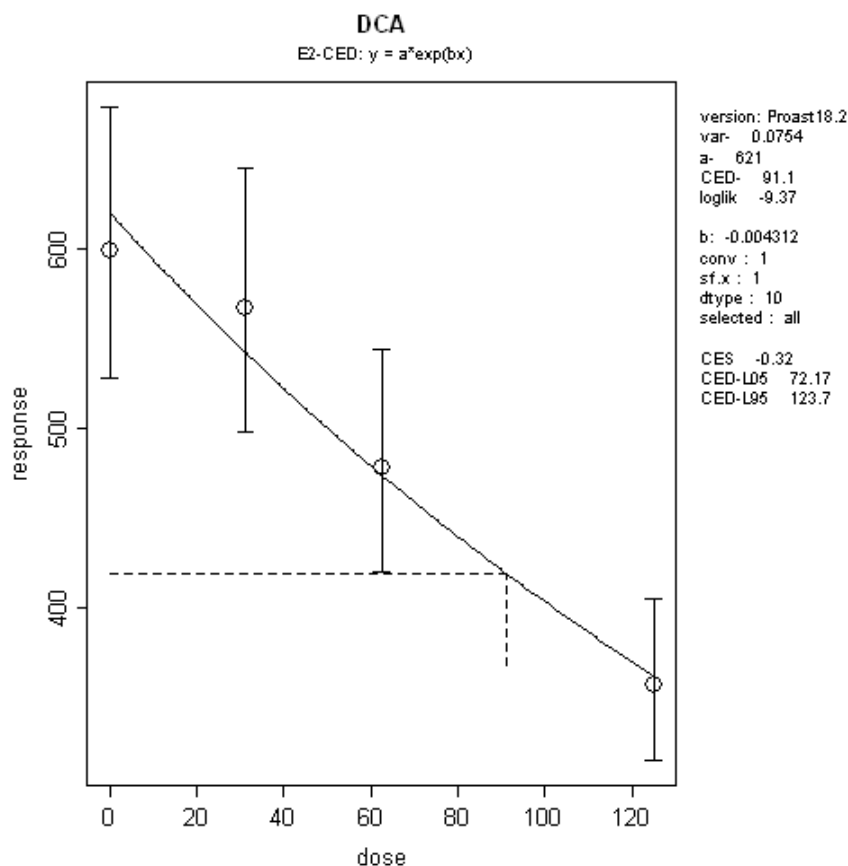


Figure 3 : Représentation graphique de la relation dose réponse utilisée du logiciel Proast pour la construction de la VTR du DCA

Sur la base des résultats présentés et de discussions des experts, le groupe de travail propose de retenir la limite inférieure de l'intervalle de confiance à 90%²⁰ de la BMD construite :

- pour l'effet critique choisi : diminution du nombre de spermatozoïdes,
- pour un niveau d'effet correspondant à une fois l'écart type : ce qui revient à considérer comme valeur seuil, la moyenne (nombre de spermatozoïdes chez le groupe non traité) moins une fois l'écart type du groupe non traité et correspond à une diminution de 32,5% de spermatozoïdes.

En effet, cette approche a été proposée par l'US EPA comme approche par défaut, lorsqu'aucun élément n'est disponible concernant le choix du niveau d'effet observé lors d'analyses biochimiques et biologiques dans le groupe témoin

$$\text{BMD}_{1 \times \text{EC}} = 91,1 \text{ mg/kg p.c./j}$$

$$\text{BMD}_{1 \times \text{EC}} \text{ L}_{90\%} = 72,1 \text{ mg/kg p.c./j}^{21}$$

²⁰ La limite inférieure de l'intervalle de confiance à 95% (one-sided ou « un coté »), utilisée par l'US EPA, est équivalente à la limite inférieure de l'intervalle de confiance à 90% (two-sided ou « deux coté ») utilisée par le RIVM.

²¹ Dans cette étude, les auteurs ont estimé le NOAEL à 31,25 mg/kg p.c./j, basé sur une diminution significative du nombre de spermatozoïdes.

2.3.3 Ajustement allométrique et choix des facteurs d'incertitude

L'objectif est de déterminer une dose équivalente humaine (ou HED : Human Equivalent Dose).

Cet ajustement allométrique peut être réalisé indifféremment, sans altérer les résultats, avant ou après le calcul de la BMD. Il a été réalisé selon les recommandations de l'US EPA (US EPA 2006) :

$$\text{Dose équivalente homme} = \text{Dose animal} \times \left(\frac{\text{Poids animal}}{\text{Poids homme}} \right)^{1/4}$$

Le poids moyen du rat a été déterminé d'après les données décrites dans l'étude, et avant sacrifice. Il est de 484 g, celui de l'homme est estimé à 70 kg. Les doses sont exprimées en $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$.

Soit, dose équivalent chez l'homme = dose animale * 0,29 (ce qui reviendrait à appliquer un facteur qui tient compte de la variabilité toxicocinétique de 2,5).

Le tableau 7 suivant présente les résultats obtenus avec le modèle qui s'ajuste le mieux aux données expérimentales.

Tableau 7 : Résumé des BMD et BMDL pour la construction de la VTR reprotoxique à seuil pour la fertilité de l'acide dichloroacétique

BMR	Modèle le mieux ajusté	BMD chez le rat (mg/kg p.c./j)	BMDL chez le rat (mg/kg p.c./j)	BMD équivalente chez l'homme (mg/kg p.c./j)	BMDL équivalente chez l'homme (mg/kg p.c./j)
1x l'écart type soit une diminution de 32,5% de spermatozoïdes	Exponentiel (modèle 2)	91	72	26,3	20,8

2.3.4 Choix des facteurs d'incertitudes

Variabilité inter-espèces

Pour tenir compte de la variabilité inter-espèces, un ajustement allométrique a été réalisé et a permis de calculer une HED (Human Equivalent Dose) à l'aide de l'équation précédente. Pour tenir compte de la variabilité toxicodynamique et des incertitudes résiduelles, un facteur d'incertitude supplémentaire a été fixée à 2,5 selon les recommandations du document de référence « Construction d'une valeur toxicologique de référence pour les substances reprotoxiques » (Afsset 2007).

$$UF_A = 2,5$$

Variabilité intra-espèce

En l'absence de connaissance, sur l'existence de sous population sensible, une valeur finale de 10 par défaut a été choisie pour la variabilité intra-espèces (Afsset 2007) :

$$UF_H = 10$$

2.3.5 Calcul de la VTR

Cette VTR est spécifique aux effets sur la fertilité et est applicable pour une exposition chronique.

Tableau 8 : Conclusion sur la VTR reprotoxique à seuil pour la fertilité de l'acide dichloroacétique

Effet critique	Dose critique*	Facteur d'incertitude	VTR
Diminution de spermatozoïdes chez le rat Long Evans Etude de Toth <i>et al.</i> , 1992	BMD _{1xEC} L _{90%} = 72 mg/kg p.c./j * <u>Ajustement allométrique</u> BMD _{1xEC} L _{90%HED} ** = 21 mg/kg p.c./j	UF 25 UF _A 2,5*** UF _H 10	VTR = 840 µg/kg p.c./j

* Dans cette étude, les auteurs ont estimé le NOAEL à 31,25 mg/kg p.c./j basé sur une diminution significative du nombre de spermatozoïdes.

** HED, Human Equivalent Dose. Il a été calculé à partir de l'équation précédente ;

*** Afin de tenir compte de la variabilité toxicodynamique, un facteur d'incertitude UF_A a été fixé à 2,5.

3 Acide trichloroacétique (CAS 76-03-9)

3.1 Recueil des données toxicologiques du TCA

Cette partie s'appuie sur le document technique de Santé Canada publié en juillet 2008 : « Recommandations pour la qualité de l'eau potable au Canada sur les acides haloacétiques » ; pour lequel une bibliographie exhaustive sur les acides haloacétiques jusqu'à l'année 2008 avait été réalisée (Santé Canada, 2008).

Une recherche bibliographique complémentaire via Pubmed concernant les effets reprotoxiques de l'acide trichloroacétique a été réalisée, couvrant la période 2004-début 2009. Les mots clés utilisés étant « haloacetic acids », « trichloroacetic acid », « toxicity », « swimming pool », « disinfection by-products mixtures », et « drinking water ». Ainsi, dix articles concernant la toxicité générale du TCA et la toxicité sur la reproduction du TCA ont été identifiés. Parmi ces dix articles, cinq articles portaient sur les effets reprotoxiques et ont été par conséquent retenus.

3.1.1 Identification de la substance

Généralités

L'acide trichloroacétique (TCA) est une substance chimique de la famille des acides haloacétiques (AHA). Avec les trihalométhanes, les acides haloacétiques sont l'un des deux principaux groupes de sous-produits chlorés de désinfection présents dans l'eau potable et dans les eaux de piscine où ils se trouvent généralement aux concentrations les plus élevées. Ils surviennent lors de la réaction du chlore avec les matières organiques naturelles et/ou les ions bromures. L'acide trichloroacétique est le deuxième AHA, après le DCA, le plus représenté dans les eaux de piscines françaises et internationales de l'ordre de 150 µg/L (OMS, 2006 et communication personnelle d'un expert du GT « piscine », laboratoire LCME de Poitiers). L'OMS recommande une valeur guide de 200 µg/L pour le TCA pour l'eau potable (Guidelines for Drinking Water Quality, 2004).

Il sert également d'intermédiaire dans la synthèse de produits chimiques organiques et comme réactif de laboratoire, herbicide, agent de stérilisation des sols et antiseptique (Santé Canada, 2008). On l'utilise aussi comme agent de mordantage ou décapant, agent de gonflement et solvant dans l'industrie plastique et la finition de textiles (Koenig *et al.*, 2002). Dans le domaine clinique, le TCA en solution aqueuse à 10-25% est employé pour traiter les affections récidivantes de la cornée (Grant et Schuman, 1993), la résorption de la racine cervicale externe en dentisterie (Heithersay et Wilson, 1988 ; Lewinstein et Rotstein, 1992) et diverses affections de la peau (Koenig *et al.*, 2002). Il est également utilisé comme abrasif cutané pour le visage et pour d'autres applications thérapeutiques ou esthétiques, y compris comme agent de cautérisation, astringent et pour l'élimination des verrues (NTP, 2003a).

Propriétés chimiques

L'acide trichloroacétique est une substance chimique non volatile, polaire et soluble (Martin, 2003). Le TCA est un cristal déliquescent dont la couleur varie d'incolore à blanc et qui a une odeur piquante âcre (Ashford, 1994 ; Budavari *et al.*, 1996).

Tableau 9 : Propriétés physicochimiques du TCA

Formule	Cl ₃ CHCOOH
Numéro CASRN	76-03-9
Poids moléculaire	163,387
Point d'ébullition (°C)	196-197
Point de fusion (°C)	57-58
Masse volumique (g.cm ⁻³)	1,62 à 25°C
Pression de vapeur (mm Hg)	0,16 à 25°C
Constante de dissociation (pKa) à 25°C	0,66 ²
Solubilité dans l'eau (g.mL ⁻¹)	1,50 à 25°C
Coefficient de partage octanol/eau	1,33

Plausibilité d'exposition humaine

Compte tenu de ces propriétés physico-chimiques :

- non volatilité ;

La voie d'inhalation serait négligeable. De plus, il existe peu de données dans l'air. A ce titre, la voie d'inhalation n'est donc pas considérée.

- de leur forme ionique (avec pKa = 1,26) dans les eaux de piscine maintenues à un pH neutre car pH > pKa

L'absorption cutanée est très basse de 1 à 3 10⁻³ cm.h⁻¹ à pH 7. (Xu *et al.*, 2002). Ainsi, la voie cutanée peut être négligée. Aucun signe d'absorption importante de TCA par voie cutanée n'est relaté chez les humains que ce soit *in vivo* ou *in vitro* (Kim et Weisel, 1998, Xu *et al.*, 2002). Par conséquent, la voie cutanée n'est pas considérée pour la proposition de VTR.

- leur forte polarité et solubilité. Ces substances sont majoritairement retrouvées dans les eaux.

La voie d'exposition majoritaire est celle de l'**ingestion** et sera la seule considérée.

3.1.2 Toxicocinétique

Absorption

Le TCA est facilement absorbé à partir du tractus gastro-intestinal après une exposition par voie orale, tant chez les rats que chez l'Homme (Kim et Weisel, 1998 ; Schultz *et al.*, 1999). Chez des rats F344, la concentration sanguine de TCA à la suite d'une ingestion orale de 500 µg.kg⁻¹ a atteint son maximum à 350 µg.kg⁻¹ environ deux heures après l'administration de la dose (Schultz *et al.*, 1999).

Distribution

Administré par voie orale ou en intraveineuse chez des rats, le TCA se fixe à hauteur de 47% aux protéines plasmatiques (Templin *et al.*, 1993 ; Schultz *et al.*, 1999 ; Yu *et al.*, 2000). Du fait de cette fixation, seul le TCA libre est éliminé (Yu *et al.*, 2000). La fixation aux protéines plasmatiques varie entre les espèces mais serait plus importante chez l'Homme (Lumpkin *et al.*, 2003).

Métabolisme

Le TCA serait peu métabolisé au niveau hépatique chez l'animal. On a observé la formation de dioxyde de carbone, d'acide glyoxylique, d'acide oxalique, d'acide glycolique et de DCA chez les rats et les souris à la suite de l'administration par voie orale de TCA (neutralisé) radiomarqué. Le TCA serait métabolisé par déshalogénéation réductrice en DCA (Larson et Bull, 1992). On a proposé comme voie métabolique une déshalogénéation réductrice plus poussée du DCA en acide monochloroacétique et, finalement, en thiodiglycolate (Bull, 2000).

Élimination

L'urine est la principale voie d'excrétion du TCA administré par voie orale ou intraveineuse (Templin *et al.*, 1993 ; Schultz *et al.*, 1999 ; Yu *et al.*, 2000). Le TCA est excrété sous forme inchangée (30% de la dose) ou sous forme de métabolites chez l'animal.

La demi-vie d'élimination plasmatique s'est établie à 50,6 heures (Muller *et al.*, 1974). Au cours d'une étude d'exposition humaine contrôlée chez cinq volontaires à qui l'on a servi de l'eau du robinet (Bader *et al.*, 2005), les demi-vies d'élimination urinaire du TCA ont varié de 2,1 à 6,3 jours.

Allen et Fisher (1993) ont mis au point un modèle pharmacocinétique basé sur la physiologie pour les êtres humains exposés au TCE, qui met l'accent sur le métabolite TCA, et l'ont comparé avec ce qui se produit chez les souris et les rats (Allen et Fisher, 1993). Ils ont constaté que le volume de distribution du TCA était moins important chez l'être humain que chez le rat ou la souris. Le modèle a permis de calculer que chez l'humain, 93% du TCA total éliminé était excrété tel quel dans l'urine, tandis que le reste pouvait être métabolisé ou éliminé par d'autres voies (Allen et Fisher, 1993).

3.1.3 Effets sanitaires

Toxicité générale

Le TCA peut provoquer des lésions cutanées, orales et oculaires après ingestion. Les signes cliniques rapportés en milieu professionnel sont des rougeurs, enflure, douleur et brûlure au niveau de la peau, des irritations sévères voire des lésions corrosives au niveau de l'œil et des lésions gastro-intestinales (CHEMINFO, 2003d, e).

Étude de DeAngelo *et al.*, 1997 Cette étude a été réalisée chez 50 rats mâles F344 exposés par voie orale dans l'eau de boisson à des doses de 0,05 ; 0,5 et 5 g/L sur deux ans. Les auteurs ne rapportent aucun effet cancérigène mais mettent en évidence une diminution significative du poids corporel et une augmentation de l'activité des enzymes hépatiques. Les auteurs proposent un NOAEL de 32,5 mg/kg p.c./j pour ces effets.

Cancérogénicité et génotoxicité

Le TCA n'est pas recensé comme produit mutagène ou génotoxique (CIRC, 2004).

L'exposition prolongée de souris par voie orale pendant 52 à 114 semaines au TCA, augmente l'incidence des tumeurs du foie pour des concentrations de TCA comprises entre 0,5 et 5 g/L dans l'eau de boisson. Les tumeurs principalement retrouvées sont des adénomes et des carcinomes hépatocellulaires (Santé Canada, 2009)²². Cependant, cet effet est non pertinent chez l'Homme et est donc non transposable à l'Homme puisque la prolifération des peroxyosomes est corrélée à l'incidence tumorale hépatique.

²² Santé Canada se base sur plusieurs études dont : Bull *et al.* (1990) ; De Angelo et Daniel (1990) ; US EPA (2001) et Pereira (1995, 1996).

Effets reprotoxiques

- **Chez l'Homme**

Il n'a pas été possible d'identifier d'étude humaine rapportant les effets toxiques associés spécifiquement à une exposition sub-chronique ou chronique au TCA.

- **Chez l'animal**

Les effets reprotoxiques du TCA sont décrits chez l'animal, en particulier chez des rates de type Long-Evans ou Sprague Dawley, pour lesquelles l'exposition au TCA entraîne des effets sur le développement fœtal.

Des malformations fœtales sont observées au niveau oculaire (Warren, 2006) et au niveau cardiaque (Johnson, 1998). Le TCA serait aussi à l'origine d'une diminution du poids fœtal. (Warren, 2006).

Concernant la fertilité, aucune étude animale rapportant spécifiquement des effets sur la fertilité attribuables au TCA n'a pu être identifiée.

A partir de la revue de la littérature, plusieurs études réalisées chez l'animal ont été retenues. Seules les études les mieux cotées selon la classification de Klimisch sont synthétisées ci-après.

Etudes sur le développement

Etude de Sidney *et al.*, 1996

L'objectif principal de cette étude était de comparer le potentiel de plusieurs sous-produits de chloration vis-à-vis des manifestations toxiques neurologiques (en relation avec le développement du tube neural). Cette étude réalisée sur des embryons de souris CD-1 cultivés *in vitro* en présence de TCA dans le milieu de culture confirme les effets du TCA sur le développement fœtal, en mettant en évidence des malformations au niveau du tube neural (2000 µM) mais aussi au niveau pharyngé, oculaire et cardiaque (3000 µM). Le TCA ne fait pas partie des sous-produits les plus actifs pour les effets neurologiques. Toutefois, cette étude confirme également le large spectre des manifestations toxiques (malformations) possibles associées à une exposition embryonnaire au TCA, parmi lesquelles les manifestations cardiaques. Les malformations cardiaques, retrouvées *in vivo* dans d'autres études, sont le deuxième effet le plus marqué après les effets neurologiques et le TCA semble l'un des sous-produits de chloration les plus actifs (après l'acide monobromoacétique) vis-à-vis de ces manifestations toxiques dans cette étude. En raison de son protocole (*in vitro*), cette étude ne permet pas d'identifier de dose repère permettant la construction d'une VTR mais apporte une confirmation expérimentale de la plausibilité des effets constatés dans d'autres études.

Etude de Fischer *et al.*, 2001

Cette étude a été réalisée sur des rates gravides Sprague Dawley. Des doses quotidiennes de 300 mg/kg p.c./j de TCA ont été administrées par gavage du 6^{ème} au 15^{ème} jour de la gestation (groupes de 20 animaux). L'examen des fœtus au 21^{ème} jour de gestation (examen microscopique approfondi du tissu cardiaque et pesées), ne montre aucune différence significative en termes de malformations cardiaques, tandis qu'une diminution significative du poids du fœtus est observée à GD15. Il est également rapporté des effets maternels avec une discrète diminution du gain de poids des mères exposées au TCA par rapport aux témoins.

Il est possible que les résultats négatifs rapportés dans cette étude soient partiellement expliqués par un problème de manque de puissance : 7 portées sur 19, soit 37%, présentaient des malformations cardiaques dans le groupe témoin (eau). Tous les groupes d'animaux différents des témoins présentaient un taux de malformations supérieur, sans atteindre le seuil de significativité statistique (sauf pour un groupe contrôle exposé à l'acide rétinoïque).

Etude de Warren *et al.*, 2006

Cette étude a été réalisée chez des rates gravides Sprague-Dawley Crl : CDR BR âgées de trois mois. Ces rates ont été exposées par gavage à 300 mg/kg p.c./j de TCA durant la période de gestation du 6^{ème} au 15^{ème} jour (étude *a posteriori* d'une partie des fœtus examinés dans l'étude de Fischer *et al.*, 2001). Les effets mis en évidence par les auteurs sont des diminutions du poids fœtal et des malformations oculaires (seules malformations étudiées précisément dans cette étude) pour cette dose. Selon les auteurs, les malformations oculaires rapportées ne sont pas la simple conséquence de la diminution de poids des fœtus. La principale limite de cette étude est méthodologique : pour des raisons de préparation initiale incorrecte (coupe non franche entre les deux yeux), seuls 48% des fœtus initialement étudiés par Fischer *et al.* ont pu faire l'objet de l'examen approfondi des lésions oculaires, ce qui limite la puissance des tests statistiques réalisés.

Etude de Smith *et al.*, 1989

Cette étude a été réalisée chez des rates Long-Evans gravides, âgées de 65 à 80 jours et exposées par voie orale (gavage) durant l'organogénèse (6^{ème} au 15^{ème} jour de gestation) à des doses de TCA de 0, 330, 800, 1200, et 1800 mg/kg p.c./j.

Les auteurs rapportent une toxicité au niveau des fœtus avec une diminution dose dépendante de la taille et du poids des fœtus et ceci quelle que soit la dose, une augmentation de la mort embryonnaire (LOAEL : 800 mg/kg p.c./j) et des malformations fœtales au niveau des tissus mous (cardiaques majoritairement avec un LOAEL de 330 mg/kg p.c./j) et des malformations des tissus squelettiques (dont orbites oculaires à 1200 mg/kg p.c./j).

Les auteurs rapportent également des effets toxiques chez les mères dès 330 mg/kg p.c./j tels qu'une légère diminution du gain de poids et une discrète augmentation de la taille des reins et de la rate liées à la dose. Les effets sur le poids maternel ne sont pas notés pour la première dose de TCA alors que les effets sur les malformations fœtales des tissus mous sont notés pour cette même dose, ce qui est en faveur d'une reprotoxicité.

Cette étude met également en évidence (fortuitement et sans explication évidente selon les auteurs) que le TCA augmente significativement le nombre de sites d'implantation (mais aussi le nombre de pertes post implantatoires) à partir de la dose 800 mg/kg p.c./j. On notera également une augmentation non significative du nombre de fœtus par portée pour la dose de 330 mg/kg p.c./j. Ces observations pourraient traduire un effet de l'exposition au TCA sur la fertilité mais aucune conclusion définitive n'est possible sur ce point en raison de la conception des études (pas d'exposition préalable).

Les auteurs considèrent un LOAEL de 330 mg/kg p.c./j pour le développement mais n'identifient aucun NOAEL.

Etude de Johnson *et al.*, 1998

Cette étude a été réalisée sur 11 rates Sprague-Dawley exposés par voie orale au TCA (eau de boisson contenant du TCA neutralisé) à une dose de 291 mg/kg p.c./j du 1^{er} au 22^{ème} jour de la gestation.

Les auteurs ne relatent aucune toxicité maternelle à cette dose (diminution non significative de la prise de poids). En revanche, ils rapportent des effets reprotoxiques observés chez les fœtus qui sont :

- une augmentation significative du nombre de sites d'implantation et du nombre de résorptions,
- une tératogénicité cardiaque avec un taux de malformations des tissus mous cardiaques plus élevé.

Il convient de noter que cette étude a porté une attention particulière à l'étude du tissu cardiaque des fœtus afin de caractériser le mieux possible les malformations et de dépasser certaines limites méthodologiques de l'étude de Smith *et al.*, par exemple sur ce point (étude du cœur perfusé vs. étude de lames fixées).

En raison de choix méthodologiques (exposition J1 à J22, eau de boisson partagée par plusieurs animaux), cette étude n'avait pas spécifiquement pour but d'identifier une dose repère pour la toxicité sur le développement cardiaque des fœtus suite à une exposition maternelle au TCA mais de confirmer le lien entre cette exposition et la survenue des malformations. Par conséquent, il n'est pas proposé de dose repère par les auteurs.

Etude de Singh, 2005

Cette étude a été réalisée chez des rates Charles Foster gravides, âgées de 85 à 120 jours, exposées par gavage à des doses de TCA de 1000 à 1800 mg/kg p.c./j du 6^{ème} au 15^{ème} jour de gestation (6 animaux par dose). Au 19^{ème} jour de gestation, les rates et leurs fœtus (et organes annexes) ont été examinés pour rechercher des signes de toxicité générale ainsi que d'éventuelles anomalies testiculaires. Les fœtus ont fait l'objet d'une recherche plus approfondie des altérations ou malformations testiculaires avec notamment un examen macroscopique et microscopique.

Le taux de pertes post-implantatoires est significativement augmenté à toutes les doses par rapport au groupe témoin avec une relation dose-effet (LOAEL = 1000 mg/kg p.c./j). La prise de poids maternelle a été significativement diminuée à partir de la dose à 1200 mg/kg p.c./j, également avec une relation dose-effet relativement claire (NOAEL = 1000 mg/kg p.c./j ; LOAEL = 1200 mg/kg p.c./j).

Sur le plan des effets testiculaires chez les fœtus, les altérations macroscopiques (diminution de poids) et microscopiques (diminution de diamètre des tubes séminifères, signes d'apoptose) sont significatives à partir de la dose de 1200 mg/kg p.c./j.

Le LOAEL de 1000 mg/kg p.c./j est retenu pour cette étude.

Etude de Singh, 2006

Cette étude a été réalisée chez des rates Charles Foster gravides, âgées de 85 à 120 jours, exposés par groupe de 25 animaux à des doses de TCA de 1000 à 2000 mg/kg p.c./j du 6^{ème} au 15^{ème} jour de gestation (gavage). Au 19^{ème} jour de gestation, les rates et leurs fœtus (et organes annexes) ont été examinés pour rechercher des signes de toxicité générale ainsi que d'éventuelles anomalies morphologiques. Les fœtus ont fait l'objet d'une recherche plus approfondie des altérations ou malformations neurologiques avec notamment un examen microscopique de coupes cérébrales.

Le groupe exposé à 2000 mg/kg p.c./j a montré une résorption totale des sites d'implantation embryonnaires, ne permettant pas l'analyse approfondie de la descendance. Le taux de pertes post-implantatoires est significativement augmenté à toutes les doses par rapport au groupe témoin avec une relation dose-effet relativement claire (LOAEL = 1000 mg/kg p.c./j). La prise de poids maternelle a été significativement diminuée à partir de la dose à 1200 mg/kg p.c./j également avec une relation dose-effet relativement claire (NOAEL = 1000 mg/kg p.c./j ; LOAEL = 1200 mg/kg p.c./j).

Sur le plan des effets neurologiques observés chez les fœtus, les altérations macroscopiques cérébrales sont significatives à partir de la dose de 1600 mg/kg p.c./j pour la diminution de taille du cerveau et à partir de la dose de 1200 mg/kg p.c./j pour la diminution de poids du cerveau. Le taux de lésions cérébrales fœtales, incluant hydrocéphalies, hémorragies cérébrales, vacuolisation cérébrale et signes d'apoptose cellulaire est significativement élevé pour toutes les doses (LOAEL = 1000 mg/kg p.c./j).

3.2 Mécanisme d'action

Le mécanisme d'action associé à la survenue de malformations après exposition *in utero* n'est pas élucidé. Singh (2005 et 2006) évoque des effets anoxiques et de stress oxydant associés au TCA qui pourraient contribuer à augmenter les phénomènes apoptotiques et par là même expliquer une partie des altérations du développement observées chez les fœtus.

3.3 Analyse et évaluation des choix pour la construction de la VTR

3.3.1 Choix de l'effet critique

La synthèse des études préalablement détaillées converge vers un effet critique du type **malformations cardiaques** consécutivement à une exposition maternelle au TCA pendant l'organogénèse. Les études de Singh en 2005 et 2006 mettent également en évidence des effets neurologiques et testiculaires en l'absence de toxicité maternelle significative mais le choix du régime de doses retenu dans ces études ne permet pas de considérer ces effets comme survenant avant les effets cardiaques.

3.3.2 Choix de l'étude

L'étude la plus appropriée pour calculer une valeur toxicologique de référence, mettant en évidence l'effet critique est l'étude de **Smith et al., 1989** pour les raisons suivantes :

- qualité méthodologique générale et notamment le nombre d'animaux par groupe, le régime de doses et l'étude des fœtus,
- transparence des résultats permettant une exploitation statistique complète

3.3.3 Choix de la dose critique

L'étude de Smith *et al.*, 1989 permet d'identifier des relations dose-réponse²³. Conformément aux recommandations de l'Afsset « Méthode de construction de VTR fondées sur des effets sur la reproduction et le développement », il a été proposé la construction d'une benchmark dose à partir des résultats présentés dans le tableau 10.

Tableau 10 : Incidence des malformations fœtales suite à une exposition maternelle au TCA aux jours 6 à 15 de gestation (rat Long Evans)

Dose (mg/kg p.c./j)	Nombre de portées atteintes	Nombre de portées
0	1	26
330	6	19
800	12	17
1200	11	14
1800	8	8

Les données disponibles ont été modélisées avec le logiciel Proast du RIVM. Il apparaît dans l'étude clé une relation dose-réponse significative entre l'augmentation des malformations cardiaques et la dose journalière d'exposition au TCA (test de Kruskal Wallis).

L'objectif de la démarche est d'estimer la dose correspondant à un niveau de réponse défini ou à un pourcentage défini de réponse supplémentaire par rapport au témoin. Ce niveau ou ce pourcentage est appelé BMR pour Benchmark Response level. C'est majoritairement la BMDL,

²³ L'étude de Smith *et al.*, 1989 permet d'identifier un LOAEL à 330 mg.kg p.c.⁻¹.j⁻¹ mais pas de NOAEL.

autrement dit la limite inférieure de l'intervalle de confiance de la BMD, qui est considérée comme dose repère.

Les données expérimentales ont été ajustées par les modèles développés par le RIVM pour des données dichotomiques (modèles gamma, logistique, multi-étapes, probit, Weibull...) (Tableau 11 et figure 4).

Le choix du modèle s'est fait sur celui qui s'ajustait le mieux aux données expérimentales par la méthode du maximum de vraisemblance (Log Likelihood) : le modèle Weibull a été retenu pour l'estimation de la limite inférieure de l'intervalle de confiance à 90% ²⁴ d'une dose correspondant à une augmentation de la réponse par rapport au groupe non exposé de 5%. Ce modèle est celui dont le maximum de vraisemblance se rapprochait le plus du modèle « full ».

Les BMD_{5%} et BMD_{5%} L_{90%} ont été calculées, car le seuil de 5% est généralement retenu dans les études de reprotoxicité.

Tableau 12 : Résultats de calcul de BMD et BMDL à partir du logiciel Proast

Modèle	Nombre de paramètres (npar)	Maximum de vraisemblance (loglik)	BMD _{5%}	BMD _{5%} L _{90%} (mg/kg p.c./j)
null	1	-57,84	NA*	NA
full	5	-33,66	NA	NA
one-stage	2	-34,62	37,2	27,5
two-stage	3	-34,19	57,7	NA
log-logist	3	-34,46	123	30
Weibull	3	-34,23	80,2	28,6
log-prob	3	-34,38	140	39,1
Gamma	3	-34,26	91,5	28,6
E2	2	-35,09	120	NA
H2	2	-34,86	48,9	NA

* NA, non accepté

²⁴ La limite inférieure de l'intervalle de confiance à 95% (one-sided ou « un coté ») utilisée par l'US EPA, est équivalente à la limite inférieure de l'intervalle de confiance à 90% (two-sided ou « deux coté ») utilisée par le RIVM

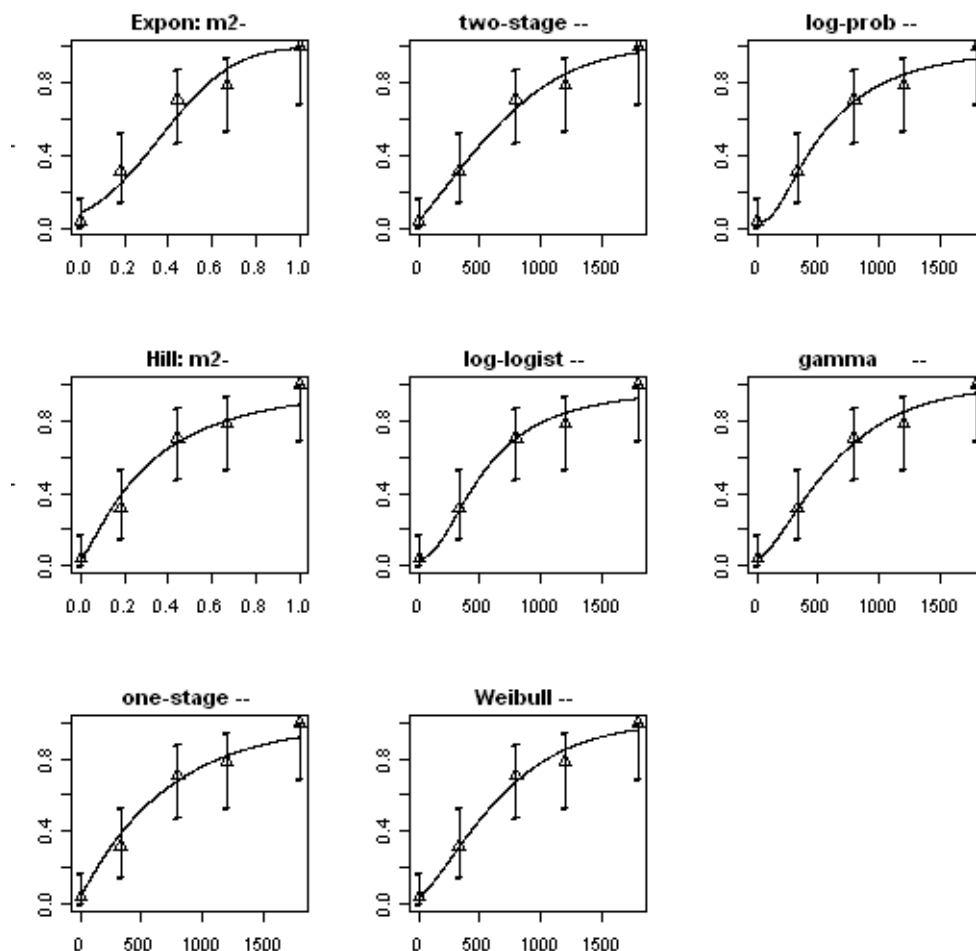


Figure 4 : Représentation graphique de la relation dose réponse issues des différentes équations utilisées du logiciel Proast pour la construction de la VTR du TCA

Sur la base des résultats présentés et des discussions des experts, le groupe de travail propose de retenir la limite inférieure de l'intervalle de confiance à 90% de la BMD construite :

- pour l'effet critique choisi : malformations cardiaques,
- pour un niveau d'effet correspondant à 5% du niveau d'effet observé dans le groupe témoin,
- par portées (données disponibles),
- calculée à partir du modèle Weibull.

$$\text{BMD}_{5\%} = 80,2 \text{ mg/kg p.c./j}$$

$$\text{BMD}_{5\%} \text{ L}_{90\%} = 28,6 \text{ mg/kg p.c./j}^{25}$$

²⁵ Le calcul de BMD et BMDL et prenant en compte la diminution du poids à la naissance et/ou les malformations sur les tissus mous, aboutissent à des résultats du même ordre de grandeur.

3.3.4 Ajustement allométrique et choix des facteurs d'incertitude

L'objectif est de déterminer une dose équivalente humaine (ou HED : Human Equivalent Dose).

Cet ajustement allométrique peut être réalisé indifféremment, sans altérer les résultats, avant ou après le calcul de la BMD. Il a été réalisé selon les recommandations de l'US EPA (US EPA 2006) :

$$\text{Dose équivalente homme} = \text{Dose animal} \times \left(\frac{\text{Poids animal}}{\text{Poids homme}} \right)^{1/4}$$

Le poids moyen du rat a été calculé d'après les données décrites dans l'étude, et mesurées aux jours 20. Il est égal à 320 g, celui de l'homme est estimé à 70 kg. Les doses sont exprimées en mg.kg p.c.⁻¹.j⁻¹.

Soit dose équivalent chez l'homme = dose animale*0.26 (ce qui reviendrait à appliquer un facteur qui tient compte de la variabilité toxicocinétique, de 3,8).

Le tableau 13 suivant présente les résultats obtenus avec le modèle qui s'ajuste le mieux aux données expérimentales.

Tableau 13 : Résumé des BMD et BMDL pour la construction de la VTR reprotoxique à seuil sur le développement de l'acide trichloroacétique

BMR	Modèle le mieux ajusté	BMD _{5%} chez le rat (mg/kg p.c./j)	BMD _{5%} L _{90%} chez le rat (mg/kg p.c./j)	BMD équivalente chez l'homme (mg/kg p.c./j)	BMDL équivalente chez l'homme (mg/kg p.c./j)
5%	Weibull	80,2	28,6	20,9	7,4

3.3.5 Choix des facteurs d'incertitude

Variabilité inter-espèces

Pour tenir compte de la variabilité inter-espèces, un ajustement allométrique a été réalisé et a permis de calculer une HED (Human Equivalent Dose) à l'aide de l'équation précédente. Pour tenir compte de la variabilité toxicodynamique et d'incertitudes résiduelles, un facteur d'incertitude supplémentaire a été fixé à 2,5 selon les recommandations du document de référence pour « Construction d'une valeur toxicologique de référence pour les substances reprotoxiques » (Afsset 2007).

La valeur du facteur d'incertitude pour la variabilité inter-espèces a donc été de 2.5.

UF_A = 2,5 (variabilité inter-espèce)

Variabilité intra-espèce

En l'absence de connaissance, sur l'existence de sous population sensible, une valeur finale de 10 par défaut a été choisie pour la variabilités intra-espèces (Afsset 2007):

UF_H = 10 (variabilité intra-espèce ou inter-individuelle)

3.3.6 Calcul de la VTR

Cette VTR est spécifique aux effets sur le développement, et s'applique pour une exposition aiguë par voie orale pour tenir compte de l'absence de connaissance sur le mécanisme d'action et de la période critique de sensibilité.

Il n'a pas été mis en évidence d'effets sur la fertilité chez l'animal. Ainsi le groupe de travail n'a pas construit de VTR pour les effets sur la fertilité.

Tableau 14: Conclusion sur la VTR reprotoxique à seuil sur le développement de l'acide trichloroacétique

Effet critique	Dose critique	Facteur d'incertitude	VTR
Augmentation des malformations cardiaques chez le rat Long Evans Etude de Smith <i>et al.</i> , 1989	BMD _{5%} L _{90%} = 28,6 mg/kg p.c./j* <u>Ajustement allométrique</u> BMD _{5%} L _{90%^{HED}} ** = 7,4 mg/kg p.c./j	UF 25 UF _A 2,5*** UF _H 10	VTR = 300 µg/kg p.c./j

* Le calcul de BMD et BMDL et prenant en compte la diminution du poids à la naissance et/ou les malformations sur les tissus mous, aboutissent à des résultats du même ordre de grandeur.

** HED, Human Equivalent Dose. Il a été calculé à partir de l'équation précédente ;

*** Afin de tenir compte de la variabilité toxicodynamique, un facteur d'incertitude UF_A a été fixé à 2,5.

4 Acide dibromoacétique (CAS 631-64-1)

Cette partie s'appuie sur le document technique de Santé Canada publié en juillet 2008 : « Recommandations pour la qualité de l'eau potable au Canada : les acides haloacétiques » (Santé Canada, 2008).

Une recherche bibliographique complémentaire (via Pubmed) concernant les effets reprotoxiques de l'acide trichloroacétique a été réalisée, couvrant la période 2004-début 2009. Les mots clés utilisés étant « haloacetic acids », « dibromoacetic acid », « toxicity », « swimming pool », « disinfection by-products mixtures » et « drinking water ». Ainsi, dix huit articles concernant la toxicité générale du DBA et la toxicité sur la reproduction du DBA ont été identifiés. Parmi ces dix huit articles, seulement 12 articles portaient sur les effets reprotoxiques et ont été par conséquent retenus.

4.1 Recueil des données toxicologiques du DBA

4.1.1 Identification de la substance

Généralités

Avec les trihalométhanes, les acides haloacétiques (AHA) sont l'un des deux principaux groupes de sous-produits chlorés de désinfection présents dans l'eau potable et dans les eaux de piscine où ils se trouvent généralement aux concentrations les plus élevées. Ils surviennent lors de la réaction du chlore avec les matières organiques naturelles et/ou les ions bromures. On retrouve l'acide dibromoacétique (DBA) dans les eaux de piscines françaises et internationales à des concentrations de l'ordre de 10 µg/L. (OMS 2006 et communication personnelle d'un expert du GT « piscine », laboratoire LCME de Poitiers). L'OMS ne recommande aucune valeur guide pour le DBA dans l'eau potable, contrairement au DCA et TCA.

Propriétés chimiques

L'acide dibromoacétique (DBA) est une substance chimique non volatile, polaire et soluble. (Martin, 2003) se présentant sous la forme d'un cristal hygroscopique (US EPA, 2005a) qui n'a aucun usage industriel signalé (NIOSH, 1990).

Tableau 15 : Propriétés physicochimiques du DBA

Formule	Br ₂ CHCOOH
Numéro CASRN	631-64-1
Poids moléculaire	217,844
Point d'ébullition (°C)	195
Point de fusion (°C)	49
Masse volumique (g.cm ⁻³)	n.d.c
Pression de vapeur (mm Hg)	n.d.c
Constante de dissociation (pKa) à 25°C	n.d.c
Solubilité dans l'eau (g.mL ⁻¹)	2,11 à 25°C
Coefficient de partage octanol/eau	1,22

4.1.2 Plausibilité d'exposition humaine

Compte tenu de ces propriétés physico-chimiques :

- non volatilité,

La voie d'inhalation serait négligeable.

- de leur forme ionique (avec $pK_a = 1,26$) dans les eaux de piscine maintenues à un pH neutre car $pH > pK_a$,

L'absorption cutanéemesurée à un pH de 7 dans des chambres de diffusion *in vitro* est très basse : de 1 à 3 10^{-3}cm.h^{-1} à pH 7 (Xu *et al.*, 2002). Les auteurs ont supposé que l'ionisation constituait peut-être le principal facteur limitant la perméabilité des AHA. Ainsi, la voie cutanée peut être négligée et ne sera donc pas considérée

- leur forte polarité et solubilité. Ces substances sont majoritairement retrouvées dans les eaux.

La voie d'exposition majoritaire est celle de l'**ingestion** et sera la seule considérée pour la proposition de VTR.

4.1.3 Toxicocinétique

Absorption

Le DBA est absorbé rapidement dans le sang à partir du tractus gastro-intestinal à la suite d'une exposition par voie orale chez les rats. Sa concentration dans le sang atteint son maximum environ une heure après l'administration de la dose (Schultz *et al.*, 1999). Schultz *et al.* (1999) ont estimé la biodisponibilité orale du DBA (en se fondant sur une seule dose importante) à 30% seulement, ce qui est peut-être attribuable, selon les auteurs, à un effet de premier passage hépatique.

Plusieurs études de courte durée (Linder *et al.*, 1994a, 1994b, 1995, 1997b) font état d'effets sur le foie, les reins, la rate et l'appareil reproducteur mâle, ce qui démontre que le DBA est suffisamment absorbé pour causer des effets indésirables systémiques.

Distribution

Au cours de l'étude de Christian *et al.* (2001) sur la reproduction et le développement, la présence de DBA (acide) est détectée dans le plasma de rats Sprague-Dawley mâles et femelles après son administration dans de l'eau potable désionisée. A contrario, le DBA n'a pas été détecté dans le plasma de souris B6C3F1 femelles auxquelles on a administré du DBA dans l'eau potable pendant 28 jours (NTP, 1999b), ce qui peut être attribuable à un métabolisme et à une excrétion importants, et non à une absorption limitée (USUSUS EPA, 2005a).

Des concentrations détectables et quantifiables de DBA ont été relevées dans le placenta, le liquide amniotique et le lait chez le rat (Christian *et al.*, 2001). Selon Christian *et al.* (2001), il n'y avait aucune accumulation apparente de DBA. Du DBA a aussi été détecté dans le liquide interstitiel testiculaire lorsqu'on a administré à des rats Sprague-Dawley mâles (dont le nombre n'était pas précisé), par gavage pendant cinq jours, 250 mg/kg p.c./j de DBA (neutralisé) (Holmes *et al.*, 2001). La concentration de DBA atteint un pic après 30 minutes et sa demi-vie était de 1,5 heure. La lipophilie du DBA étant faible à un pH voisin de celui du sang (pH 7,4), ce qui indique que le DBA n'aurait pas tendance à s'accumuler dans les tissus adipeux.

Métabolisme

Une étude sur le métabolisme *in vitro* réalisée par Tong *et al.* (1998a) a démontré que l'enzyme GST-zêta catalysait l'oxygénation du DBA en acide glyoxylique, voie qui est semblable à celle du DCA. L'OMS (2004c) a signalé que l'acide glyoxylique pouvait être métabolisé en glycine, glycolate, dioxyde de carbone ou acide oxalique, selon une étude réalisée par Stacpoole *et al.* (1998b).

Excrétion

Une seule étude a porté sur l'excrétion du DBA (Schultz *et al.*, 1999). Les auteurs ont exposé des rats à une seule dose de 109 mg/kg p.c. de DBA administrée par voie intraveineuse et ont calculé que la demi-vie d'élimination était de 0,72 heures. Les auteurs ont estimé que la biotransformation constituait la principale voie d'élimination.

4.1.4 Effets sanitaires

Effets sur la toxicité générale

Linder *et al.* (1995) ont réalisé une étude sur des rats mâles Sprague-Dawley exposés à des doses de 2, 10, 50 et 250 mg/kg p.c./j sur une durée maximale de 42 jours. A la dose la plus forte, les auteurs rapportent une toxicité neurologique avec comme signes cliniques des postures anormales, des tremblements légers, et des mouvements atypiques et/ou difficiles des membres postérieurs.

Une étude du NTP (1999) a mis en évidence des effets immunotoxiques chez des souris B6C3F1 femelles qui avaient été exposés au DBA dans l'eau potable à des concentrations de 0, 125, 250, 500, 1000 ou 2000 mg/L par jour pendant 28 jours. Une augmentation significative du nombre de macrophages dans la rate a été observé à partir de la dose de 500 mg.L⁻¹ et plus (soit à partir de 68-73 mg/kg p.c./j).

Dans une étude de 13 semaines qui a porté sur des souris B6C3F1 et des rats F344 exposés à des doses de 0, 125, 250, 500, 1 000 ou 2 000 mg/L de DBA dans l'eau de boisson, le NTP (2007) a montré les effets suivants :

- une diminution significative du poids corporel moyen final chez les deux espèces et les deux sexes exposés à la dose la plus forte, mais non liée à une baisse de la consommation d'eau. Le poids du foie a augmenté en fonction de la dose chez les souris des deux sexes exposées à 500 mg/L et plus et chez les rats exposés à 125 mg/L et plus.
- une augmentation significative de l'incidence de l'hypertrophie cellulaire au niveau de l'hypophyse était visible chez les rats mâles exposés à la dose élevée, mais ces effets étaient considérés comme secondaires à une atrophie testiculaire.

Cancérogénicité et génotoxicité

Le DBA n'est ni classé par l'US EPA, ni par l'CIRC.

Une étude de cancérogénèse a été réalisée par le NTP (NTP 2007) sur des rats F344 et des souris B6C3F1 traité au DBA dans l'eau potable à des concentrations de 0, 50, 500 ou 1000 mg/L. Aucun effet sur la survie des deux espèces ni changement dans le poids. Différentes lésions néoplasiques ont été mises en évidence chez les rats comme chez les souris : mésothéliomes malins de la cavité abdominale, leucémie à cellules mononuclées, adénome hépatocellulaire, hépatoblastome, adénome alvéolaire/bronchiolaire.

Vue le faible nombre d'étude de génotoxicité disponibles, il n'est pas possible de conclure quant au potentiel mutagène ou génotoxiques du DBA.

Effet reprotoxique

- **Chez l'Homme**

Chez l'Homme, il n'y a pas d'études relatées (IPCS 2000).

- **Chez l'animal**

Les effets reprotoxiques du DBA sont décrits chez l'animal, pour la plupart chez le rat. Les effets du DBA portent essentiellement sur la fertilité entraînant une toxicité sur la reproduction chez plusieurs espèces :

- chez les femelles : diminution de la population de follicules primordiaux, augmentation de la concentration du 17 β -estradiol sérique, augmentation des hormones estrone (E1) et estradiol (E2) circulantes,
- chez les mâles : anomalies du tractus reproducteur, altérations de la spermiation, réduction du nombre de spermatozoïdes, une morphologie anormale des spermatozoïdes

A partir de la revue de la littérature, plusieurs études réalisées chez l'animal ont été retenues. Seules les études les mieux cotées selon la classification de Klimisch seront synthétisées ci-après.

Etudes de fertilité

Etude de Christian *et al.*, 2001

Cette étude a été réalisée chez des rats mâles et femelles Sprague Dawley (50 animaux par sexes et par groupes de doses), exposés via de l'eau de boisson pendant 70 jours à des doses de 16,5 ; 33,0 et 66,1 mg/kg p.c./j. Cette étude met en évidence des effets sur la fertilité avec une diminution de l'accouplement à la dose de 66,1 mg/kg p.c./j.

Etudes de fertilité sur les femelles

Etude de Cummings *et al.*, 1998

Cette étude a été réalisée chez des rates Holtzman mûres au début de leur gestation exposées pendant 10 semaines à des doses de 62.5, 125, et 250 mg/kg p.c./j par gavage au cours des jours 1 à 8 de la gestation. L'effet observé est une augmentation de la concentration du 17 β -estradiol sérique à la dose la plus élevée chez des femelles sacrifiées au jour 9 de la gestation. Ainsi, un LOAEL de 250 mg/kg p.c./j et un NOAEL de 125 mg/kg p.c./j peuvent être déduites de cette étude pour cet effet.

Etude de Bodensteiner *et al.*, 2004

Cette étude a été réalisée chez des lapines gravides Dutch-belted âgées de six mois. Ces lapines ont été exposées pendant 24 semaines, via l'eau de boisson, à des doses de 1, 5 et 50 mg/kg p.c./j. Cette étude met en évidence des effets sur la fertilité avec des effets retrouvés au niveau du développement folliculaire. Les auteurs rapportent ainsi une réduction de la population de follicules primaires et de follicules pré-antral à 1 mg.kg p.c.⁻¹.j⁻¹ ainsi qu'une réduction de la population de follicules primordiaux et des follicules en bon état en période pré-pubertaire à 50 mg.kg p.c.⁻¹.j⁻¹, dès la première exposition *in utero*, à compter du 15^{ème} jour de la gestation et durant la vie entière. La réduction de la population de follicules primordiaux pourra être retenue comme l'effet critique avec le couple LOAEL/NOAEL de 50 mg/kg p.c./j et 5 mg/kg p.c./j.

Etude de Goldman *et al.*, 2006

Cette étude a été réalisée sur des rates Sprague-Dawley, âgées de 60 jours, exposées par gavage pendant 14 jours, à une dose de 150 mg/kg p.c./j. Les effets retrouvés sont une augmentation des hormones estrone (E1) et estradiol (E2) circulantes à cette dose d'exposition.

Etudes de fertilité sur les mâles

- **Etudes réalisées via le véhicule « eau de boisson »**

Etude de Christian *et al.*, 2002

Cette étude a été réalisée sur des rats Sprague Dawley sur deux générations P et F1. Les animaux ont été exposés, via l'eau de boisson, pour la génération P du 43^{ème} au 92^{ème} jour, et pour la génération F1 *in utero* jusqu'au 113^{ème} jour, à des doses de 4,4, 22,4 et 52,4 à pour la génération P, et 11,6 , 55,6 et 132 mg/kg p.c./j pour la génération F1. On observe chez les rats

mâles une altération de production et de morphologie des spermatozoïdes ainsi que des changements au niveau du tractus reproducteur (tubules épидидymaires, taille des épидидymes et des testicules).

Les anomalies du tractus reproducteur et de la spermatogénèse retrouvées pour deux générations (P et F1) aux doses moyennes de 22,4 mg/kg p.c./j pour la génération P et de 55,6 mg/kg p.c./j pour la génération F1, pourraient constituer pour les deux générations un couple LOAEL/NOAEL de 22,4-55,6 mg/kg p.c./j et 4,4-11,6 mg/kg p.c./j.

Etude de Linder *et al.*, 1994

Cette étude a été réalisée chez des rats Sprague Dawley âgés de 3 à 4 mois. Ces rats ont été exposés à des doses de 10, 30, 90 et 270 mg/kg p.c./j durant 14 jours. Cette étude met en évidence des effets spermatotoxiques à partir de 10 mg/kg p.c./j tels qu'une altération de la spermiation et une réduction du nombre de spermatozoïdes pouvant constituer un LOAEL.

Etude de Klinefelter *et al.*, 2004

Cette étude a été réalisée sur deux générations (P et F1) de rats Sprague Dawley mâles et femelles. Ces rats ont été exposés de la puberté à la vie adulte à des doses de 0,6 ; 3,6 et 76,3 mg/kg p.c./j. Les effets observés à la puberté sont une altération de la capacité stéroïdogénique du parenchyme testiculaire à la dose de 0,6 mg/kg p.c./j. Les auteurs considèrent cette dose comme le LOAEL et propose un NOAEL de 0,06 mg/kg p.c./j par ajout d'un facteur 10 à le LOAEL.

Cette étude mis en évidence un effet très sensible : la diminution d'une protéine membranaire située à la surface des spermatozoïdes, la protéine SP22. La diminution de cette protéine membranaire SP22 peut donc constituer un effet critique sensible (diminution de la fertilisation), avec un LOAEL de 3,6 mg/kg p.c./j et un NOAEL de 0,6 mg/kg p.c./j.

- Etudes réalisées par gavage

Etude de Tsuchiya *et al.*, 2000

Cette étude a été réalisée chez des rats mâles Sprague Dawley âgés de 5 semaines durant 2 ou 4 semaines à des doses de 5, 50 et 250 mg/kg p.c./j. Les auteurs rapportent une spermatotoxicité à partir de 50 mg/kg p.c./j dès deux semaines. Une augmentation significative du nombre de spermatozoïdes, du nombre d'anomalies de la tête et du col des spermatozoïdes ainsi que de spermatozoïdes fusionnés ($p < 0,05$) a été observée. Le LOAEL et le NOAEL qui peuvent être déduit de cette étude sont respectivement 50 et 5 mg/kg p.c./j.

Etude de Linder *et al.*, 1993

Cette étude a été réalisée en deux étapes chez des rats mâles Sprague Dawley âgés de 3,5 à 4 mois durant 28 jours. Dans un premier temps, des rats ont été exposés à une dose de 1250 mg/kg p.c./j afin d'évaluer la toxicité subaigue. Dans un deuxième temps, des rats ont été exposés aux doses de 1000 et 2000 mg/kg p.c./j. Les effets observés sont une toxicité au niveau du système reproducteur mâle avec une morphologie anormale des spermatozoïdes, une altération de leur motilité ainsi qu'une toxicité testiculaire (diminution du poids des testicules, épидидymes, prostates et diminution du nombre de sperme et du taux de testostérone).

Etude de Linder *et al.*, 1995

Cette étude a été réalisée sur des rats mâles Sprague-Dawley âgés de 81 jours. Ces rats ont été exposés à des doses de 2, 10, 50 et 250 mg/kg p.c./j sur une durée maximale de 42 jours. Cette étude met en évidence plusieurs effets toxiques au niveau de l'appareil reproducteur mâle tels qu'une morphologie et une motilité anormale des spermatozoïdes, une diminution du nombre de spermatozoïdes normaux et une anomalie des spermatides à la dose de 50 mg/kg p.c./j. Une diminution significative du nombre de spermatozoïdes et de la tête de l'épididyme a même été

observée à la plus faible dose (10 mg/kg p.c./j). A Cette dose des effets sur la spermatogénèse ont été observés (Linder *et al.*, 1994). Ils concernent l'augmentation significative ($p < 0,05$) du nombre de spermatozoïdes à l'étape 19 retenus au-delà du stade VIII (Czyba JC, Montella A, 1993). D'après ces effets de spermatotoxicité, un LOAEL de 50 mg/kg p.c./j pourrait être déduit ainsi qu'un NOAEL de 10 mg/kg p.c./j.

Etude de Linder *et al.*, 1996 :

Cette étude a été réalisée chez des rats mâles Sprague Dawley âgés de 105 jours. Ces rats ont été exposés à des doses de 2, 10, 50 et 250 mg/kg p.c./j. Dès 10 mg/kg p.c./j, des effets spermatotoxiques sont rapportés tels que des changements histopathologiques au niveau des spermatozoïdes provoquant une altération du comportement sexuel masculin reproductif. On note qu'à la dose maximale de l'étude de 250 mg/kg p.c./j, de nombreux effets spermatotoxiques sont observés au niveau des spermatozoïdes : anomalies de l'acrosome et de constituants de la tête des spermatozoïdes, fusion de cellules, atrophie tubulaire, présence de corps résiduels atypiques.

Etude de Holmes *et al.*, 2001

Cette étude a été réalisée chez des rats mâles adultes Sprague Dawley, âgés de 110 à 130 jours. Cette étude se déroule en deux parties : *in vitro* et *in vivo*. L'étude *in vivo* met en évidence des effets de spermatotoxicité avec une altération de la spermatogénèse à une dose d'exposition de 250 mg/kg p.c./j par gavage sur 5 jours. Tandis que l'étude *in vitro* met en évidence des altérations morphologiques des tubules séminifères.

Etudes sur le développement

- Etudes réalisées via le véhicule « eau de boisson »

Etude de Christian *et al.*, 2002 (Cf étude sur la fertilité)

Cette étude a été réalisée sur des rats Sprague Dawley sur deux générations (P et F1). Elle met en évidence des effets sur le développement masculin à des doses supérieures de celles entraînant des effets sur la fertilité. Les auteurs énoncent ainsi un NOAEL parental de 4,4 et 11,6 mg/kg p.c./j en se fondant sur une augmentation du poids absolu et relatif des reins et du foie en l'absence d'histopathologie. Seules les générations P et F1 sont touchées.

D'autres effets sont rapportés tels qu'une augmentation du poids des glandes pituitaire et surrénales chez l'ensemble des générations (P, F1 et F2) aux doses de 52,4 et 132 mg/kg p.c./j pour P et à 22,4 et 55,6 mg/kg p.c./j pour F1 et F2, mais cette augmentation ne semble pas être liée à l'exposition car elle n'est pas dose dépendante. En ce qui concerne les anomalies unilatérales des épидидymes (épидидymes petits ou absents), l'incidence observée chez les rats mâles de la génération F1 exposée à 600 ppm de DBA par rapport aux témoins est statistiquement significative. Elles sont probablement liées à l'exposition *in utero* et/ou pendant la période de lactation.

Ainsi, la plus faible dose pourrait constituer le LOAEL (LOAEL 22,4 pour F1 et 55,6 mg/kg p.c./j pour F2). Ainsi, un NOAEL de 4,4 mg/kg p.c./ pour F1, et 11,6 mg/kg p.c./j pour F2 pourrait également être déduit pour ces deux populations.

4.2 Mécanisme d'action

Etude de Holmes *et al.*, 2001

In vitro, le DBA entraîne une vacuolisation des cellules de Sertoli avec dégénération des cellules germinales qui ont pour conséquence des altérations morphologiques des testicules.

In vivo, l'exposition au DBA altère la synthèse de la protéine cytotologique 4 des tubules séminifères.

4.3 Analyse et évaluation des choix pour la construction de la VTR

4.3.1 Choix de l'effet critique

L'étude de Klinefelter *et al.* (2004) a mis en évidence un effet très sensible : la diminution de la protéine membranaire SP22 des spermatozoïdes. La diminution de la protéine membranaire SP22 des spermatozoïdes peut donc constituer un effet critique sensible, avec un LOAEL de 3,6 mg/kg p.c./j et un NOAEL de 0,6 mg/kg p.c./j. Cependant dans cette étude, il n'y a pas eu de baisse de la fertilité par rapport aux témoins (les auteurs l'expliquent par un nombre de spermatozoïdes inséminés suffisamment élevé pour couvrir l'effet de la diminution de SP22). Toutefois, dans la partie « dose finding » de l'étude, la fertilité a été altérée à partir de 600 ppm (112,5 mg/kg p.c./j avec une corrélation significative avec SP22 ($p < 0.05$; $r^2=0.68$)).

L'étude de Bodensteiner *et al.* (2004) a mis en évidence un effet du DBA sur la fertilité féminine par la réduction de la population de follicules primordiaux à des doses relativement faibles aboutissant à un NOAEL aussi bas que 1 mg/kg p.c./j. Cependant, les effets du DBA les plus décrits dans la littérature relatent essentiellement des atteintes de la fertilité masculine, en particulier les anomalies morphologiques des spermatozoïdes et le développement des spermatides.

L'effet critique choisi est l'altération de la spermatogénèse (rétention des spermatozoïdes à l'étape 19 dans les tubules aux stades IX et X) est un effet qui se retrouve dans plusieurs études et à des doses du même ordre de grandeur.

4.3.2 Choix de l'étude

L'étude la plus appropriée pour calculer une VTR mettant en évidence l'effet critique est l'étude de **Christian *et al.* (2002)**.

Christian *et al.* (2002) ont réalisé une étude sur deux générations dans laquelle des groupes de rats Sprague Dawley (30 par sexe et par dose) ont reçu du DBA en continu dans leur eau potable à des concentrations de 0, 50, 250 ou 650 mg/L (équivalant à 0, 4,4-11,6, 22,4-55,6 et 52,4-132,0 mg/kg p.c./j respectivement). La gamme de dose avait été calculée à partir d'une précédente étude des mêmes auteurs (Christian *et al.*, 2001).

Dans l'étude de 2002, les auteurs ont constaté une réduction de la consommation d'eau à toutes les doses et pour chaque génération F1. Chez les sujets exposés à la dose la plus forte des générations P et F1, des signes cliniques associés à la réduction de la consommation d'eau ont été décrits (baisse du poids corporel, réduction de la consommation d'aliments). Toutes les doses administrées à la génération F1 pendant la lactation ont entraîné une diminution du poids corporel, ce qui a nécessité le report du sevrage au jour 29.

Cette étude décrit des altérations de la spermatogénèse avec des spermatides à l'étape 19 retenus dans les tubules aux stades IX et X, accompagnés de changement au niveau des tubules de l'épididyme (augmentation de la quantité de cellules exfoliées et de corps résiduels dans les tubules de l'épididyme, atrophie et hypospermie) chez les rats des deux générations P et F1 exposés à 250 et 650 ppm (22,4 – 55,6 et 52,4 - 132 mg/kg p.c./j).

4.3.3 Choix de la dose critique

L'étude deux générations de Christian *et al.* (2002) permet d'identifier une relation dose-réponse. Conformément aux recommandations de l'Afsset « Méthode de construction de VTR fondées sur des effets sur la reproduction et le développement », il a été proposé la construction d'une benchmark dose à partir des résultats présentés dans le tableau 16. Il résume les incidences des altérations de la spermatogénèse (à savoir, les spermatides à l'étape 19 retenus dans les tubules séminifères) de la génération parentale. Selon un test de Fisher, la dose de 22,4 mg/kg p.c./j est

statistiquement significative (avec $p=0,01$) et constitue ainsi le LOAEL. Par conséquent, le NOAEL est de 4,5 mg/kg p.c./j.

Plusieurs études (Cf. études de fertilité précédemment citées) ont montré une toxicité sur le système mâle reproducteur (des altérations de la spermatogénèse, diminution de la motilité du sperme, anormalité morphologique du sperme). Ces effets se retrouvent à des doses du même ordre de grandeur que le NOAEL identifié dans l'étude de Christian *et al.* (2002).

Tableau 16 : Incidence des altérations de la spermatogénèse (spermatides à l'étape 19 retenus dans les tubules séminifères)-génération parentale

Dose (mg/kg p.c./j)	Nombre de rats atteints	Nombre de rats examinés
0	4	30
4,5	3	30
22,4*	13	30
52,4	23	30

*, statistiquement significatif, test de Fisher (un coté), avec $p=0,01$

Les données disponibles ont été modélisées avec le logiciel Proast du RIVM afin d'élaborer une Benchmark Dose (BMD). Il apparaît dans l'étude clé une relation dose-réponse significative entre l'augmentation des altérations de la spermatogénèse et la dose journalière d'exposition au DBA (test de Fisher).

L'objectif de la démarche est d'estimer la dose correspondant à un niveau de réponse défini ou à un pourcentage défini de réponse supplémentaire par rapport au témoin. Ce niveau ou ce pourcentage est appelé BMR pour Benchmark Response level. C'est majoritairement la BMDL, autrement dit la limite inférieure de l'intervalle de confiance de la BMD, qui est considérée comme dose repère.

Les données expérimentales ont été ajustées par les modèles développés par le RIVM pour des données continues (modèles gamma, logistique, multi-étapes, probit, Weibull...) (Tableau 17 et figure 5).

Le choix du modèle s'est fait sur celui qui s'ajustait le mieux aux données expérimentales par la méthode du maximum de vraisemblance (Log Likelihood) : le modèle Log Probit a été retenu pour l'estimation de la limite inférieure de l'intervalle de confiance à 90% ²⁶ d'une dose correspondant à une augmentation de la réponse par rapport au groupe non exposé de 5 %. Ce modèle est celui dont le maximum de vraisemblance se rapprochait le plus du modèle « full ».

Les $BMD_{5\%}$ et $BMD_{5\%L_{90\%}}$ ont été calculées, car le seuil de 5% est généralement retenu dans les études de reprotoxicité.

²⁶ La limite inférieure de l'intervalle de confiance à 95% (one-sided ou « un coté ») utilisée par l'US EPA, est équivalente à la limite inférieure de l'intervalle de confiance à 90% (two-sided ou « deux coté ») utilisée par le RIVM

Tableau 17 : Résultats de calcul de BMD et BMDL à partir du logiciel Proast

Modèle	Nombre de paramètres (npar)	Maximum de vraisemblance (loglik)	BMD _{5%}	BMD _{5%} L _{90%} (mg/kg p.c./j)
null	1	-78,29	NA	NA
full	4	-58,36	NA	NA
one-stage	2	-59,52	2,25	1,65
two-stage	3	-58,92	4,48	NA
log-logist	3	-58,56	7,18	2,26
Weibull	3	-58,74	5,53	1,83
log-prob	3	-58,49	7,99	2,73
gamma	3	-58,65	6,42	1,86
E2	2	-59,08	5,26	NA
H2	2	-59,53	2,47	NA
BMR: 0.05				
constraint: yes				
P-value GoF: 0.01				

*acc : acceptabilité, NA, non accepté

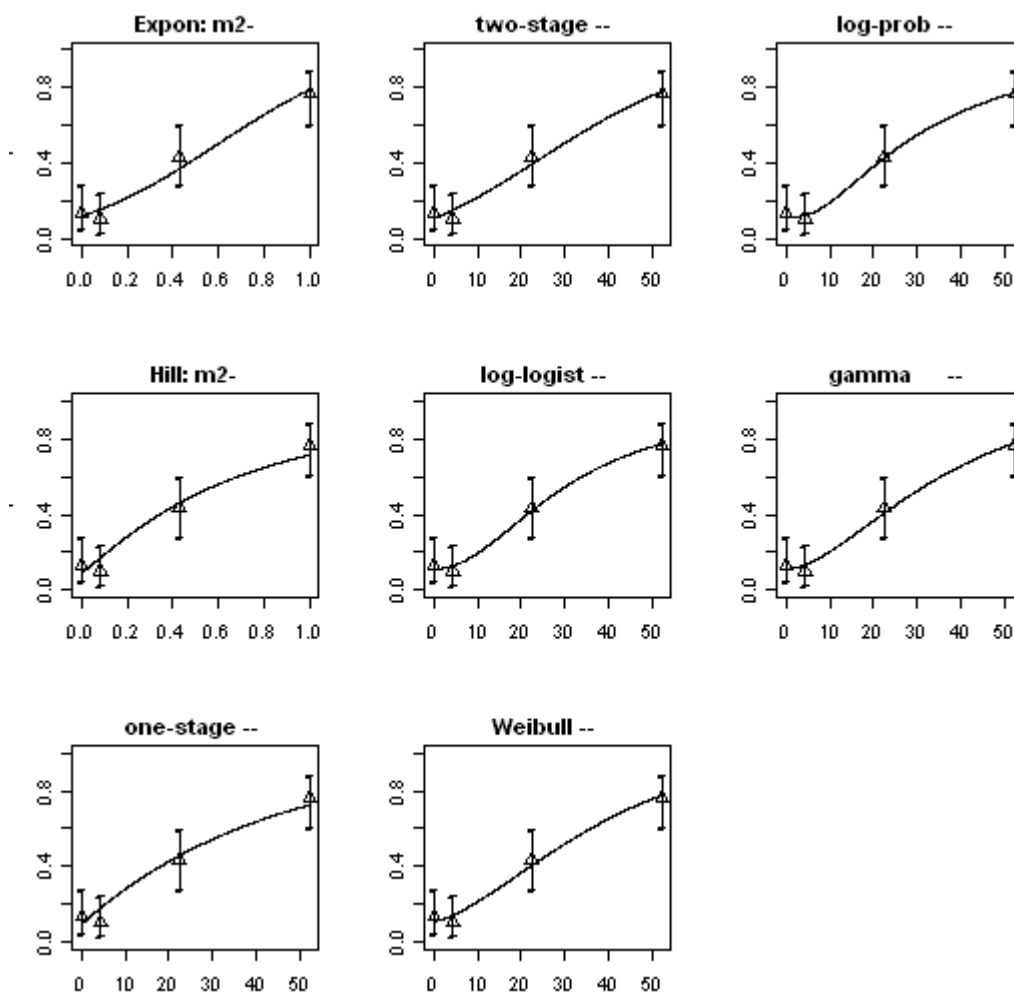


Figure 5 : Représentation graphique de la relation dose réponse issues des différentes équations utilisées du logiciel Proast pour la construction de la VTR du DBA

Sur la base des résultats présentés, le groupe de travail propose de retenir la limite inférieure de l'intervalle de confiance à 90% de la BMD construite :

- pour l'effet critique choisi : altérations de la spermatogénèse
- pour un niveau d'effet correspondant à 5% du niveau d'effet observé dans le groupe témoin,
- calculée à partir du modèle log probit,

$$\begin{aligned} \text{BMD}_{5\%} &= 7,99 \text{ mg/kg p.c./j} \\ \text{BMD}_{5\% \text{ L}_{90\%}} &= 2,73 \text{ mg/kg p.c./j} \end{aligned}$$

4.3.4 Ajustement allométrique

L'objectif est de déterminer une dose équivalente humaine (ou HED : Human Equivalent Dose).

Cet ajustement allométrique peut être réalisé indifféremment, sans altérer les résultats, avant ou après le calcul de la BMD. Il a été réalisé selon les recommandations de l'US EPA (US EPA 2006) :

$$\text{Dose équivalente homme} = \text{Dose animal} \times \left(\frac{\text{Poids animal}}{\text{Poids homme}} \right)^{1/4}$$

Le poids moyen du rat a été calculé d'après les données décrites dans l'étude. Il est égal à 578 g, celui de l'homme est estimé à 70 kg. Les doses sont exprimées en mg/kg p.c./j.

Soit, dose équivalent chez l'homme = dose animale*0.30 (ce qui reviendrait à appliquer un facteur qui tient compte de la variabilité toxicocinétique, de 3,4).

Le tableau 17 suivant présente les résultats obtenus avec le modèle qui s'ajuste le mieux aux données expérimentales.

Tableau 18 : Résumé des BMD et BMDL pour la construction de la VTR reprotoxique à seuil sur la fertilité de l'acide dibromoacétique

BMR	Modèle le mieux ajusté	BMD _{5%} chez le rat (mg/kg p.c./j)	BMD _{5%} L _{90%} chez le rat (mg/kg p.c./j)	BMD équivalente chez l'homme (mg/kg p.c./j)	BMDL équivalente chez l'homme (mg/kg p.c./j)
5%	Log Probit	8,0	2,7	2,4	0,8

4.3.5 Choix des facteurs d'incertitude

Variabilité inter-espèces

Pour tenir compte de la variabilité inter-espèces, un ajustement allométrique a été réalisé et a permis de calculer une HED (Human Equivalent Dose), à l'aide de l'équation précédente. Pour tenir compte de la variabilité toxicodynamique et d'incertitudes résiduelles, un facteur d'incertitude supplémentaire a été fixée à 2,5 selon les recommandations du document de référence pour « Construction d'une valeur toxicologique de référence pour les substances reprotoxiques » (Afsset 2007).

$$\text{UF}_A = 2,5$$

Variabilité intra-espèce

En l'absence de connaissance, sur l'existence de sous population sensible, une valeur finale de 10 par défaut a été choisie pour la variabilités intra-espèces (Afsset 2007):

$$UF_H = 10$$

4.3.6 Calcul de la VTR

Cette VTR est spécifique aux effets sur la fertilité, et est applicable pour une exposition chronique. Il n'a pas été mis en évidence d'effets sur le développement chez l'animal. En l'état actuel des connaissances, le groupe de travail n'a pas construit de VTR pour les effets sur le développement.

Tableau 19 : Conclusion sur la VTR reprotoxique à seuil sur la fertilité de l'acide dibromoacétique

Effet critique	Dose critique*	Facteur d'incertitude	VTR
Augmentation des altérations de la spermatogenèse chez le rat Sprague Dawley Etude de Christian <i>et al.</i> 2002	BMD _{5%} L _{90%} = 2,7 mg/kg p.c./j Ajustement allométrique BMD _{5%} L _{90%} HED * = 0,8 mg/kg p.c./j	UF 25 UF _A 2,5** UF _H 10	VTR = 30 µg/kg p.c./j

*HED, Human Equivalent Dose. Il a été calculé à partir de l'équation précédente.

**Afin de tenir compte de la variabilité toxicodynamique, un facteur d'incertitude UFA été fixé à 2,5.

5 Bibliographie

5.1 Acide dichloroacétique

CIRC, 2004. Some drinking-water disinfectants and contaminants, including arsenic. Monographies du CIRC sur l'évaluation des risques de cancérogénicité pour l'homme, vol 84 ; CIRC, Lyon.

Cornett *et al.*, 1999. Inhibition of glutathione S-transferase and tyrosine metabolism by dichloroacetate : A potential unifying mechanism for its altered biotransformation and toxicity. *Biochem. Res. Commun.*, 262 :752-756.

Curry, S.H., Chu, P.I., Baumgartner, T.G. et Stacpoole, P.W. (1985) Plasma concentrations and metabolic effects of intravenous sodium dichloroacetate. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 37: 89-93.

Epstein, D.L., Nolen, G.A., Randall, J.L., Christ, S.A., Read, E.J., Stober, J.A. et Smith, M.K 1992. Cardiopathic effects of dichloroacetate in the fetal Long-Evans rat. *Teratology*, 46(3) : 225-235.

Evans, O.B. 1982. Dichloroacetate tissue concentrations and its relationship to hypolactatemia and pyruvate dehydrogenase activation. *Biochem. Pharmacol.*, 31(19) : 3124-3126.

Fisher, J.W., Channel, S.R., Eggers, J.S., Johnson, P.D., MacMahon, K.L., Goodyear, C.D., Sudberry, G.L., Warren, D.A., Latendresse, J.R. et Graeter, L.J. 2001. Trichloroethylene, trichloroacetic acid, and dichloroacetic acid: do they affect fetal rat heart development? *Int. J. Toxicol.*, 20 : 257-267.

Forkert, P.G., Lash, L., Tardif, R., Tanphaichitr, N., Vandevort, C. et Moussa, M. 2003. Identification of trichloroethylene and its metabolites in human seminal fluid of workers exposed to trichloroethylene. *Drug Metab. Dispos.*, 31(3) : 306-311.

Gonzalez-Leon A *et al.*, 1997. Pharmacokinetics and metabolism of dichloroacetate in the F344 rat after prior administration in drinking water. *Toxicology and Applied Pharmacology* 146(2), 189-195.

Hunter ES *et al.*, 1996. Comparative effects of haloacetic acids in whole embryo culture. *Teratology* 54(2), 7-64.

Keys, D.A., Schultz, I.R., Mahle, D.A. et Fisher, J.W. 2004. A quantitative description of suicide inhibition of dichloroacetic acid in rats and mice. *Toxicol. Sci.*, 82 : 381-393.

Kim, H. et Weisel, C.P. 1998. Dermal absorption of dichloro- and trichloroacetic acids from chlorinated water. *J. Expos. Anal. Environ. Epidemiol.*, 8(4) : 555-575.

Koenig, G., Lohmar, E. et Rupprich, N. 2002. Chloroacetic acids. Dans : *Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry*. John Wiley & Sons, Inc. Disponible sur : http://www.mrw.interscience.wiley.com/ueic/articles/a06_537/sect2-fs.html.

Lin, E.L., Mattox J.K. et Daniel, F.B. 1993. Tissue distribution, excretion and urinary metabolites of dichloroacetic acid in the male Fischer 344 rat. *J. Toxicol. Environ. Health*, 38(1) : 19-32.

Linder RE *et al.*, Spermatotoxicity of dichloroacetic acid. *Reproductive Toxicology (Elmsford, N.Y.)* 1(5), 681-688.

Lukas, G., Vyas, K.H., Brindle, S.D., LeSher, A.R. et Wagner, W.E., Jr. 1980. Biological disposition of sodium dichloroacetate in animals and humans after intravenous administration. *J. Pharmacol. Sci.*, 69(4) : 419-421.

Martin JW *et al.*, 2003. Airborne haloacetic acids. *Environmental Science & Technology* 37(13), 2889-2897

Morris, E.D. et Bost, J.C. 2002. Acetic acid, halogenated derivatives. Dans : Kirk-Othmer encyclopedia of chemical technology. 5e éd. John Wiley & Sons, Inc. Disponible sur : http://www.mrw.interscience.wiley.com/kirk/articles/halomorr.a01/sect1_2-fs.html.

Rapport OMS, 2006 Guidelines for safe recreational waters Volume 2 - Swimming pools and similar recreational-water environments.

Smith MK *et al.*, 1992. Developmental toxicity of dichloroacetate in the rat. *Teratology* 46(3), 217-223.

Schultz, I.R., Merdink, J.L., Gonzalez-Leon, A. et Bull, R.J. 1999. Comparative toxicokinetics of chlorinated and brominated haloacetates in F344 rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 158(2) : 103-114.

Schultz IR *et al.*, 2002. Dichloroacetate toxicokinetics and disruption of tyrosine catabolism in B6C3F1 mice: dose-response relationships and age as a modifying factor. *Toxicology* 173(3), 229-247.

Stacpoole, P.W., Henderson, G.N., Yan, Z. et James, M.O. 1998a. Clinical pharmacology and toxicology of dichloroacetate. *Environ. Health Perspect.*, 106 (Suppl. 4) : 989-994.

Stacpoole, P.W., Henderson, G.N., Yan, Z., Cornett, R. et James, M.O. 1998b. Pharmacokinetics, metabolism, and toxicology of dichloroacetate. *Drug Metab. Rev.*, 30(30) : 499-539.

Tong, Z., Board, P.G. et Anders, M.W. 1998a. Glutathione transferase zeta-catalyzed biotransformation of dichloroacetic acid and other alpha-haloacids. *Chem. Res. Toxicol.*, 11 : 1332-1338.

Tong, Z., Board, P.G. et Anders, M.W. 1998b. Glutathione transferase zeta catalyzes the oxygenation of the carcinogen DCA to glyoxylic acid. *Biochem. J.*, 331(2) : 371-374.

Toth GP *et al.*, 1992. Adverse male reproductive effects following subchronic exposure of rats to sodium dichloroacetate. *Fundamental and Applied Toxicology: Official Journal of the Society of Toxicology* 19(1), 57-63.

USUSUS EPA (Environmental Protection Agency des États-Unis). 2003c. Toxicological review of dichloroacetic acid (CAS No. 79-43-6). In support of summary information on the Integrated Risk Information System (IRIS). EPA 635/R-03/007. National Center for Environmental Assessment, USUSUS EPA, Washington, DC. Août. Disponible sur : <http://www.epa.gov/iris/toxreviews/0654-tr.pdf>.

Warren DA *et al.*, 2006 Trichloroethylene, trichloroacetic acid, and dichloroacetic acid: do they affect eye development in the Sprague-Dawley rat? *International Journal of Toxicology* 25(4), 279- 284.

Xu, X., Mariano, T.M., Laskin, J.D. et Weisel, C.P. 2002. Percutaneous absorption of trihalomethanes, haloacetic acids, and halo ketones. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 184(1) : 19-26.

Communication personnelle d'un expert du GT « piscine », laboratoire LCME de Poitiers

Recommandations pour la qualité de l'eau potable au Canada : document technique. Les acides haloacétiques », préparé par le Comité fédéral-provincial-territorial sur l'eau potable du Comité fédéral-provincial-territorial sur la santé et l'environnement, Ottawa (Ontario), juillet 2008.

5.2 Acide trichloroacétique

Allen, B.C. et Fisher, J.W. 1993. Pharmacokinetic modeling of trichloroethylene and trichloroacetic acid in humans. *Risk Anal.*, 13(1) : 71-86.

Ashford, R.D. 1994. Ashford's dictionary of industrial chemicals. Wavelength Publications Ltd., Londres, Royaume-Uni.

Bader, E.L., Hrudey, S.E. et Froese, K.L. 2005. Urinary excretion half life of trichloroacetic acid as a biomarker of exposure to chlorinated drinking water disinfection by-products. *Occup. Environ. Med.*, 61 : 715-716.

- Bull, R.J. 2000. Mode of action of liver tumor induction by trichloroethylene and its metabolites, trichloroacetate and dichloroacetate. *Environ. Health Perspect.*, 108 (Suppl. 2) : 241-259.
- CHEMINFO, 2003 d. Trichloroacetic acid solutions. No CAS 76-03-9. Registre no 766, volume 80. Profils chimiques établis par le Centre canadien d'hygiène et de sécurité au travail, Hamilton, Ontario.
- CHEMINFO. 2003 e. Trichloroacetic acid solid. No CAS 76-03-9. Registre no 539, volume 80. Profils chimiques établis par le Centre canadien d'hygiène et de sécurité au travail, Hamilton, Ontario.
- Fisher, J.W., Channel, S.R., Eggers, J.S., Johnson, P.D., MacMahon, K.L., Goodyear, C.D., Sudberry, G.L., Warren, D.A., Latendresse, J.R. et Graeter, L.J. 2001. Trichloroethylene, trichloroacetic acid, and dichloroacetic acid: do they affect fetal rat heart development? *Int. J. Toxicol.*, 20 : 257-267
- Grant, W.M. et Schuman, J.S. 1993. *Toxicology of the eye: effects on the eyes and visual system from chemicals, drugs, metals and minerals, plants, toxins and venoms*. 4e éd. C.C. Thomas, Springfield, IL. p. 993.
- Heithersay, G.S. et Wilson, D.F. 1988. Tissue responses in the rat to trichloroacetic acid – an agent used in the treatment of invasive cervical resorption. *Aust. Dental J.*, 33(6): 451-461.
- Johnson PD, Dawson, BV, Goldberg, SJ 1998. Cardiac teratogenicity of trichloroethylenemetabolites. *Journal of the American College of Cardiology* 32(2), 540-545.
- Hunter ES et al., 1996. Comparative effects of haloacetic acids in whole embryo culture. *Teratology* 54(2), 7-64.
- Kim, H. et Weisel, C.P. 1998. Dermal absorption of dichloro- and trichloroacetic acids from chlorinated water. *J. Expos. Anal. Environ. Epidemiol.*, 8(4) : 555-575
- Koenig, G., Lohmar, E. et Rupprich, N. 2002. Chloroacetic acids. Dans : *Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry*. John Wiley & Sons, Inc. Disponible sur : http://www.mrw.interscience.wiley.com/ueic/articles/a06_537/sect2-fs.html.
- Larson, J.L. et Bull, R.J. 1992. Metabolism and lipoperoxidative activity of trichloroacetate and dichloroacetate in rats and mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 115 : 268-277.
- Lewis, R.J., Sr. (dir.). 2001. *Hawley's condensed chemical dictionary*. 14e éd. John Wiley & Sons, Inc., New York, NY. p. 251, 361, 1124.
- Lewinstein, I. et Rotstein, I. 1992. Effect of trichloroacetic acid on the microhardness and surface morphology of human dentin and enamel. *Endodont. Dent. Traumatol.*, 8 : 16-20.
- Lide, D.R. (dir.). 2003-2004. *CRC handbook of chemistry and physics*. 84e éd. CRC Press Inc., Boca Raton, FL.
- Lumpkin, M.H., Bruckner, J.V., Campbell, J.L., Dallas, C.E., White, C.A. et Fisher, J.W. 2003. Plasma binding of trichloroacetic acid in mice, rats, and humans under cancer bioassay and environmental exposure conditions. *Drug Metab. Dispos.*, 31(10): 1203-1207.
- Martin JW et al., 2003. Airborne haloacetic acids. *Environmental Science & Technology* 37(13), 2889-2897.
- Meister, R.T. (dir.). 2002. *Farm chemicals handbook*. Vol. 88. Meister Publishing Co., Willoughby, OH. p. C-380.
- Muller, G., Spassovski, M. et Henschler, D. 1974. Metabolism of trichloroethylene in man. II. Pharmacokinetics of metabolites. *Arch. Toxicol.*, 32 : 283-295.
- Global Nest: *Int. J.*, 1(3) : 143-156.
- NTP (National Toxicology Program). 2003a. Dichloroacetic acid (sommaire). Clinical Evaluation Committee -

Rapport préliminaire soumis par Arthur D. Little, Inc. NTP, National Institutes of Health, Public Health Service, USUSUS Department of Health and Human Services. Disponible sur :

<http://ntp.niehs.nih.gov/index.cfm?objectid=03DADAD8-DFB8-5274-3E46A0CEA167B37D>.

Rapport OMS, 2006 Guidelines for safe recreational waters Volume 2 - Swimming pools and similar recreational-water environments.

Schultz, I.R., Merdink, J.L., Gonzalez-Leon, A. et Bull, R.J. 1999. Comparative toxicokinetics of chlorinated and brominated haloacetates in F344 rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 158(2): 103-114.

Smith MK et al., 1989. Teratogenic activity of trichloroacetic acid in the rat. *Teratology* 40(5), 445-451.

Templin, M.V., Parker, J.C. et Bull, R.J. 1993. Relative formation of dichloroacetate and trichloroacetate from trichloroethylene in male B6C3F1 mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 123 : 1-8.

Verschueren, K. 2001. Handbook of environmental data on organic chemicals. 4e éd. John Wiley & Sons, Inc., New York, NY.

Volkel, W., Friedewald, M., Lederer, E., Pahler, A., Parker, J. et Dekant, W. 1998. Biotransformation of perchloroethene: Dose-dependent excretion of trichloroacetic acid, dichloroacetic acid, and N-acetyl-S-(trichlorovinyl)-L-cysteine in rats and humans after inhalation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 153 : 20-27.

Warren DA et al., Trichloroethylene, trichloroacetic acid, and dichloroacetic acid: do they affect eye development in the Sprague-Dawley rat? *International Journal of Toxicology* 25(4), 279-284.

Weast, R.C. (dir.). 1973. Handbook of chemistry and physics. 54e éd. CRC Press Inc., Cleveland, OH.

Xu, X., Mariano, T.M., Laskin, J.D. et Weisel, C.P. 2002. Percutaneous absorption of trihalomethanes, haloacetic acids, and halo ketones. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 184(1) : 19-26.

Yu, K.O., Barton, H.A., Mahle, D.A. et Frazier, J.M. 2000. In vivo kinetics of trichloroacetate in male Fischer 344 rats. *Toxicol. Sci.*, 54 : 302-311.

Communication personnelle d'un expert du GT « piscine », laboratoire LCME de Poitiers.

Recommandations pour la qualité de l'eau potable au Canada : document technique. Les acides haloacétiques », préparé par le Comité fédéral-provincial-territorial sur l'eau potable du Comité fédéral-provincial-territorial sur la santé et l'environnement, Ottawa (Ontario), juillet 2008.

5.3 Acide dibromoacétique

Bodensteiner KJ *et al.*, 2004. Chronic exposure to dibromoacetic acid, a water disinfection byproduct, diminishes primordial follicle populations in the rabbit. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology* 80(1), 83-91.

Christian MS *et al.*, 2001. Oral (drinking water) two-generation reproductive toxicity study of dibromoacetic acid (DBA) in rats. *International Journal of Toxicology* 21(4), 237-276.

Christian MS *et al.*, 2001. Biodisposition of dibromoacetic acid (DBA) and bromodichloromethane (BDCM) administered to rats and rabbits in drinking water during range-finding reproduction and developmental toxicity studies. *International Journal of Toxicology* 20(4), 239-253.

Czyba JC, Montella A, 1993. *Biologie de la reproduction humaine*, 305p.

Cummings A.M, Hedge, JM, 1998. Dibromoacetic acid does not adversely affect early pregnancy in rats. *Reproductive Toxicology* (Elmsford, N.Y.) 12(4), 445-448.

Goldman JM *et al.*, 2007. Moderating influence of the drinking water disinfection by-product dibromoacetic acid on a dithiocarbamate-induced suppression of the luteinizing hormone surge in female rats. *Reproductive Toxicology* (Elmsford, N.Y.) 23(4), 541-549.

Holmes M *et al.*, 2001. Dibromoacetic acid, a prevalent by-product of drinking water disinfection, compromises the synthesis of specific seminiferous tubule proteins following both in vivo and in vitro exposures. *Journal of Andrology* 22(5), 878-890.

Kim, H. et Weisel, C.P. 1998. Dermal absorption of dichloro- and trichloroacetic acids from chlorinated water. *J.Expos. Anal. Environ. Epidemiol.*, 8(4) : 555-575.

Klinefelter, G.R., Strader, L., Suarez, J., Roberts, N., Holmes, M. et Mole, L. 2000. Dibromoacetic acid, a drinking water disinfection-by-product, alters male reproductive development and fertility. *Biol. Reprod.*, 62 (Suppl. 1) : 285 (abrégé).

Lide, D.R. (dir.). 2003-2004. *CRC handbook of chemistry and physics*. 84e éd. CRC Press Inc., Boca Raton, FL.

Linder RE *et al.*, 1997. Histopathologic changes in the testes of rats exposed to dibromoacetic acid. *Reproductive Toxicology* (Elmsford, N.Y.) 11(1), 47-56.

Linder RE *et al.*, 1997. Spermatotoxicity of dibromoacetic acid in rats after 14 daily exposures. *Reproductive Toxicology* (Elmsford, N.Y.) 8(3), 251-259.

Linder RE *et al.*, 1994. Acute spermatogenic effects of bromoacetic acids. *Fundamental and Applied Toxicology: Official Journal of the Society of Toxicology* 22(3), 422-430.

Linder RE *et al.*, 1995. Dibromoacetic acid affects reproductive competence and sperm quality in the male rat. *Fundamental and Applied Toxicology: Official Journal of the Society of Toxicology* 28(1), 9-17.

Martin JW *et al.*, 2003. Airborne haloacetic acids. *Environmental Science & Technology* 37(13), 2889-2897

NIOSH (National Institute for Occupational Safety and Health). 1990. Données provisoires non publiées, à partir du 7/1/90. National Occupational Exposure Survey (1981-83). NIOSH. Cincinnati, OH [cité dans OMS, 2004c].

NTP (National Toxicology Program). 1999b. Final range-finding report. Immunotoxicity of dibromoacetic acid in female B6C3F1 mice. Rapport final soumis au NTP par K.L. White et J.A. Munson, Medical College of Virginia [cité dans USUSUS EPA, 2005a].

OMS (Organisation mondiale de la santé). 2004c. Brominated acetic acids in drinking water. WHO/SDE/WSH/03.04/79. OMS, Genève. Disponible sur : http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/brominatedaceticacids.pdf.

PISC (Programme international sur la sécurité des substances chimiques). 2000. Disinfectants and disinfectant byproducts. Critère d'hygiène de l'environnement 216. Organisation mondiale de la santé, Genève.

Rapport OMS, 2006. Guidelines for safe recreational waters Volume 2 - Swimming pools and similar recreational-water environments.

Schultz, I.R., Merdink, J.L., Gonzalez-Leon, A. et Bull, R.J. 1999. Comparative toxicokinetics of chlorinated and brominated haloacetates in F344 rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 158(2) : 103-114.

Tsuchiya T *et al.*, 2000. Collaborative work to evaluate toxicity on male reproductive organs by repeated dose studies in rats 25). Effects of 2- and 4- week repeated-dosing of dibromoacetic acid. *The Journal of Toxicological Sciences* 25 Spec No, 241-249.

Tong, Z., Board, P.G. et Anders, M.W. 1998a. Glutathione transferase zeta-catalyzed biotransformation of dichloroacetic acid and other alpha-haloacids. *Chem. Res. Toxicol.*, 11 : 1332-1338.

USUSUS EPA (Environmental Protection Agency des États-Unis). 2005a. Drinking water criteria document: Brominated acetic acids. No de document EPA-822-R-05-007. Office of Science and Technology, Office of Water, USUSUS EPA, Washington, DC, novembre.

Xu, X., Mariano, T.M., Laskin, J.D. et Weisel, C.P. 2002. Percutaneous absorption of trihalomethanes, haloacetic acids, and haloketones. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 184(1): 19-26.

Communication personnelle d'un expert du GT « piscine », laboratoire LCME de Poitiers.

Recommandations pour la qualité de l'eau potable au Canada : document technique. Les acides haloacétiques », préparé par le Comité fédéral-provincial-territorial sur l'eau potable du Comité fédéral-provincial-territorial sur la santé et l'environnement, Ottawa (Ontario), juillet 2008.

ANNEXES

Annexe 1 : Synthèse des déclarations publiques d'intérêts des experts par rapport au champ de la saisine

Cette partie présente une synthèse des liens déclarés par les experts, dans le domaine sur lequel se porte la saisine, et précise d'une part comment ces liens ont été analysés et d'autre part la manière dont ils ont été gérés, eu égard à un risque potentiel de conflit d'intérêts.

Les déclarations publiques d'intérêts sont mises à jour par les experts à chaque changement de situation.

Au cours des expertises, les liens d'intérêts sont réexaminés au vu de l'ordre du jour.

RAPPEL DES RUBRIQUES DE LA DÉCLARATION PUBLIQUE D'INTÉRÊTS

IP-A	Interventions ponctuelles : autres
IP-AC	Interventions ponctuelles : activités de conseil
IP-CC	Interventions ponctuelles : conférences, colloques, actions de formation
IP-RE	Interventions ponctuelles : rapports d'expertise
IP-SC	Interventions ponctuelles : travaux scientifiques, essais, etc.
LD	Liens durables ou permanents (Contrat de travail, rémunération régulière ...)
PF	Participation financière dans le capital d'une entreprise
SR	Autres liens sans rémunération ponctuelle (Parents salariés dans des entreprises visées précédemment)
SR-A	Autres liens sans rémunération ponctuelle (Participation à conseils d'administration, scientifiques d'une firme, société ou organisme professionnel)
VB	Activités donnant lieu à un versement au budget d'un organisme

SYNTHÈSE DES LIENS DES MEMBRES DU CES, MENTIONNÉS DANS LA DECLARATION PUBLIC D'INTERET, EN RAPPORT AVEC LA THEMATIQUE DE LA SAISINE

NOM	Prénom <i>Rubrique de la DPI</i> Description de l'intérêt <i>en cas de lien déclaré</i>	Date de déclaration des intérêts
Analyse Agence :		

BADOT	Pierre-Marie	29 novembre 2007 03 novembre 2008 16 février 2009
Analyse Afsset :	Aucun lien déclaré /	

BEAUSOLEIL Claire		20 septembre 2007 04 mars 2009
Analyse Afsset : /	Aucun lien déclaré	Démission octobre 2009
BELZUNCES Luc		19 avril 2008
Analyse Afsset : Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la thématique de la saisine	VB Étude du mode d'action de l'acétamipride financée par Aventis donnant lieu à versement à l'organisme d'appartenance (INRA) (10 % du budget du laboratoire) (2001-2003)	
CÉZARD Christine		19 décembre 2006
Analyse Afsset : /		
DESLAURIERS Michel		26 juin 2007
Analyse Afsset : Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la thématique de la saisine	LD Médecin du travail au sein d'EDF-GDF	
EMPEREUR-BISSONNET Pascal		15 avril 2008
Analyse Afsset : /	Aucun lien déclaré	
ENRIQUEZ Brigitte		20 septembre 2007
Analyse Afsset : /	Aucun lien déclaré	
FARDEL Olivier		26 juin 2007
Analyse Afsset : Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la thématique de la saisine	VB Collaboration scientifique avec EDF-SEM (Service des études médicales) donnant lieu à versement à l'organisme d'appartenance (Université de Rennes I) (6 % du budget du laboratoire) (2007-2009)	
FÉNET Hélène		20 septembre 2007
Analyse Afsset : /	Aucun lien déclaré	
FERRARI Luc		11 octobre 2007
Analyse Afsset : /	Aucun lien déclaré	
FONTANA Luc		20 juin 2008

	Aucun lien déclaré	
Analyse Afsset :	/	
FOUILHÉ SAM-LAÏ	Nathalie	20 septembre 2007
Analyse Afsset :	Aucun lien déclaré /	
GOUGET	Barbara	08 février 2008
Analyse Afsset :	Aucun lien déclaré /	Démission en juillet 2009
GUENOT	Dominique	20 septembre 2007
Analyse Afsset :	Aucun lien déclaré /	
GUERBET	Michel	26 juin 2007
Analyse Afsset :	Aucun lien déclaré /	
HUYNH	Cong Khanh	20 septembre 2007
Analyse Afsset :	Aucun lien déclaré /	
LAFON	Dominique	14 avril 2008
	LD	
	Médecin du travail pour Dassault Falcon Service	
Analyse Afsset :	Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la thématique de la saisine	
LALÈRE	Béatrice	26 juin 2007
Analyse Afsset :	Aucun lien déclaré /	
LAUDET	Annie	20 septembre 2007
Analyse Afsset :	Aucun lien déclaré /	
LEPOITTEVIN	Jean-Pierre	26 septembre 2008
	IP-SC	
	Financement de thèses par L'Oréal jusqu'en 2006, par le COLIPA (The European Cosmetic Toiletry and Perfumery Association) jusqu'en 2007 et par Firmenich jusqu'en 2009 au bénéfice de l'organisme d'appartenance (Université de Strasbourg I)	
	Contrat en préparation avec le COLIPA au bénéfice de l'organisme d'appartenance (Université de Strasbourg I)	
	IP-AC	
	Conseil Sécurité produits chez L'Oréal donnant lieu à versement à l'organisme d'appartenance (Université)	

	de Strasbourg I)	
Analyse Afsset :	Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la thématique de la saisine	
MACHEREY	Anne-Christine	26 juin 2007
Analyse Afsset :	Aucun lien déclaré /	
MÉNÉTRIER	Florence	22 avril 2008
Analyse Afsset :	Aucun lien déclaré /	
PFOHL-LESZKOWICZ	Annie	12 avril 2008
Analyse Afsset :	Aucun lien déclaré /	
PICART	Daniel	26 septembre 2007
Analyse Afsset :	Aucun lien déclaré /	
ROUDOT	Alain-Claude	26 mars 2008
Analyse Afsset :	Aucun lien déclaré /	
SECRETAN	Béatrice	27 juin 2008
Analyse Afsset :	Aucun lien déclaré /	
STEENHOUT	Anne IP-CC Évaluation de projets pour Ecetoc (2002) donnant lieu à versement à l'organisme d'appartenance (Université Libre de Bruxelles - ULB) VB Participation à un programme de recherche « Méthodologie générale » financé par le CEFIC (European Chemical Industry Council) sur l'exposition des consommateurs, donnant lieu à versement à l'organisme d'appartenance (Université Libre de Bruxelles - ULB)	20 février 2008
Analyse Afsset :	Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la thématique de la saisine	
TARDIF	Robert	23 janvier 2008
Analyse Afsset :	Aucun lien déclaré /	
THYBAUD	Éric	04 juillet 2008 25 septembre 2008 18 novembre 2008
Analyse Afsset :	/	

SYNTHÈSE DES LIENS DES MEMBRES DU GT, MENTIONNÉS DANS LA DECLARATION PUBLIC D'INTERET, EN RAPPORT AVEC LA THEMATIQUE DE LA SAISINE

NOM	Prénom <i>Rubrique de la DPI</i> Description de l'intérêt	Date de déclaration des intérêts
Analyse Afsset :		
BOIZE	Magali <i>LD</i> Pharmacien évaluateur de risques sanitaires au sein d'EDF-SEM (Service des études médicales)	17 avril 2008 17 juillet 2008 25 novembre 2008 26 février 2009 Démission en mars 2011
Analyse Afsset :	Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la thématique de la saisine	
CHAKROUN	Radhouane Aucun lien déclaré	28 mai 2008
Analyse Afsset :	/	
CHEVALIER	Dany Aucun lien déclaré	11 avril 2008 05 novembre 2008 21 novembre 2008 29 janvier 2009
Analyse Afsset :	/	
DOR	Frédéric <i>IP-AC</i> Membre du Conseil scientifique d'ADP (Aéroports de Paris) depuis 2006	29 mai 2008
Analyse Afsset :	Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la thématique de la saisine	
EL GHISSASSI	Fatiha Aucun lien déclaré	18 avril 2008
Analyse Afsset :	/	
FALCY	Michel (membre du CES « Expertise en vue de la fixation de valeurs limites d'exposition à des agents chimiques en milieu professionnel »)	15 avril 2008
Analyse Afsset :	Aucun lien déclaré /	
GIRAULT	Sébastien	05 mai 2008

	LD Chef du Service de Toxicologie de Cephalon France	
Analyse Afsset :	Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la thématique de la saisine	
KAIRO	Cécile	03 mai 2008
	LD Évaluateur de risques sanitaires au sein d'ICF Environnement jusqu'en 2004	
Analyse Afsset :	Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la thématique de la saisine	
LA ROCCA	Bénédicte	14 avril 2008
	LD Ingénieur toxicologue à l'INERIS (jusqu'en juillet 2010)	Démission en mars 2011
Analyse Afsset :	Aucun lien déclaré	
LAFON	Dominique (membre du CES « Évaluation des risques liés aux substances chimiques »)	14 avril 2008
	LD Médecin du travail pour Dassault Falcon Service	
Analyse Afsset :	Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la thématique de la saisine	
MAXIMILIEN	Rémi	14 avril 2008 22 septembre 2008
	Aucun lien déclaré	
Analyse Afsset :	/	
MEEK	Bette	14 mai 2008
	Aucun lien déclaré	
Analyse Afsset :	/	
MULLOT	Jean-Ulrich	05 avril 2008 07 janvier 2009
	Aucun lien déclaré	
Analyse Afsset :	/	
OULD-ELHKIM	Mostafa	26 mai 2008 26 septembre 2008
	Aucun lien déclaré	
Analyse Afsset :	/	
ROUDOT	Alain-Claude (membre du CES « Évaluation des risques liés aux substances chimiques »)	26 mars 2008

	Aucun lien déclaré	
Analyse Afsset :	/	
TISSOT Sylvie		05 mai 2008 Démission en mars 2011
LD		
	Responsable de l'unité expertise collective des substances chimiques à l'INERIS	
Analyse Afsset :	Aucun lien déclaré	
VIAN Laurence		14 avril 2008 Démission avril en 2010
	Aucun lien déclaré	
Analyse Afsset :	/	

Annexe 2 : Grille d'analyse critique d'études toxicologiques pour le DCA

Référence	Toth <i>et al.</i> , 1992 –Fundamental and Applied Toxicology
Type d'étude (1G, 2G, prénatale...)	Effets nocifs du DCA sur la reproduction chez le rat mâle par exposition subchronique au dichloroacétate de sodium <u>But de l'étude</u> : évaluer la toxicité du DCA sur la reproduction du mâle (histopathologie dans les testicules et épидидymes) à des concentrations plus basses que celles causant des effets nocifs sur la reproduction du mâle.
Respect BPL – lignes directrices	BPL
Substances chimiques, pureté, composition	Sigma Chemical Co
Espèce / souche étudiée / âge – poids	Rat Long-Evans, mâles (100 j), femelles (70 j) Nourriture : Purina Lab Chow 5001 et eau purifiée et filtrée du robinet <i>ad libitum</i> , T°C : 25°C, humidité : 55%, cycle lumineux : 12 H
Conditions de vie	Cage individuelle pour les mâles deux semaines avant le traitement
Sexe et nombre d'animaux par lot	Mâles ,18-19 par groupe de doses
Groupe témoin et nombre	groupe témoin pour une dose de 0 avec N =19 rats
Pré-exposition éventuelle	non
Voie d'exposition	Orale, gavage
Fréquence et durée de l'exposition	10 semaines
Doses ou concentrations d'expositions	0, 31.25, 62.5, 125 mg/kg/j
Observations de l'étude	Effets sur les organes et le sperme à 31.25 et 62.5 mg/kg/j Effets sur les testicules à 1250mg/kg/j
Observations à propos du DCA en exposition chronique	Polyneuropathie et dommages testiculaires (dégénération)
Tests statistiques utilisés	- Analyse de la variance pour : le poids de l'animal et celui des organes, de la sperm motion, sperme et spermatides counts, associé à une pairwise contrasts permettant de comparer les doses individuelles au groupe contrôle. Test Wilcoxon pour : - % de sperme altéré point de vue morphologie - Mesurer le succès d'implantation et le nombre d'implants par femelle
Effets observés – reprotoxicité	<u>A 31.25 mg/kg/j</u> : - réduction des glandes préputiales et du poids des épидидymes <u>A 62.5 mg/kg/j</u> : - réduction du poids total et du foie - diminution du nombre du sperme - morphologie du sperme altérée - diminution du % de sperme normal, - réduction de la motilité du sperme, de sa vitesse, de sa linéarité <u>A 125 mg/kg/j</u> : - réduction du poids des organes

	<ul style="list-style-type: none">- spermiation inhibée dans les testicules- diminution du nombre d'implants par femelle- augmentation de têtes malformées
Effet critique pris en compte	réduction des glandes préputiales et du poids des épидидymes
Couple NOAEL / LOAEL pour l'effet critique et incidence du LOAEL	LOAEL : 31,25, Pas de NOAEL
Qualité de l'étude (cotation Klimisch)	(suivi des lignes directrices de l'OCDE ?)

Référence	Linder <i>et al.</i> , 1997 –Reproductive Toxicology
Type d'étude (1G, 2G, prénatale...)	Etude de la spermatotoxicité précoce du DCA
But de l'étude	Comparer les similitudes d'effets (spermatotoxicité) entre le DCA et le DBA.
Respect BPL – lignes directrices	
Substances chimiques, pureté, composition	Pureté de 99% -> dissous puis ajusté
Espèce / souche étudiée / âge – poids	Pour les doses uniques : Rats <i>Sprague-Dawley</i> , âge 104 jours (rats âgés) Pour les doses répétées : Rats <i>Sprague-Dawley</i> , âge 105 jours
Conditions de vie	2 par cage, cycle lumineux : 12H, T°C : 22 ° C +/-1, humidité : 50+/- 10%
Sexe et nombre d'animaux par lot	Pour les doses uniques : Mâles, 9 groupes de 8 rats Pour les doses répétées : Mâles, 9 groupes de 6 rats et 6 groupes de 8 rats
Groupe témoin et nombre	groupe de 6 à 8 rats
Pré-exposition éventuelle	non
Voie d'exposition	Orale, gavage
Fréquence et durée de l'exposition	2, 5, 9 et 14 jours
Doses ou concentrations d'expositions	DCA : Doses uniques : 0 (contrôle : eau), 1500, 3000 mg/kg/j Doses répétées : 0 (contrôle : eau), 18, 54, 160, 480, 1440 mg/kg/j ----- DBA : (early study) Doses répétées 30, 90, 270 mg/kg/j
Comparaison du DBA et du DCA	Même effet mais à des degrés différents (le DCA est moins sévère 3 fois moins) Le DCA induit comme le DBA des lésions testiculaires (<i>greater potency as the duration of dosing increases</i>)
Tests statistiques utilisés	- Analyse statistique par le SAS (Statistical Analysis System) - Procédure PROC GLM : pour les points finaux - Analyse de la covariance : pour le poids des organes - One-way ANOVA pour les mesures du sperme - T test pour comparer les groupes traités et leur contrôle, p value < 0,05
Effets observés – reprotoxicité – pour les doses uniques	- A 1500 mg/k/j : → augmentation du nombre du sperme pour une exposition de 28 jours → Changement histologique des testicules et diminution de la qualité du sperme - A 3000 mg/kg/j : → augmentation du poids des testicules pour une exposition de 28 jours
Effets observés – reprotoxique- pour les doses répétées	- à 160 mg/kg/j Altération de la morphologie du sperme » <i>epididymal</i> » - A 480 mg/kg/j : - Diminution du % de sperme « caudal et caput » normal - Diminution de la motilité du sperme, de sa progression et de sa vitesse A 1440 mg /kg/j : - Diminution du poids - Présence de corps résiduels atypiques au stade IX et X
Conclusions sur les effets observés	Effets sur le système reproductif mâle , avec des effets plus sévères pour une exposition de doses répétées que pour une exposition de doses uniques : - Altération de la spermiation (rétention de spermatides mûres, formation de corps atypiques résiduels et résorption du cytoplasme) :

	<ul style="list-style-type: none">- Altération de la morphologie du sperme (<i>epididymal</i>) (160 mg/kg/j)- Diminution de la motilité du sperme
Effet critique pris en compte	Spermatotoxicité : morphologie anormale du sperme (J9)
Couple NOAEL / LOAEL pour l'effet critique et incidence du LOAEL	LOAEL : 160mg/kg/j NOAEL : 54 mg/kg/j
Qualité de l'étude (cotation Klimisch)	(suivi des lignes directrices de l'OCDE ?)

Référence	Sidney <i>et al.</i> , 1991 –Teratology
Type d'étude (1G, 2G, prénatale...)	Comparaison des effets des HAA dans des cultures embryonnaire « <i>in vitro</i> » → pour évaluer les effets des AHAs sur le développement
Respect BPL – lignes directrices	
Substances chimiques, pureté, composition	De Sigma Chemicals
Espèce / souche étudiée / âge - poids	souris CD-1, cycle lumineux 14H10 à 22H, Purina rodent chow et eau filtrée <i>ad libitum</i>
Conditions de vie	Femelles : 3 à 5 par cage, mâles en cage individuelle Accouplement → GD 9 : femelles gravides sont tuées
Sexe et nombre d'animaux par lot	356 « conceptuses » ?
Groupe témoin et nombre	Cellules...
Pré-exposition éventuelle	non
Fréquence et durée de l'exposition	9 jours ?
Doses ou concentrations d'expositions	TCA : 500, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000 µM DCA : 0, 734, 1468, 4403, 5871, 7339, 11010, 14680 µM MCA : 0, 50, 100, 175, 250, 350, 500 µM
Observations	<u>A 24 H : Dysmorphogénèse</u> - effet sur le tube neural (hypoplasie proencéphalique) → fermeture anormale ou hypoplasie - malformations optiques, du cœur, et du pharynx (développement optique affecté, malformation pharyngée, perturbation dans le développement du cœur) - BMDL _{95%} calculé pour des augmentations de défauts des tubes neuraux (pris car cet effet apparaît comme le plus sensible) Potentiel croissant : DCA<TCA<DBA<MCA<MBA - <i>In vivo</i> : TCA et DCA : affecte le développement mais sont les moins toxiques <i>in vitro</i> - Les dérivés bromo sont les plus puissants, les mono>di> tri -HAAS
Tests statistiques utilisés	t-test Fisher Exact : permet la comparaison entre l'incidence des effets sur le tube neural et les contrôles Le nombre de « somite pairs » est comparé par un analyse de variance + suivi d'un test de comparaison multiple Tukey-Kramer Pour comparer la toxicité de chaque substance, une Benchmark concentration est calculée pour les effets des AHAs sur le tube neural (forme généralisée d'un modèle logistique) avec un intervalle de confiance de 95 % pour la concentration (BMDL _{95%})
Influence pH	Sur la part d'acides ionisés et non ionisés + pH moyen (augmenté) + passage embryonnaire → ++effets - Si pH < 7,5 → développement normal et croissance normale - Si pH = 7 → 24 % de développement anormal avec non fermeture du tube neural
Effets observés – reprotoxicité	Effets sur le développement : - Développement anormal des yeux, du cœur et du pharynx TCA : A 2000 → défaut du tube neural, nombre de somites diminués A 3000 → défaut des yeux, de l'arche pharyngée et du coeur

	<p>A 4000 → dysmorphologie des somites</p> <p><u>DCA :</u> A 1468 → nombre de somites diminués A 5871 → défaut du tube neural A 7339 → défaut de l'arche pharyngée, et du cœur A 11010 → défaut « rotational » et dysmorphologie des somites A 14980 → défaut des yeux</p> <p><u>MCA :</u> A 175 µM → défaut du tube neural, diminution des somites A 250 µM → défaut de l'arche pharyngée et du coeur</p>
Effet critique pris en compte	défaut du tube neural (effet le plus sensible)
Couple NOAEL / LOAEL pour l'effet critique et incidence du LOAEL	<p><u>TCA :</u> LOAEL : 2000 µM, NOAEL : 1000 µM</p> <p><u>DCA :</u> LOAEL : 5871 µM, NOAEL : 1468 µM</p> <p><u>MCA :</u> LOAEL : 175 µM, NOAEL : 100 µM</p>
Qualité de l'étude (cotation Klimisch)	(suivi des lignes directrices de l'OCDE ?)

Référence	Smith <i>et al.</i> , 1992 –Teratology
Type d'étude (1G, 2G, prénatale...)	Toxicité sur le développement chez le rat (progéniture) exposé au DCA 1 Génération 2 études→ avec des doses différentes
Respect BPL – lignes directrices	oui
Substances chimiques, pureté, composition	Forme : sodium dichloroacetate, pureté : > 99 %--> dissous et ajustée
Espèce / souche étudiée / âge - poids	rats Long-Evans, femelles gravides
Conditions de vie	Nourriture : Purina Rodent Laboratory chow, eau distillée, <i>Ad libitum</i> 3 par cage T°C : 70-74°F, humidité : 40-60%, cycle lumineux : 12 H
Sexe et nombre d'animaux par lot	Groupe de 20 rats pour chaque étude et pour chaque dose
Groupe témoin et nombre	Véhicule contrôle : eau distillée
Voie d'exposition	Orale « intubation » : gavage
Pré-exposition éventuelle	non
Fréquence et durée de l'exposition	Sur la période de gestation de JG 6-15
Doses ou concentrations d'expositions	Etude 1: 0, 900, 1400, 1900, 2400 mg/kg/j Etude 2 : 0, 14, 140, 400 mg/kg/j → Justifier les deux groupes de doses
Observations	A 14 mg/kg/j : on observe une diminution significative du poids des mères mais pas d'anomalies cardiaques LOAEL mère : 14 mg/kg/j Pas de NOAEL pour les mères
Tests statistiques utilisés	- Test ANOVA : analyse de la variance : poids maternel, poids des organes, poids fœtal et taille, taille de la progéniture - Test Winer : Différence entre contrôles et groupes : - Dose-réponse significative testée par une régression linéaire - Z-test : proportion de mort maternelle et de grossesse - Test Kruskal-Wallis : poids des organes, taille des progénitures, sex-ratios, pourcentage de résorption et fœtus avec anomalies + test Mann-Whitney pour comparer chaque traitement avec son contrôle
Effets observés – reprotoxicité Chez la mère	<u>Chez les mères :</u> - Poids diminué - Poids du foie, rate, reins sont augmentés - Le pourcentage d'implants résorbés pour la progéniture est élevé à 900 mg/kg/j Etude 1 : <u>à 900 mg/kg/j (étude 1) :</u> - diminution des grossesses (taux de grossesse plus bas mais non liés au traitement) - augmentation des post-implantations - Mort chez les femelles gravides Etudes 1 ET 2 : - à 140 - 400mg/kg/j (étude 2) à 900 mg/kg/j (étude1): diminution du gain de poids maternel (avec un LOAEL : 14 mg/kg/j) Etude 2 : - Augmentation du poids de certains organes des mères : des reins (400mg/kg/j), de la rate (400 mg/kg/j), et du foie (14 mg/kg/j)→ exprimé pour « 100g adjusted weight at sacrifice », augmentation significative et relative par rapport au poids du

	corps.
Effets observés – reprotoxicité Chez le foetus	<p>Chez les foetus :</p> <ul style="list-style-type: none"> - à 140 mg/kg/j réductions du poids et de la longueur - malformations des tissus mous à 140 mg/kg/j → ++ système cardiovasculaire (aorte ascendante et ventricule droit) <p>Etude 1 : à 900 mg/kg/ j (étude 1) :</p> <ul style="list-style-type: none"> - augmentation du poids du foie, de la rate et des reins - diminution du poids des foetus (F et M) et diminution de « fetal crown-rump length » - malformations urogénitales et orbitales <p>à 2400 mg/kg/j :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Plus forte survie à l'exposition pour les foetus M//F - diminution de vie des foetus <p>Etudes 1 ET 2 :</p> <ul style="list-style-type: none"> - à 900 mg/kg/j (étude 1) et à 140 mg/kg/j (étude 2) : diminution du poids durant la G→ F ou M ? <p>Etude 2 : à 140 mg/kg/j :</p> <ul style="list-style-type: none"> - diminution du poids des foetus (F et M) - diminution de « fetal crown-rump length » (14 mg/kg/j) <p>à 400 mg/kg/j : malformations fœtales cardiaques</p>
Effet critique pris en compte	<ul style="list-style-type: none"> - Développement toxique → embryotoxique - mort fœtale, retard de croissance - malformations cardiaques (++ système cardiovasculaire (aorte ascendante et ventricule droit)
Couple NOAEL / LOAEL pour l'effet critique et incidence du LOAEL	<p>NOAEL : 14 mg/kg/j LOAEL : 140 mg/kg/j</p>
Qualité de l'étude (cotation Klimisch)	(suivi des lignes directrices de l'OCDE ?)

Référence	Epstein <i>et al.</i> , 1992 –Teratology
Type d'étude (1G, 2G, prénatale...)	Etude des effets cardiopathiques du DCA chez le fœtus. <u>But de l'étude :</u> <ul style="list-style-type: none"> - déterminer la période la plus sensible de l'organogénèse, de caractériser les défauts morphologiques sur le cœur des fœtus à GD 20 et de voir quels sont les tissus touchés in utero - évaluer la relation entre une dose unique maternelle et la réponse sur le développement → avec présence ou absence de défauts cardiaques fœtaux
Respect BPL – lignes directrices	oui
Substances chimiques, pureté, composition	99 % de pureté (Sigma Chemical Co.) → dissous et ajustée quotidiennement
Espèce / souche étudiée / âge - poids	Femelle rat gravide Long-Evans
Conditions de vie	Cage individuelle <i>Ad libitum</i> : nourriture "Purina rodent laboratory chow" et eau T° : 74-74 °F Humidité : 40-60 %, cycle lumineux : 12H
Sexe et nombre d'animaux par lot	7-9 rats Long-Evans pour les traitements 11-13 rats contrôles
Groupe témoin et nombre	8 fœtus contrôles provenant de 4 mères
Voie d'exposition	orale par intubation à 10 ml/kg p.c..
Pré-exposition éventuelle	Non
Fréquence et durée de l'exposition	Journalière Jours sélectionnés durant la gestation
Doses ou concentrations d'expositions	<u>Doses pour le fœtus :</u> <ul style="list-style-type: none"> • 1900 mg/kg/j (étude 1) → mesurées à J 6-8, 9-11, 12-15 <i>Commentaire auteurs : D'après Smith 1989, cette dose produit le plus fort taux de malformations mais aussi la plus faible évidence de toxicité maternelle et de mort fœtale</i> <ul style="list-style-type: none"> • 2400 mg/kg/j (étude 2) → mesurées à J 10, 11, 12, 13 → résultats anormalement bas • forte dose de 3500 mg/kg/j (étude 3) → mesurées à J 9, 10, 11, 12, 13 <u>Dose unique pour la mère :</u> <ul style="list-style-type: none"> • 1900 mg/kg/j de GD 6-15
DOSE 2400	Résultats anormalement bas → 3 ^{ème} dose est là pour conforter si les résultats sont liés à la dose administrée ou simplement au régime unitaire de dose.
Tests statistiques utilisés	<ul style="list-style-type: none"> - Procédure ANOVA pour l'analyse de la variance + comparaison multiple de Tuckley : pour évaluer les différences de poids maternel et de poids fœtal, mais aussi les différences du nombre de fœtus - Test Kruskal-Wallis : pour étude 1 et 3 ; nombre de fœtus, pourcentage de fœtus avec malformations et % de résorptions, % de progénitures avec malformations cardiaques → p= 0,05 - Test Wilcoxon : étude 2 : % de résorptions, % malformations cardiaques par progéniture → permet de comparer chaque groupe avec son contrôle.
Observations chez la mère	Pas de changements significatifs du gain du poids (études 1 et 2) Résorptions augmentées pour les femelles traitées le JG 10 Diminution du gain du poids (mères), à JG 13 (étude 2) pour 3500 mg/kg/j → effet secondaire (« incidental »)

Observations chez le fœtus pour les différentes doses	<p><u>Dose 1 :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Diminution du poids fœtal à JG 6-8 - 45% ont des défauts cardiaques <p><u>Dose 2 :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Pas de changements significatifs du poids fœtal - Anophtalmia (1 fœtus), - Défauts cardiaques à J10-12 <p><u>Dose 3:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Fœtus plus petits (à JG 10) - Plusieurs fœtus touchés par : microphthalmie, meningoencéphalocèle - Défauts cardiaques : IVSD, H-IVSD
Observations cardiaques chez le fœtus	<p>Malformations cardiaques avec :</p> <ul style="list-style-type: none"> - 1900 mg/kg/j à partir de J9 - 2400 mg/kg/j à J10 et 12 seulement - 3500 mg/kg/j à J9, 10, et 12.
Effets observés – reprotoxicité Chez le fœtus	<p>Effet sur le développement fœtal cardiovasculaire → malformations +++</p> <ul style="list-style-type: none"> - Défaut du cœur « caudal » au niveau des valves « semilunar » : <ul style="list-style-type: none"> - la paroi de l'artère droite ascendante - "the right cusp or sinus of Vasalva" → communiquant tous deux avec le ventricule droit - communication entre le ventricule gauche et droit <ul style="list-style-type: none"> - Défaut au niveau interventriculaire : H-IVSD et IVSD - Levocardia
Effet critique pris en compte	Malformations cardiaques fœtales durant la période GD 9-15
Couple + NOAEL / LOAEL pour l'effet critique et incidence du LOAEL	
Qualité de l'étude (cotation Klimisch)	suivi des lignes directrices de l'OCDE, bonne.
Observations sur les effets cardiaques	<p>Pas augmentation associée des anomalies cardiaques avec l'augmentation des doses :</p> <ul style="list-style-type: none"> - soit dû au régime de doses (unique) - soit dû à une saturation pharmacocinétique à forte dose. <p>La caractérisation morphologique confirme que l'organe cible d'une exposition au DCA est le « cœur »</p>

Référence	Fischer <i>et al.</i> , 2001 –International Journal of Toxicology
Type d'étude (1G, 2G, prénatale...)	DCA et TCA affectent-ils le développement cardiaque foetal durant l'organogénèse?
Respect BPL – lignes directrices	En accord avec le "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, National Research Council", 1996
Substances chimiques, pureté, composition	Préparation de solutions à partir de TCE → TCA, et de DCA, Aldrich.
Espèce / souche étudiée / âge - poids	Rates gravides Sprague –Dawley
Conditions de vie	Cage individuelle pour males, femelles par deux sauf pour l'accouplement Eau fraîche conditionné et « certified rodent chow » <i>ad libitum</i>
Sexe et nombre d'animaux par lot	Femelle et males → G1, 20 rates par dose
Groupe témoin et nombre	Par dose : 19 mères (contrôles) et 275 fœtus (contrôles), contrôle : eau
Voie d'exposition	Orale, véhicule : eau et « soybean oil »
Pré-exposition éventuelle	Non, acclimatation pendant 14 jours seulement
Fréquence et durée de l'exposition	Durant la gestation, de GD 6 à 15
Doses ou concentrations d'expositions	Bolus de 300 mg/kg/j pour le TCA et le DCA
Examens fœtus	Réalisés à GD 21
Tests statistiques utilisés	Test Kruskal-Wallis analyse : <ul style="list-style-type: none"> - poids corporel, poids utérin de la mère et poids du fœtus - le nombre d'implantations - le nombre de fœtus par mère Test Wicoxon : permet de faire les comparaisons Test chi-square permet l'analyse des malformations cardiaques fœtales et de voir les différences significatives avec les contrôles Test de Fischer permet de faire les comparaisons entre les contrôles et les groupes traités
Observations chez la mère	Surveillance de la mère (poids, anormalités...) : <ul style="list-style-type: none"> - Moyenne du gain du poids maternelle est plus basse que les contrôles pour le TCA et le DCA. - Pas de différence significative pour le nombre d'implantations, sur le % de résorptions ou sur la taille de la portée. - Réduction significative du poids utérin avec le TCA.
Observations chez le foetus	- Réduction significative du gain du poids (plus basse que les contrôles) à GD 21 pour le TCA et le DCA
Observations cardiaques chez le foetus	pas de malformations cardiaques significatives
Qualité de l'étude (cotation Klimisch)	bonne

Référence	Warren <i>et al.</i> , 2006 – Journal of Toxicology
Type d'étude (1G, 2G, prénatale...)	Exposition maternelle de rats à fortes doses aux TCA et DCA <u>But de l'étude</u> : TCA et DCA affectent-ils le développement de l'œil chez les fœtus?
Respect BPL – lignes directrices	En accord avec le "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, National Research Council", 1996
Substances chimiques, pureté, composition	
Espèce / souche étudiée / âge - poids	Rats Sprague-Dawley gravides, âge : 3 mois
Conditions de vie	
Sexe et nombre d'animaux par lot	femelles
Groupe témoin et nombre	6 groupes de rats dont 3 groupes témoin, examen des malformations sur n= 1185 fœtus 3 groupes témoin : 15 mg/kg/j d'acide <i>trans</i> -rétinoïde, huile de graines de soja et eau
Voie d'exposition	Orale (intubation)
Pré-exposition éventuelle	non
Fréquence et durée de l'exposition	JG 6-15 : 10 jours, 1 fois par jour lors du gavage
Doses ou concentrations d'expositions	Bolus oral de 300 mg/kg/j de DCA et TCA administré via une eau traitée par osmose inverse/échangeuse d'ions (élément limitant : 1 seule dose)
Observations	Têtes des fœtus sont coupées, fixées et examinées
Tests statistiques utilisés	Test de Kruskal-Wallis pour déterminer la différence significative parmi les groupes testés Test de Wilcoxon (p=0,05) pour déterminer la significativité des appariés
Effets observés – reprotoxicité	DCA et TCA → - Diminution du poids fœtal - malformations oculaires (Augmentation significative de tissus mous et malformations orbitales squelettiques +diminution significative de : la couche mince, de l'ensemble de l'œil, et de la distance interoculaire → altère le développement oculaire) Progénitures : avec DCA → diminution significative de : la couche mince, de l'ensemble de l'œil, et de la distance interoculaire
Effet critique pris en compte	Pour la même dose : diminution du poids fœtal + malformations oculaires
Couple NOAEL / LOAEL pour l'effet critique et incidence du LOAEL	
Qualité de l'étude (cotation Klimisch)	suivi des lignes directrices de l'OCDE

Annexe 3 : Grille d'analyse critique d'études toxicologiques pour le TCA

Référence	Fischer <i>et al.</i> , 2001 –International Journal of Toxicology
Type d'étude (1G, 2G, prénatale...)	DCA et TCA affectent-ils le développement cardiaque fœtal durant l'organogénèse?
Respect BPL – lignes directrices	En accord avec le "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, National Research Council", 1996, BPL.
Substances chimiques, pureté, composition	Préparation de solutions à partir de TCE → TCA, et de DCA, Aldrich.
Espèce / souche étudiée / âge - poids	Rates gravides Sprague –Dawley
Conditions de vie	Cage individuelle pour males, femelles par deux sauf pour l'accouplement Eau fraîche conditionné et « certified rodent chow » <i>ad libitum</i>
Sexe et nombre d'animaux par lot	Femelle et males → Génération 1, 20 rates par dose
Groupe témoin et nombre	Par dose : 19 mères (contrôles) et 275 fœtus (contrôles) ; contrôle : administration d'eau
Voie d'exposition	Orale, véhicule : eau et « soybean oil »
Pré-exposition éventuelle	Non, acclimatation pendant 14 jours seulement
Fréquence et durée de l'exposition	Durant la gestation, de JG 6 à 15
Doses ou concentrations d'expositions	Bolus de 300 mg/kg/j pour le TCA et le DCA
Examens fœtus	Réalisés à GD 21
Tests statistiques utilisés	Test Kruskal-Wallis analyse : <ul style="list-style-type: none"> - le poids corporel, le poids utérin de la mère et le poids du fœtus - le nombre d'implantations - le nombre de fœtus par mère Test Wicoxon : permet de faire les comparaisons Test chi-square : permet l'analyse des malformations cardiaques fœtales et de voir les différences significatives avec les contrôles Test de Fischer : permet de faire les comparaisons entre les contrôles et les groupes traités
Observations chez la mère	Surveillance de la mère (poids, anormalités...) : <ul style="list-style-type: none"> - Moyenne du gain du poids maternelle est plus basse que les contrôles pour le TCA et le DCA. - Pas de différence significative pour le nombre d'implantations, sur le % de résorptions ou sur la taille de la portée. - Réduction significative du poids utérin avec le TCA.
Observations chez le fœtus	- Réduction significative du gain du poids (plus basse que les contrôles) à JG 21 pour le TCA et le DCA
Observations cardiaques chez le fœtus	pas de malformations cardiaques significatives
Qualité de l'étude (cotation Klimisch)	bonne

Référence	Warren <i>et al.</i> , 2006 – Journal of Toxicology
Type d'étude (1G, 2G, prénatale...)	Exposition maternelle de rats à fortes doses aux TCA et DCA But de l'étude : TCA et DCA affectent-ils le développement de l'œil chez les fœtus?
Respect BPL – lignes directrices	- En accord avec le "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, National Research Council", 1996. - Protocole bien décrit.
Substances chimiques, pureté, composition	
Espèce / souche étudiée / âge - poids	Rats Sprague-Dawley gravides, âge : 3 mois
Conditions de vie	
Sexe et nombre d'animaux par lot	femelles
Groupe témoin et nombre	6 groupes de rats dont 3 groupes témoin, examen des malformations sur n= 1185 fœtus 3 groupes témoin : 15 mg/kg/j d'acide <i>trans</i> -rétinoïde, huile de graines de soja et eau
Voie d'exposition	Orale (intubation)
Pré-exposition éventuelle	non
Fréquence et durée de l'exposition	JG 6-15 : 10 jours, 1 fois par jour lors du gavage
Doses ou concentrations d'expositions	Bolus oral de 300 mg/kg/j de DCA et TCA administré via une eau traitée par osmose inverse/échangeuse d'ions (1 dose testée)
Observations	Têtes des fœtus sont coupées, fixées et examinées
Tests statistiques utilisés	Test de Kruskal-Wallis : pour déterminer la différence significative parmi les groupes testés Test de Wilcoxon (p=0,05) : pour déterminer la significativité des appariés
Effets observés – reprotoxicité	DCA et TCA → - Diminution du poids fœtal - Malformations oculaires (augmentation significative de tissus mous et malformations orbitales squelettiques +diminution significative de : la couche mince, de l'ensemble de l'œil, et de la distance interoculaire → altère le développement oculaire) Progénitures : avec DCA → diminution significative de : la couche mince, de l'ensemble de l'œil, et de la distance interoculaire
Effet critique pris en compte	Pour la même dose : diminution du poids fœtal + malformations oculaires
Couple NOAEL / LOAEL pour l'effet critique et incidence du LOAEL	
Qualité de l'étude (cotation Klimisch)	(suivi des lignes directrices de l'OCDE ?)

Référence	Smith <i>et al.</i> , 1989 –Teratology
Type d'étude (1G, 2G, prénatale...)	Activité tératogénique du TCA chez le rat
Respect BPL – lignes directrices	oui
Substances chimiques, pureté, composition	99% de pureté (Sigma Chemical → dissous dans de l'eau et ajusté à pH = 7 → solution
Espèce / souche étudiée / âge - poids	Rates Long-Evans gravides, âge : 65-80 jours
Conditions de vie	3 rats par cage, eau distillée <i>ad libitum</i> , T°C = 70-74°F, humidité : 55, cycle lumineux 12h
Sexe et nombre d'animaux par lot	Femelles
Groupe témoin et nombre	6 rates gravides par dose, 26 en tout
Voie d'exposition	Orale, intubation
Pré-exposition éventuelle	non
Fréquence et durée de l'exposition	Durant la gestation, de GD 6-15, pendant 10 jours (organogénèse)
Doses ou concentrations d'expositions	0, 330, 800, 1200, 1800 mg/kg p.c./j
Observations	TCA : tératogène chez le rat : toxique sur le développement du fœtus → spécificité?
Tests statistiques utilisés	- Test Jonckheere : p=0,0001 pour la dose-réponse - Test ANOVA : pour la variance + comparaison multiple Tukley - Test de Kruskal-Wallis, test Mann-Whitney pour comparer chaque traitement avec le contrôle
Chez la mère	Toxicité non évidente
Effets maternels	- Diminution du poids (à partir de 330 mg/kg/j, poids du groupe plus bas texte p446) <u>A 800 mg/kg p.c. /j :</u> - Augmentation des 'implants' et augmentation de la fréquence des résorptions - Différence significative du poids à partir de 800 mg/kg/j → discussion p447-448
Effet critique pris en compte	Augmentation du poids de la rate et des reins chez les mères (p=0,0001) liée à la dose administrée.
Couple NOAEL / LOAEL pour l'effet critique et incidence du LOAEL (mère)	LOAEL : 330mg/kg p.c. /j
Chez les fœtus	
Effets observés – reprotoxicité	<u>Fœtus :</u> - Diminution de la taille et du poids des fœtus - Mort embryonnaire (LOAEL : 800mg/kg/j) et malformations fœtales des tissus mous (dont cardiaques, p= 0,029), malformations des tissus squelettiques (dont les orbites, 1200mg/kg/j)
Effet critique pris en compte	Malformations fœtales des tissus mous cardiaques
Couple NOAEL / LOAEL pour l'effet critique et incidence du LOAEL	LOAEL : 330 mg/kg p. /kg
Qualité de l'étude (cotation Klimisch)	suivi des lignes directrices de l'OCDE, bonne

Référence	Johnson <i>et al</i>, 1998 –Journal of the American College of Cardiology
Type d'étude (1G, 2G, prénatale...)	Cardiotoxicité du MCA et TCA, métabolites du trichloroéthylène (TCE)
Respect BPL – lignes directrices	Accréditation du laboratoire
Substances chimiques, pureté, composition	Métabolites du trichloroéthylène
Espèce / souche étudiée / âge - poids	Rats Sprague-Dawley, jeunes mais mûres sexuellement, F : poids 225g+/-30 g, M : 300g+/- 50 g
Conditions de vie	40aine 7 jours avant début étude, rats cage individuelle, femelles mises par 4 maximum Alimentation : Eau + nourriture Teklad 4%, <i>ad libitum</i>
Sexe et nombre d'animaux par lot	Suffisamment pour déceler un effet
Groupe témoin et nombre	Témoin : administration d' eau distillée durant leur gestation
Voie d'exposition	Orale, eau de boisson
Pré-exposition éventuelle	non
Fréquence et durée de l'exposition	JG 1 au JG 22 (temps du développement cardiaque)
Doses ou concentrations d'expositions	Solutions préparées toutes les 24h par dilution à partir d'eau distillée, eau titrée avec NaOH si nécessaire, concentration maximale de TCE = 1100 ppm (limite de solubilité), quantités contrôlées quotidiennement Une seule dose testée de TCA = 2730ppm ou 290 mg/kg p.c. /j
Observations	Mesures quotidiennes du taux d'oestrogènes et du poids, + frottis vaginaux
Observations sur les mères	Pas de toxicité significative
Accouplement	Femelle placée chaque nuit avec un mâle, si spermatozoïde retrouvé dans vagin le matin => GD 1
Tests statistiques utilisés	Test Fisher pour les données fœtales, Test Wilcoxon pour la progéniture
Effets observés – reprotoxicité → EXAMEN DES FOETUS	TCA : - augmentation significative du nombre de site d'implantation (p=0,0006) et du nombre de sites de résorption (p= 0.0001) par progéniture - tératogène cardiaque → taux de malformations cardiaques + élevé → anomalies cardiaques retrouvées
Effet critique pris en compte	anomalies cardiaques élevées
Couple NOAEL / LOAEL pour l'effet critique et incidence du LOAEL	LOAEL : 290 mg/kg/j
Qualité de l'étude (cotation Klimisch)	suivi des lignes directrices de l'OCDE → ?

Annexe 2 : Grille d'analyse critique d'études toxicologiques pour le DBA

Référence	Christian <i>et al.</i> , 2001 –International Journal of Toxicology
Type d'étude (1G, 2G, prénatale...)	But étude : déterminer la relation de cause à effet entre le DBA et la reprotoxicité et la toxicité sur le développement à des concentrations proches de la consommation humaine.
Respect BPL – lignes directrices	Good Laboratory Practise Standards, US EPA 2000
Substances chimiques, pureté, composition	Pureté 97%--> utilisation telle quelle aucune correction effectuée → solutions conservées entre 2 et 8 °c, protégées de la lumière et recouverte de nitrogène.
Espèce / souche étudiée / âge - poids	Rats Crl : CD Sprague Dawley
Conditions de vie	Cage individuelle (mise à part pour l'accouplement (fécondation surveillée→ Détermination de GD 0) et la lactation), T°C = 18-26°C, humidité = 30 à 70 %, cycle lumineux : 12 h Nourriture spéciale et eau <i>ad libitum</i>
Sexe et nombre d'animaux par lot	50 rats mâles et 50 femelles Sprague-Dawley → 5 groupes + 6 mâles et 17 femelles pour la bioanalyse.
Groupe témoin et nombre	5 rats par groupe témoin pour les doses = 0
Voie d'exposition	Orale, eau de boisson
Pré-exposition éventuelle	14 jours avant la cohabitation
Fréquence et durée de l'exposition	Poursuivie pendant la gestation et la lactation → 63-70 j
Doses ou concentrations d'expositions	16,525 ; 33,05 ; 66,1 mg/kg p.c./j
Observations	Pas de risques pour la reprotoxicité ou le développement chez l'homme avec une exposition orale au DBA aux doses d'exposition classiques
Tests statistiques utilisés	
Effets observés – reprotoxicité	pas à des doses plus élevées que la LOAEL
Effet critique pris en compte	Diminution de l'accouplement
Couple NOAEL / LOAEL pour l'effet critique et incidence du LOAEL	NOAEL : 500 ppm→ 33,05 mg/kg p.c. /j LOAEL : 1000 ppm-> dose moyenne de 66,1 mg/kg/j
Qualité de l'étude (cotation Klimisch)	suivi des lignes directrices de l'OCDE

Référence	Cummings <i>et al.</i> , 1998– Reproductive Toxicology
Type d'étude (1G, 2G, prénatale...)	Evaluation des effets potentiels du DBA chez les rats gravides au premier stade Sur deux durées d'études différentes : Etude 1 : GD 1-8→ tuées à GD 9 (étude reprotoxique) Etude 2 : GD 1 à 8→ tuées à GD 20 (tués à la naissance)
Respect BPL – lignes directrices	BPL
Substances chimiques, pureté, composition	Pureté de 99%--> dissous et ajusté
Espèce / souche étudiée / âge - poids	Rats femelles matures, Holtzman (70j)
Conditions de vie	En cage par deux, eau du robinet et nourriture <i>ad libitum</i> Cycle lumineux : 14/10H, T°C : 20-24 °C, humidité : 40 à 50%
Sexe et nombre d'animaux par lot	8 par dose et par expérience
Groupe témoin et nombre	Dose : 0
Voie d'exposition	gavage
Pré-exposition éventuelle	Acclimatation une semaine avant.
Fréquence et durée de l'exposition	8 jours
Doses ou concentrations d'expositions	62,5, 125, 250, 500 mg/kg p.c./j
Observations	Si administration multiples de doses de 500 mg/kg/j → dose toxique entraînant un comportement moribond et parfois la mort = dose éliminée
Tests statistiques utilisés	- Procédure GLM (general linear model) - Test ANOVA : effets significatifs - t-test ; pour les comparaisons "post hoc", pour des hypothèses <i>a priori</i>
Effets observés – reprotoxicité (LOAEL)	- Pour une exposition de JG 1 à JG8 --> à JG 9 aucun effet sur le nombre de sites d'implantation ni sur aucun paramètre « progestational » excepté pour taux d'estradiol qui est élevé. → effets mineurs sur la reproduction chez les femelles - Pour une exposition de JG 1 à JG 8 --> à JG 20, aucun effet sur la progéniture, aucune résorption, ni variation de poids
Effet critique pris en compte	A 250 mg/kg/j → augmentation du taux d'estradiol (élevé) au premier stade
Couple NOAEL / LOAEL pour l'effet critique et incidence du LOAEL	LOAEL : 250mg/kg/j NOAEL : 125 mg/kg/j
Qualité de l'étude (cotation Klimisch)	suivi des lignes directrices de l'OCDE
Observations	Il faudrait envisager des études supplémentaires pour voir s'il existe un lien entre cette augmentation d'estradiol et les fonctions ovariennes Cette étude ne permettant pas d'exclure des effets du DBA sur les cellules des mammifères

Référence	Bodensteiner <i>et al</i> , 2004, Toxicological Sciences
Type d'étude (1G, 2G, prénatale...)	Exposition chronique au DBA chez le lapin
Respect BPL – lignes directrices	BPL, protocole bien décrit
Substances chimiques, pureté, composition	Pureté de 97%
Espèce / souche étudiée / âge - poids	Lapins de 6 mois Dutch-belted, acclimatés pendant 6 semaines
Accouplement	Insémination artificielle (injection im de GnRH → ovulation), n= 45
Conditions de vie	12 h de lumière, T°= 19-21°C, humidité= 40%
Sexe et nombre d'animaux par lot	- 4 groupes de femelles gravides de 10 lapins par dose pour une exposition de 24 semaines - 6 lapins par groupe de dose pour une durée d'exposition de 12 semaines
Groupe témoin et nombre	Groupe de 6 ou 10 lapins
Voie d'exposition	Orale, eau de boisson
Pré-exposition éventuelle	In utero
Fréquence et durée de l'exposition	Quotidienne, de JG 15 et durant la vie entière
Doses ou concentrations d'expositions	1-5-50mg/kg p.c. via de l'eau de boisson Contrôle : eau déionisée
Observations	Effet du DBA sur la « reproductive senescence », vulnérabilité du développement folliculaire au DBA
Tests statistiques utilisés	Test de Fisher et ANOVA p=0,05
Effets observés – reprotoxicité	Diminution du nombre de follicules primaires et de follicules pré-antral à 1mg/kg (p=0,05)
Effet critique pris en compte	Réduction du nombre de follicules primordiaux et des follicules en bon état (p=0,05) en période pré pubertaire
Couple NOAEL / LOAEL pour l'effet critique et incidence du LOAEL	NOAEL : 5 mg/kg p.c./j LOAEL : 50 mg/kg p.c./j
Qualité de l'étude (cotation Klimisch)	(suivi des lignes directrices de l'OCDE ?)

Référence	Christian <i>et al.</i> , 2002 –International of Toxicology
Type d'étude (1G, 2G, prénatale...)	2 Générations
Respect BPL – lignes directrices	BPL
Substances chimiques, pureté, composition	97% pureté
Espèce / souche étudiée / âge - poids	Rats Sprague-Dawley, exposition à partir de leur 43ème jour
Conditions de vie	Acclimatation d'une semaine, T°C = 18 à 26, humidité = 30 à 70%, cycle lumineux 12 h, eau et nourriture <i>ad libitum</i>
Sexe et nombre d'animaux par lot	G1 : 4 groupes de 30 rats SD par sexe par dose d'exposition F1 : 30 rats SD par sexe par dose d'exposition
Groupe témoin et nombre	4 groupes de CrI : CD pour chaque génération
Voie d'exposition	Orale, eau de boisson
Pré-exposition éventuelle	Acclimatation seulement
Fréquence et durée de l'exposition	Pour P : Du 43 ème jour au 92 ème jour Pour F1 : exposition in utero (G) → lactation → 113ème jour
Doses ou concentrations d'expositions	4,4 à 11,6 ; 22,4 à 55,6 ; 52,4 à 132 mg/kg p.c./j
Observation de l'étude	Doses calculées à partir de l'étude de Christian <i>et al.</i> (2001)
Observations	- Pas de changement histopathologique, DBA non considéré comme reprotoxique ou toxique au niveau du développement pour l'homme qui ingère de l'eau chlorée - Chez les rats femelles aucune altération de la reproduction ou de développement retrouvée chez P et F1.
Tests statistiques utilisés	- SAS system - Test de variance - Test Bartlett + analyse de la variance - Test Dunnett - Test Kruskal-Wallis - Méthode Dunn - Test Fisher
Effets observés – reprotoxicité	P, F1 : Toxicité Générale (augmentation du poids → foie, reins) → LOAEL : 4,5-11,6 mg/kg p.c./j P, F1, F2 : Réduction du poids → glande pituitaire, surrénales P, F1 : (LOAEL : 250- 650 ppm) : Anormalités épидидymaires, testiculaires et du sperme.
Effet critique pris en compte	P : diminution du poids F1-F2 : diminution du poids P, F1 : Anormalités épидидymaires et testiculaires (tissus, taille, développement) + du sperme (production et morphologie)
Couple NOAEL / LOAEL pour l'effet critique et incidence du LOAEL	Pour P : LOAEL : 52,4-132 mg/kg p.c./j NOAEL : 22,4-55,6 mg/kg p.c./j Pour F1-F2: LOAEL : 22,4-55,6 mg/kg p.c./j ; NOAEL : 4,4-11,6 mg/kg p.c./j Pour P, F1 mâles : LOAEL: 22,4-55,6 mg/kgp.c./j NOAEL : 4,4-11,6 mg/kg p.c./j
Qualité de l'étude (cotation Klimisch)	suivi des lignes directrices de l'OCDE

Référence	Linder <i>et al.</i> , 1994– Reproductive Toxicology
Type d'étude (1G, 2G, prénatale...)	Spermatotoxicité du DBA sur les rats après 14 jours d'exposition (durée d'exposition courte)
Respect BPL – lignes directrices	BPL
Substances chimiques, pureté, composition	99 % de pureté -> dissous puis solution ajustée
Espèce / souche étudiée / âge - poids	rats Sprague-Dawley de 3 à 4 mois d'âge
Conditions de vie	2 par cage, cycle lumineux de 12 h, 22 °C +/- 1, humidité de 50% +/- 10
Sexe et nombre d'animaux par lot	Mâles, 5 groupes de 8 rats
Groupe témoin et nombre	6 rats
Voie d'exposition	Orale, eau de boisson
Pré-exposition éventuelle	non
Fréquence et durée de l'exposition	14 jours
Doses ou concentrations d'expositions	0 (contrôle : eau), 10, 30, 90, 270 mg/kg/j DBA → dans un volume de 5 ml ajusté selon le poids de l'animal
Observations	DBA apparait comme un toxique plus fort que le DCA chez le rat. Plus la dose est forte et plus les effets sont élevés.
Tests statistiques utilisés	Test SAS, points finaux → PRO GLM (general model linear) Poids des organes → analyse de la covariance Mesure du sperme → ANOVA
Effets observés – reprotoxicité	- Diminution du poids des testicules, des épидидymes, et du nombre de sperme (head and epididymal) - Changement histologique dans les testicules (rétention des spermatides au niveau 19), et développement et relargage anormaux des spermatides et du sperme (tête), formation de résidus atypiques (corps résiduels) → réponse toxique commune du DBA à 10 mg/kg/j - Spermatotoxicité - Diminution de la motilité du sperme et anomalies morphologiques
Effet critique pris en compte	Pour une LOAEL de 90 mg/kg/j : - Effets sur la spermiation et sur le développement des spermatides - Diminution du sperme épидидymal, et de la motilité du sperme - Morphologie anormale du sperme Pour une LOAEL 10 mg/kg/j : - réduction du nombre de sperme, effets sur la spermiation
Couple NOAEL / LOAEL pour l'effet critique et incidence du LOAEL	LOAEL : 10 mg/kg/j
Qualité de l'étude (cotation Klimisch)	suivi des lignes directrices de l'OCDE

Référence	Klinefelter <i>et al.</i> , 2004 –Toxicological Sciences
Type d'étude (1G, 2G, prénatale...)	Exposition continue de DBA chez le rat sur 2 Générations → Effets : retard du développement pubertaire et diminution de la qualité du sperme → Voir si les capacités de reproduction (fertilité et qualité du sperme) sont altérées à l'âge adulte → Voir si le développement reproductif est altéré (séparation prépuce ? et ouverture du vagin)
Respect BPL – lignes directrices	BPL
Substances chimiques, pureté, composition	99% de pureté → solution ajustée
Espèce / souche étudiée / âge - poids	Rats Sprague-Dawley femelles gravides → 48 rats à diviser en 4 groupes femelles et mâles
Conditions de vie	Cycle lumineux : 12h, 22 °C +/-1, humidité : 50 +/- 10 %, cage individuelle → validation de l'US EPA
Sexe et nombre d'animaux par lot	4 groupes de 12 (mâles et femelles) par dose
Groupe témoin et nombre	3 dams par groupe (0, 400, 600, 800 ppm) sont dosés de GD 1 au 21ème jour après la naissance.
Voie d'exposition	Orale, eau de boisson changée tous les deux-trois jours
Pré-exposition éventuelle	non
Fréquence et durée de l'exposition	Développement pubertaire → vie adulte (117 jours) Durée de dosage différente pour les 4 groupes (rats tués à des temps différents)
Doses ou concentrations d'expositions	Contrôle : 0 ppm (eau distillée) Doses testées : 0,6 ; 3,6 et 76,3 mg/kg p.c./ j
Observations	La consommation d'eau n'est pas altérée → Santé Canada dit l'inverse p 61 pour P et F1 à toutes les doses+ effets associés (poids, alimentation...) Pour chaque exposition, chaque animal a été observé après sa puberté à J 56 et à l'âge adulte (J 120) De GD15 à J 21 → aucune altération dans la reproduction.
Tests statistiques utilisés	<ul style="list-style-type: none"> - Analyse de la variance (SAS, PROC, GLM) pour les effets du traitement avec $p < 0,005$ comme seuil de différence significative - Analyse de corrélation pour déterminer le lien entre la protéine (du sperme) et la fertilité. - Pearson corrélation pour le lien entre VO et P production.
Effets observés – reprotoxicité	<ul style="list-style-type: none"> - Diminution du poids (mesuré à la mort) à 150mg/kg - Diminution du poids des testicules à 800 ppm et des épидидymes à 600 ppm et des reins à 400 ppm - Retard PPS et VO significatif à partir de 400 ppm - Augmentation des corps résiduels atypiques, retard de la spermiation et atrophie des tubules séminifères à 400 ppm - Perte de motilité et de vitesse su sperme à 600 ppm - Diminution de la fertilité à 600 ppm - Augmentation de sécrétion de testostérone : à 4 ppm - Qualité du sperme altérée : membrane du protéome, « proximal cauda epididymal » LOAEL : à 40 ppm (3.6 mg/kg), NOAEL : 4 ppm (0,4 mg/kg) → effet relié au niveau de la protéine SP22 → La protéine membranaire du sperme du sperme SP22 diminue à toutes les doses mais basé sur le retard PPS → à 400 ppm - Léger retard de la maturation sexuelle chez les rats F1 avec : séparation du prépuce et l'ouverture du vagin sont retardés de 4 j chez le mâle et de 3 jours chez la femelle à 400 ppm (0,6 mg/kg) - Diminution importante de la distance anogénitale le jour 22 de la lactation

	chez les petits mâles F2 aux doses moyennes et élevées.
Couple Effet critique pris en compte + NOAEL / LOAEL pour l'effet critique et incidence du LOAEL	<u>Chez l'adulte :</u> Qualité du sperme altérée : membrane du protéome, « proximal cauda epididymal » : LOAEL : 3,6 mg/kg p.c./j et NOAEL : 0,6 mg/kg p.c./j <u>A la puberté :</u> Altération de la capacité stéroïdogénique du parenchyme testiculaire : LOAEL : 0,6mg/kg p.c./j
Qualité de l'étude (cotation Klismich)	Suivi des lignes directrices de l'OCDE

Référence	Tsuchiya <i>et al.</i> , 2000 – Toxicological Sciences
Type d'étude (1G, 2G, prénatale...)	Etude de la toxicité du DBA sur les organes reproducteurs mâles chez le rat par une étude doses répétées par gavage, effets observés à 2 et 4 semaines. But étude : évaluer la sensibilité des rats au DBA (agent toxique des cellules de Sertoli) à 2 semaines sur leur fertilité
Respect BPL – lignes directrices	Respect des recommandations japonaises
Substances chimiques, pureté, composition	Les solutions sont ajustées au pH 6,5 par du NaOH (eau distillée)
Espèce / souche étudiée / âge - poids	Rat- Sprague Dawley-mâles, âge : 5 semaines Acclimatation 1-3 semaines avant l'administration
Conditions de vie	Animaux en cage (2 par cage) dans une pièce maintenue à 22 °C+/-3 , air conditionné, humidité relative : 55+/- 20%, cycle lumineux 12h Eau disponible <i>ad libitum</i> , régime alimentaire habituel
Sexe et nombre d'animaux par lot	6 rats mâles (4 groupes)
Groupe témoin et nombre	6 rats mâles
Voie d'exposition	Orale, gavage
Pré-exposition éventuelle	non
Fréquence et durée de l'exposition	2 ou 4 semaines, 1 fois par jour lors du gavage
Doses ou concentrations d'expositions	DBA : 0 – 5 – 50 – 250 mg/kg/j
Observations	<u>Note sur la discussion des auteurs :</u> - 2 semaines sont suffisantes pour détecter la toxicité sur le système mâle reproducteur - Dans cette étude l'effet du DBA sur la spermatogénèse est plus sensible par un examen histopathologique que par un examen général du sperme
Tests statistiques utilisés	Bartlett's test (Bartlett, 1937) pour le traitement des données pour les moyennes et +/- SD - Si variance homogène → Anova + Dunett's test (paramétrique) - Si pas d'homogénéité de la variance → Kruskal-Wallis test+ Dunett (non paramétrique)
Effets observés – reprotoxicité (LOAEL)	A 50 mg/kg/j - ↘ nb de sperme normal → sperme fusionné, tête anormale A 250 mg/kg/j : - ↘ poids épидидymaire - présence de corps résiduels atypiques++ - arrêt en phase 19 des spermatides A 250 mg/kg/j : - altération du sperme - ↘ motilité du sperme, ↘ du nombre de sperme
Effet critique pris en compte	- Effet critique : anormalité morphologique du sperme: tête, sperme fusionné
Couple NOAEL / LOAEL pour l'effet critique et incidence du LOAEL	NOAEL : 5 mg/kg/j LOAEL : 50 mg/kg/j
Qualité de l'étude (cotation Klimisch)	suivi des lignes directrices de l'OCDE?

Référence	Linder <i>et al</i> , 1993, Fundamental and Applied toxicology
Type d'étude (1G, 2G, prénatale...)	Etude de la spermatotoxicité aigue du DBA et MBA <u>But de l'étude</u> : déterminer les effets spermatogénétiques aigus des BAA
Respect BPL – lignes directrices	BPL
Substances chimiques, pureté, composition	MBA commercial (99%), DBA commercial (contenant + de 10% de MCA)→ dissous dans de l'eau distillée et solution ajustée par NaOH pour des volumes de 5 ml/kg(MBA) et 10 ml/kg (DBA) : Aldrich Chemical Co
Espèce / souche étudiée / âge - poids	Rats Sprague-Dawley, 3,5-4 mois, en cage (2par cage)
Conditions de vie	Lumière : 12 h, T°= 22°C +/-1°C, humidité 50 +/- 10%
Sexe et nombre d'animaux par lot	Toxicité aigue : Groupe de 5 rats par dose Spermatototoxicité : groupe de 7- 8 rats
Groupe témoin et nombre	7-8 rats
Voie d'exposition	Orale, gavage
Pré-exposition éventuelle	non
Fréquence et durée de l'exposition	De 1 à 28 jours
Doses ou concentrations d'expositions	<u>Toxicité aigue:</u> MBA : 0-100-200 mg/kg/j DBA : 0-1000--2000 mg/kg/j <u>Spermatotoxicité:</u> MBA : 0-100mg/kg DBA : 0-1250 mg/kg
Observations	Toxicité aigue plus forte pour le MBA que le DBA mais dans cette étude DBA retenu comme toxique pour le système reproducteur mâle
Tests statistiques utilisés	Statistical analysis system P = 0,05 PROC Probit Procédure PROC GLM Test one way ANOVA
Effets observés – reprotoxicité	DBA : - toxique testiculaire → effets sur les spermatides et cellules germinales - diminution du poids (testicules, épидидyme, prostate) et diminution du nombre de sperme et du taux de testostérone pour une dose unique de 1250 mg/kg
Effet critique pris en compte	DBA : Spermatotoxicité : qualité du sperme pauvre (dégénérescence flagellaire et, morphologie anormale de la tête → mauvaise motilité)
Couple NOAEL / LOAEL pour l'effet critique et incidence du LOAEL	
Qualité de l'étude (cotation Klimisch)	(suivi des lignes directrices de l'OCDE ?)

Référence	Linder <i>et al.</i> , 1995 – Fundamental and Applied Toxicology
Type d'étude (1G, 2G, prénatale...)	Qualité du sperme et capacité de reproduction affectés par le DBA Objectif de l'étude : déterminer un temps de réponse et les points critiques afin d'établir la relation dose-réponse sur la fertilité pour une exposition subchronique de DBA sur 79 jours 1G
Respect BPL – lignes directrices	BPL
Substances chimiques, pureté, composition	99% de pureté → dissous dans de l'eau distillée et ajustée avec une solution de NaOH
Espèce / souche étudiée / âge - poids	Rats mâles (81 jours) Sprague-Dawley
Conditions de vie	Cage individuelle, cycle lumineux de 12h, T°C : 22+/-1, humidité : 50+/-10%
Sexe et nombre d'animaux par lot	Rats mâles + femelles → rats mâles
Groupe témoin et nombre	Pour l'insémination naturelle : groupe de 10 mâles par dose Pour l'insémination artificielle : groupe de 6 mâles par dose
Voie d'exposition	Orale par gavage
Pré-exposition éventuelle	non
Fréquence et durée de l'exposition	79 jours
Doses ou concentrations d'expositions	Contrôle : 0 (eau), 2, 10, 50, 250 mg/kg/j dans un volume de 5 ml
Observations	Pour une exposition répétée de 250 mg/kg → diminution de la capacité de reproduction des mâles → diminution de l'accouplement → ++ effets neurotoxiques
Tests statistiques utilisés	Analyse statistiques avec le SAS (statistical analysis system) Analyse continue mesurée avec le modèle GLM (general linear model) Analyse de la covariance pour le poids des organes Mesure du sperme par ANOVA Test de Fisher pour les données discontinues sur la reproduction
Effets observés – reprotoxicité	Pour une LOAEL de 250 mg/kg/j - Diarrhée, perte de poids, signes neurologiques , mouvements atypiques des membres, et posture anormale - Respiration difficile, léger tremblement, difficulté à bouger les membres arrière, - Diminution du poids, des épидидymes, du TSHC, du nombre du sperme Difficulté de reproduction, par diminution de la fertilité masculine chez le rat exposé
Effet critique pris en compte	Morphologie et motilité anormale du sperme , diminution du nombre de sperme, anormalité des spermatozoïdes
Couple NOAEL / LOAEL pour l'effet critique et incidence du LOAEL	LOAEL : 50 mg/kg/j NOAEL: 10 mg/kg/j
Qualité de l'étude (cotation Klimisch)	suivi des lignes directrices de l'OCDE

Référence	Linder <i>et al.</i> , 1996 –Reproductive Toxicology
Type d'étude (1G, 2G, prénatale...)	Voir si le DBA provoque des changements histopathologiques dans les testicules et épидидymes de rats exposés à ce DBA. (toxicité reproductive)
Respect BPL – lignes directrices	
Substances chimiques, pureté, composition	Pureté : 99%--> dissous dans de l'eau distillée puis ajustée.
Espèce / souche étudiée / âge – poids	Rats mâles Sprague-Dawley (âge : 105 jours)
Conditions de vie	Cage individuelle, cycle lumineux, T°C : 22+/- °C et humidité 50% +/- 10
Sexe et nombre d'animaux par lot	Mâles 5 groupes de 10 rats (pour l'accouplement et the « final necropsis ») 13 groupes de 6 rats (pour « interim necropsies »)
Groupe témoin et nombre	Dose 0 (contrôle : eau)
Pré-exposition éventuelle	non
Voie d'exposition	Orale, gavage
Fréquence et durée de l'exposition	Journalière, de J2 à J79
Doses ou concentrations d'expositions	2, 10, 50, 250 mg/kg p.c./j
Observations de l'étude	- <u>A 6 mois</u> : atrophie des tubules séminifères après 42 doses de 250 mg/kg/j - ARB et rétention des spermatides au stade 19 observés après 31 et 79 doses de 50 mg/kg/j et une augmentation de la rétention des spermatides au stade 19 est observée chez plusieurs rats à la dose de 10 mg/kg/j. - <u>A 2 mg/kg p.c.</u> : aucune anomalie observée.
Observations à propos du DBA	Anomalie morphologique du sperme : effet le plus sensible retrouvé en réponse à l'exposition au DBA. (sperme fusé, anomalie tête, ..)
Tests statistiques utilisés	
Effets observés – reprotoxicité	<u>A J5</u> : - Fusion des spermatides mûres - Présence de corps résiduels (ARB) atypiques dans la lumière et l'épithélium des tubules séminifères <u>A J9</u> : ARB à plusieurs stades du cycle séminifère épithélial et dans le « caput » epididymidis. <u>A J16</u> : - Têtes de spermatozoïdes déformées au stade 12 - Vieux spermatozoïdes et débris cytoplasmiques luminal retrouvés dans les épидидymes <u>A J31</u> : vacuolisation cytoplasmique des cellules de Sertoli, large rétention des spermatides au stade 19 et vésiculation de l'acrosome des spermatides. Anomalies de la forme du sperme (apparaissant au stade I, anomalie de l'acrosome et des constituants nucléaires et extranucléaires de la tête des spermatozoïdes, fusion de cellules, atrophie tubulaire, formation d'ARB) : effets +++ à 250 mg/kg/j
Effet critique pris en compte	Changement histopathologique à 10 mg/kg p.c./j : Rétention anormale des spermatides au stade 19 → altération du comportement sexuel masculin reproductif
Couple NOAEL / LOAEL pour l'effet critique et incidence du LOAEL	
Qualité de l'étude (cotation Klimisch)	(suivi des lignes directrices de l'OCDE ?)

Référence	Goldman <i>et al.</i> , 2006 –Reproductive Toxicology
Type d'étude (1G, 2G, prénatale...)	Influence du DBA sur l'augmentation de l'hormone lutéinisante du rat femelle
But de l'étude	Voir si l'augmentation associée de DBA et d'E2 circulant pourrait induire une hausse de LH et voir si l'augmentation d'E2 est capable d'altérer la réponse de l'hypothalamus : qui est une suppression de cette hausse causée par un neurotoxique
Respect BPL – lignes directrices	BPL
Substances chimiques, pureté, composition	Pureté de 97% : DBA Pureté de 98 % : DMDC
Espèce / souche étudiée / âge – poids	Rats Sprague-Dawley, âge 60 jours, acclimatation préalable, cycle lumineux : 14H lumière /10 H nuit, T°C : 22+/-°C, humidité : 40-50%
Conditions de vie	Eau et nourriture <i>ad libitum</i>
Sexe et nombre d'animaux par lot	femelle
Groupe témoin et nombre	
Pré-exposition éventuelle	non
Voie d'exposition	Orale, gavage
Fréquence et durée de l'exposition	Journalière à la même heure, pendant 14 jours
Doses ou concentrations d'expositions	0, 150 mg/kg p.c./j
Effets du DBA	Augmente les taux circulants d'hormones stéroïdes
Observations de l'étude	Pas d'effets avec le DBA seul. Pas d'effets avec le DMDC Pas d'interaction entre le DMDC et le DBA.
Tests statistiques utilisés	- Analyse de la variance SAS et logiciel Graphp Instat - Test Dunnett pour comparer les effets des doses entre chaque groupe et son contrôle - Test Student est utilisé pour comparer les animaux recevant du DMDC et ceux n'en recevant pas - Approximation de Wech appliquée si existence d'une différence significative - Les aires sous courbe des données de LH sont analysées par le logiciel MedCalc
Effets du DBA	- Augmente le taux circulant des hormones estrone (E1) et estradiol (E2) Conséquences → suppression du catabolisme hépatique de l'estradiol - Pas d'altération de la LH
Effets observés – reprotoxicité	- Augmentation des taux d'estrogènes et en parallèle diminution de la synthèse du DMDC inhibiteur de la LH.
Effet critique pris en compte	- Augmentation des hormones E2 et E1 circulantes
Couple NOAEL / LOAEL pour l'effet critique et incidence du LOAEL	
Qualité de l'étude (cotation Klimisch)	suivi des lignes directrices de l'OCDE

Référence	Holmes <i>et al.</i> , 2001 – Journal of Andrology
Type d'étude (1G, 2G, prénatale...)	Effets du DBA sur la spermatogénèse chez le rat
Respect BPL – lignes directrices	
Substances chimiques, pureté, composition	99% pureté → dissous puis solution ajustée à pH 6,5 pour un volume de 2 mL/kg
Espèce / souche étudiée / âge - poids	Rats mâles adultes Sprague-Dawley, âge : 110-130j
Conditions de vie	2 par cage, cycle lumineux 12h, T°C : 22, humidité : 50+/-10 % Nourriture + eau : <i>ad libitum</i>
Sexe et nombre d'animaux par lot	
Groupe témoin et nombre	Rats mâles adultes
Voie d'exposition	Orale, par gavage (volume de 2 mL/kg)
Pré-exposition éventuelle	non
Fréquence et durée de l'exposition	In vivo : Quotidienne (250mg/kg), sur 5 jours In vitro : 180-600 µM
Doses ou concentrations d'expositions	In vivo : 250 mg/kg
Observations	Altérations histologiques + altération de la synthèse de la protéine 4 cytotolique dans les tubules séminifères
Tests statistiques utilisés	Modèle général linéaire p <0,05 (SAS, Cary, NC)
Effets observés – reprotoxicité	<u>In vivo</u> : - Diminution de la synthèse de la protéine cytosolique 4 des tubules séminifères <u>In vitro</u> : - Vacuolisation des cellules de Sertoli, dégénération et séparation des cellules germinales - Diminution de la synthèse et altération histopathologique de la protéine cytosolique 4 des tubules séminifères
Effet critique pris en compte	Altération de la spermatogénèse
Couple NOAEL / LOAEL pour l'effet critique et incidence du LOAEL	
Qualité de l'étude (cotation Klimisch)	suivi des lignes directrices de l'OCDE ?

Notes



Agence nationale de sécurité sanitaire
de l'alimentation, de l'environnement et du travail
27-31 avenue du général Leclerc
94701 Maisons-Alfort Cedex
www.anses.fr