

Valeurs toxicologiques de référence (VTR)

Élaboration de VTR chroniques par voie orale pour les isomères
ortho, méta et para du chloronitrobenzène

- Avis de l'Afsset
- Rapport d'expertise collective



Le Directeur général

Maisons-Alfort, le 10 août 2009

AVIS

de l'Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail

**Relatif à l'élaboration de VTR chroniques par voie orale du chloronitrobenzène
(isomères ortho, méta et para)**

Saisine Afsset n° « 070057 »

L'Afsset a pour mission de contribuer à assurer la sécurité sanitaire dans les domaines de l'environnement et du travail et d'évaluer les risques sanitaires qu'ils peuvent comporter.

Elle fournit aux autorités compétentes toutes les informations sur ces risques ainsi que l'expertise et l'appui technique nécessaires à l'élaboration des dispositions législatives et réglementaires et à la mise en œuvre des mesures de gestion du risque (article L.1336-1 du Code de la santé publique).

Présentation de la question posée

L'Afsset a été saisie par la direction générale de la santé (DGS) le 12 novembre 2007 afin d'élaborer des valeurs toxicologiques de référence (VTR) pour les isomères ortho, méta et para du chloronitrobenzène (CNB), suite à la contamination de la nappe d'Alsace au nord de Mulhouse par des produits organiques, dont les 3 isomères du chloronitrobenzène, provenant de deux sites industriels.

En parallèle, la DGS a saisi l'Afssa à la même date afin d'élaborer, à partir des VTR construites par l'Afsset, des valeurs limites dans l'eau potable pour ces composés.

Contexte

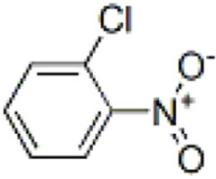
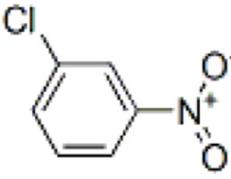
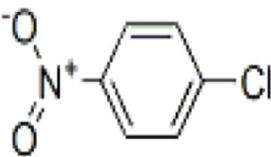
Le chloronitrobenzène (CNB) est utilisé comme intermédiaire de synthèse chimique. Son occurrence naturelle n'est pas connue. Il est retrouvé de manière accidentelle dans l'environnement, en particulier dans l'eau. Il peut par ailleurs être formé à partir des nitrobenzènes lors de la chloration de l'eau potable. Il a également été identifié chez diverses espèces de poissons à proximité de rivières polluées par ce composé. Les données disponibles ne permettent pas d'exclure l'hypothèse selon laquelle l'homme est majoritairement exposé à ce composé et non à ses produits de dégradation. L'exposition humaine peut donc être considérée comme plausible par ingestion d'eau contaminée, par inhalation de vapeurs ou d'aérosols (épisodes de bains et de douches, dégazage de la nappe) et par passage cutané de

AVIS de l'Afsset

vapeurs et/ou d'aérosols de CNB contenus dans l'eau potable (bains, douches). Du fait de ses propriétés physico-chimiques, la principale voie d'exposition chez l'homme, hors exposition professionnelle, semble être la voie orale (ingestion directe ou indirecte d'eau contaminée).

La structure chimique du CNB comporte notamment un atome de chlore en position ortho, méta ou para. Le CNB peut donc se présenter sous la forme de 3 isomères présentant chacun des propriétés toxicocinétiques et toxiques différentes (cf tableau). La construction de VTR spécifiques pour chacun des isomères a donc été envisagée.

Tableau : Identification du CNB

Numéro CAS	88-73-3	121-73-3	100-00-5
Nom	Ortho-chloronitrobenzène	Méta-chloronitrobenzène	Para-chloronitrobenzène
Formule brute	$C_6H_4ClNO_2$	$C_6H_4ClNO_2$	$C_6H_4ClNO_2$
Formule développée			

Organisation de l'expertise

L'Afsset a confié au Comité d'Experts Spécialisés (CES) « Evaluation des risques liés aux substances chimiques » la validation des VTR des isomères ortho-, méta- et para- du chloronitrobenzène (CNB). Pour ce travail, trois experts du groupe de travail (GT) « Valeurs Toxicologiques de Référence et substances cancérigènes » et deux experts du CES « Evaluation des risques liés aux substances chimiques » ont été nommés rapporteurs.

Les travaux ont été présentés à plusieurs reprises pour commentaires au GT « Valeurs Toxicologiques de Référence », les 19 décembre 2008, 13 février 2009 et 10 avril 2009. Les rapports « Elaboration d'une VTR chronique par voie orale fondée sur les effets cancérigènes et non cancérigènes pour l'ortho-chloronitrobenzène (CASRN 88-73-3) », « Elaboration d'une VTR chronique par voie orale fondée sur les effets cancérigènes et non cancérigènes pour le méta-chloronitrobenzène (CASRN 121-73-3) », et « Elaboration d'une VTR chronique par voie orale fondée sur les effets cancérigènes et non cancérigènes pour le para-chloronitrobenzène (CASRN 100-00-5) » ont été soumis au CES « Evaluation des risques sanitaires liés aux substances chimiques » le 20 mars 2008 et validés le 28 mai 2008.

Ce travail est issu d'un collectif d'experts aux compétences complémentaires. Il a été réalisé 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.

Cet avis s'appuie sur les notes d'expertise collective du CES « Evaluation des risques liés aux substances chimiques » et sur le rapport global « Elaboration de VTR par voie orale des isomères ortho, méta et para du chloronitrobenzène ».

VTR de l'ortho-chloronitrobenzène (CASRN 88-73-3)

L'Union européenne n'a pas classé l'ortho-chloronitrobenzène (O-CNB) vis-à-vis de sa cancérogénicité. En 1996, le CIRC a classé l'O-CNB dans le groupe 3 (non classable vis-à-vis de sa cancérogénicité pour l'homme).

Depuis, de nouvelles études de toxicité subchronique, chronique et de cancérogénicité ont été menées, mettant clairement en évidence les effets cancérogènes de l'O-CNB chez l'animal au niveau hépatique (Matsumoto *et al.* 2006¹). Le mécanisme à l'origine de ces tumeurs hépatiques reposerait sur un mécanisme d'action génotoxique.

Par ailleurs, l'O-CNB exerce une toxicité hépatique et hématologique lors d'expositions subchroniques par voie orale et par voie respiratoire chez le rat et chez la souris.

Conformément aux conclusions du rapport d'expertise collective, l'Afsset propose, pour protéger des effets de l'O-CNB par ingestion, deux VTR :

- Une VTR chronique à seuil basée sur les effets hépatotoxiques,
- Une VTR sans seuil basée sur les effets cancérogènes hépatiques (mécanisme d'action génotoxique).

Type de VTR	Effet critique	Dose critique	UF*	VTR
A seuil, voie orale	Toxicité hépatique chez la souris femelle BDF1 Matsumoto <i>et al.</i> (2006) ¹	NOAEL = 14 mg.kg ⁻¹ .j ⁻¹ Ajustement allométrique NOAEL _{aj} ^{**} = 2 mg.kg ⁻¹ .j ⁻¹	25 UF _A (composante toxicodynamique) = 2,5 UF _H = 10	VTR = 80 µg.kg⁻¹.j⁻¹
Sans seuil, voie orale	Hépatocarcinomes et hépatoblastomes chez la souris femelle BDF1 Matsumoto <i>et al.</i> (2006) ¹	BMD _{10L95} ^{***} = 11,7 mg.kg ⁻¹ .j ⁻¹ Ajustement allométrique BMD _{10L95aj} ^{**} = 1,7 mg.kg ⁻¹ .j ⁻¹	-	Après extrapolation linéaire à l'origine : VTR = 6.10⁻⁵ (µg.kg⁻¹.j⁻¹)⁻¹ 0,017 µg.kg ⁻¹ .j ⁻¹ pour un risque de 10 ⁻⁶ 0,17 µg.kg ⁻¹ .j ⁻¹ pour un risque de 10 ⁻⁵ 1,7 µg.kg ⁻¹ .j ⁻¹ pour un risque de 10 ⁻⁴

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

** NOAEL_{aj} / BMD_{10L95aj} : NOAEL / BMD_{10L95} ajustée (ajustement allométrique)

*** BMD_{10L95} : limite inférieure de l'intervalle de confiance à 95% de la benchmark dose correspondant à une augmentation de la réponse par rapport au groupe non exposé de 10%

¹ Matsumoto, M., Umeda, Y., Senoh, H., Suzuki, M., Kano, H., Katagiri, T., Aiso, S., Yamazaki, K., Arito, H., Nagano, K., Yamamoto, S., and Matsushima, T. (2006). Two-year feed study of carcinogenicity and chronic toxicity of ortho-chloronitrobenzene in rats and mice. *J. Toxicol. Sci.* 31(3), 247-264.

VTR du méta-chloronitrobenzène (CASRN 121-73-3)

Le M-CNB n'a pas été classé par l'Union européenne. En 1996, le CIRC a classé le M-CNB dans le groupe 3 (composé non classable vis-à-vis de la cancérogénicité pour l'homme). Aucune donnée de cancérogénicité n'a été retrouvée dans la littérature pour le méta-chloronitrobenzène (M-CNB). Il n'est pas possible de conclure à un quelconque potentiel cancérogène compte tenu du peu de données disponibles chez l'animal et chez l'homme.

Conformément aux conclusions du rapport d'expertise collective, l'Afsset considère que, compte tenu de l'insuffisance de données toxicologiques chez l'animal et chez l'homme, il n'est pas possible d'élaborer une VTR quelque soit le type d'effet pour le M-CNB. Il n'est pas non plus envisageable d'élaborer une VTR par similitude structurale avec les autres chloronitrobenzènes car les profils de génotoxicité sont différents et les profils de toxicité chronique sont différents entre l'O-CNB (essentiellement hépatotoxique) et le P-CNB (essentiellement hématotoxique), et inconnus pour le M-CNB.

VTR du para-chloronitrobenzène (CASRN 100-00-5)

En 2004, l'Union européenne a classé le para-chloronitrobenzène (P-CNB) comme cancérigène de catégorie 3 (substance préoccupante pour l'homme en raison de ses possibles effets cancérigènes) et mutagène de catégorie 3 (substance préoccupante pour l'homme en raison de ses possibles effets mutagènes). En 1996, le CIRC a classé le P-CNB dans le groupe 3 (non classable vis-à-vis de la cancérigénicité pour l'homme).

Depuis, de nouvelles études de toxicité subchronique, chronique et de cancérigénicité ont été menées, mettant clairement en évidence les effets cancérigènes du P-CNB (Matsumoto *et al.* 2006²).

Le P-CNB est hématotoxique lors d'expositions subchroniques par voie orale et par voie respiratoire chez l'animal. Des signes de toxicité hépatique sont également observés chez les rongeurs. L'O-CNB et le P-CNB sont tous deux responsables d'effets hématotoxiques et hépatotoxiques toutefois le P-CNB apparaît davantage hématotoxique que l'O-CNB, en relation avec son fort pouvoir méthémoglobinisant.

Conformément aux conclusions du rapport d'expertise collective, l'Afsset propose, pour protéger des effets du P-CNB par ingestion, deux VTR :

- Une VTR chronique à seuil basée sur les effets hématotoxiques,
- Une VTR sans seuil basée sur les effets cancérigènes spléniques (mécanisme d'action génotoxique).

Type de VTR	Effet critique	Dose critique	UF*	VTR
A seuil, voie orale	Hématotoxicité chez le rat mâle F344 Matsumoto <i>et al.</i> (2006) ²	BMD _{10L95} ** = 3,2 mg.kg ⁻¹ .j ⁻¹ Ajustement allométrique BMD _{10L95aj} *** = 0,85 mg.kg ⁻¹ .j ⁻¹	UF = 25 UF _A (composante toxicodynamique) = 2,5 UF _H = 10	VTR = 34 µg.kg⁻¹.j⁻¹
Sans seuil, voie orale	Hémangiosarcomes de la rate chez le rat mâle F344 Matsumoto <i>et al.</i> (2006) ²	BMD _{10L95} ** = 7,4 mg.kg ⁻¹ .j ⁻¹ Ajustement allométrique BMD _{10L95aj} *** = 1,97 mg.kg ⁻¹ .j ⁻¹	-	Après extrapolation linéaire à l'origine : VTR = 5.10⁻⁵ (µg.kg⁻¹.j⁻¹)⁻¹ 0,02 µg.kg ⁻¹ .j ⁻¹ pour un risque de 10 ⁻⁶ 0,2 µg.kg ⁻¹ .j ⁻¹ pour un risque de 10 ⁻⁵ 2 µg.kg ⁻¹ .j ⁻¹ pour un risque de 10 ⁻⁴

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

** BMD_{10L95} : limite inférieure de l'intervalle de confiance à 95% de la benchmark dose correspondant à une augmentation de la réponse par rapport au groupe non exposé de 10%

*** BMD_{10L95aj} : MD_{10L95} ajustée (ajustement allométrique)

² Matsumoto M, Aiso S, Senoh H, Yamazaki K, Arito H, Nagano K, Yamamoto S, Matsushima T. Carcinogenicity and chronic toxicity of para-chloronitrobenzene in rats and mice by two-year feeding. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 2006;25(3):571-84.

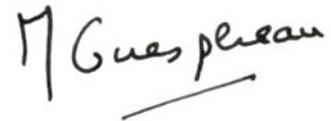
Recommandations

Compte tenu du manque de connaissances sur les mécanismes d'action cancérigène, des VTR sans seuil de dose ont été élaborées pour protéger des effets cancérigènes de l'O-CNB et du P-CNB. Ces VTR sont très protectrices mais leur niveau de confiance est faible. L'agence recommande donc d'initier des recherches en vue de déterminer les mécanismes d'action cancérigène de l'O-CNB et du P-CNB.

L'agence recommande également qu'en raison des incertitudes sur le potentiel cancérigène de l'O-CNB et du P-CNB, des études soient initiées sur les sources et niveaux d'exposition à ces substances, tant en population générale qu'en milieu professionnel, de manière à pouvoir évaluer les risques.

Par ailleurs, d'une manière générale, lors d'une évaluation globale des risques dans un contexte de multi-exposition, il conviendrait de prendre en compte la somme des risques des composés dès lors qu'ils ont les mêmes organes cibles et les mêmes mécanismes d'actions toxiques.

Le Directeur général



Martin GUESPEREAU

**Elaboration de VTR chroniques par voie orale pour les
isomères ortho, méta et para du chloronitrobenzène**

Saisine n°070057

**RAPPORT
d'expertise collective**

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

Groupe de Travail « Valeurs Toxicologiques de Référence »

Avril 2009

Mots clés

Ortho-chloronitrobenzène, para-chloronitrobenzène, méta-chloronitrobenzène, cancer, valeur toxicologique de référence, facteurs d'incertitude, modélisation, dose critique.

Présentation des intervenants

GROUPE DE TRAVAIL « VTR »

Président

M. Dominique LAFON, Médecin toxicologue (Institut National de Recherche et de Sécurité)

Membres

Mme Magali BOIZE, Pharmacien évaluateur de risques sanitaires (EDF - Service des études médicales)

M. Radhouane CHAKROUN, Pharmacien toxicologue (Institut de santé et de sécurité au travail, Tunisie)

M. Dany CHEVALIER, Pharmacien toxicologue (Faculté de Pharmacie de Lille)

M. Frédéric DOR, Pharmacien évaluateur de risques sanitaires (Institut de Veille Sanitaire, Département Santé Environnement)

Mme Fatiha EL GHISSASSI, Docteur en biochimie (Centre International de Recherche sur le Cancer)

M. Michel FALCY, Médecin toxicologue (Institut National de Recherche et de Sécurité)

M. Sébastien GIRAULT, Vétérinaire toxicologue (Cephalon France)

Mme Cécile KAIRO, Evalueur de risques sanitaires (Institut de Veille Sanitaire, Département Santé Environnement)

Mme Bénédicte LA ROCCA, Docteur en toxicologie de l'environnement (Institut National de l'environnement industriel et des risques)

M. Rémy MAXIMILIEN, Médecin toxicologue (Commissariat à l'Energie Atomique, Direction des Sciences du Vivant)

Mme Bette MEEK, Toxicologue évaluateur de risques sanitaires (Université d'Ottawa, Canada)

M. Jean-Ulrich MULLOT, Pharmacien (Service de Santé des Armées)

M. Mostafa OULD ELHKIM, Docteur en toxicologie (Afssaps)

M. Alain-Claude ROUDOT, Enseignant chercheur en statistique et analyse de risque (Université de Bretagne occidentale)

Mme Sylvie TISSOT, Vétérinaire toxicologue (Institut National de l'environnement industriel et des risques)

Mme Laurence VIAN, Pharmacien, professeur des universités en toxicologie (Faculté de Pharmacie de Montpellier)

RAPPORTEURS

Rapporteurs auprès du GT « VTR Cancer » :

Mme Brigitte ENRIQUEZ, Professeur de pharmaco-toxicologie, Ecole nationale vétérinaire d'Alfort - membre du CES « Substances chimiques » et du groupe de travail « VTR Cancer »

Mme. Fatiha EL GHISSASSI, docteur en biochimie, Unité "Identification et évaluation des cancérogènes", Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) – LYON - membre du groupe de travail « VTR Cancer »

M. Frank KARG, Dr. es. Sciences (rer. Nat.), géochimiste, directeur scientifique du Groupe HPC et d'HPC Envirotec - membre du groupe de travail « VTR Cancer »

Rapporteurs auprès du CES « Substances chimiques » :

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

Mme Annie PFOHL-LESZKOWICZ, Professeur d'Université en toxicologie et sécurité alimentaire, Pharmacien-Toxicologue

ADOPTION DU RAPPORT PAR LE COMITE D'EXPERTS SPECIALISES

Ce rapport a été soumis pour commentaires au CES :

- Evaluation des risques liés aux substances chimiques – 20 mars 2008, 29 mai 2008, 26 février 2009, 26 mars 2009, 23 avril 2009

Président

M. Michel GUERBET – Professeur des Universités en toxicologie

Membres

M. Pierre-Marie BADOT – Professeur des Universités en biologie environnementale, Chrono-Environnement, CNRS, Université de Franche-Comté

Mme Claire BEAUSOLEIL – Pharmacien toxicologue, département études et assistance médicales, INRS

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 à l'InVS

Mme Brigitte ENRIQUEZ – Professeur de pharmaco-toxicologie – Ecole nationale vétérinaire d'Alfort

M. Olivier FARDEL – Professeur des Universités en toxicologie

Mme Hélène FENET – Pharmacien, Maître de conférence, département 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 en médecine du travail

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

Mme Barbara GOUGET – Chercheur en toxicologie des contaminants physico-chimiques, Toxicologue à l'AFSSA

Mme Dominique GUENOT – Chercheur en cancérologie et neurosciences

M. Cong Khanh HUYNH – Dr 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, LNE

Mme Annie LAUDET-HESBERT – Pharmacien toxicologue, retraitée

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 – Chef de projet – Pharmacien, CEA

Mme Annie PFOHL-LESZKOWICZ – Professeur d'Université 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 au CIRC 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 discussion en réunion d'échange et commentaires, le rapport a été approuvé par les membres du groupe de travail.

Il a été adopté par le CES Evaluation des risques liés aux substances chimiques le 23 avril 2009.

PARTICIPATION AFSSET

Rédaction du rapport

Mme Violaine Jabbour – Interne pharmacie – toxicologue – Afsset

M. Laurent Bodin – Chef de projet scientifique – toxicologue – Afsset

Contribution scientifique

M. Christophe Rousselle – Chef d'unité – toxicologue – Afsset

Mme Aurélie Mathieu – Chargée de projet scientifique – Afsset

Mme Cécilia Solal - Chef de projet scientifique – toxicologue – Afsset

Secrétariat administratif

Mme Séverine Boix – Afsset

Mme Christina Calmels – Afsset

SOMMAIRE

Présentation des intervenants.....	3
Expertise collective : synthèse et conclusions.....	10
Abréviations	27
Liste des tableaux	28
Liste des figures	29
Liste des annexes	29
1 Contexte, objet et modalités de traitement de la saisine.....	30
1.1 Contexte.....	30
1.2 Objet de la saisine.....	30
1.3 Modalités de traitement : moyens mis en œuvre et organisation.....	30
2 Ortho-chloronitrobenzène (CASRN 88-73-3)	32
2.1 Profil toxicologique de l'O-CNB	32
2.1.1 Informations générales	32
2.1.1.1 Identification de la substance	32
2.1.1.2 Propriétés physico-chimiques.....	32
2.1.1.3 Plausibilité d'exposition humaine.....	33
2.1.2 Toxicocinétique	34
2.1.2.1 Absorption	34
2.1.2.2 Distribution	34
2.1.2.3 Métabolisme	34
2.1.2.4 Excrétion - élimination	35
2.1.3 Toxicité aiguë	35
2.1.3.1 Voie inhalée.....	35
2.1.3.2 Voie orale	35
2.1.3.3 Voie cutanée	35
2.1.4 Toxicité subchronique et chronique	35
2.1.4.1 Données animales.....	35
2.1.4.2 Données humaines	36
2.1.5 Reprotoxicité	36
2.1.6 Génotoxicité	36
2.1.7 Effets cancérogènes	38
2.2 Elaboration de VTR pour la voie orale	39
2.2.1 Choix et description de l'étude clé	39
2.2.2 Elaboration de VTR sans seuil	40
2.2.2.1 Mécanisme d'action cancérogène proposé et cohérence des données animales et humaines	41
2.2.2.2 Choix de l'effet critique	41
2.2.2.3 Choix de la dose repère (POD) et extrapolation à l'origine	43

2.2.2.4	Ajustements.....	44
2.2.2.5	Calcul de la VTR	44
2.2.2.6	Synthèse	45
2.2.3	Elaboration de VTR à seuil	45
2.2.3.1	Mécanisme d'action proposé et cohérence des données animales et humaines	45
2.2.3.2	Choix de l'effet critique et de la dose repère	46
2.2.3.3	Ajustements.....	46
2.2.3.4	Choix des facteurs d'incertitude (UF)	46
2.2.3.5	Calcul de la VTR	47
2.2.3.6	Synthèse	47
2.3	Elaboration de VTR pour la voie inhalée	47
3	Méta-chloronitrobenzène (CASRN 121-73-3)	49
3.1	Profil toxicologique du M-CNB.....	49
3.1.1	Informations générales	49
3.1.1.1	Identification de la substance	49
3.1.1.2	Propriétés physico-chimiques.....	49
3.1.1.3	Plausibilité d'exposition humaine.....	50
3.1.2	Toxicocinétique - Toxicodynamie	50
3.1.3	Toxicité aiguë	51
3.1.3.1	Voie inhalée.....	51
3.1.3.2	Voie orale	51
3.1.3.3	Voie cutanée	51
3.1.4	Toxicité subchronique et chronique	51
3.1.4.1	Données animales.....	51
3.1.4.2	Données humaines	51
3.1.5	Reprotoxicité	51
3.1.6	Génotoxicité	51
3.1.7	Effets cancérogènes et mécanismes d'action	53
3.2	Elaboration de la VTR du M-CNB pour la voie orale et pour la voie inhalée	53
3.2.1	VTR existantes.....	53
3.2.2	Mécanisme d'action proposé et cohérence des données animales et humaines	54
3.2.3	Calcul de la VTR	54
4	Para-chloronitrobenzène (CASRN 100-00-5).....	55
4.1	Profil toxicologique du P-CNB	55
4.1.1	Informations générales	55
4.1.1.1	Identification de la substance	55
4.1.1.2	Propriétés physico-chimiques.....	55
4.1.1.3	Plausibilité d'exposition humaine.....	56
4.1.2	Toxicocinétique	57
4.1.2.1	Absorption	57
4.1.2.2	Distribution	57
4.1.2.3	Métabolisme	57
4.1.2.4	Excrétion - élimination	58
4.1.3	Toxicité aiguë	58
4.1.3.1	Voie inhalée.....	58
4.1.3.2	Voie orale	59
4.1.3.3	Voie cutanée	59
4.1.4	Toxicité subchronique et chronique	59
4.1.4.1	Données animales.....	59
4.1.4.2	Données humaines	59

4.1.5	Reprotoxicité	60
4.1.6	Génotoxicité	60
4.1.7	Effets cancérigènes	62
4.2	Elaboration de VTR pour la voie orale	62
4.2.1	Choix et description de l'étude clé	63
4.2.2	Elaboration de VTR sans seuil	65
4.2.2.1	Mécanisme d'action cancérigène proposé et cohérence des données animales et humaines	65
4.2.2.2	Choix de l'effet critique	66
4.2.2.3	Choix de la dose repère (POD) et extrapolation à l'origine	66
4.2.2.4	Ajustements.....	67
4.2.2.5	Calcul de la VTR	67
4.2.2.6	Synthèse	68
4.2.3	Elaboration de VTR à seuil	68
4.2.3.1	Mécanisme d'action hématotoxique proposé et cohérence des données animales et humaines.....	68
4.2.3.2	Choix de l'effet critique et de la dose repère	69
4.2.3.3	Ajustements.....	71
4.2.3.4	Choix des facteurs d'incertitude (UF)	72
4.2.3.5	Calcul de la VTR	72
4.2.4	Synthèse	73
4.2.5	Elaboration de VTR pour la voie inhalée	73
5	Conclusion et mise en perspective	74
5.1	Ortho-chloronitrobenzène	74
5.2	Méta-chloronitrobenzène.....	75
5.3	Para-chloronitrobenzène	76
6	Bibliographie.....	78
6.1	Ortho-chloronitrobenzène	78
6.2	Méta-chloronitrobenzène.....	80
6.3	Para-chloronitrobenzène	81
ANNEXES	83

Expertise collective : synthèse et conclusions



EXPERTISE COLLECTIVE : SYNTHÈSE ET CONCLUSIONS

Relatif à l'élaboration de VTR chroniques par voie orale fondées sur les effets
cancérogènes et non cancérogènes pour l'ortho-chloronitrobenzène
(CASRN 88-73-3)

Saisine Afsset n°070057

Ce document synthétise les travaux des rapporteurs et présente les éventuels compléments du
Comité d'Experts Spécialisés « Evaluation des risques liés aux substances chimiques »

Présentation de la question posée

L'Afsset a été saisie par la Direction Générale de la Santé le 12 novembre 2007 afin d'élaborer des valeurs toxicologiques de référence (VTR) pour les isomères ortho, méta et para du chloronitrobenzène (CNB), suite à la contamination de la nappe d'Alsace au nord de Mulhouse par des produits organiques provenant de deux sites industriels et comportant du chloronitrobenzène.

Ce document présente la démarche d'élaboration de VTR et les résultats obtenus, pour l'un des isomères, l'ortho-chloronitrobenzène.

Organisation de l'expertise

Un examen préliminaire de cette saisine a été effectué par le CES « Evaluation des risques liés aux substances chimiques » lors de sa séance du 24 janvier 2008 et par le groupe de travail « VTR Cancer » le 31 janvier 2008. A l'issue de cet examen, le CES a confirmé l'intérêt de construire prioritairement des VTR pour les isomères ortho et para du CNB par voie orale, la pertinence de dériver des VTR pour les autres voies devant être évaluée.

Trois experts membres du GT « VTR cancérogènes », et deux experts membres du CES « Evaluation des risques liés aux substances chimiques » ont été nommés rapporteurs respectivement les 22 février 2008 et 26 mars 2009 pour examiner le mécanisme d'action cancérogène des isomères du CNB de manière à pouvoir déterminer la nature de la relation dose-effet (à seuil de dose ou sans seuil de dose).

Une analyse détaillée de la littérature actuellement disponible sur le CNB a été effectuée par l'Afsset et transmise aux rapporteurs.

Les travaux ont été présentés à plusieurs reprises pour commentaires au GT « Valeurs Toxicologiques de Référence », les 19 décembre 2008, 13 février 2009 et 10 avril 2009.

Les données toxicologiques disponibles ont été présentées au CES « Chimie » le 26 février 2009 et ont fait l'objet de questions et de demandes d'éclaircissements. Sur la base de ces remarques, une réunion d'échange entre l'Afsset et les rapporteurs a eu lieu le 10 avril 2009.

Les travaux d'expertise ont été soumis au CES le 20 mars 2009 pour commentaires et le 28 mai 2009 pour adoption.

Ces travaux d'expertise sont 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.

- Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail
253 av. du Général Leclerc 94701 Maisons-Alfort Cedex
Tél. 01.56.29.19.30 Fax 01.43.96.37.67 Mèl afssset@afssset.fr
www.afssset.fr

Description de la méthode de construction d'une VTR

La construction des VTR diffère en fonction de l'hypothèse formulée ou des données acquises sur les mécanismes d'action toxique de la substance.

L'Afsset a publié en 2007 un rapport méthodologique¹ décrivant la démarche de construction de VTR fondées sur des effets reprotoxiques qui peuvent être considérés comme un modèle d'effets à seuil. La méthode de construction de VTR pour des substances exerçant des effets sans seuil de dose est en cours d'élaboration par un groupe de travail dédié aux effets cancérogènes. Cette méthode est détaillée dans le « Document de référence pour la construction d'une VTR fondée sur des effets cancérogènes ». Une version préliminaire de ce document a servi de guide pour l'élaboration des VTR du CNB.

Dans le cas d'une VTR sans seuil, l'effet apparaît quelle que soit la dose reçue et la probabilité de survenue croît avec la dose. La VTR s'exprime alors sous la forme d'un ERU (excès de risque unitaire), et se définit comme la probabilité supplémentaire, par rapport à un sujet non exposé, qu'un individu développe une pathologie (en l'occurrence ici, le cancer), s'il est exposé pendant sa vie entière à une unité de dose de la substance.

Dans le cas d'une VTR à seuil, l'hypothèse de construction de la VTR basée sur des effets donnés suit une relation à seuil de dose. L'effet n'est susceptible d'apparaître qu'à partir d'une certaine dose reçue, qui correspond à la VTR.

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 (ou dose – effet) ;
- 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 (dans le cas d'une VTR à seuil) ou extrapolation à l'origine (dans le cas d'une VTR sans seuil).

Résultats de l'expertise collective

Recueil des données toxicologiques

- Toxicité générale

L'ortho-chloronitrobenzène (O-CNB) exerce une toxicité hépatique et hématologique lors d'expositions subchroniques par voie orale et par voie respiratoire, chez le rat et chez la souris (Matsumoto *et al.* 2006a; NTP 1993; Matsumoto *et al.* 2006b). Les lésions histologiques suivantes ont été observées : nécrose et dégénérescence hépatique chez les rats ; hépatocytes atypiques avec un noyau élargi chez les souris. De plus, d'un point de vue biochimique, l'activité enzymatique des ALAT (Alanine Amino Transférases) est augmentée. Cette augmentation est considérée comme le reflet d'une cytolysse des hépatocytes, à l'origine d'une libération des transaminases hépatiques dans le sang.

Par ailleurs, l'O-CNB est hématotoxique. Les modifications observées sont d'ordre hématologique, biochimique et anatomopathologique : les animaux présentent une anémie et une élévation du taux de bilirubine et de la méthémoglobinémie ; la rate est congestionnée et

¹ Document de référence pour la construction d'une valeur toxicologique de référence fondée sur des effets reprotoxiques
http://www.afsset.fr/upload/bibliotheque/210401124823782117964751534907/VTR_rapport_afsset.pdf

présente des dépôts d'hémossidérine ; enfin, une hématopoïèse extramédullaire splénique est observée, témoignant d'un phénomène compensatoire en réponse à l'anémie (Matsumoto *et al.* 2006a; Matsumoto *et al.* 2006b; NTP 1993).

Il est à noter également que la plupart des rats traités par de l'O-CNB -y compris les rats femelles- sont atteints de troubles rénaux et présentent, en particulier, une néphropathie chronique progressive (Matsumoto *et al.* 2006b).

- **Génotoxicité**

Les résultats des différents tests de génotoxicité réalisés *in vitro* et *in vivo* montrent que l'O-CNB est une substance génotoxique. Ce potentiel génotoxique semble toutefois assez faible : en particulier, lors du test d'Ames (TA 98, TA 1538, WP2uvrA), seules des concentrations élevées (mais non bactériotoxiques) en O-CNB induisent des effets génotoxiques (IARC 1996; OCDE 2001). Par ailleurs, l'O-CNB entraîne, chez le rat et chez l'homme, la formation d'adduits à l'hémoglobine (Jones *et al.* 2006; Sabbioni 1994), argument supplémentaire en faveur d'un potentiel génotoxique.

- **Cancérogénicité**

Le CIRC a classé en 1996 l'O-CNB dans le groupe 3 (non classable vis-à-vis de sa cancérogénicité pour l'homme). L'Union Européenne n'a pas classé l'O-CNB. Depuis 1996, de nouvelles études de toxicité subchronique, chronique et de cancérogénicité ont été menées, mettant clairement en évidence les effets cancérogènes de l'O-CNB (Matsumoto *et al.* 2006b). Ces données seraient selon les experts, de nature à modifier le classement de ce composé.

L'exposition par voie orale à l'O-CNB est responsable de l'apparition de tumeurs hépatiques : adénomes et carcinomes hépatocellulaires chez le rat et la souris mâle et femelle et hépatoblastomes chez la souris mâle et femelle. Chez la souris, des métastases apparaissent essentiellement dans les poumons (Matsumoto *et al.* 2006b).

Une étude antérieure (Weisburger *et al.* 1978) avait mis en évidence, après exposition à l'O-CNB par voie orale, une augmentation de la fréquence des cancers hépatiques chez les souris mâles et femelles et une augmentation de la fréquence de plusieurs cancers chez le rat. Cependant, les résultats de cette étude sont à interpréter avec prudence du fait de la méthodologie insuffisante (durée d'exposition courte, doses en O-CNB élevées, méthodologie brièvement décrite, données d'histopathologie limitées,...) (IARC 1996; OCDE 2001).

Analyse et évaluation des choix pour la construction de VTR

Choix de l'étude clé

Une étude de cancérogénicité répond aux critères scientifiques définis par l'Afsset dans la méthode de construction des VTR permettant de dériver une VTR. Il s'agit de l'étude de Matsumoto *et al.* (2006b), qui est une étude de cancérogénicité et de toxicité chronique (2 ans) chez le rat (F344) et la souris (B6F₁), cotée 1a selon les critères de Klimisch. Dans cette étude, des groupes de 50 animaux du même sexe ont été exposés à différentes doses d'O-CNB contenu dans la nourriture, 7 jours sur 7 pendant 2 ans (trois doses testées en plus du témoin). Cette étude montre notamment que l'O-CNB est un cancérogène hépatique : il est responsable de la formation d'adénomes et de carcinomes hépatocellulaires chez le rat et la souris, mâle et femelle. Des hépatoblastomes sont de plus observés chez la souris (souris âgée uniquement). Le potentiel cancérogène est nettement plus prononcé chez la souris que chez le rat (incidence de tumeurs hépatiques plus élevée, développement de métastases en particulier métastases pulmonaires). Le rat est plus sensible que la souris à la néphrotoxicité (créatinémie et urémie élevées), conduisant à la mort de tous les rats mâles à la plus forte dose. Enfin, des perturbations biochimiques sont observées, en particulier une élévation des enzymes hépatiques (ALAT, ASAT, γ -GT et LDH) avec une augmentation significative à partir de 54 mg.kg⁻¹.j⁻¹ chez la souris mâle, et 69 mg.kg⁻¹.j⁻¹ chez la souris femelle.

Construction d'une VTR pour les effets cancérogènes*Mécanisme d'action cancérogène de l'O-CNB*

Le mécanisme génotoxique de l'O-CNB dans l'apparition de tumeurs hépatiques passerait par la production de métabolites réactifs et mutagènes dont la 2-chloroaniline (Matsumoto *et al.* 2006b).

Choix de l'effet critique

L'exposition par voie orale à l'O-CNB induit l'apparition de tumeurs hépatiques : adénomes et carcinomes hépatocellulaires chez le rat et la souris et hépatoblastomes uniquement chez la souris.

En raison de la relation dose-réponse significative et de la pertinence biologique de prendre en compte les deux types de tumeurs, le cumul des incidences tumorales des hépatoblastomes et des carcinomes hépatocellulaires chez la souris femelle a été retenu comme effet critique.

Incidences de tumeurs lors d'une exposition à l'O-CNB chez la souris BDF1 femelle

	Doses journalières d'exposition (mg.kg ⁻¹ .j ⁻¹)			
	0*	14*	69*	396*
Carcinomes hépatocellulaires	0	3	14	48
Hépatoblastomes	0	0	9	28
Carcinomes hépatocellulaires et hépatoblastomes (cumul) **	0	3	20	48

* 50 animaux par groupe de dose

** Nombre d'animaux portant au moins une tumeur

Calcul de la VTR

Dans le cas de la construction d'une VTR sans seuil de dose, le choix du « *Point of departure* » (POD) est déterminé par une modélisation des données expérimentales correspondant à une benchmark dose (BMD). Ainsi, les données ont été ajustées par les modèles développés par le RIVM (Proast software version 18.2) pour des données dichotomiques (modèles gamma, logistique, multi-étapes, probit et Weibull).

Le choix du modèle s'est fait sur celui qui s'ajustait le mieux aux données par la méthode du maximum de vraisemblance ($p > 0,1$). Au final, le modèle gamma a été retenu pour l'estimation de la limite inférieure de l'intervalle de confiance à 95% d'une dose correspondant à une augmentation de 10% de la réponse par rapport au groupe non exposé (BMD_{10L95}).

Un ajustement allométrique a ensuite été réalisé selon les recommandations de l'US EPA (US EPA 2006) :

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

La masse moyenne de la souris est estimée à 30g, la masse de l'homme, à 70kg. Les doses sont exprimées en mg.kg⁻¹.j⁻¹.

$$\begin{aligned} \text{Dose critique chez la souris :} & \quad \text{BMD}_{10L95} = 11,7 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1} \\ \text{Dose ajustée chez l'homme :} & \quad \text{BMD}_{10L95} = 1,7 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1} \end{aligned}$$

L'extrapolation linéaire réalisée ensuite consiste en une droite tracée depuis le POD jusqu'à l'origine représentant le risque (pente) de développer un cancer en fonction de la dose.

Après extrapolation linéaire aux faibles doses :

$$\text{VTR} = 6.10^{-5} (\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1})^{-1}$$

Ainsi, un excès de risque de 10⁻⁶ de développer un cancer correspondrait à une exposition par voie orale de 0,017 μg.kg⁻¹.j⁻¹.

Construction d'une VTR chronique pour les effets non cancérogènes*Mécanisme d'action hépatotoxique de l'O-CNB*

L'O-CNB -et/ou ses métabolites- exerce une action cytotoxique sur les hépatocytes, aboutissant à une lyse cellulaire avec libération des enzymes hépatiques dans le sang. La cytotoxicité hépatique se manifeste notamment par une élévation du taux des enzymes hépatiques (ALAT, ASAT, γ -GT).

Choix de l'effet critique

Il a été proposé de retenir comme point de départ le NOAEL pour l'élévation des ALAT, qui sont les enzymes les plus spécifiques des lésions hépatiques. Le calcul d'une Benchmark dose n'a pas pu être réalisé car les données expérimentales ne pouvaient pas être modélisées.

Élévation des ALAT chez la souris femelle

DJE ($\text{mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$)	0	14	69	396
Nombre d'animaux examinés	29	34	26	4
ALAT (UI/L) (moyenne \pm écart type)	36 \pm 27	51 \pm 62	480 \pm 816*	2115 \pm 779*

DJE : Dose journalière d'Exposition, * significatif $p < 0,01$ (test de Dunnett)

Calcul de la VTR

Dans un souci de cohérence avec la VTR sans seuil calculée chez la souris femelle, le calcul de la VTR à seuil n'a été effectué que pour la souris femelle.

Un ajustement allométrique a été appliquée sur le NOAEL retenu selon les recommandations de l'US EPA (US EPA 2006).

Les facteurs d'incertitude suivants ont été appliqués :

- UF_A de 2,5 pour la variabilité inter-espèces (variabilité toxicodynamique et incertitudes résiduelles (Afsset 2007).
- UF_H de 10 pour la variabilité interindividuelle (Afsset 2007).

La VTR a été calculée comme suit :

$$VTR = \frac{NOAEL}{UF_A \times UF_H} \text{ pour les effets hépatotoxiques}$$

Avec $UF_A = 2,5$; $UF_H = 10$; NOAEL ajustée = $2 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$

Soit une VTR orale basée sur les effets hépatotoxiques = $80 \mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$

Conclusions et recommandations de l'expertise collective

L'étude de Matsumoto *et al.* (2006b) a mis en évidence que l'exposition à l'O-CNB par ingestion était responsable de l'apparition de tumeurs hépatiques chez le rat et la souris. Le mécanisme à l'origine des tumeurs du foie reposerait sur un mécanisme d'action génotoxique.

En parallèle, l'O-CNB exercerait une action hépatotoxique, avec cytolysse des hépatocytes se manifestant par une élévation des enzymes hépatiques en particulier des ALAT.

Deux VTR orales ont été élaborées au regard des effets observés chez l'animal et des mécanismes d'action :

- Une VTR sans seuil basée sur les effets cancérogènes hépatiques (mécanisme d'action génotoxique),
- Une VTR chronique à seuil basée sur les effets hépatotoxiques.

Le niveau de confiance de la VTR sans seuil de l'O-CNB a été considéré comme faible en raison des incertitudes relatives au mécanisme d'action cancérogène.

Expertise collective : synthèse et conclusions

Saisine n°070057

Type de VTR	Effet critique	Dose critique	UF**	VTR
A seuil, voie orale	Toxicité hépatique chez la souris femelle BDF1 Matsumoto <i>et al.</i> (2006) ¹	NOAEL = 14 mg.kg ⁻¹ .j ⁻¹ NOAEL _{AJ} * = 2 mg.kg ⁻¹ .j ⁻¹	25 UF _A = 2,5 UF _H = 10	VTR = 80 µg.kg ⁻¹ .j ⁻¹
Sans seuil, voie orale	Hépatocarcinomes et hépatoblastomes chez la souris femelle BDF1 Matsumoto <i>et al.</i> (2006) ¹	BMD _{10L95} = 11,7 mg.kg ⁻¹ .j ⁻¹ BMD _{10L95AJ} * = 1,7 mg.kg ⁻¹ .j ⁻¹	-	Après extrapolation linéaire à l'origine : VTR = 6.10 ⁻⁵ (µg.kg ⁻¹ .j ⁻¹) ⁻¹ 0,017 µg.kg ⁻¹ .j ⁻¹ pour un risque de 10 ⁻⁶ 0,17 µg.kg ⁻¹ .j ⁻¹ pour un risque de 10 ⁻⁵ 1,7 µg.kg ⁻¹ .j ⁻¹ pour un risque de 10 ⁻⁴

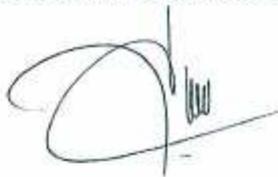
* NOAEL_{AJ} = NOAEL ajusté chez l'homme, BMD_{10L95AJ} = BMD_{10L95} ajusté chez l'homme** UF = *uncertainty factors* (facteurs d'incertitude). UF : facteur d'incertitude global (appliqué), UF_A : variabilité inter-espèces, UF_H : variabilité individuelle

Le Comité d'Experts Spécialisés « Evaluation des risques liés aux substances chimiques » adopte le rapport d'expertise collective lors de sa séance du 23 avril 2009 et fait part de cette adoption à la direction générale de l'Afsset.

Maisons-Alfort, le 28 mai 2009

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

le président du CES, Michel Guerbet



Bibliographie

Fin de la revue bibliographique : Février 2009

1. Afsset. Valeurs toxicologiques de référence (VTR) pour les substances reprotoxiques. 2007.
Ref Type: Report
2. IARC (1996). 2-Chloronitrobenzene, 3-chloronitrobenzene and 4-chloronitrobenzene. *IARC Monogr Eval. Carcinog. Risks Hum.* 65, 263-296.
3. Jones, C. R., Liu, Y. Y., Sepai, O., Yan, H., and Sabbioni, G. (2006). Internal exposure, health effects, and cancer risk of humans exposed to chloronitrobenzene. *Environ. Sci. Technol.* 40(1), 387-394.
4. Matsumoto, M., Aiso, S., Umeda, Y., Arito, H., Nagano, K., Yamamoto, S., and Matsushima, T. (2006a). Thirteen-week oral toxicity of para- and ortho- chloronitrobenzene in rats and mice. *J. Toxicol. Sci.* 31(1), 9-22.
5. Matsumoto, M., Umeda, Y., Senoh, H., Suzuki, M., Kano, H., Katagiri, T., Aiso, S., Yamazaki, K., Arito, H., Nagano, K., Yamamoto, S., and Matsushima, T. (2006b). Two-year feed study of carcinogenicity and chronic toxicity of ortho-chloronitrobenzene in rats and mice. *J. Toxicol. Sci.* 31(3), 247-264.
6. NTP. 2-Chloronitrobenzene and 4-Chloronitrobenzene administered by inhalation for F344/N Rats and B6C3F Mice (NIH Publication 93-3382). 1993.
Ref Type: Report
7. OCDE. SIDS initial Assessment Report for SIAM 13; 1-Chloro-2-nitrobenzene. 2001.
Ref Type: Report
8. Sabbioni, G. (1994). Hemoglobin binding of arylamines and nitroarenes: molecular dosimetry and quantitative structure-activity relationships. *Environ. Health Perspect.* 102 Suppl 6, 61-67.
9. US EPA. 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
10. Weisburger, E. K., Russfield, A. B., Homburger, F., Weisburger, J. H., Boger, E., Van Dongen, C. G., and Chu, K. C. (1978). Testing of twenty-one environmental aromatic amines or derivatives for long-term toxicity or carcinogenicity. *J. Environ. Pathol. Toxicol.* 2(2), 325-356.



EXPERTISE COLLECTIVE : SYNTHÈSE ET CONCLUSIONS

Relatives à l'élaboration de Valeur toxicologique de référence (VTR) pour le
méta-chloronitrobenzène (CASRN 121-73-3)

Saisine Afsset n°070057

Ce document synthétise les travaux des rapporteurs et présente les éventuels compléments du
Comité d'Experts Spécialisés « Evaluation des risques liés aux substances chimiques »

Présentation de la question posée

L'Afsset a été saisie par la Direction Générale de la Santé le 12 novembre 2007 afin d'élaborer des valeurs toxicologiques de référence (VTR) pour les isomères ortho, méta et para du chloronitrobenzène (CNB), suite à la contamination de la nappe d'Alsace au nord de Mulhouse par des produits organiques provenant de deux sites industriels et comportant du chloronitrobenzène.

Ce document présente la démarche qui a finalement conduit à ne pas élaborer de VTR pour le M-CNB.

Organisation de l'expertise

Un examen préliminaire de cette saisine a été effectué par le CES « Evaluation des risques liés aux substances chimiques » lors de sa séance du 24 janvier 2008 et par le groupe de travail « VTR Cancer » le 31 janvier 2008. A l'issue de cet examen, le CES a confirmé l'intérêt de construire prioritairement des VTR pour les isomères ortho et para du CNB par voie orale, la pertinence de dériver des VTR pour les autres voies devant être évaluée. La question d'élaborer une VTR pour le M-CNB a également été posée. Cet isomère est le moins stable que les deux autres et a donc moins de chance d'être produit en proportion importante par rapport à eux.

Trois experts membres du GT « VTR cancérigènes », et deux experts membres du CES « Evaluation des risques liés aux substances chimiques » ont été nommés rapporteurs respectivement les 22 février 2008 et 26 mars 2009 pour examiner le mécanisme d'action cancérigène des isomères du CNB de manière à pouvoir déterminer la nature de la relation dose-effet (à seuil de dose ou sans seuil de dose).

Une analyse détaillée de la littérature actuellement disponible sur le CNB a été effectuée par l'Afsset et transmise aux rapporteurs.

Les travaux ont été présentés à plusieurs reprises pour commentaires au GT « Valeurs Toxicologiques de Référence », les 19 décembre 2008, 13 février 2009 et 10 avril 2009.

Ces travaux d'expertise sont 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.

• Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail
253 av. du Général Leclerc 94701 Maisons-Alfort Cedex
Tél. 01.56.29.19.30 Fax 01.43.96.37.67 Mèl afsset@afsset.fr
www.afsset.fr

Résultats de l'expertise collective

Recueil des données toxicologiques

- Toxicité générale

La toxicité générale du méta-chloronitrobenzène (M-CNB) est très peu renseignée, quelle que soient la voie et la durée d'exposition. Seules quelques données de toxicité aiguë sont disponibles chez l'animal.

- Génotoxicité

La plupart des tests classiques de génotoxicité sont négatifs *in vitro* et *in vivo*.

- Cancérogénicité

En 1996, le CIRC a classé le M-CNB dans le groupe 3 (composé non classable vis-à-vis de la cancérogénicité pour l'homme). Le M-CNB n'a pas été classé par l'Union Européenne. Aucune donnée de cancérogénicité n'a été retrouvée dans la littérature. Il n'est pas possible de conclure à un quelconque potentiel cancérogène pour le M-CNB compte-tenu du peu de données disponibles chez l'animal et chez l'homme.

Faisabilité d'élaboration d'une VTR pour le M-CNB

Compte-tenu de l'insuffisance de données toxicologiques chez l'animal et chez l'homme, il n'est pas possible d'élaborer une VTR pour ce composé.

Il n'est pas non plus envisageable d'élaborer une VTR par similitude structurale avec les autres chloronitrobenzènes car les profils de génotoxicité sont différents et les profils de toxicité chronique sont différents entre l'O-CNB (essentiellement hépatotoxique) et le P-CNB (essentiellement hématotoxique), et inconnus pour le M-CNB.

Conclusions et recommandations de l'expertise collective

Aucune VTR n'a pu être élaborée pour le M-CNB, quelle que soit la voie d'exposition.

Le Comité d'Experts Spécialisés « Evaluation des risques liés aux substances chimiques » adopte le rapport d'expertise collective lors de sa séance du 23 avril 2009 et fait part de cette adoption à la direction générale de l'Afsset.

Maisons-Alfort, le 28 mai 2009

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

le président du CES, Michel Guerbet





EXPERTISE COLLECTIVE : SYNTHÈSE ET CONCLUSIONS

Relatif à l'élaboration de VTR chroniques par voie orale fondées sur les effets
cancérogènes et non cancérogènes pour le para-chloronitrobenzène
(CASRN 100-00-5)

Saisine Afsset n°070057

Ce document synthétise les travaux des rapporteurs et présente les éventuels compléments du
Comité d'Experts Spécialisés « Evaluation des risques liés aux substances chimiques »

Présentation de la question posée

L'Afsset a été saisie par la Direction Générale de la Santé le 12 novembre 2007 afin d'élaborer des valeurs toxicologiques de référence (VTR) pour les isomères ortho, méta et para du chloronitrobenzène (CNB), suite à la contamination de la nappe d'Alsace au nord de Mulhouse par des produits organiques provenant de deux sites industriels comportant du chloronitrobenzène.

Ce document présente la démarche d'élaboration des VTR et les résultats obtenus pour l'un des isomères, le para-chloronitrobenzène.

Organisation de l'expertise

Un examen préliminaire de cette saisine a été effectué par le CES « Evaluation des risques liés aux substances chimiques » lors de sa séance du 24 janvier 2008 et par le groupe de travail « VTR Cancer » le 31 janvier 2008. A l'issue de cet examen, le CES a confirmé l'intérêt de construire prioritairement des VTR pour les isomères ortho et para du CNB par voie orale, la pertinence de dériver des VTR pour les autres voies devant être évaluée.

Trois experts membres du GT « VTR cancérogènes », et deux experts membres du CES « Evaluation des risques liés aux substances chimiques » ont été nommés rapporteurs respectivement les 22 février 2008 et 26 mars 2009 pour examiner le mécanisme d'action cancérogène des isomères du CNB de manière à pouvoir déterminer la nature de la relation dose-effet (à seuil de dose ou sans seuil de dose).

Une analyse détaillée de la littérature actuellement disponible sur le CNB a été effectuée par l'Afsset et transmise aux rapporteurs.

Les travaux ont été présentés à plusieurs reprises pour commentaires au GT « Valeurs Toxicologiques de Référence », les 19 décembre 2008, 13 février 2009 et 10 avril 2009.

Les données toxicologiques disponibles ont été présentées au CES « Chimie » le 26 mars 2009 et ont fait l'objet de questions et de demandes d'éclaircissements. Sur la base de ces remarques, une réunion d'échange entre l'Afsset et les rapporteurs a eu lieu le 10 avril 2009. Les travaux d'expertise ont été soumis au CES le 20 mars 2009 pour commentaires et le 28 mai 2009 pour adoption.

Ces travaux d'expertise sont 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.

• Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail
253 av. du Général Leclerc 94701 Maisons-Alfort Cedex
Tél. 01.56.29.19.30 Fax 01.43.96.37.67 M@il afsset@afsset.fr
www.afsset.fr

Description de la méthode de construction d'une VTR

La construction des VTR diffère en fonction de l'hypothèse formulée ou des données acquises sur les mécanismes d'action toxique de la substance.

L'Afsset a publié en 2007 un rapport méthodologique¹ décrivant la démarche de construction de VTR fondées sur des effets reprotoxiques qui peuvent être considérés comme un modèle d'effets à seuil. La méthode de construction de VTR pour des substances exerçant des effets sans seuil de dose est en cours d'élaboration par un groupe de travail dédié aux effets cancérigènes. Cette méthode est détaillée dans le « Document de référence pour la construction d'une VTR fondée sur des effets cancérigènes ». Une version préliminaire de ce document a servi de guide pour l'élaboration des VTR du P-CNB.

Dans le cas d'une VTR sans seuil, l'effet peut apparaître quelle que soit la dose reçue et la probabilité de survenue croît avec la dose. La VTR s'exprime alors sous la forme d'un ERU (excès de risque unitaire), et se définit comme la probabilité supplémentaire, par rapport à un sujet non exposé, pour qu'un individu développe une pathologie (en l'occurrence ici, le cancer), s'il est exposé pendant sa vie entière à une unité de dose de la substance.

Dans le cas d'une VTR à seuil, l'hypothèse de construction de la VTR basée sur des effets donnés suit une relation à seuil de dose. L'effet n'est susceptible d'apparaître qu'à partir d'une certaine dose reçue, qui correspond à la VTR.

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 (ou dose – effet) ;
- 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 (dans le cas d'une VTR à seuil) ou extrapolation à l'origine (dans le cas d'une VTR sans seuil).

Résultats de l'expertise collective

Recueil des données toxicologiques

- Toxicité générale

Le para-chloronitrobenzène (P-CNB) a une toxicité hématologique lors d'expositions subchroniques par voie orale et par voie respiratoire chez l'animal. Cette hématotoxicité s'exprime par une anémie accompagnée d'une élévation du taux sanguin de bilirubine, une hypertrophie de la rate et des dépôts d'hémossidérine. Chez l'animal, une hématopoïèse extramédullaire est observée dans la rate, puis dans le foie. Cette hématopoïèse extramédullaire correspond à un phénomène réactionnel en réponse à l'anémie. Ces effets toxiques, observés chez les rats F344 et souris BDF1 semblent être concomitants à la méthémoglobinémie induite par l'exposition au P-CNB (Matsumoto *et al.* 2006a; Matsumoto *et al.* 2006b; NTP 1993).

¹ Document de référence pour la construction d'une valeur toxicologique de référence fondée sur des effets reprotoxiques

http://www.afsset.fr/upload/bibliotheque/210401124823782117964751534907/VTR_rapport_afsset.pdf

Il semble exister un phénomène d'adaptation à l'anémie due à l'exposition au P-CNB. Cette hypothèse est suggérée au regard des résultats de l'étude de toxicité subchronique de Matsumoto (Matsumoto *et al.* 2006b). En effet, dans cette étude, les doses d'exposition auxquelles apparaissent les signes d'anémie sont inférieures à celles nécessaires pour observer un effet cancérogène (travaux conduits par la même équipe). Il est donc possible que la toxicité du P-CNB se manifeste assez rapidement par une anémie mais qui serait compensée par une hématopoïèse extramédullaire.

Des lésions hépatiques sont également observées (nécrose et dégénérescence hépatique chez les rats ; hépatocytes atypiques avec un noyau élargi uniquement chez les souris). Les ALAT (Alanine Amino Transférases) sont augmentées (Matsumoto *et al.* 2006a) et l'augmentation de leur activité sérique est considérée comme le reflet d'une cytolyse des hépatocytes libérant les transaminases dans le sang. Cette cytotoxicité hépatique apparaît à des doses 4 fois plus faibles que pour l'O-CNB (Matsumoto *et al.* 2006b).

- Génotoxicité

Les résultats des différents tests de génotoxicité réalisés *in vitro* et *in vivo* montrent que le P-CNB présente un potentiel génotoxique plus prononcé que celui des autres chloronitrobenzènes (IARC 1996; OCDE 2002). Le P-CNB est mutagène dans le test d'Ames sur *Salmonella Typhimurium* (TA 100 et TA 98) essentiellement en présence de système d'activation métabolique (microsome S9) (NTP 1993). De plus, le P-CNB induit des adduits à l'hémoglobine chez le rat et chez l'homme (Jones *et al.* 2006; Sabbioni 1994), argument supplémentaire en faveur d'un potentiel génotoxique.

L'activité génotoxique du P-CNB serait surtout liée à ses métabolites, comme le suggèrent les résultats des tests de génotoxicité (IARC 1996), majoritairement positifs *in vivo* ou en présence de système S9.

- Cancérogénicité

Le CIRC (IARC 1996) a classé en 1996 le P-CNB dans le groupe 3 (non classable vis-à-vis de la cancérogénicité pour l'homme). En 2004, l'Union Européenne a classé le P-CNB comme cancérogène de catégorie 3 (substance préoccupante pour l'homme en raison de ses possibles effets cancérogènes) et mutagène de catégorie 3 (substance préoccupante pour l'homme en raison de ses possibles effets mutagènes). Depuis 1996, de nouvelles études de toxicité subchronique, chronique et de cancérogénicité ont été menées, mettant clairement en évidence les effets cancérogènes du P-CNB (Matsumoto *et al.* 2006a). Selon le CIRC, ces nouvelles données pourraient être de nature à modifier le classement de ce composé.

Chez le rat mâle, l'exposition chronique par voie orale au P-CNB est associée à une augmentation de l'incidence de tumeurs de la rate : fibromes, fibrosarcomes, ostéosarcomes, sarcomes NOS², hémangiosarcomes (Matsumoto *et al.* 2006a). Chez le rat femelle, seules les incidences de fibrosarcomes sont augmentées de manière significative. Dans l'étude de (Matsumoto *et al.* 2006a), des hémangiosarcomes hépatiques ont également été observés chez la souris femelle et uniquement à la dose la plus élevée.

Dans une étude antérieure (Weisburger *et al.* 1978), une augmentation de la fréquence des hémangiosarcomes a été observée dans divers organes, chez les souris mâles et femelles, et une augmentation de l'incidence de plusieurs cancers chez le rat, pour une exposition au P-CNB par voie orale pendant 18 mois. Cependant, les résultats de cette étude sont à interpréter avec prudence du fait de biais méthodologiques (durée d'exposition courte, doses en P-CNB élevées, méthodologie brièvement décrite, données d'histopathologie limitées...) (IARC 1996; OCDE 2002).

² NOS : Not Otherwise Specified (sans autre précision)

Il est à souligner que les effets cancérogènes du P-CNB présentent des similitudes avec ceux causés par la para-chloroaniline, qui est un métabolite majeur du P-CNB. En particulier, la para-chloroaniline est responsable d'une élévation de l'incidence de tumeurs atypiques au niveau de la rate (fibrosarcomes, ostéosarcomes, hémangiosarcomes) chez le rat mâle. Chez le rat femelle, des signes de fibroses de la rate sont observés mais l'élévation de l'incidence de sarcomes (fibrosarcomes, hémangiosarcomes) reste marginale. Chez la souris mâle, les résultats ne sont pas significatifs et chez la souris femelle, aucune tumeur de la rate n'est observée (NTP 1989).

D'une manière plus générale, des tumeurs de la rate sont observées lors d'expositions à l'aniline et ses dérivés, de façon beaucoup plus prononcée chez le rat mâle que chez le rat femelle. La souris ne développe pas de tumeurs de la rate, ce qui pourrait être en relation avec un métabolisme différent (pas de saturation de la voie d'excrétion de l'aniline chez le rat) (INRS 2008). Ces données sur la para-chloroaniline corroborent les résultats de l'équipe de Matsumoto *et al.* (2006) et ceux de Weisburger *et al.* (1978).

Analyse et évaluation des choix pour la construction de VTR

Choix de l'étude clé

Une étude de cancérogénicité répond aux critères scientifiques définis par l'Afsset dans la méthode de construction des VTR cancérogènes. Il s'agit de l'étude de (Matsumoto *et al.* 2006a), qui est une étude de cancérogénicité et de toxicité chronique (2 ans) chez le rat (F344) et souris (BDF₁), étude cotée 1a selon les critères de Klimisch. Dans cette étude, des groupes de 50 animaux du même sexe ont été exposés à différentes doses de P-CNB contenu dans la nourriture, 7 jours sur 7 pendant 2 ans (trois doses testées en plus du témoin).

Chez le rat mâle, une augmentation dose-dépendante de l'incidence de tumeurs au niveau de la rate (fibromes, fibrosarcomes, ostéosarcomes, sarcomes NOS, hémangiosarcomes) avec métastases hépatiques, péritonéales et pancréatiques a été observée. Chez le rat femelle, une augmentation significative de l'incidence de tumeurs de la rate, uniquement pour les fibrosarcomes, a été mise en évidence. Les souris ont présenté une légère augmentation de l'incidence de tumeurs hépatiques. Enfin, des perturbations biologiques ont été observées chez le rat F344 mâle et femelle : anémie, diminution de l'hématocrite, élévation de la bilirubine totale. Une augmentation de l'hématopoïèse extramédullaire (foie et rate) a été mise en évidence chez le rat et la souris.

Construction d'une VTR chronique pour les effets cancérogènes

Mécanisme d'action cancérogène du P-CNB

La cancérogénèse pourrait être secondaire à un phénomène épigénétique (prolifération des cellules spléniques). Toutefois, il n'est pas possible d'exclure un phénomène génotoxique direct. En effet, le P-CNB agirait par le biais d'un mécanisme génotoxique dans l'apparition de tumeurs spléniques (métabolites réactifs et mutagènes), dont vraisemblablement la para-chloroaniline (NTP 1989).

Choix de l'effet critique

L'exposition par voie orale au P-CNB induit l'apparition de tumeurs malignes au niveau de la rate : des fibromes, fibrosarcomes, ostéosarcomes, hémangiosarcomes sont observés chez le rat, en particulier chez le rat mâle. La souris ne développe pas de tumeurs de la rate.

Les hémangiosarcomes de la rate chez le rat mâle ont été choisis comme effet critique pour dériver la VTR, du fait de l'existence d'une relation dose-réponse, contrairement aux autres tumeurs qui n'apparaissent qu'à la plus forte dose.

Expertise collective : synthèse et conclusions

Saisine n°070057

Diminution du nombre d'hématies par μl de sang chez le rat femelle

DJE ($\text{mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$) [*]	0	1,9	9,8	53,8
Nombre d'animaux examinés	36	41	38	28
Hématies ($10^6/\mu\text{l}$)	$8,13 \pm 0,73$	$8,08 \pm 0,51$	$6,88 \pm 1,48$	$4,94 \pm 0,8$

^{*}DJE : Dose Journalière d'Exposition**Calcul de la VTR**

Les données établies sur la diminution du nombre d'érythrocytes ont pu être modélisées à l'aide des modèles mathématiques proposés par le logiciel Proast (Proast software version 18.2), élaboré par le RIVM. Dans ce cas, le modèle s'ajustant le mieux aux données expérimentales est le modèle de Hill. Les valeurs des BMD_{10} (Benchmark Dose) et $\text{BMD}_{10L_{95}}$ (limite inférieure de l'intervalle de confiance de la BMD_{10}) sont respectivement de 4,6 et de 3,2 $\text{mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$. Un ajustement allométrique a ensuite été réalisé selon les recommandations de l'US EPA (US EPA 2006).

Le calcul de la VTR à partir de la BMDL a été effectué à l'aide des facteurs d'incertitude suivants :

- UF_A de 2,5 tenant compte de la variabilité inter-espèces (variabilité toxicodynamique et incertitudes résiduelles) (Afsset 2007),
- UF_H de 10 pour la variabilité interindividuelle (Afsset 2007).

La VTR a été calculée comme suit :

$$\text{VTR} = \frac{\text{BMDL}}{\text{UF}_A \times \text{UF}_H} \text{ pour la toxicité hématologique}$$

Avec $\text{UF}_A = 2,5$; $\text{UF}_H = 10$; $\text{BMD}_{10L_{95} \text{ ajustée}} = 0,85 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$

Soit une VTR basée sur les effets hématotoxiques = $34 \mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$

Conclusions et recommandations de l'expertise collective

L'étude de Matsumoto *et al.* (2006a) a mis en évidence que l'exposition chronique au P-CNB par ingestion était responsable de l'apparition de tumeurs spléniques chez le rat. On ne peut rejeter l'hypothèse que le mécanisme à l'origine des tumeurs de la rate soit génotoxique. En parallèle, le P-CNB exercerait une action hématotoxique, l'hématopoïèse extramédullaire dans la rate étant le reflet d'une réponse compensatoire du système hématopoïétique aux lésions des érythrocytes (formation de méthémoglobine et anémie).

Deux VTR ont donc été dérivées au regard des effets observés et mécanismes d'action impliqués :

- Une VTR sans seuil basée sur les effets cancérogènes spléniques (mécanisme d'action génotoxique),
- Une VTR chronique à seuil basée sur les effets hématotoxiques.

Le niveau de confiance de la VTR sans seuil du P-CNB a été considéré comme faible en raison du manque de connaissances sur le mécanisme d'action cancérogène.

Expertise collective : synthèse et conclusions

Saisine n°070057

Diminution du nombre d'hématies par μl de sang chez le rat femelle

DJE ($\text{mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$) [*]	0	1,9	9,8	53,8
Nombre d'animaux examinés	36	41	38	28
Hématies ($10^9/\mu\text{l}$)	$8,13 \pm 0,73$	$8,08 \pm 0,51$	$6,88 \pm 1,48$	$4,94 \pm 0,8$

^{*}DJE : Dose Journalière d'Exposition**Calcul de la VTR**

Les données établies sur la diminution du nombre d'érythrocytes ont pu être modélisées à l'aide des modèles mathématiques proposés par le logiciel Proast (Proast software version 18.2), élaboré par le RIVM. Dans ce cas, le modèle s'ajustant le mieux aux données expérimentales est le modèle de Hill. Les valeurs des BMD_{10} (Benchmark Dose) et $\text{BMD}_{10L_{95}}$ (limite inférieure de l'intervalle de confiance de la BMD_{10}) sont respectivement de 4,6 et de $3,2 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$. Un ajustement allométrique a ensuite été réalisé selon les recommandations de l'US EPA (US EPA 2006).

Le calcul de la VTR à partir de la BMDL a été effectué à l'aide des facteurs d'incertitude suivants :

- UF_A de 2,5 tenant compte de la variabilité inter-espèces (variabilité toxicodynamique et incertitudes résiduelles) (Afsset 2007),
- UF_H de 10 pour la variabilité interindividuelle (Afsset 2007).

La VTR a été calculée comme suit :

$$\text{VTR} = \frac{\text{BMDL}}{\text{UF}_A \times \text{UF}_H} \text{ pour la toxicité hématologique}$$

Avec $\text{UF}_A = 2,5$; $\text{UF}_H = 10$; $\text{BMD}_{10L_{95} \text{ ajustée}} = 0,85 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$

Soit une VTR basée sur les effets hématotoxiques = $34 \mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$

Conclusions et recommandations de l'expertise collective

L'étude de Matsumoto *et al.* (2006a) a mis en évidence que l'exposition chronique au P-CNB par ingestion était responsable de l'apparition de tumeurs spléniques chez le rat. On ne peut rejeter l'hypothèse que le mécanisme à l'origine des tumeurs de la rate soit génotoxique. En parallèle, le P-CNB exercerait une action hématotoxique, l'hématopoïèse extramédullaire dans la rate étant le reflet d'une réponse compensatoire du système hématopoïétique aux lésions des érythrocytes (formation de méthémoglobine et anémie).

Deux VTR ont donc été dérivées au regard des effets observés et mécanismes d'action impliqués :

- Une VTR sans seuil basée sur les effets cancérogènes spléniques (mécanisme d'action génotoxique),
- Une VTR chronique à seuil basée sur les effets hématotoxiques.

Le niveau de confiance de la VTR sans seuil du P-CNB a été considéré comme faible en raison du manque de connaissances sur le mécanisme d'action cancérogène.

Expertise collective : synthèse et conclusions

Saisine n°070057

Type de VTR	Effet critique	Dose critique	UF*	VTR
A seuil, voie orale	Hématotoxicité chez le rat mâle F344 Matsumoto <i>et al.</i> (2006a)	BMD ₁₀ L ₉₅ ** = 3,2 mg.kg ⁻¹ .j ⁻¹ Ajustement allométrique BMD ₁₀ L _{95A} *** = 0,85 mg.kg ⁻¹ .j ⁻¹	UF = 25 UF _A = 2,5 (composante toxicodynamique) UF _H = 10	VTR = 34 µg.kg⁻¹.j⁻¹
Sans seuil, voie orale	Hémangiosarcomes de la rate chez le rat mâle F344 Matsumoto <i>et al.</i> (2006a)	BMD ₁₀ L ₉₅ ** = 7,4 mg.kg ⁻¹ .j ⁻¹ Ajustement allométrique BMD ₁₀ L _{95A} *** = 1,97 mg.kg ⁻¹ .j ⁻¹	-	Après extrapolation linéaire à l'origine : VTR = 5.10⁻⁵ (µg.kg⁻¹.j⁻¹)⁻¹ 0,02 µg.kg ⁻¹ .j ⁻¹ pour un risque de 10 ⁻⁶ 0,2 µg.kg ⁻¹ .j ⁻¹ pour un risque de 10 ⁻⁵ 2 µg.kg ⁻¹ .j ⁻¹ pour un risque de 10 ⁻⁴

Le Comité d'Experts Spécialisés « Evaluation des risques liés aux substances chimiques » adopte le rapport d'expertise collective lors de sa séance du 23 avril 2009 et fait part de cette adoption à la direction générale de l'Afsset.

Maisons-Alfort, le 28 mai 2009

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

le président du CES, Michel Guerbet



Bibliographie

1. Afsset. Valeurs toxicologiques de référence (VTR) pour les substances reprotoxiques. 2007.
Ref Type: Report
2. IARC (1996). 2-Chloronitrobenzene, 3-chloronitrobenzene and 4-chloronitrobenzene. *IARC Monogr Eval. Carcinog. Risks Hum.* 65, 263-296.
3. INRS. Fiche toxicologique de l'Aniline FT 19. 2008.
Ref Type: Report
4. Jones, C. R., Liu, Y. Y., Sepai, O., Yan, H., and Sabbioni, G. (2006). Internal exposure, health effects, and cancer risk of humans exposed to chloronitrobenzene. *Environ. Sci. Technol.* 40(1), 387-394.
5. Matsumoto, M., Aiso, S., Senoh, H., Yamazaki, K., Arito, H., Nagano, K., Yamamoto, S., and Matsushima, T. (2006a). Carcinogenicity and chronic toxicity of para-chloronitrobenzene in rats and mice by two-year feeding. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 25(3), 571-584.
6. Matsumoto, M., Aiso, S., Umeda, Y., Arito, H., Nagano, K., Yamamoto, S., and Matsushima, T. (2006b). Thirteen-week oral toxicity of para- and ortho-chloronitrobenzene in rats and mice. *J. Toxicol. Sci.* 31(1), 9-22.
7. Matsumoto, M., Umeda, Y., Senoh, H., Suzuki, M., Kano, H., Katagiri, T., Aiso, S., Yamazaki, K., Arito, H., Nagano, K., Yamamoto, S., and Matsushima, T. (2006c). Two-year feed study of carcinogenicity and chronic toxicity of ortho-chloronitrobenzene in rats and mice. *J. Toxicol. Sci.* 31(3), 247-264.
8. NTP. Toxicology and carcinogenesis studies of para-chloroaniline hydrochloride CAS No. 20265-96-7 in F344/N rats and B6C3F1 mice (gavage studies) (TR 351; NIH Publication No. 89-2806). 1989.
Ref Type: Report
9. NTP. 2-Chloronitrobenzene and 4-Chloronitrobenzene administered by inhalation for F344/N Rats and B6C3F Mice (NIH Publication 93-3382). 1993.
Ref Type: Report
10. OCDE. SIDS initial Assessment Report for SIAM 15; 1-Chloro-4-nitrobenzene. 2002.
Ref Type: Report
11. Sabbioni, G. (1994). Hemoglobin binding of arylamines and nitroarenes: molecular dosimetry and quantitative structure-activity relationships. *Environ. Health Perspect.* 102 Suppl 6, 61-67.
12. US EPA. 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
13. Weisburger, E. K., Russfield, A. B., Homburger, F., Weisburger, J. H., Boger, E., Van Dongen, C. G., and Chu, K. C. (1978). Testing of twenty-one environmental aromatic amines or derivatives for long-term toxicity or carcinogenicity. *J. Environ. Pathol. Toxicol.* 2(2), 325-356.

Abréviations

ADN :	Acide désoxyribonucléique
Afssa :	Agence française de sécurité sanitaire des aliments
Afsset :	Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail
BMD :	Benchmark Dose
BPL :	Bonnes Pratiques de Laboratoire (« <i>good laboratory practices</i> »)
CES :	Comité d'Experts Spécialisés
CHO :	Chinese hamster ovary cell (cellules ovariennes de hamster chinois)
CYP 450 :	Cytochrome P450
DGS :	Direction Générale de la Santé
EDR :	Evaluation Détaillée des Risques
ERU :	Excès de Risque Unitaire
EDH :	Equivalent de Dose chez l'Homme (Human Equivalent Dose)
HEAST :	Health Effects Assessment Summary Tables
INERIS :	Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques
LOAEL :	Dose minimale entraînant un effet néfaste observé (« Lowest Observed Adverse Effect Level »)
M-CNB :	Méta-Chloronitrobenzène
NOAEL :	Dose maximale n'entraînant pas d'effet néfaste observé (« No Observed Adverse Effect Level »)
OCDE :	Organisation de coopération et de développement économiques
OEHHA :	Office of Environmental Health Hazard Assessment
O-CNB :	Ortho-Chloronitrobenzène
P-CNB :	Méta-Chloronitrobenzène
UF :	Facteur d'incertitude (« Uncertainty Factor »)
RIVM :	Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (Institut néerlandais pour la santé publique et l'environnement)
US EPA :	United State Environmental Protection Agency (Etats-Unis)
VTR :	Valeur Toxicologique de Référence

Liste des tableaux

Tableau 1 : Identification de l'O-CNB	32
Tableau 2 : Propriétés physicochimiques de l'O-CNB	33
Tableau 3 : Données de génotoxicité sur l'O-CNB.....	38
Tableau 4 : Caractéristiques de l'étude de Matsumoto <i>et al.</i> (2006c).....	40
Tableau 5 : Incidences des tumeurs hépatiques chez la souris femelle (nombre d'animaux porteurs de tumeurs hépatiques)	43
Tableau 6 : BMD, BMDL, VTR chez la souris femelle pour les souris porteuses de carcinomes hépatocellulaires ou d'hépatoblastomes (incidences cumulées).....	45
Tableau 7 : Conclusion sur la VTR sans seuil.....	45
Tableau 8 : Elévation des ALAT chez la souris femelle (Matsumoto <i>et al.</i> 2006a)	46
Tableau 9 : Conclusion sur la VTR à seuil	47
Tableau 10 : Identification du M-CNB.....	49
Tableau 11 : Propriétés physicochimiques du M-CNB.....	49
Tableau 12 : Données de génotoxicité sur le M-CNB	53
Tableau 13 : Identification du P-CNB	55
Tableau 14 : Propriétés physicochimiques du P-CNB	56
Tableau 15 : Données de génotoxicité sur le P-CNB.....	61
Tableau 16 : Caractéristiques de l'étude de Matsumoto <i>et al.</i> (2006c)	64
Tableau 17 : Incidences des tumeurs de la rate chez le rat (nombres d'animaux atteints)	66
Tableau 18 : BMD, BMDL, ERU chez le rat mâle pour les hémangiosarcomes de la rate.....	68
Tableau 19 : Conclusion sur la VTR sans seuil du P-CNB	68
Tableau 20 : Paramètres hématologiques (moyenne du nombre d'hématies + écart type) décrit dans l'étude de Matsumoto <i>et al.</i> (2006c) chez le rat femelle.....	69
Tableau 21 : Diminution du nombre d'hématies chez le rat femelle (Matsumoto <i>et al.</i> 2006b)	70
Tableau 22 : Conclusion sur la VTR à seuil du P-CNB	73
Tableau 23 : Conclusion sur les VTR chroniques de l(O-CNB.....	74
Tableau 24 : Conclusion sur les VTR chroniques du P-CNB	76

Liste des figures

Figure 1 : Métabolisme du P-CNB chez l'homme (IARC 1996)	58
Figure 2 : Modélisation des données expérimentales avec les équations de Hill et détermination d'une BMDL pour le P-CNB.....	71

Liste des annexes

Annexe 1 : Lettre de saisine	84
Annexe 2 : Synthèse des déclarations publiques d'intérêts des experts par rapport au champ de la saisine	87

1 Contexte, objet et modalités de traitement de la saisine

1.1 Contexte

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 biologique des substances. Ainsi, si une substance est connue comme ayant une action directe sur le matériel génétique humain (l'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 de la reproduction) peuvent se produire même pour la plus petite dose reçue, et que la probabilité de survenue de cet effet croît linéairement avec la dose. On parle de « VTR sans seuil d'effet ». 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 c'est la gravité de l'effet qui croît avec la dose plutôt que la probabilité de survenue. On parle de « VTR à seuil d'effet ».

L'élaboration de ces VTR suit une approche très structurée et exigeante qui implique des évaluations collectives par des groupes de spécialistes. Elles sont par ailleurs largement impliquées dans la démarche d'évaluation des risques sanitaires, processus décisionnel visant à fournir les éléments scientifiques essentiels à la proposition d'actions correctives par les gestionnaires de risque. Leur élaboration et leur utilisation s'inscrivent donc dans une procédure lourde, aux conséquences majeures en termes de santé publique.

1.2 Objet de la saisine

En novembre 2007, la Direction Générale de la Santé (DGS) a saisi l'Afsset sur la pertinence d'élaborer des VTR pour les chloronitrobenzènes, polluants de la nappe d'Alsace au nord de Mulhouse, issus de deux sites industriels. La ressource en eau contaminée n'alimente plus le réseau d'eau potable depuis 1988. En revanche, elle alimente toujours les puits privés (arrosages...). Il est question de la remettre en exploitation prochainement.

Dans cette pollution, les trois isomères (ortho, méta et para) du chloronitrobenzène sont représentés.

En parallèle de la saisine transmise à l'Afsset, la DGS a saisi l'Afssa pour élaborer, à partir des VTR construites par l'Afsset des valeurs limites dans l'eau potable pour ces composés.

1.3 Modalités de traitement : moyens mis en œuvre et organisation

L'Afsset a confié au Comité d'Experts Spécialisés (CES) « Evaluation des risques liés aux substances chimiques » l'instruction de cette saisine (synthèse des déclarations publiques d'intérêts en annexe 2. Pour ce travail, trois experts du groupe de travail (GT) « Valeurs Toxicologiques de Référence et substances cancérigènes » et deux experts du CES « Evaluation des risques liés aux substances chimiques » ont été nommés rapporteurs.

Une réunion a eu lieu le 24 janvier 2008 afin de statuer sur la pertinence d'élaborer des VTR. La mise à disposition de VTR permettrait de s'orienter vers un plan de gestion approprié.

Les principales données toxicologiques disponibles ont été présentées au CES « Chimie » le 20 mars 2008 et ont fait l'objet de questions et de demandes d'éclaircissements, notamment sur le mécanisme d'action cancérigène. Les travaux ont été discutés à plusieurs reprises dans le groupe de travail VTR (« GT VTR ») les 18 décembre 2008, 13 février 2009 et 10 avril 2009.

Ce travail est le résultat d'une expertise collective réalisée à partir des avis des experts rapporteurs du groupe de travail « VTR ». Il est ainsi issu d'un collectif d'experts aux compétences complémentaires. Il a été réalisé 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.

Ce rapport été rédigé par l'Afsset en tenant compte des remarques du CES et a pour objectif de présenter les données toxicologiques de l'O-CNB, la méthode d'élaboration de la VTR, le choix de l'effet critique, de l'étude clé, de la dose de référence, des facteurs d'incertitude.

Les travaux d'expertise ont été soumis au CES le 26 février et le 26 mars 2009 pour commentaires et le 23 avril 2009 pour adoption.

2 Ortho-chloronitrobenzène (CASRN 88-73-3)

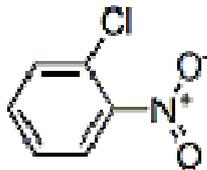
2.1 Profil toxicologique de l'O-CNB

2.1.1 Informations générales

2.1.1.1 Identification de la substance

L'ortho-chloronitrobenzène (O-CNB) est une substance chimique comportant un cycle benzénique dont deux hydrogènes sont substitués par un groupement nitro et un atome de Chlore en position ortho. Son identification est donnée dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Identification de l'O-CNB

Numéro CAS	88-73-3
Nom	Ortho-chloronitrobenzène
Formule brute	C ₆ H ₄ ClNO ₂
Formule développée	

2.1.1.2 Propriétés physico-chimiques

L'O-CNB se présente sous forme solide dont les principales propriétés physicochimiques sont données dans le Tableau 2 (IARC 1996) :

Tableau 2 : Propriétés physicochimiques de l'O-CNB

Forme physique	Solide
Masse Molaire (g.mol⁻¹)	157,56
Point d'ébullition (°C)	246
Pression de vapeur (Pa)¹	53,3 à 25°C
Densité de vapeur	5,44
Facteurs de conversion	1 ppm = 6,44 mg.m ⁻³
Solubilité dans l'eau (mg.L⁻¹)	590 à 20 °C
Constante de Henry (sans unité)²	3,79 10 ⁻⁴ 3
Log Kow⁴	2,24

2.1.1.3 Plausibilité d'exposition humaine

L'O-CNB est exclusivement utilisé comme intermédiaire de synthèse ; son occurrence naturelle n'est pas connue. Il est retrouvé de manière accidentelle dans l'environnement, en particulier dans l'eau. Il peut par ailleurs être formé à partir des nitrobenzènes lors de la chloration de l'eau potable. Il a été également identifié chez diverses espèces de poissons à proximité de rivières polluées par ce composé (IARC 1996).

L'O-CNB semble être relativement stable, peu hydrolysable dans l'eau (INERIS 2008) mais une dégradation microbiologique relativement lente existe en environnement. En effet, une dégradation microbiologique existe par *Pseudomonas acidovorans* CA50 (Kuhlmann, 2006). Le métabolite principal de cette réduction microbiologique est la 2-chloroaniline. L'exposition humaine doit donc être considérée comme plausible en dehors de l'exposition professionnelle et concerne en plus la 2-chloroaniline. Les données disponibles ne permettent donc pas d'exclure l'hypothèse selon laquelle l'homme serait principalement exposé à ce composé et en plus à au moins un de ses produits de dégradation.

L'homme peut être exposé à ce composé par ingestion d'eau contaminée, par inhalation de vapeurs ou d'aérosols (épisodes de bains et de douches, nettoyages à l'aide d'eau à haute pression, dégazage de la nappe), et par passage cutané de vapeurs et ou d'aérosols d'O-CNB contenus dans l'eau potable (bains, douches).

Du fait de ses propriétés physico-chimiques, la principale voie d'exposition chez l'homme hors exposition professionnelle semble être la voie orale (ingestion directe ou indirecte d'eau contaminée). Il paraît peu probable que la population générale soit exposée de façon importante par inhalation à des vapeurs d'O-CNB consécutives à un dégazage de la nappe ou lors d'épisodes de douches et de bains, compte-tenu du fait que ce composé est peu volatile à température ambiante. L'inhalation d'O-CNB sous forme d'aérosols peut en revanche être envisagée lors des épisodes de douches et de bains.

¹ La pression de vapeur est la pression partielle de la vapeur d'un corps présent également sous forme liquide ou solide.

² Constante de Henry : la loi de Henry établit à l'équilibre, les concentrations en gaz dissous dans un liquide : $p(i) = x(i) \cdot K_H(i)$ avec $p(i)$: pression partielle du gaz "i" dans la phase gazeuse, $x(i)$: fraction molaire du gaz "i", et $K_H(i)$: constante de Henry du gaz "i".

³ Information disponible dans l'évaluation détaillée des risques de Rhodia Organic, 2006

⁴ Log Kow : logarithme du coefficient de partage octanol-eau. Il correspond au ratio entre la concentration de la substance dans l'octanol et celle dans l'eau à l'équilibre. Il est corrélé à la solubilité dans l'eau et reflète indirectement les potentiels de bioconcentration et de bioaccumulation d'une substance.

En milieu professionnel, les individus peuvent être exposés à de l'O-CNB par inhalation de vapeurs et par voie cutanée. Pour la voie cutanée, les données disponibles ne permettent pas de savoir si le passage transcutané concerne l'O-CNB à l'état liquide ou à l'état gazeux.

2.1.2 Toxicocinétique

2.1.2.1 Absorption

2.1.2.1.1 Voie inhalée

L'O-CNB traverse la barrière pulmonaire, mais aucune donnée de toxicocinétique concernant cette voie d'exposition n'est disponible (IARC 1966).

2.1.2.1.2 Voie orale

Chez le rat, lors d'une exposition aiguë, environ 80 % de la dose en O-CNB (dose de 2 à 200 mg.kg⁻¹) administrée par voie orale est absorbée au niveau du tractus gastro-intestinal (OCDE 2001).

2.1.2.1.3 Voie cutanée

Chez le rat, l'O-CNB en solution (véhicule : acétone) traverse la barrière cutanée : en 72 heures, plus de 40 % de l'O-CNB (doses de 0,65 à 65 mg.kg⁻¹) administré sur la peau est excrété dans les urines ou dans les fèces (NTP 1993).

2.1.2.2 Distribution

Aucune donnée de distribution n'est disponible pour les voies respiratoire et cutanée.

Chez le rat, la radioactivité issue de l'OCN[¹⁴C]-Benzène administré par voie orale est retrouvée en très petite quantité dans de nombreux tissus de l'organisme, et en quantités significatives principalement dans le foie, mais aussi dans les graisses, les muscles et les reins (IARC 1996 ; OCDE 2001).

2.1.2.3 Métabolisme

Chez l'animal (rat, lapin), les principales voies métaboliques de l'O-CNB consistent en une réduction du groupement nitro en groupement Amine (formation de 2-chloroaniline) et en une hydroxylation du cycle aromatique. Des nitrophénols et aminophénols sont formés à partir de la 2-chloroaniline, lesquels sont ensuite conjugués avec des acides glucuroniques, sulfuriques ou mercapturiques, avant d'être excrétés dans les urines et dans les fèces (OCDE 2001).

La formation des chloroanilines à partir des CNB est réalisée vraisemblablement sous la dépendance des cytochromes P450 (CYP450) puisque la réduction de l'O-CNB en chloroaniline est inhibée en présence d'inhibiteur de CYP450 (metyrapone et monoxyde de carbone) (Rickert and Held 1990). Par contre, les mêmes auteurs ont montré que 14 % de la métabolisation par réduction du groupement nitro passe par la cytochrome b5-réductase. Des essais subaigus sur des rats mâles (Cr1:CD[SD]BR) ont montré une augmentation de l'activité de l'alanine-aminotransférase (BG Chemie, 2000).

Au cours de la réduction du groupement nitro en groupement amine, un produit intermédiaire très réactif d'hydroxylamine est formé. Cette formation a été observée *in vitro* et *in vivo* chez le rat (BG Chemie, 2000).

Aucune donnée de métabolisme de l'O-CNB n'est disponible chez l'homme.

2.1.2.4 Excrétion - élimination

Chez le rat, la majorité de l'O-CNB serait, après biotransformation, excrétée dans les urines, sous forme de dérivés conjugués des nitrophénols et aminophénols. Une faible proportion de l'O-CNB est excrétée sous forme de 2-chloroaniline dans les urines et dans les fèces (OCDE 2001).

2.1.3 Toxicité aiguë

L'O-CNB induit une cyanose chez le rat et la souris, quelle que soit la voie d'exposition. Pour plus d'informations, il est conseillé de se rapporter au SIDS Initial Assessment Report de l'OCDE (OCDE 2001).

2.1.3.1 Voie inhalée

Chez le rat, la $CL_{50}/4h$ est estimée à $3200 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3}$. La principale manifestation clinique d'intoxication est une cyanose. D'autres symptômes (léthargie, opacification de la cornée, etc.) ont été mis en évidence (OCDE 2001).

Chez l'homme, aucune intoxication à l'O-CNB seul n'a été rapportée. En revanche, on dispose d'informations sur une exposition simultanée aux composés ortho et para du CNB, responsable de maux de tête, dyspnée, cyanose, avec au niveau biologique, des érythrocytes déformés ; l'ensemble de ces signes est en faveur d'une méthémoglobinémie (IARC 1996). L'exposition concernait la voie respiratoire et probablement la voie cutanée.

2.1.3.2 Voie orale

Chez le rat et la souris, la DL50 par voie orale est comprise entre 135 et $560 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Une DL50 de $280 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ a été rapportée chez le lapin (BG Chemie 2000).

Chez le rat, la cyanose est le principal signe d'intoxication (OCDE 2001).

Aucune donnée de toxicité aiguë n'est disponible chez l'homme.

2.1.3.3 Voie cutanée

Chez le rat, la DL_{50} par voie cutanée est comprise entre 655 (mâles) et $1320 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (femelles). Des DL50 de 355 à $450 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ont été rapportées chez le lapin (OCDE 2001).

2.1.4 Toxicité subchronique et chronique

2.1.4.1 Données animales

L'O-CNB exerce une toxicité au niveau hépatique et hématologique lors d'expositions subchroniques par voie orale et par voie respiratoire, chez le rat et chez la souris (Matsumoto *et al.* 2006b ; NTP 1993). La toxicité hépatique et hématologique de l'O-CNB est également mentionnée dans les études de cancérogénicité par voie orale (Matsumoto *et al.* 2006c). Des lésions histologiques suivantes ont été observées au niveau du foie : nécrose et dégénérescence hépatique chez les rats ; hépatocytes atypiques avec un noyau élargi uniquement chez les souris. De plus, d'un point de vue biochimique, l'activité enzymatique des ALAT (Alanine Amino Transférases) est augmentée. Cette augmentation est considérée comme le reflet d'une cytolyse des hépatocytes, à l'origine d'une libération des transaminases hépatiques dans le sang.

Par ailleurs, l'O-CNB est hématotoxique. Les modifications observées sont d'ordre hématologique, biochimique et anatomopathologique : les animaux présentent une anémie et une élévation du taux de bilirubine ; la rate est congestionnée et présente des dépôts d'hemosidérine. Enfin, une hématopoïèse extramédullaire splénique est augmentée, et une hématopoïèse extramédullaire splénique est observée, témoignant d'un phénomène compensatoire en réponse à l'anémie. Ces effets toxiques pourraient être la conséquence de la méthémoglobinémie induite par l'exposition à l'O-CNB. (Matsumoto *et al.* 2006b ; Matsumoto *et al.* 2006c ; NTP 1993). Des études chez le rat

montrent aussi une réduction des érythrocytes, leucocytes et de l'hématocrite ainsi qu'une augmentation des lymphocytes, thrombocytes et réticulocytes (BG Chemie, 2000).

Il est à noter également que la plupart des rats traités par de l'O-CNB – y compris les rats femelles - sont atteints de troubles rénaux et présentent, en particulier, une néphropathie chronique (Matsumoto *et al.* 2006c).

L'O-CNB et le P-CNB sont tous deux responsables d'effets hépatotoxiques et hématotoxiques, mais l'O-CNB est plus spécifiquement hépatotoxique, et le P-CNB plus spécifiquement hématotoxique. Le P-CNB est davantage méthémoglobinisant que l'O-CNB. L'hématotoxicité modérée de l'O-CNB pourrait expliquer que des tumeurs de la rate ne sont pas retrouvées dans l'étude de cancérogénicité de Matsumoto (Matsumoto *et al.* 2006a ; Matsumoto *et al.* 2006c).

Les toxicités subchronique et chronique sont reprises dans le paragraphe 2.2.1.

2.1.4.2 Données humaines

En milieu professionnel, l'exposition aux vapeurs d'O-CNB a été associée à la formation d'adduits à l'hémoglobine. Aucune corrélation n'a été mise en évidence entre les niveaux d'exposition et la quantité d'adduits formés à l'hémoglobine, suggérant que l'inhalation n'est pas la seule voie d'exposition (Jones *et al.* 2006). Les résultats de l'étude de Jones *et al.* (2006) restent toutefois à interpréter avec prudence car l'étude n'a porté que sur un faible échantillon de travailleurs avec co-exposition possible à d'autres composés chimiques.

Aucune étude épidémiologique portant sur l'exposition à l'O-CNB n'a été rapportée.

2.1.5 Reprotoxicité

Des effets sur la fertilité ont été mis en évidence, mais à des doses entraînant une toxicité systémique. Des effets sur le développement ont été mis en évidence à des doses entraînant une toxicité maternelle. Chez des rats mâles F344/N, une réduction de la spermatogenèse a été constatée (NTP 1993 ; Travlos *et al.* 1996).

Pour plus d'information, il est recommandé de se reporter au rapport SIDS de l'OCDE (OCDE 2001) ou à la monographie de l'IARC (IARC 1996).

2.1.6 Génotoxicité

Les résultats des différents tests de génotoxicité réalisés *in vitro* et *in vivo* montrent que l'O-CNB est une substance génotoxique. Ce potentiel génotoxique semble toutefois assez faible : en particulier, lors du test d'Ames (TA 98, TA 1538, WP2uvrA), seules des concentrations élevées d'O-CNB (mais non bactériotoxiques) induisent des effets génotoxiques (IARC 1996 ; OCDE 2001). Ceci laisse supposer que l'activité génotoxique de l'O-CNB serait davantage liée aux métabolites de l'O-CNB qu'à l'O-CNB lui-même. La similitude entre les effets causés par l'O-CNB et ceux causés par la 2-chloroaniline, l'un de ses métabolites (IARC 1996), corroborent cette hypothèse.

L'O-CNB induit aussi des aberrations chromosomiques et des échanges de chromatides sœurs sur des cellules CHO *in vitro* aussi bien en absence qu'en présence de S9.

Par ailleurs, l'O-CNB entraîne chez le rat et chez l'homme la formation d'adduits à l'hémoglobine (Jones *et al.* 2006 ; Sabbioni 1994), argument supplémentaire en faveur d'un potentiel génotoxique, qui peut-être corroborée par la formation potentielle des adduits à l'ADN. Une étude a montré que les adduits à l'ADN après exposition de rats à l'O-CNB (Jones et Sabbioni 2003) sont au-dessous des limites de détection. Cependant, la méthode utilisée (HPLC/MS/MS) est moins sensible que d'autres méthodes plus spécifiques à l'analyse des adduits à l'ADN telles que le marquage au Phosphore-32 (³²P-postlabelling) après purification (par HPLC par exemple) (Hemminki *et al.* 1993 ; IARC 1994). Dans l'étude de Jones and Sabbioni, (2003), des

adduits à l'hémoglobine sont formés avec des arylamines et nitroarènes pour lesquels les adduits à l'ADN n'ont pas été détectés.

La formation d'adduits à l'hémoglobine signifie que des intermédiaires réactifs sont produits et qu'ils pourraient aussi réagir avec les sites nucléophiles de l'ADN (Jones et Sabbioni 2003).

A noter que le caractère génotoxique de l'O-CNB est reconnu par plusieurs nombre d'organismes (OCDE, HEAST), même si celui-ci est considéré comme étant relativement faible.

L'ensemble des données de génotoxicité disponibles est résumée dans le Tableau 3 de manière synthétique. Les études non publiées n'ont pas été considérées.

Tableau 3 : Données de génotoxicité sur l'O-CNB

	Nature du test	O-CNB	Référence
<i>In vitro</i>	Test d'Ames en absence de S9	Négatif sur TA1537, TA100, TA1535 (doses de 25 à 1638 µg/plaque)	(Shimizu <i>et al.</i> 1983)
		Positif sur TA98, TA1538 (doses de 25 à 1638 µg/plaque)	(Shimizu <i>et al.</i> 1983)
		Négatif sur TA100 et sur TA 98 (doses de 0 à 333 µg/plaque)	(Haworth <i>et al.</i> 1983) - données publiées dans le rapport NTP (NTP 1993i)
	Test d'Ames en présence de S9	Positif sur TA100 (doses de 0 à 333 µg/plaque) et WP2uvrA	(Haworth <i>et al.</i> 1983) - données publiées dans le rapport NTP (NTP 1993h)
		Négatif sur TA98 (doses de 0 à 333 µg/plaque)	Haworth, 1983 - données publiées dans le rapport NTP (NTP 1993)
	Activité mutagène en présence de S9	Positif sur TA98 (doses de 0 à 20 µg/plaque) uniquement en présence de norharmane ⁵	(Suzuki <i>et al.</i> 1983)
		Positif sur TA98 (doses de 0 à 1000 µg/plaque) uniquement en présence de norharmane	(Suzuki <i>et al.</i> 1987)
	Echanges de chromatides sœurs (sur CHO) en absence et en présence de S9	Positif	(Galloway <i>et al.</i> 1987) - données publiées dans le rapport NTP (NTP 1993)
Aberrations chromosomiques (sur CHO) en absence et en présence de S9	Positif	(Galloway <i>et al.</i> 1987) - données publiées dans le rapport NTP (NTP 1993)	
<i>In vivo</i>	Mutations létales récessives liées au sexe chez <i>Drosophila melanogaster</i> (larves et adultes)	Négatif	(Zimmering <i>et al.</i> 1985; Zimmering <i>et al.</i> 1989)
	Test indicatif: Adduits à l'hémoglobine (rat, homme)	Positif	(Jones <i>et al.</i> 2006)
	Adduits à l'ADN (rat)	Négatif (une seule étude, résultats à interpréter avec prudence)	(Jones and Sabbioni 2003)
	Conclusion	Substance considérée comme génotoxique	

2.1.7 Effets cancérogènes

L'exposition par voie orale à l'O-CNB est responsable de l'apparition de tumeurs hépatiques : adénomes et carcinomes hépatocellulaires chez le rat et la souris (mâle et femelle), et hépatoblastomes chez la souris uniquement (mâle et femelle). Chez la souris, des métastases apparaissent essentiellement au niveau pulmonaire (Matsumoto *et al.* 2006c). L'étude de Matsumoto *et al.* (2006) est davantage détaillée dans le paragraphe 2.2.1.

Une étude antérieure (Weisburger *et al.* 1978) a mis en évidence, après exposition à l'O-CNB par voie orale, une augmentation de la fréquence des cancers hépatiques chez les souris mâles et femelles, et une augmentation de la fréquence de plusieurs cancers chez le rat. Cependant, les

⁵ Norharmane : agent co-mutagène

résultats de cette étude sont à interpréter avec prudence du fait de la méthodologie insuffisante (durée d'exposition courte, doses en O-CNB élevées, méthodologie brièvement décrite, données d'histopathologie limitées, etc.) (IARC 1996 ; OCDE 2001).

Le CIRC a classé en 1996 l'O-CNB dans le groupe 3 (non classable vis-à-vis de la cancérogénicité pour l'homme). L'Union Européenne n'a pas classé l'O-CNB. Depuis 1996, de nouvelles études de toxicité subchronique, chronique et de cancérogénicité ont été menées, mettant clairement en évidence les effets cancérogènes de l'O-CNB (Matsumoto *et al.* 2006c). Ces données sont de nature à modifier le classement de ce composé.

2.2 Elaboration de VTR pour la voie orale

Aucune VTR orale n'est à ce jour disponible (à seuil ou sans seuil). La voie orale représentant la voie d'exposition majoritaire pour l'O-CNB, une attention particulière a été portée sur la dérivation de VTR pour cette voie d'exposition.

Deux VTR orales ont été élaborées au regard des effets observés chez l'animal et des mécanismes d'action :

- Une VTR sans seuil basée sur les effets cancérogènes hépatiques (en lien avec un mécanisme d'action génotoxique) ;
- Une VTR à seuil basée sur les effets hépatotoxiques relevant d'un effet non cancérogène.

2.2.1 Choix et description de l'étude clé

Une étude de cancérogénicité répond à des critères scientifiques acceptables définis par l'Afsset dans la méthode de construction des VTR permettant de dériver une VTR. Il s'agit de l'étude de **Matsumoto *et al.* (2006c)**, qui est une étude de cancérogénicité et de toxicité chronique (2 ans) chez le rat (F344) et la souris (BDF₁), cotée 1a selon les critères de Klimisch (Tableau 4). Dans cette étude, des groupes de 50 animaux du même sexe ont été exposés à différentes doses d'O-CNB contenu dans la nourriture, 7 jours sur 7 pendant 2 ans (trois doses testées en plus du témoin).

Cette étude montre notamment que l'O-CNB est un cancérogène hépatique : il est responsable de la formation d'adénomes et de carcinomes hépatocellulaires chez le rat et la souris, mâle et femelle. De plus, des hépatoblastomes sont observés chez la souris (souris âgée uniquement).

Le potentiel cancérogène est nettement plus prononcé chez la souris que chez le rat (incidence de tumeurs hépatiques plus élevée, développement de métastases, en particulier métastases pulmonaires). Le rat est plus sensible que la souris à la néphrotoxicité (créatinémie et urémie élevées), conduisant à la mort de tous les rats mâles à la plus forte dose.

Enfin, des perturbations biochimiques sont observées, en particulier une élévation des enzymes hépatiques (ALAT, ASAT, γ -GT et LDH) avec une augmentation significative à partir de 54 mg.kg⁻¹.j⁻¹ chez la souris mâle, et 69 mg.kg⁻¹.j⁻¹ chez la souris femelle.

Tableau 4 : Caractéristiques de l'étude de Matsumoto *et al.* (2006c)

Type d'étude	Etude de cancérogénicité et de toxicité chronique (2 ans)
Pertinence de l'étude	Etude BPL et réalisée en accord avec la ligne directrice de l'OCDE n°451 Cotation 1a selon les critères de Klimisch
Espèces étudiées	Rats 50 F344 et souris 50 BDF ₁
Voie d'exposition	Ingestion
Protocole expérimental	50 animaux par groupe et par sexe ; 3 doses testées + un témoin O-CNB contenu dans la nourriture, exposition 7 jours/7 pendant 2 ans
Effets observés	<p><u>Constantes biologiques :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Elévation des enzymes hépatiques (ALAT, ASAT, γ-GT et LDH) : augmentation significative à partir de 54 mg.kg⁻¹.j⁻¹ chez la souris mâle, et 69 mg.kg⁻¹.j⁻¹ chez la souris femelle - Créatinémie et urémie élevées chez les rats (indicateurs biologiques de néphrotoxicité). <p><u>Poids des organes :</u></p> <p>Chez le rat et chez la souris: augmentation importante du poids du foie, des reins. Augmentation moins marquée pour la rate.</p> <p><u>Lésions non néoplasiques :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Chez les rats : néphropathie chronique conduisant à la mort de quasiment tous les rats mâles aux fortes doses d'O-CNB <p><u>Lésions néoplasiques :</u> l'O-CNB est un cancérogène hépatique et rénal avec augmentation dose-dépendante de l'incidence</p> <ul style="list-style-type: none"> - Chez le rat : adénomes et carcinomes rénaux (augmentation marginale), adénomes et carcinomes hépatocellulaires - Chez la souris : adénomes et carcinomes hépatocellulaires, hépatoblastomes (souris âgées uniquement) <p>Potentiel carcinogène nettement plus prononcé chez la souris que chez le rat (davantage de tumeurs hépatiques, davantage de métastases en particulier métastases pulmonaires)</p>

2.2.2 Elaboration de VTR sans seuil

D'après les informations disponibles, l'O-CNB peut être considéré comme une substance génotoxique (voir paragraphe 2.1.6). De plus, d'après l'arbre décisionnel proposé par le groupe de travail « VTR Cancer » (Afsset 2009), l'absence de données claires sur le mécanisme de cancérogène d'une substance conduit, par précaution, à retenir l'hypothèse d'absence de seuil. Cette hypothèse a ainsi été retenue pour cette expertise.

Dans cette perspective, l'effet apparaît quelle que soit la dose reçue et la probabilité de survenue croît avec la dose. La VTR s'exprime alors sous la forme d'un ERU (excès de risque unitaire), et se définit comme la probabilité supplémentaire, par rapport à un sujet non exposé, qu'un individu développe une pathologie s'il est exposé pendant sa vie entière à une unité de dose de la substance.

Pour la construction d'une VTR cancérigène sans seuil, la méthodologie du groupe de travail préconise de suivre les étapes suivantes :

1. Identification et choix de l'effet critique et de(s) l'étude(s) ;
2. Identification d'une dose critique ou POD (*Point Of Departure*) à travers une modélisation des données toxicologiques. L'objectif est de choisir le point de départ de l'extrapolation aux faibles doses, c'est-à-dire un point de la courbe dose-réponse modélisée, peu éloigné des données expérimentales.
3. Extrapolation à l'origine afin de définir une VTR.

2.2.2.1 Mécanisme d'action cancérigène proposé et cohérence des données animales et humaines

Le mécanisme génotoxique de l'O-CNB dans l'apparition de tumeurs hépatiques passerait par la production de métabolites réactifs et mutagènes dont la 2-chloroaniline (ou ses métabolites).

Hypothèse formulée sur le mécanisme d'action cancérigène de l'O-CNB, aboutissant à des tumeurs hépatiques

1. Métabolisation en intermédiaire(s) actif(s)

Les métabolites potentiels de l'O-CNB (N-hydroxylarylamines, 2-chloroaniline) sont des intermédiaires hautement réactifs. Comme les intermédiaires de nitroarènes et des arylamines, ils peuvent réagir avec l'ADN et les protéines (dont l'hémoglobine) et induire des effets génotoxiques et cytotoxiques.

2. Effets génotoxiques au niveau hépatique

Les métabolites réactifs et mutagènes de l'O-CNB joueraient un rôle important dans l'étape d'initiation de la formation des tumeurs hépatiques (Matsumoto *et al.* 2006c).

3. Hyperprolifération cellulaire et formation de tumeurs hépatiques

L'hyperprolifération cellulaire hépatique se traduit par l'apparition de tumeurs :

- Adénomes et carcinomes hépatocellulaires chez le rat et la souris ;
- Hépatoblastomes uniquement observés chez la souris.

Cohérence des données animales et humaines

Il existe peu de données de toxicité sur l'O-CNB disponibles chez l'homme. Cependant, cliniquement, lors d'expositions aiguës, l'O-CNB est responsable de cyanose à la fois chez l'homme et chez l'animal. Par ailleurs, les adduits de l'hémoglobine se forment à la fois chez les rongeurs et chez des travailleurs exposés aux CNB (Jones *et al.* 2006).

L'ensemble de ces éléments est en faveur d'un mécanisme d'action similaire chez l'animal et chez l'homme.

2.2.2.2 Choix de l'effet critique

L'effet critique retenu pour dériver la VTR orale sans seuil de l'O-CNB est l'effet « cancers hépatiques ». L'exposition par voie orale à l'O-CNB induit l'apparition de tumeurs hépatiques : adénomes et carcinomes hépatocellulaires chez le rat et la souris et hépatoblastomes uniquement chez la souris. La forte mortalité chez les rats due à une néphropathie chronique justifie de ne pas tenir compte de cette espèce dans la dérivation de la VTR. Chez les souris, la forte incidence des

tumeurs hépatiques observée chez les témoins mâles justifie de ne pas tenir compte des souris mâles dans la construction de la VTR.

Il est proposé de cumuler, comme le recommandent Turusov *et al.* (Turosoy *et al.* 2002), les incidences de ces tumeurs hépatiques (une souris présentant deux ou trois tumeurs en même temps n'étant comptée que comme « une souris porteuse d'une tumeur »)⁶. Les adénomes hépatocellulaires n'ont pas été pris en compte car les résultats issus de la modélisation (calcul de la BMD et BMDL) étaient de moins bonne qualité en terme d'intervalle de confiance (estimé par le rapport BMD/BMDL) lorsque les trois types de tumeurs étaient considérés ensemble que lorsque les carcinomes hépatocellulaire et les hépatoblastomes étaient cumulés.

En raison de la relation dose-réponse significative et de la pertinence biologique de prendre en compte plusieurs types de tumeurs, **le cumul des incidences tumorales des hépatoblastomes et des carcinomes hépatocellulaires chez la souris femelle a été retenu comme effet critique** (Tableau 5).

⁶ Cette proposition se base sur l'hypothèse que les hépatoblastomes ne sont pas formés *de novo*, mais proviennent de tumeurs hépatiques pré-existantes, à savoir les adénomes et/ou carcinomes hépatocellulaires.

Turusov *et al.* (2002) ont analysé les études du NTP (National Toxicology Program) dans lesquelles les souris ont présenté des hépatoblastomes dans les études de cancérogénicité de 2 ans. Ils ont notamment mis en évidence que ce type de tumeurs, dont les caractéristiques anatomopathologiques sont bien connues et ne peuvent aboutir à une mauvaise classification, apparaissait aussi bien pour des expositions à des composés génotoxiques que non génotoxiques. Ces tumeurs apparaissent également avec une faible incidence chez les animaux non traités.

Par ailleurs, ces auteurs se sont intéressés à la question de l'origine des hépatoblastomes : ces tumeurs survenaient-elles *de novo*, ou bien étaient-elles formées à partir d'adénomes et de carcinomes hépatocellulaires ? Ils ont observé que lors de sacrifices de souris au bout de 9 mois d'exposition, l'incidence des hépatoblastomes était nulle. A 15 mois, cette incidence était très faible. Lors des sacrifices terminaux, plus de 99% des hépatoblastomes étaient entourés de carcinomes hépatocellulaires, suggérant que les hépatoblastomes provenaient d'adénomes et de carcinomes hépatocellulaires.

Il est à noter que chez l'homme, les hépatoblastomes sont quasi-exclusivement des tumeurs survenant chez de très jeunes enfants, *de novo*, vraisemblablement formés à partir d'hépatoblastes. Par ailleurs, si les hépatoblastomes sont quasi-systématiquement associés à des adénomes et carcinomes hépatocellulaires, l'inverse n'est pas vrai : la plupart des agents responsables d'adénomes et carcinomes hépatiques n'entraînent pas la formation d'hépatoblastomes. Enfin, les agents carcinogènes responsables d'hépatoblastomes chez la souris ne sont généralement pas responsables de tumeurs hépatiques chez le rat, et surviennent par ailleurs chez des souris âgées, en présence de carcinomes hépatocellulaires. C'est également ce qui est observé dans le cas de l'O-CNB.

Sur la base de ces observations, Turusov *et al.* (2002) recommandent, dans le cadre d'une évaluation de risques, de considérer le cumul de l'incidence de ces cancers.

Tableau 5 : Incidences des tumeurs hépatiques chez la souris femelle (nombre d'animaux porteurs de tumeurs hépatiques)

Etude de Matsumoto <i>et al.</i> (2006c), exposition à l'O-CNB chez la souris BDF1 femelle				
Tumeurs cancéreuses	Doses journalières d'exposition (mg.kg ⁻¹ .j ⁻¹)*			
	0	14	69	396
Adénomes hépatocellulaires	8	22	48	38
Carcinomes hépatocellulaires	0	3	14	48
Hépatoblastomes	0	0	9	28
Cumul des adénomes, carcinomes hépatocellulaires et hépatoblastomes ⁷	8	24	50	50
Cumul des carcinomes hépatocellulaires et hépatoblastomes**	0	3	20	48

* 50 animaux par groupe de dose

** Nombre d'animaux portant au moins une tumeur

2.2.2.3 Choix de la dose repère (POD) et extrapolation à l'origine

Dans le cas de la construction d'une VTR sans seuil de dose, le choix du POD est déterminé par une modélisation des données expérimentales. Celle-ci se fait à partir d'équations de régression (linéaires, quadratiques, polynomiales) ou de distribution de probabilités (modèle de Weibull, probit, logistique ou gamma). Dans le cas d'une substance cancérigène et lorsque les données le permettent, on peut également appliquer des modèles mécanistes tels que le modèle multi-étapes linéarisé ou LMS. Enfin, la détermination d'une benchmark dose comme POD suivie d'une extrapolation linéaire à l'origine est une approche de plus en plus utilisée (US EAP 2005).

Les données disponibles ont été modélisés avec le logiciel Proast du RIVM : élaboration d'une Benchmark Dose (BMD), avec extrapolation à l'origine pour la détermination d'une VTR. Il apparaît dans l'étude clé une relation dose-réponse significative entre l'augmentation des incidences tumorale combinées (hépatoblastomes et carcinomes hépatocellulaires) et la dose journalière d'exposition d'O-CNB (test de Peto). Le nombre d'animaux porteurs des deux types de tumeurs aux deux dernières doses diffère de façon statistiquement significative par rapport au groupe témoin.

L'objectif de cette 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 (logiciel Proast⁸ pour des données dichotomiques (modèles gamma, logistique, multi-étapes, probit, Weibull,...)).

⁷ Combinaison des incidences tumorales fournies par les auteurs, correspondant au nombre d'animaux porteurs d'au moins une tumeur.

⁸ Le logiciel Proast, utilisé par le RIVM, a pour avantage, par rapport au logiciel de l'US-EPA (BMD Software), de comparer davantage de modèles mathématiques et de jouer sur un plus grand nombre de paramètres.

Les $BMD_{1\%, 5\%, 10\%}$ et $BMDL_{1\%, 5\%, 10\%}$ ont été calculées, bien que le seuil de 10 % soit généralement retenu car il correspond à la limite de détection dans les essais de cancérogénicité (US EPA 2005). C'est également le seuil de 10 % qui a été considéré comme POD pour l'extrapolation à l'origine permettant d'exprimer l'excès de risque unitaire de cancers. Facteurs d'ajustement

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 95 % d'une dose correspondant à une augmentation de la réponse par rapport au groupe non exposé de 1, 5 ou 10 %.

2.2.2.4 Ajustements

2.2.2.4.1 *Ajustement au temps*

Dans l'étude de Matsumoto, d'une durée de 2 ans, les animaux ont ingéré de l'O-CNB 7 jours sur 7. Une dose journalière d'exposition moyenne pour chaque lot a été calculée à partir de la mesure de la consommation et du poids corporel.

Par conséquent aucun ajustement temporel n'est à prendre en compte puisque l'exposition à l'O-CNB a été continue pendant toute la durée de l'étude.

2.2.2.4.2 *Ajustement allométrique*

L'objectif est de réduire la valeur de l'incertitude sur la variabilité inter-espèce afin de déterminer une dose équivalente humaine (EDH).

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

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

Poids moyen de la souris estimé à 30 g, poids de l'homme estimé à 70 kg. Les doses sont exprimées en $\text{mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$.

Dose critique chez la souris : $BMD_{10L95} = 11,7 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$

$$BMD_{10L95AJ} = 11,7 \times (30.10^{-3}/70)^{1/4} = 1,7 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$$

Dose ajustée chez l'homme : $BMD_{10L95AJ} = 1,7 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$

2.2.2.5 Calcul de la VTR

Le tableau suivant présente les résultats obtenus avec le modèle qui s'ajuste le mieux aux données expérimentales. Chez la souris femelle, le modèle le mieux ajusté aux données expérimentales est le modèle « Gamma ». Selon le BMR utilisé (1,5 ou 10 %), les VTR sont du même ordre de grandeur.

Tableau 6 : BMD, BMDL, VTR chez la souris femelle pour les souris porteuses de carcinomes hépatocellulaires ou d'hépatoblastomes (incidences cumulées)

Excès de risque (BMR)	Modèle le mieux ajusté	BMD chez la souris femelle (mg.kg ⁻¹ .j ⁻¹)	BMDL chez la souris femelle (mg.kg ⁻¹ .j ⁻¹)	BMD équivalente chez l'homme (mg.kg ⁻¹ .j ⁻¹)	BMDL équivalente chez l'homme (mg.kg ⁻¹ .j ⁻¹)	Pente* = ERU (µg.kg ⁻¹ .j ⁻¹) ⁻¹
10 %	Gamma	19,1	11,7	2,75	1,7	5,94 10 ⁻⁵
5 %		10,5	5,72	1,5	0,8	6,10 10 ⁻⁵
1 %		2,73	1,12	0,39	0,16	6,20 10 ⁻⁵

** Pente = BMR/BMD_{10L95}

La VTR calculée à partir de la BMDL₁₀ a été retenue. Dans un souci de simplification, il a été arrondi à sa valeur entière supérieure.

$$\rightarrow \text{VTR} = 6.10^{-5} (\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1})^{-1}$$

Soit pour un risque de 10⁻⁶ : il faudrait être exposé à une dose de 0,017 µg.kg⁻¹.j⁻¹

2.2.2.6 Synthèse

Tableau 7 : Conclusion sur la VTR sans seuil

Effet critique	Dose critique	VTR
Hépatocarcinomes et hépatoblastomes chez la souris femelle BDF1	BMD _{10L95} = 11,7 mg.kg ⁻¹ .j ⁻¹	Après extrapolation linéaire à l'origine : VTR = 6.10⁻⁵ (µg.kg⁻¹.j⁻¹)⁻¹
Etude de cancérogénicité et de toxicité chronique chez le rat et la souris Matsumoto <i>et al.</i> (2006)	Ajustement allométrique BMD _{10L95AJ} * = 1,7 mg.kg ⁻¹ .j ⁻¹	0,017 µg.kg ⁻¹ .j ⁻¹ pour un risque de 10 ⁻⁶ 0,17 µg.kg ⁻¹ .j ⁻¹ pour un risque de 10 ⁻⁵ 1,7 µg.kg ⁻¹ .j ⁻¹ pour un risque de 10 ⁻⁴

* BMD_{10L95AJ} = BMD_{10L95} ajusté chez l'homme

2.2.3 Elaboration de VTR à seuil

2.2.3.1 Mécanisme d'action proposé et cohérence des données animales et humaines

La cytotoxicité hépatique se manifeste notamment au niveau biologique par une élévation des enzymes hépatiques (ALAT, ASAT, γ-GT).

La cytotoxicité de l'O-CNB se manifeste essentiellement au niveau hépatique, bien que ce composé induise également des effets hématotoxiques dont l'une des manifestations est la méthémoglobinémie (Matsumoto *et al.* 2006b ; Matsumoto *et al.* 2006c ; NTP 1993). Les événements clés impliqués dans les effets hépatotoxiques de l'O-CNB se dérouleraient de la manière suivante :

1. Génération de métabolites de l'O-CNB et/ou de ses métabolites

Dans un premier temps, l'O-CNB serait métabolisé en différents métabolites (dont la 2-chloroaniline).

2. Cytotoxicité

L'O-CNB et/ou ses métabolites exerceraient une action cytotoxique.

3. Lyse cellulaire et élévation des enzymes hépatiques

Cette action cytotoxique aboutirait à une lyse des hépatocytes, avec libération des enzymes hépatiques dans la circulation sanguine (élévation des ALAT, ASAT, γ -GT).

2.2.3.2 Choix de l'effet critique et de la dose repère

Il est proposé de retenir comme point de départ le NOAEL pour l'élévation des ALAT qui sont les enzymes les plus spécifiques des lésions hépatiques que les ASAT et les γ -GT. Elles témoignent d'une lyse cellulaire et donc, indirectement, d'une hépatotoxicité.

Tableau 8 : Elévation des ALAT chez la souris femelle (Matsumoto et al. 2006a)

DJE* (mg.kg ⁻¹ .j ⁻¹)	0	14	69	396
Nombre d'animaux examinés	29	34	26	4
ALAT (U.I.L ⁻¹) (moyenne +écart type)	36 ±27	51 ±62	480 ±816**	2115 ±779**

*DJE : Dose journalière d'Exposition ** significatif p<0,01 (test de Dunnett)

Le NOAEL pour l'élévation des ALAT est de 14 mg.kg⁻¹.j⁻¹ pour les souris femelles. A noter que les NOAEL des autres enzymes (ASAT, γ -GT, LDH) sont également de 14 mg.kg⁻¹.j⁻¹ pour les souris femelles.

Remarque : Le calcul d'une Benchmark Dose n'a pas pu être réalisé dans ce cas précis car les données expérimentales ne pouvaient pas être modélisées (les écart-types associés à la moyenne sont trop dispersés pour être modélisés).

2.2.3.3 Ajustements

2.2.3.3.1 Ajustement au temps

Dans l'étude de Matsumoto, d'une durée de 2 ans, les animaux ont ingéré de l'O-CNB pendant 7 jours sur 7. Une dose journalière d'exposition moyenne pour chaque lot a été calculée à partir de la mesure de la consommation et du poids corporel.

Par conséquent aucun ajustement temporel n'est à prendre en compte puisque l'exposition à l'O-CNB a été continue pendant toute la durée de l'étude.

2.2.3.3.2 Ajustement allométrique

Un ajustement allométrique a été appliquée sur le NOAEL retenu selon les recommandations de l'US EPA (US EPA 2006) et a permis de calculer une EDH (Equivalent de Dose chez l'Homme), à l'aide de l'équation décrite en 2.2.2.4.2.

2.2.3.4 Choix des facteurs d'incertitude (UF)

- **UF_A** : variabilité inter-espèces : Pour tenir compte de la variabilité toxicodynamique et d'incertitudes résiduelles, un facteur d'incertitude de 2,5 a été fixé selon les recommandations du document de référence pour « la construction d'une valeur toxicologique de référence pour les substances reprotoxiques » (Afsset 2007).
- **UF_H** : variabilité inter-individuelle (ou intra-espèce) : Une valeur finale de 10 par défaut a été choisie pour la variabilité intra-espèces (Afsset 2007)

2.2.3.5 Calcul de la VTR

Dans un souci de cohérence avec la VTR sans seuil calculée chez la souris femelle, le calcul de la VTR à seuil n'a été effectué que pour la souris femelle. Il est toutefois à noter que les résultats auraient été sensiblement comparables chez la souris mâle compte-tenu du fait que le NOAEL pour l'élévation des ALAT se situe à 11 mg.kg⁻¹.j⁻¹.

Choix de la dose critique : NOAEL = 14 mg.kg⁻¹.j⁻¹

Ajustement au temps : x 1

Ajustement allométrique :

$$\text{NOAEL}_{\text{AD}} = 14 \times (30 \cdot 10^{-3} / 70)^{1/4} = 2 \text{ mg.kg}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$$

Application des facteurs d'incertitude :

Facteur de variabilité inter-espèces = 2,5

Facteur de variabilité interindividuelle = 10

La VTR a été calculée comme suit :

$$\text{VTR} = \frac{\text{NOAEL}}{\text{UFA} \times \text{UFH}} \text{ pour les effets hépatotoxiques}$$

Soit une VTR basée sur les effets hépatotoxiques = 80 µg.kg⁻¹.j⁻¹

2.2.3.6 Synthèse

Tableau 9 : Conclusion sur la VTR à seuil

Effet critique	Dose critique*	Facteur d'incertitude	VTR
Effets hépatotoxiques (diminution des ALAT) chez la souris femelle	NOAEL = 14 mg.kg ⁻¹ .j ⁻¹	25	VTR= 80 µg.kg⁻¹.j⁻¹
Etude de cancérogénicité et de toxicité chronique chez le rat et la souris	Ajustement allométrique NOAEL _{AJ} = 2 mg. kg ⁻¹ .j ⁻¹	UF _A (composante toxicodynamique) = 2,5	
Matsumoto <i>et al.</i> , 2006c		UF _H = 10	

2.3 Elaboration de VTR pour la voie inhalée

Aucune VTR existante n'a été retrouvée pour la voie inhalée.

Le CES n'a pas souhaité dériver une VTR chronique pour la voie inhalée. En effet, les données de toxicité sont insuffisantes. Il n'existe pas d'étude de cancérogénicité pour cette voie d'exposition. Une étude de toxicité de 13 semaines a été retrouvée (Travlos *et al.* 1966) mais ne permet pas de dériver une VTR par voie respiratoire.

Par ailleurs, il peut être souligné que l'exposition par inhalation est vraisemblablement limitée du fait que les concentrations saturantes en M-CNB dans l'air sont relativement basses. La voie d'exposition majoritaire à l'O-CNB semble être la voie orale.

3 Méta-chloronitrobenzène (CASRN 121-73-3)

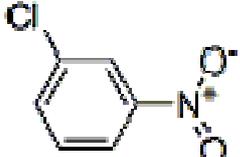
3.1 Profil toxicologique du M-CNB

3.1.1 Informations générales

3.1.1.1 Identification de la substance

Le M-CNB est un benzène substitué par un groupement nitro et un atome de chlore en position méta. Son identification est donnée dans le Tableau 10.

Tableau 10 : Identification du M-CNB

Numéro CAS	121-73-3
Nom	Méta-chloronitrobenzène (M-CNB) ou 3-chloronitrobenzène
Formule brute	C ₆ H ₄ ClNO ₂
Formule développée	

3.1.1.2 Propriétés physico-chimiques

A température ambiante, le M-CNB se présente sous forme solide (prismes) dont les principales propriétés physicochimiques sont données dans le Tableau 11 (IARC 1996 ; INERIS 2008).

Tableau 11 : Propriétés physicochimiques du M-CNB

Forme physique	Solide cristallin
Masse Molaire (g.mol ⁻¹)	157,56
Point d'ébullition (°C)	236
Pression de vapeur (Pa) ⁹	1,11 Pa à 20°C
Densité de vapeur	1,34 -1,53
Facteurs de conversion	1 ppm = 6,44 mg.m ⁻³ à 25°C
Solubilité dans l'eau (mg.L ⁻¹)	273 mg.L ⁻¹ à 20 °C
Log Kow ¹⁰	2,46

⁹ La pression de vapeur est la pression partielle de la vapeur d'un corps présent également sous forme liquide ou solide.

3.1.1.3 Plausibilité d'exposition humaine

Le M-CNB est exclusivement utilisé comme intermédiaire de synthèse et son occurrence naturelle n'est pas connue. Il est retrouvé de manière accidentelle dans l'environnement, en particulier dans l'eau. Il peut par ailleurs être formé à partir des nitrobenzènes lors de la chloration de l'eau potable. Il a été également identifié chez diverses espèces de poissons à proximité de rivières polluées par ce composé (INERIS 2008).

Une dégradation microbiologique existe par *Pseudomonas acidovorans* CA50 (Kuhlmann, 2006). Le métabolite principal de cette réduction microbiologique est la 3-chloroaniline. L'exposition humaine doit donc être considérée comme plausible en dehors de l'exposition professionnelle et concerne en plus la 3-chloroaniline. Les données disponibles ne permettent donc pas d'exclure l'hypothèse selon laquelle l'homme serait principalement exposé à ce composé et en plus à au moins un de ses produits de dégradation.

L'homme peut être exposé à ce composé par ingestion d'eau contaminée, par inhalation de vapeurs ou d'aérosols (épisodes de bains et de douches, dégazage de la nappe), et par passage cutané de vapeurs et ou d'aérosols de M-CNB contenus dans l'eau potable (bains, douches).

Du fait de ses propriétés physico-chimiques, la principale voie d'exposition chez l'homme hors exposition professionnelle semble être la voie orale (ingestion directe ou indirecte d'eau contaminée). Il paraît peu probable que la population générale puisse être exposée de façon importante par inhalation à des vapeurs de M-CNB consécutives à un dégazage de la nappe ou lors d'épisodes de douches et de bains, compte-tenu du fait que ce composé est peu volatil à température ambiante. L'inhalation de M-CNB sous forme d'aérosols et ou de gaz peut en revanche être envisagée lors des épisodes de douches et de bains.

En milieu professionnel, les individus peuvent être exposés au M-CNB par inhalation de vapeurs et par voie cutanée. L'exposition au M-CNB par voie cutanée n'est pas documentée mais il est possible qu'un passage transcutané de vapeurs ait lieu, comme cela est semblé être le cas pour les autres chloronitrobenzènes (voir paragraphe 0).

3.1.2 Toxicocinétique - Toxicodynamie

Le métabolisme du M-CNB est peu renseigné. Aucune donnée n'est disponible chez l'homme.

In vitro, lorsque des hépatocytes de rat sont incubés avec du M-CNB, le principal métabolite produit est la chloroaniline (environ 30 %), suivi de la 3-chloroacétanilide et de la 3-chloroaniline-n-glucuronide. Aucun composé conjugué au glutathion n'a été mis en évidence, contrairement aux autres chloronitrobenzènes. La formation des chloroanilines à partir du M-CNB est sous la dépendance de cytochrome P450 et peut être inhibée par le monoxyde de carbone (Rickert and Held 1990).

Au cours de la réduction du groupement nitro en groupement amine, un produit intermédiaire très réactif d'hydroxylamine est formé. Cette formation a été observée *in vitro* et *in vivo* chez le rat (BG Chemie, 2000).

Aucune donnée concernant la toxicocinétique du M-CNB n'a été retrouvée dans la littérature chez l'animal ou chez l'homme, quelle que soit la voie d'exposition.

¹⁰ Log Kow : logarithme du coefficient de partage octanol-eau. Il correspond au ratio entre la concentration de la substance dans l'octanol et celle dans l'eau à l'équilibre. Il est corrélé à la solubilité dans l'eau et reflète indirectement les potentiels de bioconcentration et de bioaccumulation d'une substance.

3.1.3 Toxicité aiguë

Les données relatives à la toxicité aiguë du M-CNB sont quasiment inexistantes. Ce composé est cependant connu comme étant méthémoglobinisant (IARC 1996).

3.1.3.1 Voie inhalée

Chez le rat, l'exposition par voie intra-péritonéale au M-CNB est responsable d'une méthémoglobinémie et d'anémie. Des résultats *in vitro* ont mis en évidence l'action du M-CNB sur l'hémoglobine, avec formation d'adduits (IARC 1996).

Il n'existe pas de données disponibles chez l'homme.

3.1.3.2 Voie orale

Chez le rat et la souris, la DL50 par voie orale est comprise entre 300 et 470 mg.kg⁻¹ (BG Chemie 2000).

3.1.3.3 Voie cutanée

Chez le rat, la DL50 par voie cutanée est comprise entre 800 et 1700 mg.kg⁻¹ (BG Chemie 2000).

3.1.4 Toxicité subchronique et chronique

3.1.4.1 Données animales

Une étude d'exposition orale de 28 jours sur des rats Charles-River (CrI:CD(SD)BR) a montré des effets hématotoxiques à la dose de 1 mg.kg⁻¹ de poids corporel (LOAEL) (BG Chemie, 2000).

Des études de neurotoxicité ont montré qu'une dose orale de 0,025 mg.kg⁻¹ de poids corporel correspond à une NOAEL (Davydova, 1967).

3.1.4.2 Données humaines

En milieu professionnel, il est suggéré que l'exposition aux vapeurs de M-CNB soit associée à la formation d'adduits sur l'hémoglobine, comme lors de l'exposition aux autres chloronitrobenzènes (Jones *et al.* 2006). Les niveaux d'exposition dans l'air sont insuffisamment documentés pour déterminer s'il existe une corrélation entre les concentrations en M-CNB dans l'air et la formation d'adduits sur l'hémoglobine. Cependant, pour le para-CNB et l'ortho-CNB, composés dont on dispose davantage d'informations, il n'existe pas de corrélation entre les niveaux d'exposition et la quantité d'adduits formés sur l'hémoglobine, suggérant que l'inhalation n'est pas la seule voie d'exposition. Les résultats de l'étude de Jones *et al.* (2006) restent toutefois à interpréter avec prudence car l'étude n'a porté que sur un faible échantillon de travailleurs.

Aucune étude épidémiologique portant sur l'exposition au M-CNB n'a été retrouvée.

3.1.5 Reprotoxicité

Selon Mohr et Working (1988), l'exposition orale de rats mâles Fischer 344 a démontré, après 25 jours, une diminution de la production des spermatozoïdes et une toxicité testiculaire significative (BG Chemie, 2000).

3.1.6 Génotoxicité

L'ensemble des tests suivants s'est révélé négatif : SOS Chromotest sur *E. Coli*, essais de mutagénicité sur *S. typhimurium* avec ou sans système d'activation S9, tests d'échanges de chromatides sœurs et d'induction d'aberration chromosomiques sur des cellules ovariennes de hamster chinois (IARC 1996).

In vivo, le M-CNB est responsable de la formation d'adduits à l'hémoglobine chez le rat (Sabbionni 1994), ce qui est un argument fort mais non suffisant en faveur d'un potentiel génotoxique. Chez l'homme, l'étude de Jones *et al.* (2006) a montré que les dérivés ortho et para du chloronitrobenzène entraînaient la formation d'adduits à l'hémoglobine, mais n'a pas permis de conclure clairement pour le dérivé méta, en raison d'insuffisances méthodologiques. Compte-tenu des données disponibles pour les dérivés ortho et para, il est vraisemblable que le M-CNB entraîne la formation d'adduits sur l'hémoglobine chez l'homme.

Compte-tenu du fait que les tests de génotoxicité classiques sont négatifs, et malgré la formation d'adduits à l'hémoglobine, il est autorisé de penser que le M-CNB n'a pas d'activité génotoxique.

Remarque : En 1996, le CIRC a classé le M-CNB dans le groupe 3 (composé non classable vis-à-vis de la cancérogénicité chez l'homme). Le M-CNB n'a pas été classé par l'Union Européenne.

L'ensemble des données de génotoxicité disponibles est résumée dans le tableau suivant de manière synthétique. Les études non publiées n'ont pas été considérées.

Tableau 12 : Données de génotoxicité sur le M-CNB

	M-CNB	Référence
Test d'Ames en absence de S9	Négatif sur TA 98, TA1538, TA1537, TA100, TA1535 (doses de 25 à 1638 µg/plaque)	(Shimizu <i>et al.</i> 1983)
Test d'Ames en présence de S9	Négatif sur TA 98, TA1538, TA1537, TA100, TA1535 (doses de 25 à 1638 µg/plaque)	(Shimizu <i>et al.</i> 1983)
Activité mutagène en présence de S9 et de norharmane ¹¹	Négatif sur TA 98, (doses de 0 à 100 µg/plaque)	(Suzuki <i>et al.</i> 1983)
Echanges de chromatides sœurs (<i>in vitro</i> sur CHO) en absence de S9 et en présence	Négatif	(Galloway <i>et al.</i> 1987) (information disponible dans NTP, 1993)
Aberrations chromosomiques (<i>in vitro</i> sur CHO) en absence et en présence de S9	Négatif	(Galloway <i>et al.</i> 1987) (information disponible dans NTP, 1993)
Aberrations chromosomiques (<i>in vitro</i> sur lymphocytes humains) en absence de S9	Positif	(Huang <i>et al.</i> , 1995)
Test indicatif : Adduits à l'hémoglobine (rat, homme)	Positif	(Jones <i>et al.</i> 2006)
Conclusion des experts sur la génotoxicité	Composé non génotoxique	

3.1.7 Effets cancérigènes et mécanismes d'action

Il n'est pas possible de conclure à un quelconque potentiel cancérigène du M-CNB compte-tenu du peu de données disponibles chez l'animal et chez l'homme.

3.2 Elaboration de la VTR du M-CNB pour la voie orale et pour la voie inhalée

3.2.1 VTR existantes

Aucune VTR n'a été retrouvée dans la littérature, quelle que soit la voie d'exposition considérée.

¹¹ Norharmane : agent co-mutagène

3.2.2 Mécanisme d'action proposé et cohérence des données animales et humaines

Les données sont insuffisantes pour proposer un mécanisme d'action.

3.2.3 Calcul de la VTR

Compte-tenu de l'insuffisance de données toxicologiques chez l'animal et chez l'homme, il n'est pas possible d'élaborer une quelconque VTR pour ce composé.

Il n'est pas non plus envisageable d'élaborer une VTR par similitude structurale avec les autres chloronitrobenzènes car les profils de génotoxicité sont différents entre l'O-CNB et les autres CNB et car les profils de toxicité chronique sont différents entre l'O-CNB (essentiellement hépatotoxique) et le P-CNB (essentiellement hématotoxique) et inconnus pour le M-CNB.

Enfin, il est à noter que le M-CNB est quantitativement minoritaire dans la nappe d'Alsace.

4 Para-chloronitrobenzène (CASRN 100-00-5)

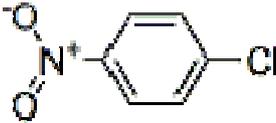
4.1 Profil toxicologique du P-CNB

4.1.1 Informations générales

4.1.1.1 Identification de la substance

Le para-chloronitrobenzène (P-CNB) est un benzène substitué par un groupement Nitro et un atome de Chlore en position para ; son identification est donnée dans le Tableau 13.

Tableau 13 : Identification du P-CNB

Numéro CAS	100-00-5
Nom	Para-chloronitrobenzène
Formule brute	$C_6H_4ClNO_2$
Formule développée	
Classification	CIRC : groupe 3 (composé non classable vis-à-vis de la cancérogénicité pour l'homme) UE : cancérogène de catégorie 3 (substance préoccupante pour l'homme en raison de ses possibles effets cancérogènes) et mutagène de catégorie 3 (substance préoccupante chez l'homme en raison de ses possibles effets mutagènes)

4.1.1.2 Propriétés physico-chimiques

Le P-CNB se présente sous forme d'un solide dont les principales propriétés physicochimiques sont données dans le Tableau 14 (IARC 1996).

Tableau 14 : Propriétés physicochimiques du P-CNB

Forme physique	Solide
Masse Molaire (g.mol ⁻¹)	157,56
Point d'ébullition (°C)	242
Pression de vapeur (Pa) ¹²	20 à 30 °C
Densité de vapeur	5,44
Facteurs de conversion	1 ppm = 6,44 mg.m ⁻³
Solubilité dans l'eau (mg.L ⁻¹)	243 à 20 °C
Constante de Henry ¹³	1,99.10 ⁻⁴
Log Kow ¹⁴	2,39

4.1.1.3 Plausibilité d'exposition humaine

Le P-CNB est exclusivement utilisé comme intermédiaire de synthèse ; son occurrence naturelle n'est pas connue. Il est retrouvé de manière accidentelle dans l'environnement, en particulier dans l'eau. Il peut par ailleurs être formé à partir des nitrobenzènes lors de la chloration de l'eau potable. Il a été également identifié chez diverses espèces de poissons à proximité de rivières polluées suite à des relargages accidentels de P-CNB (IARC 1996).

L'O-CNB semble être relativement stable, peu hydrolysable dans l'eau (INERIS 2008) mais une dégradation microbiologique relativement lente existe en environnement. En effet, une dégradation microbiologique existe par *Pseudomonas acidovorans* CA50 (Kuhlmann, 2006). Le métabolite principal de cette réduction microbiologique est la 4-chloroaniline. L'exposition humaine doit donc être considérée comme plausible en dehors de l'exposition professionnelle et concerne en plus la 4-chloroaniline. Les données disponibles ne permettent donc pas d'exclure l'hypothèse selon laquelle l'homme serait principalement exposé à ce composé et en plus à au moins un de ses produits de dégradation.

L'homme peut être exposé à ce composé par ingestion d'eau contaminée, par inhalation de vapeurs ou d'aérosols (épisodes de bains et de douches, nettoyages à l'aide d'eau à haute pression, dégazage de la nappe), et par passage cutané de P-CNB contenu dans l'eau potable (bains, douches).

Du fait de ses propriétés physico-chimiques, la principale voie d'exposition chez l'homme hors exposition professionnelle semble être la voie orale (ingestion d'eau contaminée). Il paraît peu probable que la population générale puisse être exposée de façon importante par inhalation à des vapeurs de P-CNB consécutives à un dégazage de la nappe ou lors d'épisodes de douches et de bains, compte-tenu du fait que ce composé est peu volatile à température ambiante. L'inhalation de P-CNB sous forme d'aérosols peut en revanche être envisagée lors des épisodes de douches et de bains.

En milieu professionnel, les individus peuvent être davantage exposés au P-CNB par inhalation de vapeurs et par voie cutanée (IARC 1996). Pour la voie cutanée, les données disponibles ne permettent pas de savoir si le passage transcutané concerne le P-CNB à l'état liquide ou à l'état gazeux.

12 La pression de vapeur est la pression partielle de la vapeur d'un corps présent également sous forme liquide ou solide.

13 Information disponible dans l'évaluation détaillée des risques de Rhodia Organic, 2006

14 Log Kow : logarithme du coefficient de partage octanol-eau. Il correspond au ratio entre la concentration de la substance dans l'octanol et celle dans l'eau à l'équilibre. Il est corrélé à la solubilité dans l'eau et reflète indirectement les potentiels de bioconcentration et de bioaccumulation d'une substance.

4.1.2 Toxicocinétique

4.1.2.1 Absorption

Le P-CNB est rapidement absorbé quelle que soit la voie d'exposition (OCDE 2002).

4.1.2.1.1 Voie inhalée

Le P-CNB traverse la barrière pulmonaire, mais peu de données de toxicocinétique concernant cette voie d'exposition sont disponibles (IARC 1996).

4.1.2.1.2 Voie orale

Chez le rat, lors d'une exposition unique, environ 80 % de la dose en P-CNB administrée par voie orale (doses de 2 à 200 mg.kg⁻¹) est absorbée au niveau du tractus gastro-intestinal (NTP 1993, OCDE 2001).

4.1.2.1.3 Voie cutanée

Chez le rat, le P-CNB en solution (véhicule : acétone) traverse la barrière cutanée : en 72 heures, plus de 60 % du P-CNB administré sur la peau (doses de 0,65 à 65 mg.kg⁻¹) est excrété dans les urines ou dans les fèces (NTP 1993).

4.1.2.2 Distribution

Aucune donnée de distribution du P-CNB n'est disponible pour l'exposition par voie respiratoire.

Lors d'une exposition par voie orale, le P-CNB et ses métabolites sont distribués principalement dans les tissus adipeux. On les retrouve également au niveau des cellules sanguines, des tissus musculaires, du foie et des reins (OCDE 2002).

4.1.2.3 Métabolisme

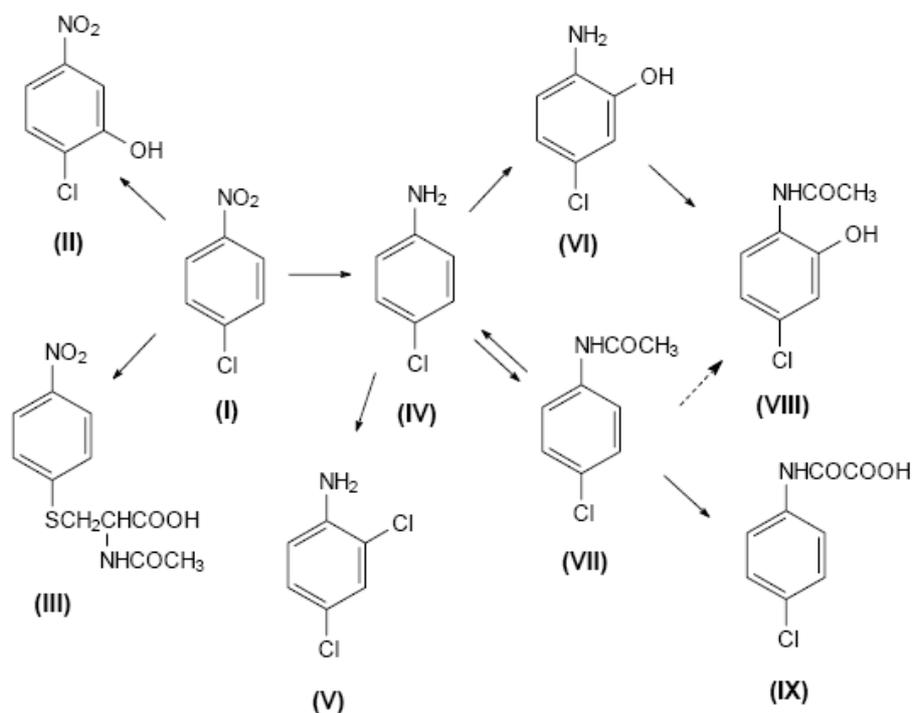
Les études toxicocinétiques effectuées chez le rat ont permis d'identifier les principales voies métaboliques du P-CNB, qui ont été confirmées chez l'homme par l'analyse des métabolites urinaires retrouvés suite à une intoxication aiguë (IARC 1996).

Le P-CNB est majoritairement métabolisé selon trois voies dont la principale est la conjugaison au glutathion. Elle aboutit à l'excrétion d'un acide mercapturique en quantité importante (48 % des métabolites) : la N-acetyl-S-(4-nitrophenyl)-L-Cystéine.

Une deuxième voie métabolite consiste en une réduction du groupement nitro en groupement amine, avec formation de chloroaniline, pouvant être soit directement excrétée, soit rapidement métabolisée en d'autres composés, dont l'acide para-oxanilique, la 4-chloroaniline et la 4-chloro-2-hydroxyacétaniline.

Enfin, le P-CNB peut également être directement hydroxylé en 2-chloro-5-nitrophénol.

Figure 1 : Métabolisme du P-CNB chez l'homme (IARC 1996)



From Yoshida *et al.* (1993)

I, 4-Chloronitrobenzene; II, 2-chloro-5-nitrophenol; III, *N*-acetyl-*S*-(4-nitrophenyl)-*L*-cysteine; IV, 4-chloroaniline; V, 2,4-dichloroaniline; VI, 2-amino-5-chlorophenol; VII, 4-chloroacetanilide; VIII, 4-chloro-2-hydroxyacetanilide; and IX, 4-chloro-oxanilic acid.

Dotted line: It was not clear whether VIII was formed by hydroxylation of VII.

D'autres auteurs (Jones *et al.* 2006) suggèrent que le P-CNB est hydroxylé en *N*-hydroxylarylamine, un intermédiaire réactif qui peut se lier à l'ADN et aux protéines dont l'hémoglobine.

4.1.2.4 Excrétion - élimination

Chez le lapin, il est rapporté qu'environ 60 % du P-CNB est excrété sous forme de métabolites dans l'urine. Ces métabolites sont essentiellement des dérivés phénoliques conjugués (OCDE 2002).

Chez le rat, plus de 50 % du P-CNB administré sur la peau (véhicule : acétone) est excrété dans les urines ou dans les fèces (NTP 1993).

4.1.3 Toxicité aiguë

4.1.3.1 Voie inhalée

Chez le rat, la cyanose est le principal signe d'intoxication (OCDE 2002).

Chez l'homme, des intoxications aiguës au P-CNB ont été associées à des maux de tête, des palpitations, des nausées, des vomissements et une cyanose. Les voies d'exposition impliquées étaient la voie respiratoire et probablement la voie cutanée. Au niveau biologique, une méthémoglobinémie, une anémie, une réticulocytose et la présence de corps de Heinz ont été mis en évidence (IARC 1996).

4.1.3.2 Voie orale

Chez le rat, la cyanose est le principal signe d'intoxication (OCDE 2002).

Aucune donnée de toxicité aiguë par voie orale n'est disponible chez l'homme.

4.1.3.3 Voie cutanée

Se reporter au paragraphe 4.1.3.1.

4.1.4 Toxicité subchronique et chronique

4.1.4.1 Données animales

Le P-CNB est hématotoxique lors d'expositions subchroniques par voie orale et par voie respiratoire. Cette hématotoxicité s'exprime par une anémie accompagnée d'une élévation du taux sanguin de bilirubine, une congestion de la rate et des dépôts d'hémossidérine. Cliniquement, une pâleur de la peau est observée. Une augmentation de l'hématopoïèse médullaire est observée. Par ailleurs une hématopoïèse extramédullaire est observée d'abord au niveau de la rate, puis au niveau du foie. Cette hématopoïèse extramédullaire correspond à un phénomène compensatoire en réponse à l'anémie. Ces effets toxiques semblent être la conséquence de la méthémoglobinémie induite par l'exposition au P-CNB (Matsumoto *et al.* 2006a ; Matsumoto *et al.* 2006b ; NTP 1993).

Des signes de toxicité hépatique sont également observés (nécrose et dégénérescence hépatique chez les rats ; hépatocytes atypiques avec un noyau élargi uniquement chez les souris). Les ALAT sont augmentées (Matsumoto *et al.* 2006a). L'augmentation de l'activité des ALAT est considérée comme un reflet d'une cytolyse hépatique, libérant des transaminases du foie dans le sang. Cette cytotoxicité hépatique serait toutefois insuffisante aux doses testées pour entraîner une augmentation de l'incidence des tumeurs hépatiques, comme c'est le cas pour l'O-CNB (Matsumoto *et al.* 2006c).

Le P-CNB est responsable d'effets hépatotoxiques et hématotoxiques (tout comme son isomère l'O-CNB). Le P-CNB apparaît toutefois davantage hématotoxique que l'O-CNB en raison de son fort pouvoir méthémoglobinisant.

Il semble exister un phénomène d'adaptation à l'anémie due à l'exposition au P-CNB. Cette hypothèse est suggérée au regard des résultats de l'étude de toxicité subchronique de Matsumoto *et al.* (Matsumoto *et al.* 2006b). En effet, dans cette étude, les doses d'exposition auxquelles apparaissent les signes d'anémie sont inférieures à celles retrouvées dans l'étude de cancérogénicité conduite par la même équipe. Il est donc possible que la toxicité du P-CNB se manifeste assez rapidement par des signes d'anémie mais que ce phénomène soit compensé par une hématopoïèse extramédullaire.

Les données de toxicité subchronique et chronique disponibles dans l'étude de Matsumoto *et al.* (2006c) sont davantage détaillées dans le paragraphe 4.2.1.

4.1.4.2 Données humaines

En milieu professionnel, l'exposition aux vapeurs de P-CNB a été associée à la formation d'adduits à l'hémoglobine. Aucune corrélation n'a été mise en évidence entre les niveaux d'exposition et la quantité d'adduits formés à l'hémoglobine, suggérant que l'inhalation n'est pas la seule voie d'exposition (Jones *et al.* 2006). Les résultats de l'étude de Jones *et al.* (2006) restent toutefois à interpréter avec prudence car l'étude n'a porté que sur un faible échantillon de travailleurs, avec co-exposition possible à d'autres composés chimiques.

Aucune étude épidémiologique portant sur l'exposition au P-CNB n'a été retrouvée.

4.1.5 Reprotoxicité

Des effets sur le développement ont été mis en évidence avec le P-CNB mais à des doses entraînant une toxicité maternelle. Pour plus d'informations, il est recommandé de se reporter au rapport de l'OCDE (OCDE 2002) ou à la monographie du CIRC (IARC 1996).

4.1.6 Génotoxicité

Les résultats des différents tests de génotoxicité réalisés *in vitro* et *in vivo* laissent supposer que le P-CNB présente un potentiel génotoxique plus prononcé que celui des autres chloronitrobenzènes (IARC 1996, OCDE 2002).

Le P-CNB est mutagène sur *Salmonella Typhimurium* (TA 100 et TA 98) essentiellement en présence de système d'activation métabolique (microsome S9) (NTP 1993). Il induit des aberrations chromosomiques et des échanges de chromatides sœurs *in vitro* sur cellules ovariennes de hamster chinois (CHO) aussi bien en absence qu'en présence de S9 (NTP 1993). *In vivo*, il induit des cassures de l'ADN dans différents tissus et une synthèse non programmée de l'ADN dans des hépatocytes (Cesarone *et al.* 1983 ; Cesarone *et al.* 1984). L'activité génotoxique du P-CNB serait donc davantage liée aux métabolites qu'au P-CNB lui-même. Un des métabolites du P-CNB, la p-chloroaniline, est aussi mutagène en présence de S9 sur bactéries et il induit des aberrations chromosomiques sur les cellules CHO (JETOC Japan Chemical Industry Ecology-Toxicology & Information Center 1996 ; Shimizu *et al.* 1983).

Le P-CNB induit chez le rat et chez l'homme des adduits à l'hémoglobine (Jones *et al.* 2006 ; Sabbioni 1994), ce qui est un argument supplémentaire en faveur de l'hypothèse de son potentiel génotoxique, qui peut-être corroborée par la formation potentielle des adduits à l'ADN. Une étude a montré que les adduits à l'ADN après exposition de rats au P-CNB (Jones and Sabbioni 2003) sont au-dessous des limites de détection. Cependant la méthode utilisée est moins sensible que d'autres méthodes plus spécifiques à l'analyse des adduits à l'ADN telles que le marquage au Phosphore-32 (³²P-*postlabelling*) après purification (Hemminki *et al.* 1993 ; IARC 1994). Dans l'étude de Jones et Sabbioni (2003), des adduits à l'hémoglobine sont formés avec des arylamines et nitroarènes pour lesquels les adduits à l'ADN n'ont pas été détectés. La formation d'adduits à l'hémoglobine signifie que des intermédiaires réactifs sont produits et qu'ils pourraient aussi réagir avec les sites nucléophiles de l'ADN (Jones and Sabbioni 2003).

A noter que le caractère génotoxique du P-CNB est reconnu par un certain nombre d'organismes même si celui-ci est considéré comme étant relativement faible (OCDE, HEAST, OEHHA).

L'ensemble des données de génotoxicité disponibles est résumé dans le Tableau 15.

Tableau 15 : Données de génotoxicité sur le P-CNB

	Nature du test	Résultats	Référence
<i>In vitro</i>	Test d'Ames en absence de S9	Négatif sur TA98, TA1538, TA 1537 (doses de 25 à 1638 µg/plaque)	(Shimizu <i>et al.</i> 1983)
		Positif sur TA100, TA1535 (doses de 25 à 1638 µg/plaque)	(Shimizu <i>et al.</i> 1983)
		Négatif sur TA100 (doses de 0 à 500 µg/plaque) et TA98 (doses de 0 à 200 µg/plaque)	(Haworth <i>et al.</i> 1983) -données publiées dans le rapport NTP (NTP 1993)
	Test d'Ames en présence de S9	Positif sur TA100 (doses de 0 à 500 µg/plaque) et Négatif sur TA98 (doses de 0 à 200 µg/plaque)	(Haworth <i>et al.</i> 1983)- données publiées dans le rapport NTP (NTP 1993)
	Activité mutagène en présence de S9	Positif sur TA98 (doses de 0 à 100 µg/plaque) uniquement en présence de norharmane ¹⁵	(Suzuki <i>et al.</i> 1983)
		Positif sur TA98 (doses de 0 à 1000 g/plaque) uniquement en présence de norharmane	(Suzuki <i>et al.</i> 1987)
	Echanges de chromatides sœurs sur CHO en absence et en présence de S9	Positif	(Galloway <i>et al.</i> 1987) -données publiées dans le rapport NTP (NTP 1993)
	Aberrations chromosomiques (<i>in vitro</i> sur CHO) en absence et en présence de S9	Positif mais à des doses assez élevées	(Galloway <i>et al.</i> 1987) -données publiées dans le rapport NTP (NTP 1993)
Synthèse non programmée de l'ADN sur hépatocytes	Positif	(Cesarone <i>et al.</i> 1984)	
<i>In vivo</i>	Sur rein, cerveau, foie de souris après injection intra-péritonéale: Augmentation de l'incidence des altérations de l'ADN (cassures de brins de l'ADN)	Positif	(Cesarone <i>et al.</i> 1983)
	Mutations létales récessives liées au sexe chez <i>Drosophila melanogaster</i> (larves et adultes)	Négatif	(Zimmering <i>et al.</i> 1985; Zimmering <i>et al.</i> 1989)
	Adduits à l'ADN (rat)	Négatif (mais une seule étude et manque de fiabilité)	(Jones and Sabbioni 2003)
	Test indicatif: Adduits à l'hémoglobine (rat, homme)	Positif	(Jones <i>et al.</i> 2006)
	Conclusion	Substance considérée comme génotoxique	

¹⁵ Norharmane : agent co-mutagène

4.1.7 Effets cancérogènes

Chez le rat, l'exposition par voie orale au P-CNB est associée à une augmentation de l'incidence de tumeurs de la rate chez le mâle essentiellement: fibromes, fibrosarcomes, ostéosarcomes, sarcomes NOS¹⁶, hémangiosarcomes (Matsumoto *et al.* 2006c). Chez le rat femelle, seules les incidences de fibrosarcomes sont élevées de manière significative. Dans l'étude de Matsumoto *et al.* (2006c), des hémangiosarcomes hépatiques ont également été observés chez la souris. Cette étude est davantage détaillée dans le paragraphe 4.2.1.

Dans une étude antérieure (Weisburger *et al.* 1978), il a été mis en évidence une augmentation de la fréquence des hémangiosarcomes dans divers organes et une augmentation de l'incidence de carcinomes hépatocellulaires, chez les souris mâles et femelles, pour une exposition au P-CNB par voie orale pendant 18 mois. Cependant, les résultats de cette étude sont à interpréter avec prudence du fait de biais méthodologiques (durée d'exposition courte, doses élevées, méthodologie brièvement décrite, données d'histopathologie limitées etc.) (IARC 1996 ; OCDE 2002).

Il est à souligner que les effets cancérogènes du P-CNB présentent des similitudes avec ceux causés par la para-chloroaniline qui est un métabolite du P-CNB. En particulier, la para-chloroaniline est responsable d'une élévation de l'incidence de tumeurs atypiques au niveau de la rate (fibrosarcomes, ostéosarcomes, hémangiosarcomes) chez le rat mâle. Chez le rat femelle, des signes de fibroses de la rate sont observés, mais l'élévation de l'incidence de sarcomes (fibrosarcomes, hémangiosarcomes) reste marginale. Chez la souris mâle, les résultats ne sont pas significatifs et chez la souris femelle, aucune tumeur de la rate n'est observée (NTP 1989).

D'une manière plus générale, des tumeurs de la rate sont observées lors d'expositions à l'aniline et ses dérivés, de façon beaucoup plus prononcée chez le rat mâle que chez le rat femelle. La souris ne développe pas de tumeurs de la rate, ce qui pourrait être en relation avec un métabolisme différent (pas de saturation de la voie d'excrétion de l'aniline chez le rat) (INRS 2008).

Ces données sur la para-chloroaniline corroborent les résultats de l'équipe de Matsumoto *et al.* (2006c) et ceux de Weisburger *et al.* (1978).

Depuis 1996, année de classement du P-CNB par le CIRC, de nouvelles études de toxicité subchronique, chronique et de cancérogénicité ont été menées, mettant clairement en évidence les effets cancérogènes du P-CNB (Matsumoto *et al.* 2006c). Selon les experts, ces nouvelles données pourraient être de nature à modifier le classement de ce composé.

4.2 Elaboration de VTR pour la voie orale

Aucune VTR orale n'est à ce jour disponible (à seuil ou sans seuil). La voie orale représentant la voie d'exposition majoritaire, une attention particulière a été portée sur la dérivation de VTR pour cette voie d'exposition.

Deux VTR orales ont été élaborées au regard des effets observés chez l'animal et des mécanismes d'action :

- Une VTR sans seuil basée sur les effets cancérogènes spléniques (en lien avec un mécanisme d'action génotoxique),
- Une VTR à seuil basée sur les effets hématotoxiques.

¹⁶ NOS : Not Otherwise Specified (sans autre précision)

4.2.1 Choix et description de l'étude clé

L'étude jugée de qualité satisfaisante et permettant de décrire une relation dose-réponse exploitable pour la construction de la VTR est l'étude de cancérogénicité de Matsumoto *et al.* (2006c), dont les principales caractéristiques sont détaillées ci-dessous :

Tableau 16 : Caractéristiques de l'étude de Matsumoto *et al.* (2006c)

Type d'étude	Etude de cancérogénicité et de toxicité chronique (2 ans)
Pertinence de l'étude	Etude BPL et réalisée en accord avec la ligne directrice de l'OCDE n°453 Cotation 1a selon les critères de Klimisch
Espèces étudiées	Rats F344 et souris BDF ₁
Voie d'exposition	Ingestion
Protocole expérimental	50 animaux par groupe et par sexe ; 3 doses testées + un témoin P-CNB contenu dans la nourriture, exposition 7 jours/7 pendant 2 ans
Effets observés	<p><u>Constantes biologiques</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Chez le rat : anémie, diminution de l'hématocrite, élévation de la CCMH (Concentration Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine), élévation de la bilirubine totale - Chez la souris : anémie, diminution de l'hématocrite mais à des doses supérieures à celles où ces mêmes effets apparaissent chez le rat <p><u>Poids des organes :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Chez le rat : augmentation importante du poids de la rate, augmentation modérée du poids du foie - Chez la souris : augmentation modérée du poids de la rate et du foie à la plus forte dose <p><u>Lésions non néoplasiques :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Chez le rat : lésions de la rate avec signes de fibrose, stéatose, augmentation de l'hématopoïèse extramédullaire, dépôts d'hémosidérine dans la rate, hyperplasie médullaire - Chez la souris : signes de congestion de la rate seulement à la plus forte dose, augmentation dose-dépendante de l'hématopoïèse extramédullaire (splénique), dépôts d'hémosidérine (rate) <p><u>Lésions néoplasiques</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Chez le rat : 1/ rat mâle : augmentation dose-dépendante de l'incidence de tumeurs au niveau de la rate : fibromes, fibrosarcomes, ostéosarcomes, sarcomes NOS, hémangiosarcomes ; métastases hépatiques, péritonéales et pancréatiques 2/ rat femelle : augmentation significative de l'incidence de tumeurs de la rate uniquement pour les fibrosarcomes 3/ les deux sexes : augmentation de l'incidence de phéochromocytomes (uniquement à la plus forte dose d'exposition ; il n'est pas précisé s'il s'agit de tumeurs bénignes ou malignes) - Chez la souris : légère augmentation de l'incidence de tumeurs hépatiques et de certains lymphomes (significatif uniquement à la plus forte dose)

4.2.2 Elaboration de VTR sans seuil

D'après les informations disponibles, le P-CNB apparaît comme une substance génotoxique (voir paragraphe 4.1.6). De plus, d'après les conclusions du groupe de travail « VTR Cancérogènes » de l'Afsset (Afsset 2009), l'absence de données claires sur le mécanisme d'action cancérogène d'une substance susceptible d'être génotoxique conduit, par précaution, à retenir l'hypothèse d'absence de seuil. Cette dernière a ainsi été retenue pour cette expertise.

Dans cette perspective, l'effet apparaît quelle que soit la dose reçue et la probabilité de survenue croît avec la dose. La VTR s'exprime alors sous la forme d'un ERU (excès de risque unitaire), et se définit comme la probabilité supplémentaire, par rapport à un sujet non exposé, qu'un individu développe une pathologie s'il est exposé pendant sa vie entière à une unité de dose de la substance.

Pour la construction d'une VTR cancérogène sans seuil, la méthodologie du groupe de travail préconise de suivre les étapes suivantes :

- 1- Identification et choix de l'effet critique et de(s) l'étude(s) clé(s)
- 2- Identification d'une dose critique ou POD (*point of departure*) déterminé par modélisation des données toxicologiques ; l'objectif est de choisir le point de départ de l'extrapolation aux faibles doses, c'est-à-dire un point de la courbe dose-réponse modélisée, peu éloigné des données expérimentales ;
- 3- Extrapolation linéaire à l'origine.

4.2.2.1 Mécanisme d'action cancérogène proposé et cohérence des données animales et humaines

Le P-CNB présente un profil toxicologique typique des nitroarènes. Il est métabolisé par la microflore intestinale et par les cytochromes P450 dans le foie en métabolites qui peuvent réagir avec l'ADN et les protéines (en l'occurrence l'hémoglobine) pour former des adduits. Bien qu'à ce jour les adduits à l'ADN du P-CNB (ou de ses métabolites) n'aient pas été mis en évidence (Jones and Sabbioni 2003), il est légitime de penser que le P-CNB est susceptible de former des adduits à l'ADN par l'intermédiaire d'un métabolite réactif, la N-Hydroxyarylamine. Les adduits à l'hémoglobine se forment chez les rongeurs et chez des travailleurs exposés aux CNBs (Jones 2006). Toutefois, on ne peut exclure aujourd'hui que l'activité génotoxique du P-CNB ne fasse intervenir son principal métabolite, la 4-chloroaniline ou d'autres métabolites. Cette hypothèse est corroborée par le fait que le chlorure de 4-chloroaniline induit également des tumeurs de la rate chez le rat (NTP 1989).

Les hypothèses sur le mécanisme d'action cancérogène du P-CNB aboutissant à des tumeurs de la rate sont les suivantes

- Métabolisation en intermédiaire(s) actif(s)

Les métabolites du P-CNB (N-hydroxyarylamine, 4-chloroaniline) sont hautement réactifs et responsables des effets génotoxiques et cytotoxiques des nitroarènes et des arylamines. Ils réagissent avec l'ADN et les protéines (dont l'hémoglobine). Les adduits à l'hémoglobine reflètent la chronicité de l'exposition des globules rouges (environ 120 jours chez l'homme) à ces métabolites.

- Effets génotoxiques

Les métabolites réactifs du P-CNB exercent une action directe sur le matériel génétique.

- Hyperprolifération cellulaire et formation de tumeurs de la rate

L'hyperprolifération cellulaire splénique se traduit par l'apparition de tumeurs au niveau de la rate : fibromes, fibrosarcomes et autres lésions : ostéosarcomes, sarcomes NOS (not otherwise specified), hémangiosarcomes.

Cohérence des données animales et humaines

Il existe peu de données de toxicité sur le P-CNB disponibles chez l'homme. Cependant, cliniquement, le P-CNB est responsable de cyanose à la fois chez l'homme et chez l'animal, du fait d'une méthémoglobinémie. Par ailleurs, les adduits de l'hémoglobine se forment à la fois chez les rongeurs et chez des travailleurs exposés aux CNB (Jones *et al.* 2006).

L'ensemble de ces éléments est en faveur d'un mécanisme d'action similaire chez l'animal et chez l'homme.

4.2.2.2 Choix de l'effet critique

Le Tableau 17 récapitule les incidences tumorales spléniques observées chez le rat mâle. En effet, aucune tumeur de la rate n'a été observée chez la souris ni chez le rat femelle (excepté les fibrosarcomes).

Tableau 17 : Incidences des tumeurs de la rate chez le rat (nombres d'animaux atteints)

Etude de Matsumoto <i>et al.</i> (2006), exposition au P-CNB chez le rat mâle					
Tumeurs cancéreuses	Doses journalières d'exposition (mg/kg/j)				N
	0	1,5	7,7	41,2	
Fibromes	0	0	1	15**	50
Fibrosarcomes	0	1	0	29**	50
Ostéosarcomes	0	0	0	11**	50
Sarcomes NOS	0	0	1	6*	50
Hémangiosarcomes	0	0	5*	7*	50

*significatif à $p < 0,05$ **significatif $p < 0,1$ (test de Fischer exact, test de Peto) N : nombre d'animaux observés

Les hémangiosarcomes de la rate chez le rat mâle ont été choisis comme effet critique, du fait de l'existence d'une relation dose-réponse, contrairement aux autres tumeurs qui n'apparaissent qu'à la plus forte dose. A noter qu'on ne retrouve pas ou peu de tumeurs chez la souris (pas de tumeurs de la rate, augmentation non significative de tumeurs du foie à l'exception des hémangiosarcomes chez la souris femelle et uniquement à la plus forte dose).

4.2.2.3 Choix de la dose repère (POD) et extrapolation à l'origine

Dans le cas de la construction d'une VTR sans seuil de dose, le choix du POD est déterminé par une modélisation des données expérimentales. Celle-ci se fait à partir d'équations de régression (linéaires, quadratiques, polynomiales) ou de distribution de probabilités (modèle de Weibull, probit, logistique ou gamma). Dans le cas d'une substance cancérigène et lorsque les données le permettent, on peut également appliquer des modèles mécanistes tels que le modèle multi-étapes linéarisé ou LMS. Enfin, la détermination d'une benchmark dose comme POD suivie d'une extrapolation linéaire à l'origine est une approche de plus en plus utilisée (US EPA, 2005).

Les données disponibles ont été modélisées avec le logiciel Proast du RIVM (Proast software version 18.2) pour l'élaboration d'une Benchmark Dose (BMD)¹⁷.

¹⁷ Cette approche a été retenue préférentiellement à l'approche classique NOAEL/LOAEL car elle permet notamment de s'affranchir des faiblesses méthodologiques liées au nombre insuffisant d'animaux étudiés.

Il apparaît dans l'étude clé une relation dose-réponse significative entre l'augmentation de l'incidence tumorale des hémangiosarcomes de la rate chez le rat mâle et la dose journalière d'exposition du P-CNB (test de Fischer).

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 95 % d'une dose correspondant à une augmentation de la réponse par rapport au groupe non exposé de 1, 5 ou 10 %.

Les $BMD_{1\%, 5\%, 10\%}$ et $BMD_{1\%, 5\%, 10\%L_{95}}$ ont été calculées, bien que le seuil de 10 % soit généralement retenu car il est proche de la limite de sensibilité pour la plupart des études de cancérogénicité.

4.2.2.4 Ajustements

4.2.2.4.1 *Ajustement au temps*

Dans l'étude de Matsumoto, d'une durée de 2 ans, les animaux ont ingéré du P-CNB 7 jours sur 7. Une dose journalière d'exposition moyenne pour chaque lot a été calculée à partir de la mesure de la consommation et du poids corporel.

Par conséquent aucun ajustement temporel n'est à prendre en compte puisque l'exposition au P-CNB a été continue pendant toute la durée de l'étude.

4.2.2.4.2 *Ajustement allométrique*

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

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

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

Poids moyen du rat estimé à 350 g, poids de l'homme estimé à 70 kg. Les doses sont exprimées en mg/kg/j.

4.2.2.5 Calcul de la VTR

Le tableau suivant présente les résultats obtenus avec le modèle qui s'ajuste le mieux aux données expérimentales. Chez le rat mâle, le modèle le mieux ajusté aux données expérimentales est le modèle « Log probit ».

Tableau 18 : BMD, BMDL, ERU chez le rat mâle pour les hémangiosarcomes de la rate

Excès de risque (BMR)	Modèle le mieux ajusté	BMD chez le rat (mg.kg ⁻¹ .j ⁻¹)	BMD _{10L95} chez le rat (mg.kg ⁻¹ .j ⁻¹)	BMD équivalente chez l'homme (mg.kg ⁻¹ .j ⁻¹)	BMD _{10L95} équivalente chez l'homme (mg.kg ⁻¹ .j ⁻¹)	Pente = ERU* (µg.kg ⁻¹ .j ⁻¹) ⁻¹
10 %	Log probit	17,2	7,4	4,57	1,97	5 10 ⁻⁵

* Pente = BMR/BMD_{10L95}

4.2.2.6 Synthèse

Tableau 19 : Conclusion sur la VTR sans seuil du P-CNB

Effet critique	Dose critique (POD)	Dose critique (POD) équivalente humaine	VTR
Apparition d'hémangiosarcomes spléniques chez le rat F344 mâle Etude de cancérogénicité et de toxicité chronique chez le rat F344 et la souris BDF1 Matsumoto <i>et al.</i> 2006c	BMD _{10L95} chez le rat mâle = 7,4 mg.kg ⁻¹ .j ⁻¹	BMD _{10L95} chez l'homme = 1,97 mg.kg ⁻¹ .j ⁻¹	Après extrapolation linéaire à l'origine : VTR = 5.10 ⁻⁵ (µg.kg ⁻¹ .j ⁻¹) ⁻¹ 0,02 µg.kg ⁻¹ .j ⁻¹ pour un risque de 10 ⁻⁶ 0,2 µg.kg ⁻¹ .j ⁻¹ pour un risque de 10 ⁻⁵ 2 µg.kg ⁻¹ .j ⁻¹ pour un risque de 10 ⁻⁴

4.2.3 Elaboration de VTR à seuil

4.2.3.1 Mécanisme d'action hématotoxique proposé et cohérence des données animales et humaines

Les effets hématotoxiques induits par le P-CNB, tels que décrit par Matsumoto *et al.* (2006c) peuvent conduire à une hémolyse et à une hémosidérose dans les macrophages rénaux et dans les cellules hépatiques de Küpffer. Au niveau biologique, des signes d'anémie sont observés, avec élévation de la bilirubine totale.

Matsumoto *et al.* ont également décrit des lésions non néoplasiques au niveau de la rate, en particulier une hématopoïèse extramédullaire qui serait le reflet d'une réponse compensatoire du système hématopoïétique aux lésions des érythrocytes (formation de méthémoglobine) (Matsumoto *et al.* 2006b ; Matsumoto *et al.* 2006c)

L'hématotoxicité serait responsable, à long terme, d'effets au niveau de la rate : séquestration des hématies anormales, anémie hémolytique suivie d'une érythropoïèse splénique compensatoire avec possiblement production d'espèces réactives de l'oxygène et hyperprolifération cellulaire. Le P-CNB étant un inducteur de méthémoglobine plus important que l'O-CNB (NTP 1993 ; Travlos *et al.* 1996), l'incidence des tumeurs de la rate est augmentée avec le P-CNB, contrairement à l'O-CNB.

Les événements clés impliqués dans les effets hématotoxiques du P-CNB se dérouleraient de la manière suivante :

- Formation de méthémoglobine par le P-CNB et/ou par l'intermédiaire de ses métabolites

La toxicité du P-CNB se manifeste essentiellement au niveau hématologique, bien que ce composé induise également des effets hépatotoxiques. Cette hématotoxicité se traduit notamment par la formation de méthémoglobine.

- Effets au niveau de la rate

Les hématies présentant de la méthémoglobine sont séquestrées au niveau de la rate, ce qui, au niveau biologique, se traduit par une anémie hémolytique régénérative. L'érythropoïèse dans la moelle osseuse et l'hématopoïèse extramédullaire dans la rate sont le reflet d'une réponse compensatoire du système hématopoïétique aux lésions des érythrocytes (formation de méthémoglobine).

- Erythropoïèse splénique compensatoire avec éventuellement stress oxydatif

4.2.3.2 Choix de l'effet critique et de la dose repère

Il est proposé de retenir comme effet critique les signes biologiques d'anémie (reflet d'une hématotoxicité), les valeurs de la méthémoglobine n'étant pas détaillées dans l'étude de Matsumoto *et al.* (2006). Ces signes d'anémie se définissent par une diminution du nombre de globules rouges, une diminution de l'hémoglobine et une diminution de l'hématocrite. L'élévation de la bilirubine pourrait également être retenue car elle témoigne dans ce cas précis d'une lyse des hématies.

Les rats mâles n'ont pas été retenus pour dériver la dose repère en raison de la trop forte incidence de mortalité à la plus haute dose, rendant les résultats d'analyse biologique difficilement exploitables.

Dans l'étude de Matsumoto *et al.* (2006c), une diminution statistiquement significative du nombre d'érythrocytes est observée à la dose de 9,8 mg/kg/j chez le rat femelle, correspondant au LOAEL. Le NOAEL est donc situé à 1,9 mg/kg/j.¹⁸

L'effet critique retenu est la diminution du nombre d'érythrocytes, chez le rat F344 femelle exposé sur une période de deux ans (Tableau 20). La diminution du nombre d'érythrocytes apparaît comme un effet pertinent à prendre en compte, étant déjà retrouvée dans des études subchroniques chez le rat et pour des niveaux de doses similaires mais étant dans un premier temps compensée par une hématopoïèse extramédullaire (Matsumoto *et al.* 2006b).

Tableau 20 : Paramètres hématologiques (moyenne du nombre d'hématies + écart type) décrit dans l'étude de Matsumoto *et al.* (2006c) chez le rat femelle

DJE (mg/kg/j)	Rat F344 mâle			
	0	1,9	9,8	53,8
Nombre d'animaux examinés	36	41	38	28
Hématies (10 ⁶ /µl)	8,13 ± 0,73	8,08 ± 0,51	6,88 ± 1,48*	4,94 ± 0,8**

* significatif p<0,05 ** significatif p<0,01 (test de Dunnett)

Les données expérimentales établies sur la diminution du nombre d'érythrocytes ont pu être modélisées à l'aide des modèles mathématiques utilisés par le logiciel Proast (Proast software version 18.2) élaboré par le RIVM (présence d'une relation dose-réponse et de deux doses significativement différentes par rapport aux témoins).

¹⁸ Le choix s'est porté sur le rat, puisque les mêmes effets apparaissent chez la souris mais à des doses supérieures.

S'agissant d'une variable continue (mesure d'une variable biologique), l'une des principales difficultés lors de la construction d'une BMDL concerne le choix de la BMR (*Benchmark Response level*) c'est-à-dire le choix de la modification maximale tolérée comme étant physiologique (ou non néfaste) pour le paramètre étudié (ici, diminution du nombre d'érythrocytes). Cela revient à considérer quelle diminution du nombre d'érythrocytes reste acceptable d'un point de vue physiologique.

Selon les recommandations de l'US EPA (US EPA 2000) et tel que décrit récemment dans la « Reference concentration » proposée pour le benzène (US EPA 2002), la BMD et la BMDL peuvent être calculées à partir d'une réponse correspondant à un changement dans les paramètres hématologiques d'un écart type par rapport à la moyenne des témoins¹⁹.

Tableau 21 : Diminution du nombre d'hématies chez le rat femelle (Matsumoto *et al.* 2006b)

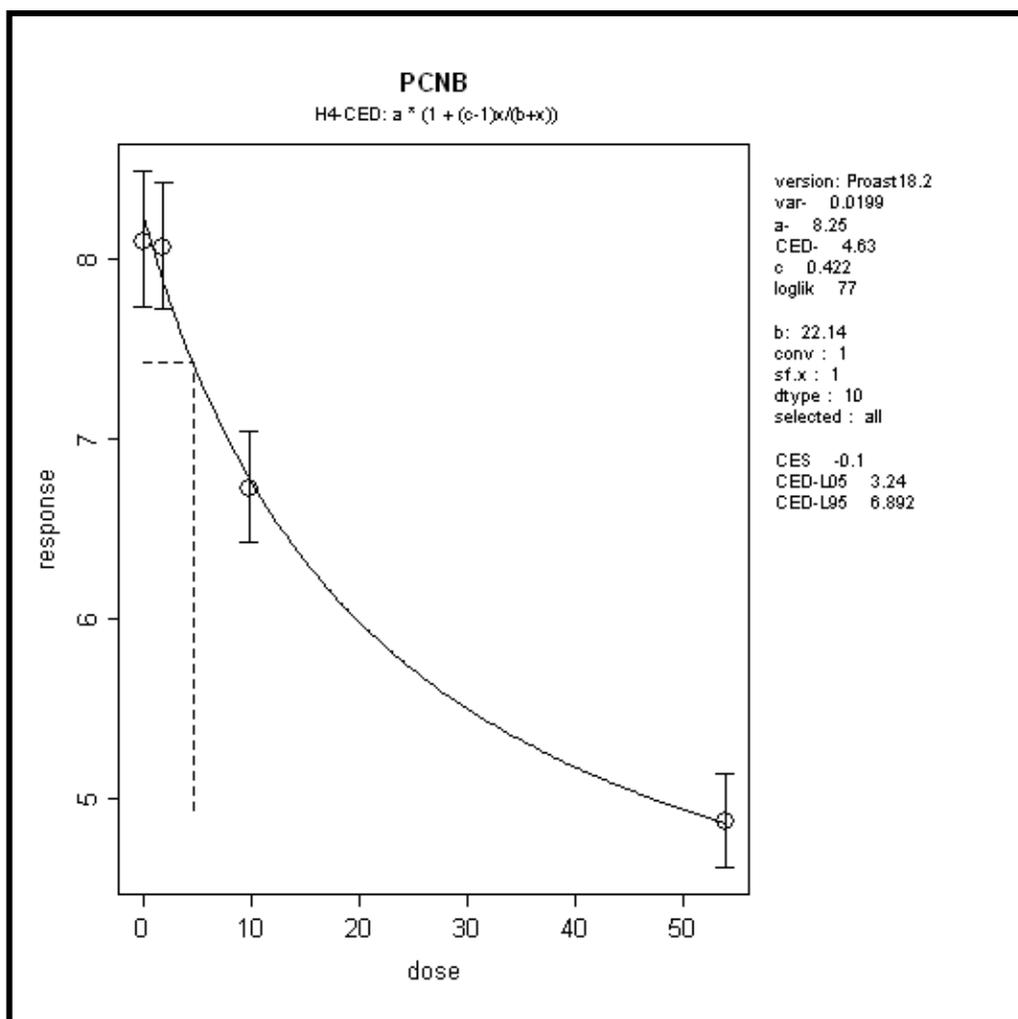
	Rat F344 mâle			
DJE (mg.kg⁻¹.j⁻¹)	0	1,9	9,8	53,8
Nombre d'animaux examinés	36	41	38	28
Hématies (10⁶.µL⁻¹)	8,13 ± 0,73	8,08 ± 0,51	6,88 ± 1,48*	4,94 ± 0,8**

* significatif p<0,05 ** significatif p<0,01 (test de Dunnett)

Les experts du groupe de travail « VTR » et du CES « substances chimiques » ont choisi de retenir comme BMR, une diminution par rapport au groupe témoin de 10 % du nombre d'érythrocytes.

¹⁹ La BMD calculée correspond souvent à un excès de risque, ou une diminution par rapport au groupe témoin approximatif de 10 %.

Figure 2 : Modélisation des données expérimentales avec les équations de Hill et détermination d'une BMDL pour le P-CNB



Lors de la détermination de la BMDL, plusieurs modèles mathématiques ont été testés. La méthode d'ajustement du modèle aux données est le maximum de vraisemblance. Le niveau de confiance associé à la BMDL est de 95 %.

Dans le cas du P-CNB, le modèle s'ajustant le mieux aux données expérimentales est le modèle de Hill. Les valeurs des BMD et BMDL sont respectivement de 4,6 et de 3,2 $\text{mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ ²⁰.

4.2.3.3 Ajustements

4.2.3.3.1 Ajustement au temps

Dans l'étude de Matsumoto, d'une durée de 2 ans, les animaux ont ingéré du P-CNB 7 jours sur 7. Une dose journalière d'exposition moyenne pour chaque lot a été calculée à partir de la mesure de la consommation et du poids corporel.

Par conséquent aucun ajustement temporel n'est à prendre en compte puisque l'exposition au P-CNB a été continue pendant toute la durée de l'étude.

²⁰ Le calcul de BMD et BMDL à partir de l'étude subchronique de Matsumoto *et al.* (2006b), et prenant en compte la diminution des érythrocytes, aboutit à des résultats du même ordre de grandeur.

4.2.3.3.2 Ajustement allométrique

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

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

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

Poids moyen du rat estimé à 350 g, poids de l'homme estimé à 70 kg. Les doses sont exprimées en mg/kg/j.

4.2.3.4 Choix des facteurs d'incertitude (UF)

4.2.3.4.1 Variabilité inter-espèces

Pour tenir compte de la variabilité toxicodynamique et d'incertitudes résiduelles, un facteur d'incertitude UF_A 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).

4.2.3.4.2 Variabilité intra-espèces

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

4.2.3.5 Calcul de la VTR

Choix de la dose critique : $BMD_{10L95} = 3,2 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$

Ajustement au temps : x 1

Ajustement allométrique :

$$BMD_{10L95AJ} = 3,2 \times (30.10^{-3}/70)^{1/4} = 0,85 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$$

Application des facteurs d'incertitude :

Facteur de variabilité inter-espèces = 2,5

Facteur de variabilité interindividuelle = 10

La VTR a été calculée comme suit :

$$VTR = \frac{BMD_{10L95}}{UFA \times UFH} \text{ pour les effets hématotoxiques}$$

Soit une VTR basée sur les effets hématotoxiques = $34 \mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$

4.2.4 Synthèse

Tableau 22 : Conclusion sur la VTR à seuil du P-CNB

Effet critique	Dose critique*	Facteur d'incertitude	VTR
Diminution du nombre d'érythrocytes chez le rat femelle	BMD _{10L95} chez le rat femelle = 3,2 mg.kg ⁻¹ .j ⁻¹	UF= 25	VTR= 34 µg.kg⁻¹.j⁻¹ ²¹
Etude de cancérogénicité et de toxicité chronique chez le rat F344 et la souris BDF1	Ajustement allométrique BMD _{10L95AJ} = 0,85 mg.kg ⁻¹ .j ⁻¹	UF _A = 2,5 (composante toxicodynamique)	
Matsumoto <i>et al.</i> (2006c)		UF _H = 10	

4.2.5 Elaboration de VTR pour la voie inhalée

Aucune VTR existante n'a été retrouvée pour la voie inhalée.

Le CES n' a pas souhaité dériver une VTR chronique pour la voie inhalée. En effet, les données de toxicité sont insuffisantes. Il n'existe pas d'étude de cancérogénicité pour cette voie d'exposition. Une étude de toxicité de 13 semaines a été étudiée (Travlos *et al.* 1996) mais ne permet pas de dériver une VTR chronique par voie respiratoire.

Par ailleurs, il peut être souligné que l'exposition par inhalation est vraisemblablement limitée car les concentrations saturantes en P-CNB dans l'air sont relativement faibles.

²¹ Remarque: une VTR élaboré à partir de la NOAEL aurait abouti, avec les mêmes facteurs d'incertitude, à 19 µg/kg/j

5 Conclusion et mise en perspective

5.1 Ortho-chloronitrobenzène

Au regard de ces deux types d'effets et de mécanismes d'action mis en jeu, deux VTR chroniques ont été élaborées pour la voie orale

- Une VTR sans seuil basée sur les effets cancérigènes hépatiques (mécanisme d'action génotoxique),
- Une VTR chronique à seuil basée sur les effets hépatotoxiques.

Le Tableau 23 présente les VTR proposées par l'Afsset dans le contexte de ce travail.

Tableau 23 : Conclusion sur les VTR chroniques de l(O-CNB

Type de VTR	Effet critique	Dose critique	UF**	VTR
A seuil, voie orale	Toxicité hépatique chez la souris femelle BDF1 Matsumoto <i>et al.</i> (2006)	NOAEL = 14 mg.kg ⁻¹ .j ⁻¹ Ajustement allométrique NOAEL _{AJ} * = 2 mg.kg ⁻¹ .j ⁻¹	25 UF _A (composante toxicodynamique) = 2,5 UF _H = 10	VTR = 80 µg.kg⁻¹.j⁻¹
Sans seuil, voie orale	Hépatocarcinomes et hépatoblastomes chez la souris femelle BDF1 Matsumoto <i>et al.</i> (2006)	BMD _{10L95} = 11,7 mg.kg ⁻¹ .j ⁻¹ Ajustement allométrique BMD _{10L95AJ} * = 1,7 mg.kg ⁻¹ .j ⁻¹	-	Après extrapolation linéaire à l'origine : VTR = 6.10⁻⁵ (µg.kg⁻¹.j⁻¹)⁻¹ 0,017 µg.kg ⁻¹ .j ⁻¹ pour un risque de 10 ⁻⁶ 0,17 µg.kg ⁻¹ .j ⁻¹ pour un risque de 10 ⁻⁵ 1,7 µg.kg ⁻¹ .j ⁻¹ pour un risque de 10 ⁻⁴

* NOAEL_{AJ} = NOAEL ajusté chez l'homme, BMD_{10L95AJ} = BMD_{10L95} ajusté chez l'homme

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

Le niveau de confiance de la VTR sans seuil de l'O-CNB a été considéré comme faible en raison des incertitudes relatives au mécanisme d'action cancérigène.

Aucune VTR n'a été élaborée pour les voies respiratoire et cutanée.

Remarques sur le caractère génotoxique de l'O-CNB

Des experts ont souligné que les métabolites présumés de ce composé étaient des génotoxiques avérés (N-Hydroxylarylamines), d'autres ont insisté sur le fait que les tests de génotoxicité réalisés *in vitro* et *in vivo* n'étaient pas concluants. L'O-CNB a finalement été considéré comme étant à une substance génotoxique.

Par ailleurs, en l'absence de preuve d'un mécanisme d'action cancérigène épigénétique, une VTR sans seuil a été construite suivant les recommandations de la méthodologie de l'Afsset de détermination d'une VTR cancer (Afsset 2009).

Pour cela, les données expérimentales ont été modélisées, et le modèle mathématique s'ajustant le mieux aux données expérimentales a été retenu. Le cumul des incidences tumorales « hépatocarcinomes et hépatoblastomes » chez la souris femelle a servi de point de départ en raison de sa relation dose-réponse significative et de sa pertinence biologique. La $BMD_{10L_{95}}$ a été extrapolée à l'origine pour déterminer un ERU. Des résultats du même ordre de grandeur auraient été obtenus (i) avec l'extrapolation à l'origine à partir des $BMD_{5L_{95}}$ et $BMD_{5L_{95}}$ (ii) avec pour point de départ les hépatoblastomes seuls ou les hépatocarcinomes seuls²².

En parallèle de ce mécanisme d'action cancérigène génotoxique, l'O-CNB agit au niveau des cellules hépatiques par le biais d'un mécanisme de cytotoxicité suivi de prolifération cellulaire compensatrice, l'hépatotoxicité se manifestant par une libération d'enzymes hépatiques dans la circulation sanguine. Ceci a conduit les experts à élaborer une VTR à seuil basée sur les effets hépatotoxiques, le choix de l'effet critique s'étant avant tout basé sur la pertinence biologique, les ALAT étant les enzymes dosées les plus spécifiques du foie. Cependant, les NOAEL des autres témoins biologiques de toxicité hépatique étaient identiques à le NOAEL observée pour les ALAT. Leur choix de l'effet critique pour le calcul de la VTR aurait donc été sans conséquence sur la valeur numérique de la VTR. Ils n'auraient de même pas pu être modélisés pour déterminer une BMD (écart-types trop élevés).

La comparaison de la VTR à seuil et de la VTR sans seuil met en évidence un facteur important entre ces deux valeurs, dès lors que l'on attribue à la VTR sans seuil une dose journalière d'exposition (DJE) pour un risque déterminé. Ainsi, la dose journalière d'exposition associée à un risque de 10^{-5} de développer un cancer hépatique chez l'homme est de $0,17 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$. Cette DJE est très largement inférieure à la VTR à seuil basée sur les effets hépatotoxiques. L'approche de l'Afsset pour dériver la VTR sans seuil s'avère donc très conservatrice.

Le niveau de confiance de la VTR sans seuil de l'O-CNB a été considéré comme faible en raison des incertitudes relatives au mécanisme d'action cancérigène. Un degré de confiance plus élevé est accordé à la VTR à seuil (degré de confiance moyen). Il conviendra de réviser ces VTR dès que de nouvelles données pertinentes de toxicité seront disponibles.

5.2 Méta-chloronitrobenzène

La revue bibliographique sur le M-CNB a mis en lumière un manque de données toxicologiques tant chez l'animal que chez l'homme. Aucune étude de toxicité subchronique ou chronique n'a été

²² Carcinomes seuls : $VTR = 4,3 \cdot 10^{-5} (\mu\text{g}/\text{kg}/\text{j})^{-1}$ (modèle Weibull)

Hépatoblastomes seuls : $VTR = 2,3 \cdot 10^{-5} (\mu\text{g}/\text{kg}/\text{j})^{-1}$ (modèle Log probit)

retrouvée. Les données disponibles chez l'homme sont quasi-inexistantes. Les données de génotoxicité ont permis de classer ce composé comme étant non génotoxique.

Il est ainsi apparu impossible d'élaborer une VTR, quelle que soit la voie d'exposition.

De plus, compte-tenu du fait que ce composé est minoritaire dans le panache de pollution en comparaison avec les dérivés ortho et para du chloronitrobenzène, la dérivation d'une VTR n'est pas prioritaire. Des VTR ont en revanche pu être élaborées pour l'ortho-chloronitrobenzène et le para-chloronitrobenzène, pour lesquelles des données de toxicité subchronique, chronique et de cancérogénicité étaient disponibles chez l'animal.

5.3 Para-chloronitrobenzène

Au regard des deux types d'effets et des mécanismes d'action mis en jeu, deux VTR chroniques ont été élaborées pour la voie orale :

- Une VTR sans seuil basée sur les effets cancérogènes spléniques (mécanisme d'action génotoxique),
- Une VTR chronique à seuil basée sur les effets hématotoxiques.

Aucune VTR n'a été élaborée pour les voies respiratoire et cutanée.

Le Tableau 24 présente les VTR proposées par l'Afsset dans le contexte de ce travail.

Tableau 24 : Conclusion sur les VTR chroniques du P-CNB

Type de VTR	Effet critique	Dose critique	UF**	VTR
A seuil, voie orale	Hématotoxicité chez le rat mâle F344 Matsumoto <i>et al.</i> (2006) ²	BMD _{10L95} = 3,2 mg.kg ⁻¹ .j ⁻¹ Ajustement allométrique BMD _{10L95AJ} * = 0,85 mg.kg ⁻¹ .j ⁻¹	UF = 25 UF _A (composante toxicodynamique) = 2,5 UF _H = 10	VTR = 34 µg.kg⁻¹.j⁻¹
Sans seuil, voie orale	Hémangiosarcomes de la rate chez le rat mâle F344 Matsumoto <i>et al.</i> (2006) ²	BMD _{10L95} = 7,4 mg.kg ⁻¹ .j ⁻¹ Ajustement allométrique BMD _{10L95AJ} * = 1,97 mg.kg ⁻¹ .j ⁻¹	-	Après extrapolation linéaire à l'origine : VTR = 5.10⁻⁵ (µg.kg⁻¹.j⁻¹)⁻¹ 0,02 µg.kg ⁻¹ .j ⁻¹ pour un risque de 10 ⁻⁶ 0,2 µg.kg ⁻¹ .j ⁻¹ pour un risque de 10 ⁻⁵ 2 µg.kg ⁻¹ .j ⁻¹ pour un risque de 10 ⁻⁴

* NOAEL_{AJ} = NOAEL ajusté chez l'homme, BMD_{10L95AJ} = BMD_{10L95} ajusté chez l'homme

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

L'élaboration d'une VTR sans seuil pour les effets cancérogènes a fait l'objet de nombreuses discussions au sein du groupe de travail. Le débat a notamment porté sur le mécanisme d'action cancérogène du P-CNB et sur la pertinence d'élaborer une VTR sans seuil.

Les données de différents tests de génotoxicité du P-CNB montrent que ce composé est génotoxique. Ce composé est d'ailleurs classé mutagène de groupe 3 par l'Union Européenne. Certains experts ont estimé que l'apparition des tumeurs spléniques était probablement peu liée à un mécanisme d'action génotoxique. Cependant aucun argument ne permettait d'exclure un mécanisme d'action génotoxique dans l'apparition de tumeurs de la rate. Ce mécanisme d'action génotoxique n'était d'ailleurs pas exclu par l'équipe de Matsumoto ayant mis en place l'étude de cancérogénicité du P-CNB chez le rat et la souris.

Dans un souci de protection de la santé humaine, du fait du caractère génotoxique du P-CNB et des incertitudes relatives à la transposition du mécanisme d'action cancérogène du P-CNB de l'animal à l'homme, les experts se sont finalement accordés sur la dérivation de deux VTR, l'une sur les effets cancérogènes sans seuil, et l'autre sur les effets hématotoxiques à seuil.

La VTR sans seuil a été calculée à partir de la BMD_{10L95} (modèle gamma) issue de la modélisation des données expérimentales (hémangiosarcomes de la rate chez le rat mâle). Cette BMD_{10L95} a été extrapolée à l'origine pour déterminer un ERU.

La VTR à seuil a été calculée à partir de la BMD_{10L95} (modèles de Hill) issue de la modélisation des données expérimentales (diminution du nombre d'hématies chez le rat femelle)²³.

La comparaison de la VTR à seuil et de la VTR sans seuil met en évidence un facteur important entre ces deux valeurs, dès lors que l'on attribue à la VTR sans seuil une dose journalière d'exposition (DJE) pour un risque déterminé. Ainsi, la dose journalière d'exposition associée à un risque de 10⁻⁶ de développer un cancer hépatique chez l'homme est de 0,02 µg/kg/j. Cette DJE est très largement inférieure à la VTR à seuil basée sur les effets hématotoxiques. L'approche de l'Afsset pour dériver la VTR sans seuil s'avère donc très conservatrice.

Le niveau de confiance de la VTR sans seuil du P-CNB a été considéré comme faible en raison du manque de données disponibles sur le mécanisme d'action cancérogène. Un degré de confiance plus élevé est accordé à la VTR à seuil (degré de confiance moyen). Il conviendra de réviser ces VTR dès que de nouvelles données pertinentes de toxicité seront disponibles.

²³ L'utilisation de la NOAEL pour la diminution du nombre d'hématies aurait abouti à calculer une VTR du même ordre de grandeur.

6 Bibliographie

6.1 Ortho-chloronitrobenzène

1. Afsset. Valeurs toxicologiques de référence (VTR) pour les substances reprotoxiques. 2007.
Ref Type: Report
2. Afsset. Valeurs Toxicologiques de Référence pour les substances cancérogènes - Méthode de construction de VTR fondées sur les effets cancérogènes (document en cours de rédaction). 2009.
Ref Type: Report
3. BG Chemie (2000). Report No. 82-82, MR No. 3793-001, NTIS/OTS 0540655. Haskell 1984
4. Galloway, S. M., Armstrong, M. J., Reuben, C., Colman, S., Brown, B., Cannon, C., Bloom, A. D., Nakamura, F., Ahmed, M., Duk, S., and . (1987). Chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: evaluations of 108 chemicals. *Environ. Mol. Mutagen.* **10 Suppl 10**, 1-175.
5. Haworth, S., Lawlor, T., Mortelmans, K., Speck, W., and Zeiger, E. (1983). Salmonella mutagenicity test results for 250 chemicals. *Environ. Mutagen.* **5 Suppl 1**, 1-142.
6. Hemminki, K., Forsti, A., Lofgren, M., Segerback, D., Vaca, C., and Vodicka, P. (1993). Testing of quantitative parameters in the 32P-postlabelling method. *IARC Sci. Publ.*(124), 51-63.
7. IARC (1994). DNA adducts: identification and biological significance. Proceedings of a meeting. Huddinge, Sweden, 18-21 November 1992. *IARC Sci. Publ.*(125), 1-478.
8. IARC (1996). 2-Chloronitrobenzene, 3-chloronitrobenzene and 4-chloronitrobenzene. *IARC Monogr Eval. Carcinog. Risks Hum.* **65**, 263-296.
9. INERIS. Base de données environnementales, fiche substance, 1-Chloro-2-nitrobenzene. 2008.
Ref Type: Internet Communication
10. Jones, C. R., Liu, Y. Y., Sepai, O., Yan, H., and Sabbioni, G. (2006). Internal exposure, health effects, and cancer risk of humans exposed to chloronitrobenzene. *Environ. Sci. Technol.* **40**(1), 387-394.
11. Jones, C. R., and Sabbioni, G. (2003). Identification of DNA adducts using HPLC/MS/MS following *in vitro* and *in vivo* experiments with arylamines and nitroarenes. *Chem. Res. Toxicol.* **16**(10), 1251-1263.
12. Matsumoto, M., Aiso, S., Senoh, H., Yamazaki, K., Arito, H., Nagano, K., Yamamoto, S., and Matsushima, T. (2006a). Carcinogenicity and chronic toxicity of para-chloronitrobenzene in rats and mice by two-year feeding. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* **25**(3), 571-584.

13. Matsumoto, M., Aiso, S., Umeda, Y., Arito, H., Nagano, K., Yamamoto, S., and Matsushima, T. (2006b). Thirteen-week oral toxicity of para- and ortho- chloronitrobenzene in rats and mice. *J. Toxicol. Sci.* **31**(1), 9-22.
14. Matsumoto, M., Umeda, Y., Senoh, H., Suzuki, M., Kano, H., Katagiri, T., Aiso, S., Yamazaki, K., Arito, H., Nagano, K., Yamamoto, S., and Matsushima, T. (2006c). Two-year feed study of carcinogenicity and chronic toxicity of ortho-chloronitrobenzene in rats and mice. *J. Toxicol. Sci.* **31**(3), 247-264.
15. NTP. 2-Chloronitrobenzene and 4-Chloronitrobenzene administered by inhalation for F344/N Rats and B6C3F Mice (NIH Publication 93-3382). 1993a. Ref Type: Report
16. OCDE. SIDS initial Assessment Report for SIAM 13; 1-Chloro-2-nitrobenzene. 2001.
17. Rickert, D. E., and Held, S. D. (1990). Metabolism of chloronitrobenzenes by isolated rat hepatocytes. *Drug Metab Dispos.* **18**(1), 5-9.
18. Sabbioni, G. (1994). Hemoglobin binding of arylamines and nitroarenes: molecular dosimetry and quantitative structure-activity relationships. *Environ. Health Perspect.* **102 Suppl 6**, 61-67.
19. Shimizu, M., Yasui, Y., and Matsumoto, N. (1983a). Structural specificity of aromatic compounds with special reference to mutagenic activity in *Salmonella typhimurium*--a series of chloro- or fluoro-nitrobenzene derivatives. *Mutat. Res.* **116**(3-4), 217-238.
20. Suzuki, J., Koyama, T., and Suzuki, S. (1983). Mutagenicities of mono-nitrobenzene derivatives in the presence of norharman. *Mutat. Res.* **120**(2-3), 105-110.
21. Suzuki, J., Takahashi, N., Kobayashi, Y., Miyamae, R., Ohsawa, M., and Suzuki, S. (1987). Dependence on *Salmonella typhimurium* enzymes of mutagenicities of nitrobenzene and its derivatives in the presence of rat-liver S9 and norharman. *Mutat. Res.* **178**(2), 187-193.
22. Travlos, G. S., Mahler, J., Ragan, H. A., Chou, B. J., and Bucher, J. R. (1996). Thirteen-week inhalation toxicity of 2- and 4-chloronitrobenzene in F344/N rats and B6C3F1 mice. *Fundam. Appl. Toxicol.* **30**(1), 75-92.
23. Turusov, V. S., Torii, M., Sils, R. C., Willson, G. A., Herbert, R. A., Hailey, J. R., Haseman, J. K., and Boorman, G. A. (2002). Hepatoblastomas in mice in the US National Toxicology Program (NTP) studies. *Toxicol. Pathol.* **30**(5), 580-591.
24. US EPA. 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). 2006a. Ref Type: Report
25. Weisburger, E. K., Russfield, A. B., Homburger, F., Weisburger, J. H., Boger, E., Van Dongen, C. G., and Chu, K. C. (1978). Testing of twenty-one environmental aromatic amines or derivatives for long-term toxicity or carcinogenicity. *J. Environ. Pathol. Toxicol.* **2**(2), 325-356.

26. Zimmering, S., Mason, J. M., and Valencia, R. (1989). Chemical mutagenesis testing in *Drosophila*. VII. Results of 22 coded compounds tested in larval feeding experiments. *Environ. Mol. Mutagen.* **14**(4), 245-251.
27. Zimmering, S., Mason, J. M., Valencia, R., and Woodruff, R. C. (1985). Chemical mutagenesis testing in *Drosophila*. II. Results of 20 coded compounds tested for the National Toxicology Program. *Environ. Mutagen.* **7**(1), 87-100.

6.2 Méta-chloronitrobenzène

1. BG CHEMIE (2000). RAPPORT N° 74 : M-CHLORONITRO-BENZOL. MISE À JOUR 2006. [HTTP://WWW.BGCHEMIE.DE/FILES/95/TOXBew74-L.PDF](http://www.bgchemie.de/files/95/ToxBew74-L.pdf)
2. DAVYDOVA S.G. (1967). A COMPARISON OF THE PROPERTIES OF NITROCHLORO BENZENE ISOMERS FOR THE DETERMINATION OF THEIR PERMISSIBLE CONCENTRATIONS IN WATER BODIES. *HYG SANIT*, **32** (8), 161-166.
3. GALLOWAY, S. M., ARMSTRONG, M. J., REUBEN, C., COLMAN, S., BROWN, B., CANNON, C., BLOOM, A. D., NAKAMURA, F., AHMED, M., DUK, S., AND . (1987). CHROMOSOME ABERRATIONS AND SISTER CHROMATID EXCHANGES IN CHINESE HAMSTER OVARY CELLS: EVALUATIONS OF 108 CHEMICALS. *ENVIRON. MOL. MUTAGEN.* **10** SUPPL 10, 1-175.
4. HUANG Q, WANG L, HAN S. (1995). THE GENOTOXICITY OF SUBSTITUTED NITROBENZENES AND THE QUANTITATIVE STRUCTURE-ACTIVITY RELATIONSHIP STUDIES. *CHEMOSPHERE*, **30**, 915-923.
5. DAVYDOVA S.G. (1967). A comparison of the properties of nitrochlorobenzene isomers for IARC (1996). 2-CHLORONITROBENZENE, 3-CHLORONITROBENZENE AND 4-CHLORONITROBENZENE. *IARC MONOGR EVAL. CARCINOGEN. RISKS HUM.* **65**, 263-296.
6. INERIS. BASE DE DONNEES ENVIRONNEMENTALES, FICHE SUBSTANCE, 1-CHLORO-3-NITROBENZENE. 2008. REF TYPE: INTERNET COMMUNICATION
7. JONES, C. R., LIU, Y. Y., SEPAI, O., YAN, H., AND SABBIONI, G. (2006). INTERNAL EXPOSURE, HEALTH EFFECTS, AND CANCER RISK OF HUMANS EXPOSED TO CHLORONITROBENZENE. *ENVIRON. SCI. TECHNOL.* **40**(1), 387-394.
8. KUHLMANN A. ET HEGEMANN W. *ACTO HYDROCHEMICA ET HYDROBIOLOGICA*, 2006, VOL. 25, ISSUE 6, P. 298 – 305.
9. MOHR K.L., WORKING P.K. (1988). TESTICULAR TOXICITY OF THE CHLORONITROBENZENES. *TOXICOLOGIST*, **8**(1), 15. ABSTRACT No. 58.
10. RICKERT, D. E., AND HELD, S. D. (1990). METABOLISM OF CHLORONITROBENZENES BY ISOLATED RAT HEPATOCYTES. *DRUG METAB DISPOS.* **18**(1), 5-9.
11. SABBIONI, G. (1994). HEMOGLOBIN BINDING OF ARYLAMINES AND NITROARENES: MOLECULAR DOSIMETRY AND QUANTITATIVE STRUCTURE-ACTIVITY RELATIONSHIPS. *ENVIRON. HEALTH PERSPECT.* **102** SUPPL 6, 61-67.
12. SHIMIZU, M., YASUI, Y., AND MATSUMOTO, N. (1983). STRUCTURAL SPECIFICITY OF AROMATIC COMPOUNDS WITH SPECIAL REFERENCE TO MUTAGENIC ACTIVITY IN *SALMONELLA TYPHIMURIUM*--A SERIES OF CHLORO- OR FLUORO-NITROBENZENE DERIVATIVES. *MUTAT. RES.* **116**(3-4), 217-238.
13. SUZUKI, J., KOYAMA, T., AND SUZUKI, S. (1983). MUTAGENICITIES OF MONO-NITROBENZENE DERIVATIVES IN THE PRESENCE OF NORHARMAN. *MUTAT. RES.* **120**(2-3), 105-110.

6.3 Para-chloronitrobenzène

1. Afsset. Valeurs toxicologiques de référence (VTR) pour les substances reprotoxiques. 2007. Ref Type: Report
2. Afsset. Valeurs Toxicologiques de Référence pour les substances cancérigènes - Méthode de construction de VTR fondées sur les effets cancérigènes (document en cours de rédaction). 2009. Ref Type: Report
3. Cesarone, C. F., Bolognesi, C., and Santi, L. (1983). DNA damage induced *in vivo* in various tissues by nitrochlorobenzene derivatives. *Mutat. Res.* **116**(3-4), 239-246.
4. Cesarone, C. F., Fugassa, E., Gallo, G., Voci, A., and Orunesu, M. (1984). Influence of the culture time on DNA damage and repair in isolated rat hepatocytes exposed to nitrochlorobenzene derivatives. *Mutat. Res.* **131**(5-6), 215-222.
5. Galloway, S. M., Armstrong, M. J., Reuben, C., Colman, S., Brown, B., Cannon, C., Bloom, A. D., Nakamura, F., Ahmed, M., Duk, S., and . (1987). Chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: evaluations of 108 chemicals. *Environ. Mol. Mutagen.* **10 Suppl 10**, 1-175.
6. Haworth, S., Lawlor, T., Mortelmans, K., Speck, W., and Zeiger, E. (1983). Salmonella mutagenicity test results for 250 chemicals. *Environ. Mutagen.* **5 Suppl 1**, 1-142.
7. Hemminki, K., Forsti, A., Lofgren, M., Segerback, D., Vaca, C., and Vodicka, P. (1993). Testing of quantitative parameters in the 32P-postlabelling method. *IARC Sci. Publ.*(124), 51-63.
8. IARC (1994). DNA adducts: identification and biological significance. Proceedings of a meeting. Huddinge, Sweden, 18-21 November 1992. *IARC Sci. Publ.*(125), 1-478.
9. IARC (1996). 2-Chloronitrobenzene, 3-chloronitrobenzene and 4-chloronitrobenzene. *IARC Monogr Eval. Carcinog. Risks Hum.* **65**, 263-296.
10. INERIS. Base de données environnementales, fiche substance, 1-Chloro-4-nitrobenzene. 2008. Ref Type: Internet Communication
11. INRS. Fiche toxicologique de l'Aniline FT 19. 2008. Ref Type: Report
12. JETOC Japan Chemical Industry Ecology-Toxicology & Information Center. Mutagenicity Test Data of Existing Chemical Substances. 1996. Ref Type: Report
13. Jones, C. R., Liu, Y. Y., Sepai, O., Yan, H., and Sabbioni, G. (2006). Internal exposure, health effects, and cancer risk of humans exposed to chloronitrobenzene. *Environ. Sci. Technol.* **40**(1), 387-394.
14. Jones, C. R., and Sabbioni, G. (2003). Identification of DNA adducts using HPLC/MS/MS following *in vitro* and *in vivo* experiments with arylamines and nitroarenes. *Chem. Res. Toxicol.* **16**(10), 1251-1263.
15. Matsumoto, M., Aiso, S., Senoh, H., Yamazaki, K., Arito, H., Nagano, K., Yamamoto, S., and Matsushima, T. (2006a). Carcinogenicity and chronic toxicity of para-chloronitrobenzene in rats and mice by two-year feeding. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* **25**(3), 571-584.
16. Matsumoto, M., Aiso, S., Umeda, Y., Arito, H., Nagano, K., Yamamoto, S., and Matsushima, T. (2006b). Thirteen-week oral toxicity of para- and ortho- chloronitrobenzene in rats and mice. *J. Toxicol. Sci.* **31**(1), 9-22.
17. Matsumoto, M., Umeda, Y., Senoh, H., Suzuki, M., Kano, H., Katagiri, T., Aiso, S., Yamazaki, K., Arito, H., Nagano, K., Yamamoto, S., and Matsushima, T. (2006c). Two-year feed study of carcinogenicity and chronic toxicity of ortho-chloronitrobenzene in rats and mice. *J. Toxicol. Sci.* **31**(3), 247-264.
18. NTP. Toxicology and carcinogenesis studies of para-chloroaniline hydrochloride CAS No. 20265-96-7) in F344/N rats and B6C3F1 mice (gavage studies) (TR 351; NIH Publication No.

- 89-2806). 1989.
Ref Type: Report
19. NTP. 2-Chloronitrobenzene and 4-Chloronitrobenzene administered by inhalation for F344/N Rats and B6C3F Mice (NIH Publication 93-3382). 1993.
Ref Type: Report
 20. OCDE. SIDS initial Assessment Report for SIAM 15; 1-Chloro-4-nitrobenzene. 2002.
Ref Type: Report
 21. Sabbioni, G. (1994). Hemoglobin binding of arylamines and nitroarenes: molecular dosimetry and quantitative structure-activity relationships. *Environ. Health Perspect.* **102 Suppl 6**, 61-67.
 22. Shimizu, M., Yasui, Y., and Matsumoto, N. (1983). Structural specificity of aromatic compounds with special reference to mutagenic activity in *Salmonella typhimurium*--a series of chloro- or fluoro-nitrobenzene derivatives. *Mutat. Res.* **116**(3-4), 217-238.
 23. Suzuki, J., Koyama, T., and Suzuki, S. (1983). Mutagenicities of mono-nitrobenzene derivatives in the presence of norharman. *Mutat. Res.* **120**(2-3), 105-110.
 24. Suzuki, J., Takahashi, N., Kobayashi, Y., Miyamae, R., Ohsawa, M., and Suzuki, S. (1987). Dependence on *Salmonella typhimurium* enzymes of mutagenicities of nitrobenzene and its derivatives in the presence of rat-liver S9 and norharman. *Mutat. Res.* **178**(2), 187-193.
 25. Travlos, G. S., Mahler, J., Ragan, H. A., Chou, B. J., and Bucher, J. R. (1996). Thirteen-week inhalation toxicity of 2- and 4-chloronitrobenzene in F344/N rats and B6C3F1 mice. *Fundam. Appl. Toxicol.* **30**(1), 75-92.
 26. US EPA. Benchmark Dose Technical Guidance Document (External Review Draft, EPA/630/R-00/001). 2000. Ref Type: Report
 27. US EPA. Toxicological review of benzene. 2002. Ref Type: Report
 28. US EPA. 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
 29. Weisburger, E. K., Russfield, A. B., Homburger, F., Weisburger, J. H., Boger, E., Van Dongen, C. G., and Chu, K. C. (1978). Testing of twenty-one environmental aromatic amines or derivatives for long-term toxicity or carcinogenicity. *J. Environ. Pathol. Toxicol.* **2**(2), 325-356.
 30. Zimmering, S., Mason, J. M., and Valencia, R. (1989). Chemical mutagenesis testing in *Drosophila*. VII. Results of 22 coded compounds tested in larval feeding experiments. *Environ. Mol. Mutagen.* **14**(4), 245-251.
 31. Zimmering, S., Mason, J. M., Valencia, R., and Woodruff, R. C. (1985). Chemical mutagenesis testing in *Drosophila*. II. Results of 20 coded compounds tested for the National Toxicology Program. *Environ. Mutagen.* **7**(1), 87-100.

ANNEXES

Annexe 1 : Lettre de saisine



Ministère de la Santé, de la Jeunesse et des Sports

COURRIER REÇU LE

14 NOV. 2007

3795

Paris, le

12 NOV 2007

Direction générale de la santé
Sous-direction Prévention des risques
liés à l'environnement et à l'alimentation
Bureau Environnement extérieur et produits chimiques
Bureau Qualité des eaux

DGS/EA1 - N° 289
 DGS/EA4 - N° 289

Personnes chargées du dossier :

Muriel ANDRIEU-SEMMELE
 Tél. : 01.40.56.47.19 / Fax : 01.40.56.50.56
 E-mail : muriel.andrieu-semmel@sante.gouv.fr
 Géraldine GRANDGUILLOT
 Tél. : 01.40.56.54.18 / Fax : 01.40.56.50.56
 E-mail : geraldine.grandguillot@sante.gouv.fr

Lupent

demande d'expertise
 pas encore une saisine
 copie: COIRI + HES
 14/11/07

(on a un dossier sur ce sujet)
 de je ancien

Le Directeur général de la santé

à

Madame la Directrice générale de
l'Agence française de sécurité sanitaire
de l'environnement et du travail
253, Avenue du Général Leclerc
94709 MAISONS-ALFORT CEDEX

- Objet :** contamination de la nappe d'Alsace au nord de Mulhouse par des produits organiques provenant de deux sites industriels et comportant du chloronitrobenzène (CNB) - demande d'expertise
- N/Réf. :** n°070057 (numéro de dossier à rappeler dans toute correspondance)
- P.J. :** note de la Cellule interrégionale d'épidémiologie - Est (CIRE-Est) en date du 17 septembre 2007 faisant suite à la saisine de la Direction départementale des affaires sociales (DDASS) du Haut-Rhin

L'Institut de veille sanitaire (InVS) m'a transmis récemment une « fiche alerte » relative à l'affaire citée en objet suite aux conclusions de la saisine de la CIRE-Est par la DDASS (voir pièce jointe). Cette dernière avait demandé que soit analysée l'évaluation des risques sanitaires produite par la société SPCM (Société des Produits Chimiques et Matières Courantes de Mulhouse), dans le cadre de la procédure de cessation d'activité d'une installation classée pour la protection de l'environnement, procédure instruite en liaison avec la Direction régionale de l'industrie, de la recherche et de l'environnement.

La nappe d'Alsace au nord de Mulhouse a été contaminée par des produits organiques provenant de deux sites industriels : l'usine SPCM, arrêtée depuis mai 1981, spécialisée dans la fabrication de colorants organiques de synthèse, et l'usine ICMD (Industrie Chimique de Mulhouse-Dornach), filiale de Rodhia toujours en activité, spécialisée dans la synthèse de produits de chimie et d'intermédiaires aromatiques chloronitrés et chloroaminés.

Les événements à l'origine de la pollution sont, pour l'usine SPCM, l'enfouissement de déchets dans les terrains de l'usine (date de dépôt inconnue) et, pour l'usine ICMD, une rupture de canalisation en 1976 ayant entraîné la perte par infiltration dans le sol et la nappe d'environ 300 tonnes d'un mélange complexe dont la principale molécule est le chloronitrobenzène (isomères ortho et para essentiellement).

D'un point de vue environnemental, la pollution découverte en 1981 à l'aval de l'usine SPCM a fait l'objet d'une surveillance régulière par l'intermédiaire d'un réseau de piézomètres et la première modélisation de la pollution venant des deux usines date de 1988. Néanmoins, l'absence de données environnementales entre la date d'apparition de la pollution (inconnue pour l'usine SPCM et 1976 pour l'usine ICMD) et les premières observations de la pollution dans la nappe (1981) ne permettent pas de connaître précisément l'évolution spatio-temporelle de la pollution pendant les premières années, probablement les plus exposantes pour la population. La pollution des milieux est en forte régression depuis 1976, date où les sources de pollution ont été arrêtées ; la dépollution est en cours depuis 1990.

Face à ce constat se pose la question des effets sanitaires éventuels à long terme induits par cette pollution chez la population résidant à proximité de la zone impactée. Les risques engendrés par cette substance sont à ce jour inconnus pour l'homme, les seules études disponibles sont des expérimentations animales qui montrent que le CNB est un cancérigène chez l'animal.

Trois situations d'exposition sont notamment à considérer :

- la consommation d'eau de distribution publique entre la date d'arrivée de la pollution au niveau des captages d'eau potable et l'arrêt de la distribution pour les habitants des communes desservies par les captages d'eau potable impactés ;
- la consommation d'eau des puits privés (ingestion, arrosage des légumes, etc.)
- l'inhalation des produits par dégazage de la nappe depuis le début de la pollution (inconnue pour SPCM et 1976 pour ICMD) pour les habitants des communes situées au dessus de la pollution.

Pour chacune de ces sources d'exposition et compte tenu du caractère volatil des produits incriminés, l'absorption peut se faire par l'ingestion d'eau, l'inhalation et le contact cutané (douche, bains, etc.). L'exposition liée à la fréquentation des piscines publiques et privées (remplies par l'eau de distribution publique ou à partir de l'eau des puits privés) est également à considérer.

A ce jour, les mesures de gestion mises en œuvre ont consisté à :

- arrêter en 1986 et 1988 les captages d'alimentation en eau potable impactés par la pollution d'eau, à la suite de la découverte d'odeurs caractéristiques au niveau des forages et prendre des mesures de restriction des captages d'eau privés par information des collectivités concernées à l'époque de la pollution ;
- réaliser des travaux de fixation de la pollution en 1989 à la suite de sa découverte et des travaux de dépollution par pompage et excavation de terres souillées.

Pour déterminer le plan de gestion à mettre en œuvre, une des difficultés est liée au fait qu'il n'existe ni valeur toxicologique de référence, ni valeur limite dans l'eau potable pour le CNB. C'est pourquoi je souhaiterais recueillir votre avis sur la pertinence de l'élaboration d'une valeur toxicologique de référence pour l'homme.

A ce titre, vous voudrez bien trouver ci-joint le dossier suivant :

**CONTAMINATION DE LA NAPPE D'ALSACE AU NORD DE MULHOUSE PAR DES
PRODUITS ORGANIQUES PROVENANT DE DEUX SITES INDUSTRIELS ET
COMPORTANT DU CHLORONITROBENZENE**

Ce dernier est enregistré à la Direction générale de la santé sous le numéro : 070057.

Je vous informe que j'ai également saisi l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (AFSSA) à ce sujet pour déterminer la faisabilité d'établir des valeurs limites dans l'eau potable pour les principaux polluants retrouvés dans la nappe permettant un usage alimentaire de l'eau.

L'ensemble des travaux à conduire en liaison avec l'AFSSA devrait permettre de mieux connaître les impacts sanitaires éventuels de cette pollution et d'en définir les modalités de gestion.

La directrice générale adjointe
de la santé

Sophie DELAPORTE

Copies : DDASS 68/Service Santé-environnement, InVS/Département Santé-environnement et CIRE-Est.

Annexe 2 : Synthèse des déclarations publiques d'intérêts des experts par rapport au champ de la saisine

RAPPEL DES RUBRIQUES DE LA DECLARATION PUBLIQUE D'INTERETS

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

SYNTHESE DES DECLARATIONS PUBLIQUES D'INTERETS DES MEMBRES DU CES PAR RAPPORT AU CHAMP DE LA SAISINE

NOM	Prénom	Date de déclaration des intérêts
Analyse Afsset :	<i>Rubrique de la DPI</i> Description de l'intérêt <i>en cas de lien déclaré</i>	
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

	Aucun lien déclaré	
Analyse Afsset :	/	
BELZUNCES Luc		19 avril 2008
	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)	
Analyse Afsset :	Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la thématique de la saisine	
CÉZARD Christine		19 décembre 2006
	N'a pas participé aux travaux	
Analyse Afsset :	/	
DESLAURIERS Michel		26 juin 2007
	LD Médecin du travail au sein d'EDF-GDF	
Analyse Afsset :	Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la thématique de la saisine	
EMPEREUR-BISSONNET Pascal		15 avril 2008
	Aucun lien déclaré	
Analyse Afsset :	/	
ENRIQUEZ Brigitte		20 septembre 2007
	Aucun lien déclaré	
Analyse Afsset :	/	
FARDEL Olivier		26 juin 2007
	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)	
Analyse Afsset :	Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la thématique de la saisine	
FÉNET Hélène		20 septembre 2007

	N'a pas participé aux travaux	
Analyse Afsset :	/	
FERRARI Luc		11 octobre 2007
	Aucun lien déclaré	
Analyse Afsset :	/	
FONTANA Luc		20 juin 2008
	Aucun lien déclaré	
Analyse Afsset :	/	
FOUILHÉ SAM-LAÏ Nathalie		20 septembre 2007
	Aucun lien déclaré	
Analyse Afsset :	/	
GOUGET Barbara		08 février 2008
	Aucun lien déclaré	
Analyse Afsset :	/	
GUENOT Dominique		20 septembre 2007
	Aucun lien déclaré	
Analyse Afsset :	/	
GUERBET Michel		26 juin 2007
	Aucun lien déclaré	
Analyse Afsset :	/	
HUYNH Cong Khanh		20 septembre 2007
	Aucun lien déclaré	
Analyse Afsset :	/	
LAFON Dominique		14 avril 2008
	LD	
	Médecin du travail (coordinateur médical) groupe Dassault Aviation	
	Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la thématique de la saisine	
Analyse Afsset :	/	
LALÈRE Béatrice		26 juin 2007
	Aucun lien déclaré	
Analyse Afsset :	/	
LAUDET Annie		20 septembre 2007
	Aucun lien déclaré	
Analyse Afsset :	/	
LEPOITTEVIN Jean-Pierre		26 septembre 2008

	<p>IP-SC</p> <p>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)</p> <p>Contrat en préparation avec le COLIPA au bénéfice de l'organisme d'appartenance (Université de Strasbourg I)</p>	
	<p>IP-AC</p> <p>Conseil Sécurité produits chez L'Oréal donnant lieu à versement à l'organisme d'appartenance (Université de Strasbourg I)</p> <p>Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la thématique de la saisine</p>	
Analyse Afsset :		
MACHEREY	Anne-Christine	26 juin 2007
	Aucun lien déclaré	
Analyse Afsset :	/	
MÉNÉTRIER	Florence	22 avril 2008
	Aucun lien déclaré	
Analyse Afsset :	/	
PFOHL-LESZKOWICZ	Annie	12 avril 2008
	Aucun lien déclaré	
Analyse Afsset :	/	
PICART	Daniel	26 septembre 2007
	Aucun lien déclaré	
Analyse Afsset :	/	
ROUDOT	Alain-Claude	26 mars 2008
	Aucun lien déclaré	
Analyse Afsset :	/	
SECRETAN	Béatrice	27 juin 2008
	Aucun lien déclaré	
Analyse Afsset :	/	
STEENHOUT	Anne	20 février 2008

	<p>IP-CC</p> <p>Évaluation de projets pour Ecetoc (2002) donnant lieu à versement à l'organisme d'appartenance (Université Libre de Bruxelles - ULB)</p> <p>VB</p> <p>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)</p> <p>Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la thématique de la saisine</p>	
Analyse Afsset :		
TARDIF Robert		23 janvier 2008
Analyse Afsset :	Aucun lien déclaré /	
THYBAUD Éric		04 juillet 2008 25 septembre 2008 18 novembre 2008
Analyse Afsset :	N'a pas participé aux travaux /	

SYNTHESE DES DECLARATIONS PUBLIQUES D'INTERETS DES MEMBRES DU GT PAR RAPPORT AU CHAMP DE LA SAISINE

NOM	Prénom	Date de déclaration des intérêts
	Rubrique de la DPI	
	Description de l'intérêt	
Analyse Afsset :		
BOIZE Magali		17 avril 2008 17 juillet 2008 25 novembre 2008 26 février 2009
Analyse Afsset :	LD Pharmacien évaluateur de risques sanitaires au sein d'EDF-SEM (Service des études médicales)	
	Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la thématique de la saisine	

CHAKROUN Radhouane	28 mai 2008
Aucun lien déclaré	
Analyse Afsset : /	
CHEVALIER Dany	11 avril 2008 05 novembre 2008 21 novembre 2008 29 janvier 2009
Aucun lien déclaré	
Analyse Afsset : /	
DOR Frédéric	29 mai 2008
IP-AC	
Membre du Conseil scientifique d'ADP (Aéroports de Paris) depuis 2006	
Analyse Afsset : Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la thématique de la saisine	
EL GHISSASSI Fatiha	18 avril 2008
Aucun lien déclaré	
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
Aucun lien déclaré	
Analyse Afsset : /	
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	
Analyse Afsset :	Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la thématique de la saisine	
LAFON Dominique (membre du CES « Évaluation des risques liés aux substances chimiques »)		14 avril 2008
	LD Médecin du travail (coordinateur médical) groupe Dassault Aviation	
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
Analyse Afsset :	/	
MEEK Bette		14 mai 2008
Analyse Afsset :	/	
MULLOT Jean-Ulrich		05 avril 2008 07 janvier 2009
Analyse Afsset :	/	
OULD-ELHKIM Mostafa		26 mai 2008 26 septembre 2008
Analyse Afsset :	/	
ROUDOT Alain-Claude (membre du CES « Évaluation des risques liés aux substances chimiques »)		26 mars 2008
Analyse Afsset :	/	
TISSOT Sylvie		05 mai 2008
	LD Responsable de l'unité expertise collective des substances chimiques à l'INERIS	
Analyse Afsset :	Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la thématique de la saisine	
VIAN Laurence		14 avril 2008

Aucun lien déclaré
Analyse Afsset : /

SYNTHESE DES DECLARATIONS PUBLIQUES D'INTERETS DES RAPPORTEURS PAR RAPPORT AU CHAMP DE LA SAISINE

NOM	Prénom	Date de déclaration des intérêts
	<i>Rubrique de la DPI</i>	
	Description de l'intérêt	
Analyse Afsset :		

EL GHISSASSI	Fatiha	18 avril 2008
	Aucun lien déclaré	
Analyse Afsset : /		
ENRIQUEZ	Brigitte	20 septembre 2007
	Aucun lien déclaré	
Analyse Afsset : /		
KARG	Frank	4 avril 2008
	Aucun lien déclaré	
Analyse Afsset : /		

Notes



))) **afsset** .)))

agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail

253, avenue du Général Leclerc
94701 Maisons-Alfort Cedex
Tél. +33 1 56 29 19 30
afsset@afsset.fr
www.afsset.fr

ISBN 978-2-11-098517-0

