

anses

agence nationale de sécurité sanitaire
alimentation, environnement, travail



Valeur toxicologique de référence de l'hydrate de chloral

Avis de l'Anses
Rapport d'expertise collective

Novembre 2011

Édition scientifique



anses

agence nationale de sécurité sanitaire
alimentation, environnement, travail



Valeur toxicologique de référence de l'hydrate de chloral

Avis de l'Anses
Rapport d'expertise collective

Novembre 2011

Édition scientifique

AVIS

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

Relatif à « l'élaboration d'une valeur toxicologique de référence chronique par voie orale de l'hydrate de chloral »

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

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

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

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

Ses avis sont rendus publics.

L'Afsset s'est auto-saisie le 25 février 2010 afin d'élaborer une valeur toxicologique de référence par voie orale pour l'hydrate de chloral.

1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE

Le Directeur général de la santé, le Directeur général de la prévention des pollutions et des risques et le Directeur de l'eau et de la biodiversité ont saisi l'agence le 22 décembre 2006 d'une demande d'« **Évaluation des risques sanitaires liés à la présence de dangers chimiques et/ou biologiques dans l'eau, l'air et les surfaces des piscines réglementées** ». Au cours du traitement de cette saisine menée par le groupe de travail « Évaluation des risques sanitaires liés à la qualité des eaux et des produits et procédés de traitement des eaux de piscines », une construction de VTR pour l'hydrate de chloral a été envisagée.

L'hydrate de chloral est en effet l'un des principaux sous-produits chlorés de désinfection présent dans l'eau potable et dans les eaux de piscine où il se trouve généralement aux concentrations les plus élevées. Il est ainsi retrouvé dans les eaux de piscines françaises à des concentrations comprises entre 96,5 et 430 µg/L (De Laat, 2009).¹

Une VTR est un indice toxicologique qui permet de qualifier ou de quantifier un risque pour la santé humaine. Elle établit le lien entre une exposition à une substance toxique et l'occurrence d'un effet sanitaire indésirable. Les VTR sont spécifiques d'une durée d'exposition (aiguë, subchronique ou chronique) et d'une voie d'exposition (orale ou respiratoire). La construction des VTR diffère en fonction des connaissances ou des hypothèses formulées sur les mécanismes d'action des substances. Actuellement,

¹ De Laat J., Berne F., Brunet R. *et al.* (2009). Sous-produits de chloration formés lors de la désinfection des eaux de piscines. Etude bibliographique. *Eur. J. Water Quality*; 40 (2) : 109-28.

l'hypothèse par défaut est de considérer une relation monotone entre l'exposition, ou la dose, et l'effet, ou la réponse. En l'état actuel des connaissances et par défaut, on considère généralement que, pour les effets non cancérogènes, la toxicité ne s'exprime qu'au-delà d'un seuil de dose. La construction d'une VTR est donc définie de la manière suivante :

VTR= Dose critique/UF

avec *Dose critique* = NOAEC, LOAEC ou BMDL
UF = facteur d'incertitude global appliqué

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

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

L'élaboration des VTR² suit une approche très structurée et exigeante qui implique des évaluations collectives par des groupes de spécialistes.

2. ORGANISATION DE L'EXPERTISE

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

L'Agence a confié en février 2010 cette expertise au groupe de travail « Valeurs toxicologiques de référence » rattaché au Comité d'Experts Spécialisés (CES) « Évaluation des risques liés aux substances chimiques ».

Les travaux ont été présentés régulièrement au CES tant sur les aspects méthodologiques que scientifiques entre le 4 novembre 2010 et le 12 mai 2011. Ils ont été adoptés par le CES « Évaluation des risques liés aux substances chimiques » réuni le 12 mai 2011.

Le présent avis se fonde pour les aspects scientifiques sur le rapport final issu de cette expertise collective « Hydrate de chloral. Élaboration de VTR par voie orale fondée sur la toxicité chronique » de juin 2011.

Ce rapport a été approuvé par le CES lors de sa séance du 10 juin 2011.

² Afssset, 2007. Construction d'une valeur toxicologique de référence pour les substances reprotoxiques

3. ANALYSE ET CONCLUSIONS DU CES

L'hydrate de choral est une substance chimique non volatile, et très soluble. La voie d'exposition majoritaire est l'ingestion et une VTR a ainsi été construite pour la voie orale.

Analyse et évaluation des choix pour la construction de VTR

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

- *Choix de l'effet critique*

Bien que ce produit soit utilisé depuis longtemps en médecine, aucune étude de toxicité chronique n'a été publiée sur l'exposition humaine à l'hydrate de chloral. Chez l'animal et par voie orale, plusieurs études subchroniques et chroniques (incluant les études de cancérogénèse) ont confirmé que le foie est le principal organe cible de la toxicité de l'hydrate de chloral.

Au vu des résultats de cancérogénicité, l'effet cancer ne peut être retenu pour la construction de la VTR. Le CIRC a d'ailleurs considéré en 2004, l'hydrate de chloral en groupe 3 soit « inclassable quant à sa cancérogénicité pour l'Homme » (Monographie du CIRC, volume 84, 2004).

Les experts ont ainsi proposé une construction de VTR à seuil de dose fondée sur la toxicité hépatique.

- *Choix de l'étude clé*

Parmi les diverses études publiées, les experts ont retenu l'étude de **George et al. (2000)**³ comme étude clé. Sa qualité a été jugée satisfaisante et l'effet étudié (toxicité hépatique) a été considéré comme pertinent pour évaluer la toxicité chronique de l'hydrate de chloral chez l'animal.

Dans cette étude, des souris mâles B6C3F1 ont été exposées *via* l'eau de boisson à des doses de 0 ; 13,5 ; 65 ; 146 mg/kg pc/j et ce, pendant 104 semaines. Les auteurs décrivent une toxicité hépatique, qui s'exprime par la formation de lésions cellulaires prolifératives, à la première dose testée. Ces lésions sont appelées foyers pré néoplasiques (AFC) par George et al. et peuvent également être rencontrées sous le terme « nodules hyperplasiques ». Elles correspondent à des îlots de cellules qui présentent des modulations de certaines activités enzymatiques. Leurs caractéristiques histologiques, malgré le terme utilisé par les auteurs, ne préjugent pas de leurs transformations tumorales.

- *Choix de la dose critique*

Les experts ont retenu la dose de **13,5 mg/kg p.c./j** comme **LOAEL**. Il n'a pas été possible de calculer de BMD et BMD_{10L90%} à partir de ces études.

³ George, M., Moore, T., Kilburn, S., Olson, G.R. et DeAngelo, A.B. (2000) Carcinogenicity of chloral hydrate administered in drinking water to the male F344/N rat and male B6C3F1 mouse. *Toxicol. Pathol.*, 28 : 610-618

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

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

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

Dans l'étude de George *et al.* (2000), le poids moyen de la souris est égal 40,6 g ($\pm 1,3$ g), celui de l'homme est estimé à 70 kg. Les doses sont exprimées en mg/kg p.c./j.

Soit un **LOAEL_{HED} = 2,1 mg/kg p.c./j**

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

UF_A = 2,5 (variabilité inter-espèces)

- Pour tenir compte de la variabilité intra-espèce, une valeur finale de 10 par défaut a été choisie :

UF_H = 10 (variabilité intra-espèce ou interindividuelle)

- Pour tenir compte de l'utilisation d'un LOAEL, un facteur de sécurité supplémentaire a été introduit :

UF_L = 3.

Au regard, des autres études de toxicité, notamment l'étude de Poon *et al.* (2002⁴), l'utilisation d'un facteur 3 semble suffisant. Pour rappel, l'étude de Poon *et al.* (2002), est une étude subchronique dans laquelle une dose critique équivalente humaine du même ordre de grandeur a été calculée sur la base d'une diminution de l'activité aldéhyde déshydrogénase.

Résultat de l'expertise collective

La VTR chronique par la voie orale pour les effets hépatotoxiques de l'hydrate de chloral proposée à l'issue de l'expertise est :

Effet critique	Dose critique*	UF	VTR orale chronique
Formation des lésions cellulaires prolifératives hépatiques chez la souris George <i>et al.</i> , (2000)	LOAEL = 13,5 mg/kg/j <u>Ajustement allométrique</u> LOAEL _{HED} * = 2,1 mg/kg/j	75 UF _A 2,5** UF _H 10 UF _L 3	VTR = 28 µg/kg/j

*HED : Human Equivalent Dose ; **Afin de tenir compte de la variabilité toxicodynamique, un facteur d'incertitude UF_A été fixé à 2,5.

⁴ Poon *et al.* (2002): Subchronic toxicity of chloral hydrate on rats: a drinking water study.

Le CES a observé que la construction d'une VTR à partir de l'étude de Poon *et al.* (2002) réalisée chez le rat aboutit à une valeur équivalente.

Par ailleurs, même si aucun organisme n'a classé l'hydrate de chloral pour des effets nocifs pendant la grossesse, le CES a attiré l'attention sur le fait qu'un effet reprotoxique n'est pas exclu par l'intermédiaire d'un métabolite, le TCA, substance pour laquelle une VTR reprotoxique a d'ailleurs été proposée par l'Agence (VTR chronique par voie orale de 300 µg/kg p.c/j basée sur une augmentation des malformations cardiaques chez le rat).

4. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail endosse les conclusions et les recommandations du CES « Évaluation des risques liés aux substances chimiques » qui portent sur l'élaboration d'une valeur toxicologique de référence par voie orale pour l'hydrate de chloral et adopte la VTR chronique par voie orale de 28 µg/kg/j.

Effet critique	Dose critique*	UF	VTR orale chronique
Formation des lésions cellulaires prolifératives hépatiques chez la souris George <i>et al.</i> , (2000)	LOAEL = 13,5 mg/kg/j <u>Ajustement allométrique</u> LOAEL _{HED} * = 2,1 mg/kg/j	75 UF _A 2,5** UF _H 10 UF _L 3	VTR = 28 µg/kg/j

*HED : Human Equivalent Dose ;

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

Fait en six exemplaires,

Le Directeur général

Marc Mortureux

MOTS-CLÉS

Hydrate de chloral, valeurs toxicologiques de référence, dose critique, facteurs d'incertitude, effets santé, population générale.

Hydrate de chloral (CAS 302-17-0)

Elaboration de VTR par voie orale fondée sur la toxicité chronique

**Saisine « 210-SA-0227 »
Saisine liée « 2007-SA-0409 »**

RAPPORT d'expertise collective

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

Groupe de Travail « Valeurs Toxicologiques de Référence »

Juin 2011

Mots clés

Hydrate de chloral, valeurs toxicologiques de référence, dose critique, facteurs d'incertitude, effets santé, population générale.

Présentation des intervenants

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

GROUPE DE TRAVAIL « VALEURS TOXICOLOGIQUES DE RÉFÉRENCE »

Président

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

Membres

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

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

M. Dany CHEVALIER – Université de Lille

M. Frédéric DOR – Institut de veille sanitaire

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

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

M. Sébastien GIRAULT – Cephalon France

Mme Cécile KAIRO - Institut de veille sanitaire

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

M. Rémi MAXIMILIEN – Commissariat à l'Energie Atomique

Mme Bette MEEK - Université d'Ottawa, Canada

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

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

M. Alain-Claude ROUDOT – Université de Brest

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

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

RAPPORTEURS

M. Dany CHEVALIER – Université de Lille

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

ADOPTION DU RAPPORT PAR LE COMITE D'EXPERTS SPÉCIALISES

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

- « Evaluation des risques liés aux substances chimiques » – 4 novembre 2010, 9 décembre 2010, 10 mars 2011 et 12 mai 2011.

Président

M. Michel GUERBET – Professeur des Universités en toxicologie

Membres

BELZUNCES Luc – Directeur de Recherche - Laboratoire de Toxicologie Environnementale, UMR 406 A&E, INRA

BONVALLOT Nathalie – Enseignant chercheur en toxicologie – EHESP Sorbonne Paris Cité, IRSET, INSERM. Démission en mars 2011

BOURGEOIS Damien – Chargé de Recherche – Institut de Chimie Séparative de Marcoule - CNRS

CASSIER-CHAUVAT Corinne – Directrice de Recherche DR2 CNRS – iBiTecS/SBIGeM/LBI, unité mixte CEA-CNRS URA 2096

EMPEREUR-BISSONNET Pascal Médecin, responsable de l'unité « Populations, Risques, Territoires » - Département Santé Environnement, InVS

ENRIQUEZ Brigitte – Enseignant chercheur (Pr) Pharmacie – toxicologie / Responsable de la pharmacie centrale – Unité de Pharmacie Toxicologie, ENVA

GUENOT Dominique – Chargée de recherche - CNRS

GUERBET Michel – Professeur des Universités en toxicologie – Laboratoire de toxicologie, UFR Médecine Pharmacie de Rouen.

HUYNH Cong Khanh – Docteur es Sciences - Ingénieur chimiste – Institut universitaire Roman de Santé au Travail

KRISHNAN Kannan – Professeur, enseignant chercheur - Santé publique et Toxicologie - Département de Santé environnementale et de santé au travail, Université de Montréal

LAFON Dominique – Médecin toxicologue, pilote de la thématique reproduction et travail– INRS

LAGADIC-GOSSMANN Dominique – Directrice de Recherche CNRS – EA 4427 SeRAIC / IRSET, Université Rennes 1

LAUDET Annie - Pharmacien toxicologue retraitée – INRS

MÉNÉTRIER Florence – Responsable de l'unité Prositon / Pharmacien – DSV/Prositon, CEA

PRAT Odette - Chercheur Biologiste Toxicologue / Responsable Toxicogénomique - Institut de Biologie Environnementale et de Biotechnologie / DSV/ CEA

SCHROEDER Henri – Enseignant chercheur / Pharmacien biologiste – URAFPA, INRA USC 340, Faculté des Sciences et Technologies, Nancy université

SECRETAN-LAUBY Béatrice – Scientifique pour monographies – groupe IMO, CIRC/ OMS

TISSOT Sylvie – Vétérinaire Toxicologue/Responsable de l'unité ETSC – INERIS. Démission en mars 2011

Après prise en compte des commentaires, le rapport a été approuvé par les membres du groupe de travail le 18 mars 2011.

Il a été adopté par le CES « Evaluation des risques liés aux substances chimiques » le 12 mai 2011.

PARTICIPATION AFSSET

Coordination scientifique

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

Contribution scientifique

Mlle Vanessa LURIENNE - Chargée de projet scientifique - Anses

Relecture

M Christophe ROUSSELLE – Responsable unité toxicologie /DER - Anses

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

Secrétariat administratif

Mme Séverine BOIX - Anses

SOMMAIRE

1.1	Contexte	14
1.2	Objet de la saisine	15
1.3	Modalités de traitement : moyens mis en œuvre et organisation	15
3.1	Identification de la substance	17
3.1.1	Généralités	17
3.1.2	Propriétés chimiques	18
3.2	Plausibilité d'exposition humaine	18
3.3	Toxicocinétique	18
3.4	Effets sanitaires	18
3.4.1	Etude de toxicité répétée	19
3.4.2	Génotoxicité et cancérogénèse	19
3.4.2.1	Etudes de génotoxicité	19
3.4.2.2	Conclusion sur la génotoxicité	20
3.4.2.3	Etudes de cancérogénèse	20
3.4.2.4	Conclusion sur le mode d'action cancérigène	22
3.4.3	Effets reprotoxiques	22
4.1	Choix de l'effet critique	24
4.2	Choix de l'étude	24
4.3	Ajustement allométrique	25
4.4	Choix des facteurs d'incertitude	25
4.4.1	Variabilité inter-espèces	25
4.4.2	Variabilité intra-espèces	25
4.4.3	Facteur d'incertitude pour l'application d'une LOAEL	26
4.5	Calcul de la VTR	26

EXPERTISE COLLECTIVE : SYNTHÈSE ET CONCLUSIONS

Relatives à la Valeur toxicologique de référence chronique par inhalation pour les effets neurotoxiques du toluène (CAS 108-88-3)

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

1 PRESENTATION DE LA QUESTION POSEE

Dans le cadre de la saisine « Évaluation des risques sanitaires liés à la présence de dangers chimiques et/ou biologiques dans l'eau, l'air et les surfaces des piscines réglementées » menée par le groupe de travail « Évaluation des risques sanitaires liés à la qualité des eaux et des produits et procédés de traitement des eaux de piscines », une construction de VTR pour l'hydrate de chloral a été envisagée.

L'Afsset a été saisie le 25/02/2010 par l'unité « Eaux et agents biologiques » afin d'élaborer une VTR chronique par voie orale pour l'hydrate de chloral.

2 CONTEXTE SCIENTIFIQUE

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 des substances. Actuellement, l'hypothèse par défaut est de considérer une relation monotone entre l'exposition, ou la dose, et l'effet, ou la réponse. En l'état actuel des connaissances et par défaut, on considère généralement que, pour les effets non cancérogènes, la toxicité ne s'exprime qu'au-delà d'un seuil de dose [US EPA, 1998]. Mathématiquement, la construction d'une VTR est donc définie de la manière suivante :

$$\text{VTR} = \text{Dose critique} / \text{UF}$$

avec *Dose critique* = NOAEC, LOAEC ou BMDL

UF = facteur d'incertitude global appliqué

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

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

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

3 ORGANISATION DE L'EXPERTISE

En réponse à une demande de l'unité « Eaux et agents biologiques » de l'Anses, le GT VTR a été saisi le 24 juillet 2009 afin d'élaborer des valeurs toxicologiques de référence pour 3 acides haloacétiques (AHAs) (acide dichloroacétique, acide dibromoacétique et acide trichloroacétique) les plus retrouvés dans les eaux de piscine et le 25 février 2010 afin d'élaborer celle pour l'hydrate de chloral.

Les travaux d'expertise du groupe de travail ont été soumis au comité d'experts spécialisés (CES) « Évaluation des risques liés aux substances chimiques » le 10 mars 2011. Le rapport produit par le groupe de travail tient compte des observations et éléments complémentaires transmis par les membres du CES.

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

4 DESCRIPTION DE LA METHODE

Recueil des données toxicologiques

Chez l'animal et par voie orale, plusieurs études subchroniques et chroniques (incluant les études de cancérogénèse) ont confirmé que le **foie** est le principal organe cible de la toxicité de l'hydrate de chloral.

L'hydrate de chloral est considéré comme un agent mutagène à forte concentration. Au vu des résultats des études de génotoxicité, le groupe de travail a considéré l'hydrate de chloral comme une substance génotoxique indirecte¹. Dans une étude réalisée chez la souris mâle, des tumeurs hépatiques ont été observées. Un mécanisme impliquant la formation de radicaux libres au cours du métabolisme de l'hydrate de chloral par le CYP2E1 pourrait être impliqué dans le

¹ Selon la méthode de construction de VTR pour les substances cancérogènes (Afsset, 2009), il devrait être considéré comme un composé "à effet de seuil" si l'effet cancer devait être retenu.

développement de ces tumeurs. Dans cette étude (George *et al.*, 2000) l'incidence d'adénomes et de tumeurs spontanées était anormalement élevée chez les témoins rendant de ce fait les résultats ininterprétables.

Le CIRC a classé, en 2004, l'hydrate de chloral en groupe 3 comme « inclassable quant à sa cancérogénicité pour l'Homme » (Monographie du CIRC, volume 84, 2004).

Aucun organisme n'a classé l'hydrate de chloral pour des effets nocifs pendant la grossesse. Le CES attire l'attention sur le fait qu'un effet reprotoxique n'est pas exclu par l'intermédiaire d'un métabolite, le TCA, substance pour laquelle une VTR reprotoxique a d'ailleurs été proposée par l'Agence (VTR chronique par voie orale de 300 µg/kg p.c./j basée sur une augmentation des malformations cardiaques chez le rat).

Analyse et évaluation des choix pour la construction de VTR

La voie d'exposition majoritaire est l'**ingestion** et sera la seule considérée pour la proposition de VTR. Bien que ce produit soit utilisé depuis longtemps en médecine, aucune étude de toxicité chronique n'a été publiée sur l'exposition humaine à l'hydrate de chloral. Au vu des résultats de cancérogénicité, l'effet cancer ne peut être retenu pour la construction de la VTR. Le groupe de travail propose ainsi une construction de VTR à seuil de dose fondée sur la toxicité hépatique.

Choix de l'étude clé et de la dose critique

Parmi les diverses études publiées, les experts ont retenu l'étude de George *et al.* (2000) comme étude clé. Sa qualité a été jugée satisfaisante et l'effet étudié (toxicité hépatique) a été considéré comme pertinent pour évaluer la toxicité chronique de l'hydrate de chloral chez l'animal.

Dans cette étude, des souris mâles B6C3F1 ont été exposées *via* l'eau de boisson à des doses de 0 ; 13,5 ; 65 ; 146 mg/kg pc/j et pendant 104 semaines. Les auteurs décrivent une toxicité hépatique, qui s'exprime par la formation de lésions cellulaires prolifératives, à la première dose testée. Ces lésions sont appelées foyers pré néoplasiques (AFC) par George *et al.* et peuvent également être rencontrées sous le terme « nodules hyperplasiques ». Leurs caractéristiques histologiques malgré le terme utilisé par les auteurs ne préjugent pas de leurs transformations tumorales. Ces lésions, correspondent à des îlots de cellules qui présentent **des modulations** de certaines activités enzymatiques.

Les experts ont retenu la dose de 13,5 mg/kg p.c./j comme LOAEL. Il n'a pas été possible de calculer de BMD et BMD_{10L90%} à partir de ces études.

Ajustement

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

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

Dans l'étude de George *et al.* (2000), le poids moyen de la souris est égal 40,6 g (±1,3 g), celui de l'homme est estimé à 70 kg. Les doses sont exprimées en mg/kg p.c./j.

$$\text{Soit un LOAEL}_{\text{HED}} = 2,1 \text{ mg/kg p.c./j}$$

Choix des facteurs d'incertitudes

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

UF_A = 2,5 (variabilité inter-espèces)

- Pour tenir compte de la variabilité intra-espèce, une valeur finale de 10 par défaut a été choisie :

UF_H = 10 (variabilité intra-espèce ou interindividuelle)

- Pour tenir compte de l'utilisation d'un LOAEL, un facteur de sécurité supplémentaire a été introduit :

UF_L = 3

Au regard, des autres études de toxicité, notamment l'étude de Poon *et al.* (2002), l'utilisation d'un facteur 3 semble suffisant. Pour rappel, l'étude de Poon *et al.* (2002), est une étude subchronique dans laquelle une dose critique équivalente humaine du même ordre de grandeur a été calculée sur la base d'une diminution de l'activité aldéhyde déshydrogénase.

5 RESULTAT DE L'EXPERTISE COLLECTIVE

VTR construite à partir de l'étude de George *et al.* (2000) :

Effet critique	Dose critique*	UF	VTR orale chronique
Formation des lésions cellulaires prolifératives hépatiques chez la souris George <i>et al.</i> , (2000)	LOAEL = 13,5 mg/kg/j <u>Ajustement allométrique</u> LOAEL _{HED} * = 2,1 mg/kg/j	75 UF _A 2,5** UF _H 10 UF _L 3	VTR = 28 µg/kg/j

*HED : Human Equivalent Dose ;

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

Le comité d'experts spécialisé « Évaluation des risques liés aux substances chimiques » a adopté les travaux d'expertise collective ainsi que ses conclusions et recommandations, objets du présent rapport lors de sa séance du 12 mai 2011 et a fait part de cette adoption à la direction générale de l'Anses.

6 CONCLUSIONS DE L'EXPERTISE COLLECTIVE

La VTR chronique pour la voie orale pour les effets hépatotoxiques de l'hydrate de chloral proposée à l'issue de l'expertise est :

Effet critique	Dose critique*	UF	VTR orale chronique
Formation des lésions cellulaires prolifératives hépatiques chez la souris George <i>et al.</i> , (2000)	LOAEL = 13,5 mg/kg/j <u>Ajustement allométrique</u> LOAEL _{HED} * = 2,1 mg/kg/j	75 UF _A 2,5** UF _H 10 UF _L 3	VTR = 28 µg/kg/j

*HED : Human Equivalent Dose ;

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

Le CES fait remarquer que la construction d'une VTR à partir de l'étude de Poon *et al.* (2002) réalisée chez le rat aboutit à une valeur équivalente.

Maisons-Alfort, le 27 mai 2011,

Au nom des experts du

CES « Évaluation des risques liés aux substances chimiques »,

**Le président du CES,
Michel GUERBET**

Sigles et abréviations

AAALAC	Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care
ADN	Acide désoxyribonucléique
Afsset	Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail
ALAT	ALanine AminoTransférerase
Anses	Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
ASAT	ASpartate AminoTransférerase
ATSDR	Agency for Toxic Substances and Disease Registry
BMD	Benchmark dose
BMDL	Limite inférieure de l'intervalle de confiance de la benchmark dose
CCI4	Tétrachlorure de carbone
CES	Comité d'experts spécialisés
CIRC	Centre international de recherché sur le cancer (IARC : International Agency for Research on Cancer)
DDT	Dichlorodiphényltrichloroéthane
DJA	Dose Journalière Admissible
Kg pc.	Kilogramme de poids corporel
LDH	Lactate deshydrogénas
LOAEL	Dose minimale entraînant un effet néfaste observe (Lowest observed adverse effect level)
MDA	Malondialdéhyde
NOAEL	Dose maximale n'entraînant pas d'effet néfaste observé (No observed adverse effect level)
NTP	National Toxicology Program
OEHHA	Office on Environmental Health Hazard Assessment
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
RfD	Dose de référence
RIVM	Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (Institut national hollandais pour la santé publique et l'environnement)
TCA	Acide trichloroacétique
UF	Facteur d'incertitude (« Uncertainty Factor »)
UF _A	Facteur d'incertitude inter-espèce
UF _H	Facteur d'incertitude inter-individuel
UF _S	Facteur d'incertitude lié à la transposition subchronique à chronique
UF _L	Facteur d'incertitude lié à l'usage d'un LOAEL
UF _D	Facteur d'incertitude insuffisance de données
US EPA	United State Environmental Protection Agency (États-Unis)
VTR	Valeur Toxicologique de Référence

Liste des tableaux

Tableau 1 : Description des VTR à seuil de l'hydrate de chloral	16
Tableau 2 : Propriétés physicochimiques de l'hydrate de chloral	18
Tableau 3 : Incidence des nécroses hépatiques chez les mâles	19

1 Contexte, objet et modalités de traitement de la saisine

1.1 Contexte

Dans le cadre de la saisine « Evaluation des risques sanitaires liés à la présence de dangers chimiques et/ou biologiques dans l'eau, l'air et les surfaces des piscines réglementées » menée par le groupe de travail « Evaluation des risques sanitaires liés à la qualité des eaux et des produits et procédés de traitement des eaux de piscines », une construction de VTR pour l'hydrate de chloral fondée sur la toxicité chronique a été envisagée car aucune VTR n'existe.

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

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

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

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

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

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

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

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

1.2 Objet de la saisine

En réponse à une demande de l'unité « Eaux et agents biologiques » de l'Agence, le groupe de travail « Valeurs toxicologiques de référence » a été saisi le 25 février 2010 afin d'élaborer une valeur toxicologique de référence pour l'hydrate de chloral.

1.3 Modalités de traitement : moyens mis en œuvre et organisation

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

La construction de VTR de l'hydrate de chloral a été confiée au Comité d'Experts Spécialisés (CES) « Evaluation des risques liés aux substances chimiques ». Ce dernier a mandaté le groupe de travail « Valeurs toxicologiques de référence » pour la réalisation des travaux d'expertise. Messieurs Dany Chevalier et Mostafa Ould-Elkhim ont été nommés rapporteurs pour construire la VTR l'hydrate de chloral.

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

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

2 Recensement des VTR existantes

Les VTR existantes élaborée par l'US EPA et Santé Canada n'ont pas été retenues.

Une VTR à seuil élaborée par l'US EPA, basée sur l'étude de Goodman et Gilman (1985) (Goodman et Gilman, 1985) et concernant la dépression du système nerveux central et des irritations gastro-intestinales (US EPA, 2000). Cette valeur n'a pas été retenue car la durée d'exposition n'est pas connue et une dose unique a été expérimentée.

Une VTR à seuil a été élaborée par Santé Canada, basée sur l'étude de George *et al.*, 2000 (George *et al.*, 2000) concernant des adénomes et des carcinomes hépatiques. Celle-ci n'a pas été retenue en raison de l'absence de relation dose réponse dans cette étude (Santé Canada, 2008).

Tableau 1 : Description des VTR à seuil de l'hydrate de chloral

	US EPA	Santé Canada
Type de VTR	RfD	DJA
Durée d'application	Chronique	Chronique
Année de construction	2000	2008
VTR	0,1 mg/kg/j	0,0045 mg/kg p.c/j
Effet critique	Dépression du système nerveux central et irritations gastro-intestinales	Augmentation de l'incidence de modifications histologiques hépatiques (adénomes et des carcinomes)
Dose critique	LOAEL = 10,7 mg/kg/j	LOAEL = 13,5 mg/kg p.c/j
Facteur d'incertitude	100 UF _H = 10 UF _L = 10	3000 UF _A = 10 UF _H = 10 UF _L = 10 UF _D = 3
Espèces	Homme	Souris B6C3F1
Études clés	Goodman et Gilman, 1985	George <i>et al.</i> , 2000
Confiance	Elevée	

3 Recueil de données toxicologiques

Cette partie est fondée sur le document technique de Santé Canada publié en août 2008 : « **Document de conseils sur l'hydrate de chloral dans l'eau potable** ».

Le groupe de travail dédié aux piscines (sous groupe toxicologie) a réalisé une recherche bibliographique complémentaire via Pubmed concernant les effets toxiques de l'hydrate de chloral couvrant la période 2004-2010. Les mots clés utilisés étaient « chloral hydrate », « swimming pool », « disinfection by-products mixtures » et « drinking water ». Ainsi, trente quatre articles concernant la toxicité générale de l'hydrate de chloral ont été identifiés et analysés par ce même groupe.

Parmi ces trente quatre publications, seulement 6 portaient sur les effets chroniques ou sub-chroniques et ont donc été détaillées dans ce rapport (Leuschner et Beuscher, 1998 ; George *et al.*, 2000 ; NTP, 2002a ; NTP, 2002b ; Daniel *et al.*, 1992b, Poon *et al.* 2002)

La synthèse de ces études est présentée en annexe.

3.1 Identification de la substance

3.1.1 Généralités

L'hydrate de chloral a été utilisé en thérapeutique sur de courte durée comme sédatif hypnotique pendant de nombreuses années. En pédiatrie, la dose thérapeutique utilisée était de 25 mg/kg p.c/j. C'est un métabolite de l'hydrate de chloral, le trichloréthanol, qui est responsable de l'effet pharmacologique.

On ne dispose d'aucune donnée quantitative sur l'exposition professionnelle.

L'hydrate de chloral fait également partie des sous-produits chlorés de désinfections présents dans l'eau potable et dans les eaux de piscine. Ils se produisent lors de la réaction du chlore avec les matières organiques naturelles.

L'hydrate de chloral est l'un des sous-produits chlorés de désinfections le plus représenté, après les acides haloacétiques, dans les eaux de piscines françaises et internationales (de l'ordre de 170 µg/L) (OMS, 2006 ; De Laat, 2009).

La synthèse de l'hydrate de chloral s'effectue par chloration de l'éthanol. Le chloral, qui en est la forme anhydre (No CAS 75-87-6) est utilisé comme intermédiaire dans la synthèse du DDT (dichlorodiphényltrichloroéthane), du méthoxychlore, du trichlorfon, du dichlorvos et de l'acide trichloracétique.

L'OMS a fixé la concentration de l'hydrate de chloral à 10µg/L pour l'eau de boisson en 1994.

3.1.2 Propriétés chimiques

L'hydrate de chloral est une substance peu volatile et soluble dans l'eau (Santé Canada, 2008).

Tableau 2 : Propriétés physicochimiques de l'hydrate de chloral

Formule	$\text{CCl}_3\text{-CH(OH)}_2$
Numéro CAS	CAS 302-17-0
Poids moléculaire	165,4
Point d'ébullition (°C)	96
Point de fusion (°C)	57
Masse volumique (g.cm^{-3})	1,91
Pression de vapeur (kPa)	2
Solubilité dans l'eau (g.L^{-1})	$9,3.10^3$

3.2 Plausibilité d'exposition humaine

La substance peut être absorbée par l'organisme par inhalation de ses aérosols et par ingestion. Cependant, compte tenu de ces propriétés physico-chimiques :

- volatilité ;

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

- forte solubilité. L'hydrate de chloral est majoritairement retrouvé dans les eaux.

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

L'hydrate de chloral est un métabolite du trichloroéthylène et du tétrachloroéthylène, la population se trouve exposée à l'hydrate de chloral si elle l'est à ces deux composés.

3.3 Toxicocinétique

L'hydrate de chloral administré par voie orale est rapidement absorbé. Il est largement distribué dans le corps et se retrouve au niveau des érythrocytes, du foie et d'autres tissus. Ses principaux métabolites sont le trichloroéthanol et son glucuronide (l'acide urochloralique) ainsi que l'acide trichloroacétique. Chez l'Homme, la demi-vie du trichloroéthanol et de son glucuronide est d'environ 8 h ; celle de l'acide trichloroacétique est d'environ 4 jours. La principale voie d'excrétion des métabolites de l'hydrate de chloral est la voie urinaire. Une fraction d'hydrate de chloral est excrétée dans la bile. On peut le retrouver, accompagné de ses métabolites, dans le lait de femmes allaitant traitées par cette substance.

3.4 Effets sanitaires

Bien que ce produit soit utilisé depuis longtemps en médecine, aucune étude de toxicité chronique n'a été publiée sur l'exposition humaine à l'hydrate de chloral.

Seuls les articles ou rapports d'études permettant la compréhension du choix de l'effet critique et/ou de l'élaboration d'une VTR seront présentés dans ce chapitre.

3.4.1 Etude de toxicité répétée

L'étude de Daniel *et al.* (1992b) chez le rat Sprague-dawley (10 mâles et 10 femelles) est une étude sub-chronique de 90 jours où plusieurs doses (0, 300, 600, 1200 et 2400 mg/L) sont testées dans l'eau de boisson. Cette étude montre des effets hépatotoxiques (foyer de nécrose uniquement chez les mâles et une augmentation sérique des enzymes hépatiques).

En ce qui concerne les marqueurs enzymatiques de l'atteinte hépatique, les variations observées demeurent faibles et sans relation dose-réponse claire. Elles sont Les nécroses rapportées chez les mâles ne montrent pas une augmentation dose-dépendante. A l'exception, des femelles de la forte dose, les foies des animaux des doses intermédiaires n'ont pas été examinés.

Tableau 3 : Incidence des nécroses hépatiques chez les mâles

Paramètres retenus	Doses (mg/kg p.c./j)				
	0	24	48	96	168
Incidence des nécroses hépatocellulaires	0/10	1/10	0/10	2/10	2/10

Les nécroses observées chez les deux animaux de la forte dose sont plus prononcées.

Les mâles semblent plus sensibles que les femelles. Les auteurs proposent un NOAEL de 600 mg/L, soit 96 mg/kg p.c./j, malgré une baisse significative de l'alanine aminotransférase (ALAT) à la dose de 300 mg/L chez les femelles. Des variations similaires significatives à cette dose ont été aussi rapportées pour l'aspartate aminotransférase (ASAT) et la lactate déshydrogénase (LDH).

3.4.2 Génotoxicité et cancérogénèse

3.4.2.1 Etudes de génotoxicité

Santé Canada, l'US EPA ainsi que le NTP concluent que les résultats des tests de génotoxicité de l'hydrate de chloral sont équivoques. En effet, ces résultats indiquent que l'hydrate de chloral est faiblement mutagène et clastogène (NTP, 2002a).

Etudes *in vitro* :

Des résultats positifs ont été obtenus dans des essais de mutation génique sur *Salmonella typhimurium* (TA98, TA100, TA104 and TA1538).

L'hydrate de chloral induit des mutations géniques au niveau des gènes *TK* (thymidine kinase) et *HPRT* (hypoxanthine(guanine)phosphoribosyl transférase) mais n'induit pas de cassures de l'ADN dans des cellules lymphoblastiques humaines (*CIRC*, 2004).

Des résultats positifs ont également été obtenus dans un essai d'échanges de chromatides sœurs (NTP, 2002a), dans deux essais d'aberrations chromosomiques et plusieurs essais de micronoyaux et d'aneuploïdie sur des cellules d'ovaires ou d'embryon d'hamster chinois (CHO et CHED).

Dans des essais sur des cellules de hamster chinois, tous les micronoyaux sont marqués par les anticorps antikinétochore (CREST test) dirigés contre les centromères, ce qui laisse supposer que ces micronoyaux contiennent des chromosomes entiers et non des fragments. L'aneuploïdie et la polyploïdie sont aussi induites dans les lymphocytes humains exposés à l'hydrate de chloral (NTP, 2002a, *CIRC*, 2004).

Etudes *in vivo* :

Dans plusieurs études sur des souris traitées par l'hydrate de chloral, des micronoyaux sont induits dans des érythrocytes de la moelle osseuse et dans des spermatozoïdes. Dans une des études sur la moelle osseuse, l'utilisation des anticorps antikinétochore a révélé que les micronoyaux induits contiennent aussi bien des chromosomes entiers que des fragments. Cependant, une étude sur

les spermatides a montré une augmentation du nombre de micronoyaux antikinétochore négatif. Etant donné qu'un autre aneugène connu, la vincristine sulfate a donné un résultat identique, les auteurs ont conclu que ce ne serait pas l'expression de la présence de fragments mais plutôt l'effet sur les protéines et la structure des kinétochores qui ne sont pas reconnus par les anticorps. Par ailleurs, l'hydrate de chloral n'induit pas d'aberrations chromosomiques dans la moelle osseuse chez la souris et le rat. La fréquence des aberrations chromosomiques n'est pas augmentée dans les spermatogonies, les spermatocytes primaires et secondaires et les ovocytes de souris traitées à l'hydrate de chloral *in vivo*. Ces résultats négatifs ont été obtenus dans 3 différentes études. Une seule étude a montré des aberrations chromosomiques dans des spermatocytes secondaires de souris. Par ailleurs, l'hydrate de chloral induit de l'aneuploïdie et de l'hyperploïdie dans la moelle osseuse de souris. L'aneuploïdie est aussi observée dans les spermatocytes secondaires (dans trois études sur 4) mais elle n'est pas observée dans les ovocytes.

Une étude a montré que l'hydrate de chloral induit des cassures de l'ADN simple brin dans des cellules hépatiques de rats et de souris traités *in vivo* mais une autre étude similaire ultérieure faite uniquement sur des souris a donné des résultats négatifs pour ce même test (US EPA, 2000 ; NTP, 2002b ; voir tableau de génotoxicité dans la monographie du CIRC, 2004).

L'hydrate de chloral semble être un agent aneugène et faiblement mutagène. L'aneuploïdie serait due à une action antiméiotique. Des concentrations élevées sont nécessaires pour que ces effets soient observables.

Les études de Ni *et al.* (1994, 1995, 1996), ainsi que celle de Beland *et al.* (1998), ont montré que le métabolisme (*in vitro* comme *in vivo*) de l'hydrate de chloral produit des radicaux libres intermédiaires responsables de la peroxydation lipidique qui conduit à la formation de malondialdéhyde (MDA), de formaldéhyde et d'acétaldéhyde. Ces trois produits sont cancérigènes. Le MDA peut former des adduits à l'ADN et il est mutagène (Basu *et al.*, 1988, Feron *et al.*, 1991; Benamira *et al.*, 1995). En effet, quand l'hydrate de chloral est incubé avec de l'ADN de thymus de veau en présence de microsomes de foie de souris, des adduits dérivés du malondialdéhyde se forment (Ni *et al.*, 1995) mais l'hydrate de chloral (radioactif) (en absence de microsome) ne se lie pas à l'ADN de foie (Keller & Heck, 1988). De surcroît une étude a montré que le taux des adduits à l'ADN dérivés du malondialdéhyde et celui du 8-oxo-2'-deoxyguanosine est augmenté dans l'ADN de foie de souris traitées à l'hydrate de chloral *in vivo* (Von Tungeln *et al.*, 2002).

3.4.2.2 Conclusion sur la génotoxicité

Au vu des résultats des études de génotoxicité, le groupe de travail a considéré l'hydrate de chloral comme une substance génotoxique indirecte.

3.4.2.3 Etudes de cancérogénèse

Le CIRC a classé, en 2004, l'hydrate de chloral en groupe 3 comme « inclassable quant à sa cancérogénicité pour l'Homme » (CIRC, 2004).

Etude de Leuschner et Beuscher (1998)

Cinq groupes de 50 rats mâles et 50 rats femelles Sprague-Dawley ont été traités via l'eau de boisson aux doses correspondantes à 0, 15, 45, et 135 mg/kg p.c./j sur 7j/semaine (pendant 124 semaines pour les mâles et 128 semaines pour les femelles). Les auteurs décrivent une hypertrophie hépatocellulaire à la dose la plus forte (135 mg/kg p.c./j) chez les mâles comparés au groupe témoin, mais la différence est non significative. Cette étude ne donne pas d'indications d'un potentiel cancérogène de l'hydrate de chloral chez le rat.

Etude de George *et al.*, 2000

Il s'agit d'une étude de cancérogenèse sur 2 ans menée selon les lignes directrices de l'US EPA. Les espèces utilisées sont le rat mâle F344/N et la souris mâle B6C3F1. Les animaux ont été exposés via l'eau de boisson à des doses de 0 ; 7,4 ; 37,4 ; 162 mg/kg p.c./j pour les rats, et 0 ; 13,5 ; 65 ; 146 mg/kg p.c./j pour les souris. Le nombre d'animaux était de 78 rats et 72 souris par dose.

Une augmentation d'incidence de cancer hépatique est observée chez les souris mâles et non chez les rats mâles. Cependant, l'incidence d'adénomes et de tumeurs spontanées est anormalement élevée chez les témoins :

- le nombre de carcinomes hépatocellulaires était plus élevé chez les souris exposées à la plus forte dose (84,4 %) que dans le groupe témoin (54,8 %),
- le nombre d'adénomes hépatiques a augmenté significativement dans tous les groupes exposés à l'hydrate de chloral (43,5 %, 51,3 % et de 50,0 % respectivement pour les souris exposées aux doses 13,5; 65, 146 mg/kg p.c./j) par rapport aux témoins (21,4 %).

La formation des tumeurs hépatiques chez la souris mâle peut s'expliquer par la formation d'adduits à l'ADN tels que le dérivé MDA-DNA et le 8-oxodG² résultant des radicaux libres libérés au cours du métabolisme de l'hydrate de chloral par le cytochrome CYP 2E1 et d'un stress oxydatif associé à une cytotoxicité et/ou une nécrose conduisant à une hyperplasie compensatoire.

Ce mécanisme peut-être corroboré par celui d'un autre composé chloré, le tétrachlorure de carbone (CCl₄). Le CCl₄ induit également une peroxydation lipidique endogène par l'intermédiaire des radicaux libres et produit une hépatotoxicité et des tumeurs hépatiques chez la souris (Albano *et al.*, 1982; Slater *et al.*, 1984), similaires à celles observées avec l'hydrate de chloral (Rijhsinghani *et al.*, 1986). Cependant, un mécanisme impliquant une cytotoxicité (par nécrose) conduisant à une hyperplasie compensatoire peut aussi jouer un rôle dans la promotion des tumeurs hépatiques.

Etudes du NTP (2002)

Les deux études du National Toxicology Program (NTP, 2002a et 2002b), réalisées chez les souris B6C3F1 mâles et femelles, ne fournissent que de faibles preuves de la cancérogénicité de l'hydrate de chloral.

Dans la première étude (NTP, 2002a, Leakey *et al.* 2003), des souris B6C3F1 mâles ont reçu de l'hydrate de chloral à des doses de 0, 17,9, 35,7 et 71,4 mg/kg p.c./j administrées par gavage ou *ad libitum per os* en solution dans l'eau de boisson. Des adénomes et des carcinomes hépatocellulaires sont observés pour les deux types de traitement, surtout pour le traitement *ad libitum*. Il faut noter que la prise de poids et la masse hépatique sont supérieures dans l'essai *ad libitum*. La quantité de nourriture influencerait le taux d'adénomes et de carcinomes hépatocellulaires. Les auteurs ont décrit les effets suivants :

- une légère diminution du poids du cœur et du poids des reins aux doses de 35,7 et 71,4 mg/kg p.c./j,
- les pourcentages d'adénomes et de carcinomes hépatocellulaires pour le groupe nourri *ad libitum* sont de 33 %, 52 %, 48 % et 46 %, respectivement, aux doses de 0, 17,9, 35,7 et 71,4 mg/kg p.c./j
- les pourcentages d'adénomes et de carcinomes hépatocellulaires pour le groupe par gavage sont de 23 %, 23 %, 29 % et 38 %, respectivement, aux doses de 0, 17,9, 35,7 et 71,4 mg/kg p.c./j.

² Il s'agit d'adduits à l'ADN, dérivés du malondialdéhyde et du 8-oxodG (qui est souvent utilisé comme biomarqueur du stress oxydatif et de l'effet des radicaux libres sur l'ADN). Mais ils ne sont pas spécifiques à l'hydrate de chloral. Ils sont le résultat de l'effet indirect de l'hydrate de chloral sur l'ADN par l'intermédiaire des radicaux libres et des produits de la peroxydation lipidique. Ce qui laisse supposer que l'hydrate de chloral est génotoxique indirect et il devrait être considéré comme un composé "à effet de seuil" si l'effet cancer devait être retenu.

A noter que l'incidence des adénomes et des carcinomes hépatocellulaires était de 42 % pour les témoins historiques.

Les auteurs n'ont pas trouvé d'autres lésions (néoplasiques ou non) sur d'autres organes en dehors du foie.

Dans une seconde étude (NTP, 2002b), des souris B6C3F1 femelles ont reçu de l'hydrate de chloral administré par voie orale de la manière suivante :

- 1^{er} traitement : 0, 25, 50, 100 mg/kg p.c./j, 5 jours /semaine sur 104 semaines, chez 48 femelles,
- 2^{ème} traitement : lot 1 (0 mg/kg p.c./j) et 3 lots de 48 femelles (100 mg/kg p.c./j), 5 jours/semaine, sacrifiés à 6, 12 et 24 mois,
- 3^{ème} traitement : 48 souris femelles ont reçu une dose unique de 0, 10, 25 ou 50 mg/kg p.c./j (âgés en début d'étude de 28 jours) puis ont été sacrifiées à la fin de l'étude, soit à 104 semaines,
- 4^{ème} traitement et 5^{ème} traitement : 48 femelles et 48 mâles (âgés de 15 jours) ont reçu une dose unique de 0, 10, 25 ou 50 mg/kg p.c. puis ont été sacrifiée à la fin de l'étude, soit à 104 semaines.

Les auteurs notent une augmentation significative des lymphomes malins à la plus forte dose (19 %, 15 %, 17 % et 31 %, respectivement, aux doses de 0, 25, 50, 100 mg/kg p.c./j). Les résultats montrent également une augmentation des adénomes du lobe antérieur de l'hypophyse à la plus forte dose chez des souris femelles traitées au plus 24 mois. Les auteurs ont conclu, à partir des augmentations de l'incidence d'adénomes du lobe antérieur de l'hypophyse, que les preuves de l'activité cancérigène de l'hydrate de chloral chez des souris femelles exposées quotidiennement pendant 2 ans étaient équivoques. Dans les autres types de traitements, les auteurs n'ont pas observé d'augmentation de l'incidence de tumeurs du lobe antérieur de l'hypophyse chez des souris B6C3F1 ayant reçu une seule dose d'hydrate de chloral à l'âge de 15 ou de 28 jours.

Dans les deux cas (adénome et hyperplasie de l'hypophyse), on ne peut déduire de relation dose réponse. Ce type d'adénome n'a pas été observé dans d'autres études. D'autre part, l'analyse des témoins historiques dans d'autres études, a révélé que l'incidence d'adénomes et de carcinomes du lobe antérieur de l'hypophyse était de 14,8 % pour les témoins historiques (Haseman *et al.*, 1998), ce qui est plus élevé que l'incidence de 12 % observée à la plus forte dose dans les deux premiers groupes testés.

Les auteurs ne retrouvent aucune lésion hépatique dans cette étude.

3.4.2.4 Conclusion sur le mode d'action cancérigène

La formation des tumeurs hépatiques chez la souris mâle peut s'expliquer par un mécanisme impliquant la formation de radicaux libres au cours du métabolisme de l'hydrate de chloral par le CYP2E1. Selon la méthode de construction de VTR pour les substances cancérigènes (Afsset, 2009), au vu des résultats de génotoxicité et de cancérogénicité, le groupe de travail propose une construction de **VTR à seuil de dose**.

3.4.3 Effets reprotoxiques

- **Chez l'Homme**

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

- **Chez l'animal**

Les études chroniques et sub-chroniques effectuées sur des rongeurs décrivent précédemment n'ont pas mis en évidence d'effets histopathologiques au niveau de l'appareil reproducteur.

Etude sur la fertilité

Klinefelter *et al.* (1995) ont évalué les effets de l'hydrate de chloral sur la morphologie et la motilité des spermatozoïdes chez des rats F344 mâles. Les concentrations administrées étaient de 0, 55 et 188 mg/kg p.c./j dans l'eau pendant 52 semaines. Chez les rats exposés à 188 mg/kg p.c./j, une réduction significative de la motilité des spermatozoïdes a été observée (de 58 % par rapport à 68 % chez les rats témoins). Ainsi, un NOAEL de 55 mg/kg p.c./j, a pu être identifiée.

Etude sur le développement

Kallman *et al.* (1984) ont exposé des groupes de cinq souris CD-1 à 0, 21,3 et 204,8 mg/kg p.c./j, d'hydrate de chloral dans l'eau. Les mâles et femelles ont été exposés pendant 3 semaines avant l'accouplement, et les femelles durant toute la gestation et jusqu'au sevrage des petits à l'âge de 21 jours. Aucun effet sur la reproduction ni le développement n'a été signalé.

Johnson *et al.* (1998) ont exposé 20 rates Sprague-Dawley à 151 mg/kg p.c./j d'hydrate de chloral dans l'eau du 1^{er} au 22^{ème} jour de gestation. Ils n'ont pas observé de toxicité maternelle, aucun effet sur la reproduction ni le développement n'a pu être associé à l'exposition à l'hydrate de chloral.

Smith *et al.* ont étudié l'un des principaux métabolites de l'hydrate de chloral, l'acide trichloroacétique (Smith *et al.*, 1989). Ils ont identifié des augmentations des malformations cardiaques chez le rat Long Evans. Cette étude a servi d'étude clé pour la construction d'une VTR reprotoxiques pour l'acide trichloroacétique de 300 µg/kg p.c./j (Anses, 2011).

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

4.1 Choix de l'effet critique

En ce qui concerne les effets sur le cancer, des études ont bien montré une augmentation de l'incidence des tumeurs hépatiques chez la souris mâle. Mais, d'une part ces tumeurs ne se retrouvent pas chez la souris femelle, ni chez le rats (quelque soit le sexe) et d'autre part, le principal métabolite de l'hydrate de chloral, l'acide trichloroacétique (TCA), est connu pour être un proliférateur de peroxysomes (Poon *et al.*, 2002). Compte tenu de ces données, l'effet cancer ne peut être retenu pour la construction de la VTR.

Plusieurs études sub-chroniques et chroniques (incluant les études de cancérogénèse) ont confirmé que le **foie** est le principal organe cible de la toxicité de l'hydrate de chloral.

4.2 Choix de l'étude

Dans l'étude George *et al.* (2000), les auteurs décrivent une toxicité hépatique en plus des adénomes et carcinomes hépatiques, à savoir la formation de lésions cellulaires prolifératives³ au niveau hépatique, ce qui conduirait à un LOAEL de 13,5 mg/kg p.c./j. Ces lésions qui peuvent apparaître bien avant les tumeurs au cours de l'hépatocarcinogénèse, correspondent à des îlots de cellules qui présentent **des déficiences** ou **des accroissements** de certaines activités enzymatiques détectées par histochimie.

L'étude sub-chronique de Sanders (1982), réalisée sur des souris Random bred CD-1 (mâles et femelles) exposés à deux doses, 0,07 et 0,7 mg/L/j dans l'eau de boisson durant 90 jours, montre également que le foie est l'organe cible. Les auteurs ont retenu un NOAEL de 0,07 mg/L/j, basé sur les effets hépatotoxiques (hépatomégalie) ainsi que sur des augmentations sériques des enzymes hépatiques.

L'étude sub-chronique de Poon *et al.* (2002), réalisée sur des rats Sprague-Dawley (mâles et femelles) exposés à 0,2, 2, 20 ou 200 ppm/j dans l'eau de boisson durant 13 semaines, montre également que le foie est l'organe cible. Les auteurs ont retenu un NOEL de 20 ppm soit 1,89 mg/kg p.c./j pour les rats mâles et 2,53 mg/kg p.c./j pour les femelles, basée sur une diminution de l'activité aldéhyde déshydrogénase ainsi qu'une augmentation de l'activité aniline hydroxylase.

L'étude de Daniel (1992a) (non détaillé dans ce rapport) a été réalisée sur des souris mâles pendant 104 semaines montre l'apparition de nécrose hépatocellulaire. Cependant, cette étude n'a utilisé qu'une seule dose d'hydrate de chloral dans l'eau de boisson à 1 g/L et ne peut servir à la construction de VTR.

³ Ces lésions sont appelées foyers pré néoplasiques (AFC) par George *et al.*, et peuvent également être rencontrées sous le terme nodules hyperplasiques.

L'étude de Leuschner et Beuschner (1998) a montré une augmentation de l'hypertrophie hépatocellulaire à la plus forte dose chez des rats Sprague-Dawley qui ont reçu des doses d'hydrate de chloral de 0, 15, 45 ou 135 mg/kg p.c./j dans l'eau durant 124 à 128 semaines.

Enfin, Daniel *et al.* (1992b) ont également montré que le foie était l'organe cible dans une étude sub-chronique dans laquelle les rats Sprague-Dawley ont été exposés à 300, 600, 1 200 ou 2 400 mg/L d'hydrate de chloral dans l'eau pendant 90 jours (équivalent à 24, 48, 96 et 168 mg/kg p.c./j pour les mâles). Les auteurs ont retenu un LOAEL de 168 mg/kg p.c./j et un NOAEL de 96 mg/kg p.c./j basé sur les effets hépatotoxiques (foyers de nécrose hépatocellulaire chez les mâles) ainsi que sur des augmentations sériques des enzymes hépatiques.

Parmi les diverses études de toxicologie publiées, les experts ont retenu l'étude de **George *et al.* (2000)** comme étude clé. Sa qualité a été jugée satisfaisante, l'effet étudié (toxicité hépatique) a été considéré comme pertinent pour évaluer la toxicité chronique de l'hydrate de chloral chez l'animal. La dose critique retenue est le LOAEL de 13,5 mg/kg p.c./j.

4.3 Ajustement allométrique

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

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

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

Le poids moyen de la souris a été déterminé d'après les données décrites dans l'étude. Il est égal $40,6 \pm 1,3$ g, celui de l'Homme est estimé à 70 kg. Les doses sont exprimées en mg/kg p.c./j.

Soit un $\text{LOAEL}_{\text{HED}} = 2,1$ mg/kg p.c. par jour

4.4 Choix des facteurs d'incertitude

4.4.1 Variabilité inter-espèces

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

$\text{UF}_A = 2,5$ (variabilité inter-espèce)

4.4.2 Variabilité intra-espèces

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

$\text{UF}_H = 10$ (variabilité intra-espèce ou interindividuelle)

4.4.3 Facteur d'incertitude pour l'application d'une LOAEL

Un facteur de sécurité supplémentaire a été introduit pour tenir compte de l'utilisation d'un LOAEL dans l'étude de George *et al.* (2000).

$$UF_L = 3$$

4.5 Calcul de la VTR

Effet critique	Dose critique*	UF	VTR
formation de lésions cellulaires prolifératives chez la souris George <i>et al.</i> , 2000	LOAEL = 13,5 mg/kg/j <u>Ajustement allométrique</u> LOAEL _{HED} = 2,1 mg/kg/j	75 UF _A 2,5 UF _H 10 UF _L 3	VTR = 28 µg/kg/j

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

5 Conclusion

La VTR chronique pour la voie orale pour les effets hépatotoxique de l'hydrate de chloral proposée à l'issue de l'expertise est :

Effet critique	Dose critique*	UF	VTR
formation de lésions cellulaires prolifératives chez la souris George <i>et al.</i> , 2000	LOAEL = 13,5 mg/kg p.c./j <u>Ajustement allométrique</u> LOAEL _{HED} = 2,1 mg/kg p.c./j	75 UF _A 2,5 UF _H 10 UF _L 3	VTR = 28 µg/kg p.c./j

*HED : Human Equivalent Dose ; elle a été calculée à partir de l'équation précédente ;

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

6 Bibliographie

Anses. 2011. Elaboration de VTRs par voie orale fondées sur les effets reprotoxiques pour l'acide dichloroacétique, l'acide trichloroacétique et l'acide dibromoacétique.

Albano, Loft K. A. K., Slater T. F., Stier A., Symons M. C. R., and Tomas A. (1982) Spin-trapping studies on the free radical products formed by metabolic activation of carbon tetrachloride in rat liver microsomal fractions, isolated hepatocytes and in vivo in the rat. *Biochem. J.* 204, 593-603 (1982).

Basu A. K., O'Hara S. M., Valladier P., Stone K., Mobs0., and Marnett L. J. (1988) Identification of adducts formed by reaction of guanine nucleosides with malondialdehyde and structurally related aldehydes. *Chem. Res. Toxicol.* 1, 53-59 (1988).

Benamira M., Johnson K., Chaudhary A., Bruner K., Tibbetts C., and Marnett L. J. (1995) Induction of mutations by replication malondialdehyde-modified M13 DNA in *Escherichia coli*: determination of the extent of DNA modification, genetic requirements for mutagenesis, and types of mutations induced. *Carcinogenesis* 16, 93-99 (1995).

Beland, F.A., Schmitt, T.C., Fullerton, N.F. et Young, J.F. (1998) Metabolism of chloral hydrate in mice and rats after single and multiple doses. *J. Toxicol. Environ. Health*, 54 : 209-226.

CIRC (2004) Monographie du CIRC, volume 84, 2004 (<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol71/index.php.5>)

Daniel, F.B., DeAngelo, A.B., Stober, J.A., Olson, G.R. et Page, N.P. (1992a) Hepatocarcinogenicity of chloral hydrate, 2-chloroacetaldehyde, and dichloroacetic acid in the male B6C3F1 mouse. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 19(2) :159-168.

Daniel F.B., Robinson M., Stober J.A., Page N.P. et Olson G.R. (1992b) Ninety-day toxicity study of chloral hydrate in the Sprague-Dawley rat. *Drug Chem. Toxicol.*, 15 : 217-232.

De Laat J., Berne F., Brunet R. et al. (2009). Sous-produits de chloration formés lors de la désinfection des eaux de piscines. Etude bibliographique. *Eur. J. Water Quality*; 40 (2) : 109-28.

Feron V. J., Til H. P., de Vrijer F., Woutersen R. A., Cassee F. R., and van Bladeren P. J. (1991) Aldehydes: occurrence, carcinogenic potential, mechanism of action and risk assessment. *Mutat. Res.* 259, 363-385 (1991).

George, M., Moore, T., Kilburn, S., Olson, G.R. et DeAngelo, A.B. (2000) Carcinogenicity of chloral hydrate administered in drinking water to the male F344/N rat and male B6C3F1 mouse. *Toxicol. Pathol.*, 28 : 610-618.

Harrington-Brock K, Doerr CL, Moore MM. (1998). Mutagenicity of three disinfection by-products: di- and trichloroacetic acid and chloral hydrate in L5178Y/TK+/- -3.7.2.C mouse lymphoma cells. *Mutat Res.* 1998 Mar 30;413(3):265-76.

Haseman, J.K., Hailey, J.R., and Morris, R.W. (1998). Spontaneous neoplasm incidences in Fischer 344 rats and B6C3F1 mice in two-year carcinogenicity studies: A National Toxicology Program update. *Toxicol. Pathol.* 26, 428-441.

Johnson P.D., Dawson B.V. et Goldberg S.J. (1998) Cardiac teratogenicity of trichloroethylene metabolites. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 32 : 540-545.

Kallman M.J., Kaempf G.L. et Balster R.L. (1984) Behavioral toxicity of chloral in mice: an approach to evaluation. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.*, 6 : 137-146.

- Keller D.A. & Heck H.d'A. (1988) Mechanistic studies on chloral toxicity: Relationship to trichloroethylene carcinogenesis. *Toxicol. Lett.*, **42**, 183–191
- Klinefelter G.R., Suarez J.D., Roberts N.L. et DeAngelo A.B. (1995) Preliminary screening for the potential of drinking water disinfection by-products to alter male reproduction. *Reprod. Toxicol.*, **9** : 571-578.
- Leakey J.E., Seng J.E., Latendresse J.R., Hussain N., Allen L.J., Allaben W.T. (2003) Dietary controlled carcinogenicity study of chloral hydrate in male B6C3F1 mice. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2003 193:266-80.
- Leuschner et Beuscher (1998) Studies on the Mutagenic and Carcinogenic Potential of Chloral Hydrat, *ArzneimForsch DrugRes.*
- Ni Y.C., Wong T.Y., Lloyd R.V., Heinze T.M., Shelton S., Casciano D., Kadlubar F.F., Fu P.P. (1996) Mouse liver microsomal metabolism of chloral hydrate, trichloroacetic acid, and trichloroethanol leading to induction of lipid peroxidation via a free radical mechanism. *Drug Metab Dispos.* 1996 24:81-90.
- Ni YC, Kadlubar FF, Fu PP. Formation of malondialdehyde-modified 2'-deoxyguanosinyl adduct from metabolism of chloral hydrate by mouse liver microsomes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995 216:1110-7.
- Ni YC, Wong TY, Kadlubar FF, Fu PP. Hepatic metabolism of chloral hydrate to free radical(s) and induction of lipid peroxidation. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994 204:937-43.
- NTP (National Toxicology Program) (2002a) Toxicology and carcinogenesis studies of chloral hydrate in B6C3F1 mice (gavage studies). NTP Technical Report Series 502, National Institutes of Health, Research Triangle Park, NC.197 p.
- NTP (National Toxicology Program) (2002b) Toxicology and carcinogenesis studies of chloral hydrate (ad libitum and dietary controlled) in male B6C3F1 mice (gavage study). NTP Technical Report Series 503, National Institutes of Health, Research Triangle Park, NC. 218 p.
- OMS. (2006b). Guidelines for safe recreational waters. Volume 2 - Swimming pools and similar recreational-water environments. Geneve: OMS. 118 p.
- Poon R, Nakai J, Yagminas A, Benoit F, Moir D, Chu I, Valli VE. (2002) Subchronic toxicity of chloral hydrate on rats: a drinking water study. *J Appl Toxicol.* 2002 Jul-Aug;22(4):227-36.
- Rijhsinghani K. S., Abrahams C., Swerdbow M. A., Rao K. V., and Ghose T. (1986) Induction of neoplastic lesions in the livers of C57B I X C3HF1 mice by chloral hydrate. *Cancer Detect. Prey.* **9**, 279-288 (1986).
- Santé Canada (2008) Document de conseils sur l'hydrate de chloral dans l'eau potable. Bureau de l'eau, de l'air et des changements climatiques, Direction générale de la santé environnementale et de la sécurité des consommateurs, Santé Canada, Ottawa (Ontario).
- Slater T. F. (1984) Free-radical mechanisms in tissue injury. *Biochem.* **1**. 222, 1-15 (1984).
- Smith MK, Randall JL, Read EJ, Stober JA. (1989) Teratogenic activity of trichloroacetic acid in the rat. *Teratology.* 1989 Nov;40(5):445-51.
- Von Tungeln L.S., Yi P., Bucci T.J., Samokyszyn V.M., Chou M.W., Kadlubar F.F. & Fu P.P. (2002) Tumorigenicity of chloral hydrate, trichloroacetic acid, trichloroethanol, malondialdehyde, 4-hydroxy-2-nonenal, crotonaldehyde, and acrolein in the B6C3F1 neonatal mouse. *Cancer Lett.*, **185**, 13–19
- US. EPA (Environmental Protection Agency des États-Unis) (2000) Toxicological review of chloral hydrate. In support of summary information on the Integrated Risk Information System (IRIS). EPA/635/R-00/006

ANNEXES

Annexe 1 : Grilles de lecture

Référence	Daniel <i>et al.</i> , 1992 –Drug and Chemical Toxicology
Type d'étude	But étude : Toxicité subchronique 90 J Effets biochimiques et toxicologiques de l'hydrate de chloral chez le rat mâle et femelle administré dans l'eau de boisson.
Respect BPL – lignes directrices	Guidelines set forth by the Canadian Council on Animal Care
Substances chimiques, pureté, composition	Pureté > 99%
Espèce / souche étudiée / âge - poids	Rats : Sprague Dawley
Conditions de vie	Cage individuelle, T°C = 20-22°C, humidité = 40 à 60 %, cycle lumineux : 12 h Nourriture spéciale et eau <i>ad libitum</i>
Sexe et nombre d'animaux par lot	50 rats mâles + 50 rats femelles Sprague-Dawley → 10 groupes (10 mâles et 10 femelles par groupe) pour la bioanalyse.
Groupe témoin et nombre	10 rats mâles et 10 rats femelles par groupe témoin pour les doses = eau + tampon phosphate
Voie d'exposition	Orale, eau de boisson
Pré-exposition éventuelle	
Fréquence et durée de l'exposition	90 j d'exposition via l'eau de boisson.
Doses ou concentrations d'expositions	0300 ; 600 ; 1200 et 2400 mg/l – 2400 mg/l → 168 mg/kg/day
Observations	Pas de diminution de poids des animaux, sauf male à la plus forte dose. Augmentation AST, ALT, LDH atteinte hépatique cytolysé chez rat male 1200 et 2400 mg/L Pas de différence chez la femelle. Male plus sensible que la femelle.
Tests statistiques utilisés	T test Kruskal-Wallis test
Effets observés – Biochimie	Augmentation de l'activité catalase rat male dès 2ppm. Diminution ALDH, augmentation anilide hydroxylase à 200 ppm : male et femelle
Effet critique pris en compte	Augmentation AST, ALT, LDH atteinte hépatique cytolysé chez rat mâle 1200 et 2400 mg/L
Couple NOAEL / LOAEL pour l'effet critique et incidence du LOAEL	NOAEL : 600 mg/l → 96 mg/kg/day
Qualité de l'étude (cotation Klisch)	

Référence	George <i>et al.</i> 2000. Carcinogenicity of chloral hydrate administered in drinking water to the male F344/N Rat and male B6C3F ₁ Mouse. Toxicol.Pathol.2000, <u>28</u> , 610-618
Type d'étude	Cancérogénèse sur 2 ans
Respect BPL/ Lignes directrice	Guidelines de l'AAALAC (US)
Qualité de la substance chimique étudiée	99 % de pureté
Espèce animale Souche Age/poids	male F344/N Rat / male B6C3F ₁ Mouse Rat sevré de 70 g / souris de 21 j. de 20 g
Conditions de vie	en cage
Nombre d'animaux/lot Essai Nombre de lots Essai /dose : 3 Lot Témoin : nb d'animaux Sexe	78 Rat et 72 souris par lot lots RaT : 7,4 - 37,4 - 162 mg/kg p.c. lots Souris : 13,5 - 65 - 146 mg/kg p.c. 78 rats et 72 souris Mâle
Voie d'administration (+ véhicule)	per os ad libitum (en sol. dans l'eau)
Durée d'administration	2 ans
Fréquence d'administration	quotidien
Examens pratiqués	Anapath/Histo Analyses enzymatiques sériques+prolifération hépatocytaire/ : (pas d'impact)
Résultats observés	Adénome Hépatique Carcinome Hépatique Souris: Témoin 21% Essai de 43 à 50 % Témoin 54% Essai de 54 à 84 % Rat : Témoin 0% Essai de 7 à 4,5 % Témoin 2,4% Essai de 7 à 2,3 %
Tests statistiques	Chi 2/ Fisher et Fisher-Irvin
Conclusions de l'étude	Cancérogène pour la Souris m. mais pas pour le Rat m.
NOAEL/LOAEL	absence
Avis de l'expert	Taux anormalement élevé d'adénomes et tumeurs dans le lot T Difficile à prendre en compte de ce fait

Référence	Leuscher et Beuscher (1998) Studies on the Mutagenic and Carcinogenic Potential of Chloral Hydrate, ArzneimForsch DrugRes
Type d'étude	Etude de cancérogénicité But de l'étude : déterminer la carcinogénicité et mutagénicité de l'hydrate de chloral
Respect BPL – lignes directrices	
Substances chimiques, pureté, composition	Hydrate de chloral
Espèce / souche étudiée / âge - poids	Rats Sprague-Dawley
Conditions de vie	
Sexe et nombre d'animaux par lot	540 rats mâles et femelles Sprague-Dawley, 60-79, âge entre 25 et 19 jours.
Groupe témoin et nombre	5 groupes randomisés de 50 mâles et 50 femelles en cage individuelle
Voie d'exposition	
Pré-exposition éventuelle	
Fréquence et durée de l'exposition	L'eau de boisson administration est contrôlée (15, 45, et 135 mg/kg de poids en masse/jour sur 7 j/semaine et sur toute la vie du rat 124 semaines pour les mâles et 128 semaines pour les femelles). Le groupe contrôle n'a pas reçu que de l'eau.
Doses ou concentrations d'expositions	
Observations	Analyse morbidité et mortalité, poids individuels. Analyse sanguine (érythrocytes et leucocytes) puis autopsie. Etude sur la mutagénicité : 5 tests (test Ames, HPRT, micronoyaux et aberrations chromosomiques dans moelle osseuse, UDS test in vivo et in vitro).
Tests statistiques utilisés	
Effets observés – Biochimie	Survie : Il n'y a pas de différence avec groupe témoin même à la plus forte dose. Idem pas de différence selon genre. Poids : Il n'y a pas de différence avec groupe témoin même à la plus forte dose. Idem pas de différence selon genre. Histopathologie : Pas de différence significative ($p \leq 0,01$) sur l'incidence d'une hypertrophie hépatocellulaire à la dose la plus forte (135 mg/kg) et chez les mâles comparés au groupe témoin. Mutagénicité : pas de propriétés mutagènes signalées mais les résultats sont non fournis.
Effet critique pris en compte	
Couple NOAEL / LOAEL pour l'effet critique et incidence du LOAEL	
Qualité de l'étude (cotation Klisch)	
Avis de l'expert	Pas d'indication d'un potentiel carcinogénétique ni mutagénique de l'hydrate de chloral chez le rat.

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

Cette partie présente une synthèse des liens déclarés par les experts, dans le domaine sur lequel se porte la saisine, et précise d'une part comment ces liens ont été analysés et d'autre part la manière dont ils ont été gérés, eu égard à un risque potentiel de conflit d'intérêts.

Les déclarations publiques d'intérêts sont mises à jour par les experts à chaque changement de situation.

Au cours des expertises, les liens d'intérêts sont réexaminés au vu de l'ordre du jour.

RAPPEL DES RUBRIQUES DE LA DÉCLARATION PUBLIQUE D'INTÉRÊTS

IP-A	Interventions ponctuelles : autres
IP-AC	Interventions ponctuelles : activités de conseil
IP-CC	Interventions ponctuelles : conférences, colloques, actions de formation
IP-RE	Interventions ponctuelles : rapports d'expertise
IP-SC	Interventions ponctuelles : travaux scientifiques, essais, etc.
LD	Liens durables ou permanents (Contrat de travail, rémunération régulière ...)
PF	Participation financière dans le capital d'une entreprise
SR	Autres liens sans rémunération ponctuelle (Parents salariés dans des entreprises visées précédemment)
SR-A	Autres liens sans rémunération ponctuelle (Participation à conseils d'administration, scientifiques d'une firme, société ou organisme professionnel)
VB	Activités donnant lieu à un versement au budget d'un organisme

SYNTHÈSE DES LIENS DES MEMBRES DU CES, MENTIONNÉS DANS LA DÉCLARATION PUBLIC D'INTÉRÊT, EN RAPPORT AVEC LA THÉMATIQUE DE LA SAISINE

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

BELZUNCES	Luc LD Université d'Avignon : Enseignements (depuis 1998) (Vacations) Université d'Angers : Enseignements (depuis 2004) (Vacations)	28 janvier 2011
------------------	--	-----------------

Université Aix-Marseille 3 : Enseignements (depuis 2000) (Vacations)

Centre Agronomique de Chania, Crête : Enseignements (01/11/2005 au 10/11/2010) (Salaire)

IP

ADAPi (Association pour le Développement de l'Apiculture Provençale) : Conférences (2000-2006) (Rémunération personnelle)

UNAF (Union nationale de l'apiculture française) : Conférences (2000-2006) (Rémunération personnelle) et consultance (2011) (Rémunération ponctuelle personnelle)

ADARA : Conférences (2000-2006) (Rémunération personnelle)

GIE Apiculture Pays de Loire : Formation toxicologie abeille (02/02/2011) (Rémunération personnelle)

Organisations apicoles : Conférences régulières (Permanent) (Rémunération personnelle)

VB

Bayer : Effets de l'imidaclopride chez l'abeille donnant lieu à versement à l'INRA (50 % du budget du laboratoire où l'expert est Directeur de recherche) (contrat clos en 2001)

Aventis-BASF : Action des sécrétions de tournesol chez l'abeille donnant lieu à versement à l'INRA (50 % du budget du laboratoire) (2002)

Aventis : Mode d'action de l'acétamipride donnant lieu à versement à l'INRA (50 % du budget du laboratoire) (2001-2003)

SR

BASF : enfant stagiaire (2007)

Analyse Anses : Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la thématique de la saisine

BONVALLOT Nathalie

25 janvier 2011

LD

EHESP : CDD (oct. 2008-oct. 2011)

Démission en mars 2011

IP

PBE + (performance Bretagne environnement), association d'entreprises bretonnes de tous secteurs : Journées PBE +, Toxicologie (avril 2008) (Aucune rémunération)

EDF GDF : Formation EQRS (juin chaque année) (Aucune rémunération)

SR

OBERTHUR : Conjoint responsable Hygiène, sécurité et environnement

Analyse Anses : Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la

thématique de la saisine		
BOURGEOIS	Damien <i>IF</i> Rhodia : Plan d'épargne en entreprise, quelques actions <i>SR</i> Maintenance Service Environnement : Conjoint ingénieur (depuis 01/12/2010) Analyse Anses : Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la thématique de la saisine	24 janvier 2011
CASSIER-CHAUVAT	Corinne <i>LD</i> CNRS CEA : chercheur CNRS dans unité mixte CEA CNRS (depuis 1983) <i>SR</i> CEA : Conjoint Chercheur Chef de laboratoire (depuis 1985) Analyse Anses : Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la thématique de la saisine	01 février 2011
EMPEREUR-BISSONNET	Pascal <i>SR</i> Institut de recherche international SERVIER : Épouse Directeur Support Opérationnel (1990-2011) Analyse Anses : Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la thématique de la saisine	26 janvier 2011
ENRIQUEZ	Brigitte Aucun lien déclaré Analyse Anses : Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la thématique de la saisine	02 février 2011
GUENOT	Dominique <i>IP</i> 2ème édition de la manifestation « A votre santé ! » Le Mois de la santé et de la recherche médicale en Alsace : Intervention/débat suite à projection de film (1 journée en mars 2010) (Aucune rémunération) Analyse Anses : Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la thématique de la saisine	02 février 2011
GUERBET	Michel <i>IP</i> AFSSAPS : expert au sein du groupe préclinique (2006-2012) et au sein de la commission d'AMM des médicaments (2010-2013) (Aucune rémunération) Analyse Anses : Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la thématique de la saisine	02 février 2011
HUYNH	Cong Khanh Aucun lien déclaré	28 janvier 2011

Analyse Anses : Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la thématique de la saisine		
KRISHNAN	Kannan <i>IP</i> Regulatory checkbook : Invited speaker and panelist, Naphthalene: State of the Science Symposium and Workshop (3 jours en 2006) (Vacation, frais de déplacement) <i>VB</i> ExxonMobil conjointement avec le conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada : Subvention de recherche pour « An integrated fugacity-pharmacokinetic model » donnant lieu à versement à l'Université de Montréal, Trent University et Université du Québec à Montréal (< 10 % du budget) (2007-2010)	02 mars 2011
Analyse Anses : Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la thématique de la saisine		
LAFON	Dominique <i>LD</i> Archives des maladies professionnelles : droits d'auteur (depuis 1995) Dassault Falcon service : Médecin du travail en CDI (depuis 1995) <i>IP</i> AFSSA : CES MCDA (2000-2006) (Vacations) AFSSAPS : Commission cosmétologie (2010)	25 janvier 2011
Analyse Anses : Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la thématique de la saisine		
LAGADIC- GOSSMANN	Dominique Aucun lien déclaré	30 janvier 2011
Analyse Anses : Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la thématique de la saisine		
LAUDET	Annie Aucun lien déclaré	17 mars 2011
Analyse Anses : Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la thématique de la saisine		
MÉNÉTRIER	Florence <i>IP</i> ANR : Appel à projets Santé-environnement/santé- travail (juin 2006-août 2006) (Aucune rémunération)	26 janvier 2011
Analyse Anses : Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la thématique de la saisine		
PRAT	Odette Aucun lien déclaré	30 janvier 2011
Analyse Anses : Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la		

thématique de la saisine		
SCHROEDER	Henri IF Air France, Rexel, BNP : actions Fonds de placement LCL Protection : Produits financiers VB Industries agro-alimentaires : Contrat sur aliments fonctionnels donnant lieu à versement à l'université Henri Poincaré (50 % du laboratoire où l'expert est Enseignant-chercheur, responsable des études réalisées) (2001-2006) ANSES : Veille bibliographique (auteur des notes de veille) donnant lieu à versement à l'université Henri Poincaré (15 % du budget du laboratoire) (2009-2011) Analyse Anses :	28 janvier 2011
Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la thématique de la saisine		
SECRETAN-LAUBY	Béatrice LD CIRC : Salariée (depuis 2001) IP Encyclopedia of Cancer (Springer Verlag) : Article sur "UV radiation (déc. 2007 à fév. 2008) (Aucune rémunération) AFTIM (Association française des techniciens et ingénieurs de sécurité et des médecins du travail) : Journée AFTIM-ADHYS, Paris (2004) (Aucune rémunération) ADHYS (Association pour le développement de l'hygiène et de la sécurité dans les établissements de recherche ou d'enseignement supérieur) : 22ème journées de l'ADHYS (2005) (Aucune rémunération) BTP : 28èmes journées Nationales du BTP (2005) (Aucune rémunération) DRASS : Journée d'échange de pratiques professionnelles sur les CMR (2005) (Aucune rémunération) TSR (Télévision Suisse romande) : Emission "A bon entendeur" sur le benzène dans les boissons de table (2006) (Aucune rémunération) AFSSET : Substitution: un enjeu pour les CMR (2007) (Aucune rémunération) Université de Grenoble : Journée FMC Quoi de neuf en Cancérologie (2008) (Aucune rémunération) Université Claude Bernard Lyon 1er : Journée de formation de la Société de SMST Lyon: Les cancers professionnels (2010) (Aucune rémunération) Université de Grenoble : Enseignement (1 journée en 2006, 2007, 2010) (Aucune rémunération)	03 février 2011

Analyse Anses : Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la thématique de la saisine		
TISSOT	Sylvie	27 janvier 2011
	Aucun lien déclaré	Démission en janvier 2011
Analyse Anses : Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la thématique de la saisine		

SYNTHÈSE DES LIENS DES MEMBRES DU GT, MENTIONNÉS DANS LA DÉCLARATION PUBLIC D'INTÉRÊT, EN RAPPORT AVEC LA THÉMATIQUE DE LA SAISINE

NOM	Prénom <i>Rubrique de la DPI</i> Description de l'intérêt	Date de déclaration des intérêts
Analyse Afsset :		
BOIZE	Magali	17 avril 2008 17 juillet 2008
	LD Pharmacien évaluateur de risques sanitaires au sein d'EDF-SEM (Service des études médicales)	25 novembre 2008 26 février 2009
Analyse Afsset :	Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la thématique de la saisine	Démission en mars 2011
CHAKROUN	Radhouane	28 mai 2008
	Aucun lien déclaré	
Analyse Afsset :	/	
CHEVALIER	Dany	11 avril 2008 05 novembre 2008
	Aucun lien déclaré	21 novembre 2008 29 janvier 2009
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	
Analyse Afsset :	Chef du Service de Toxicologie de Cephalon France Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la thématique de la saisine	
KAIRO Cécile		03 mai 2008
	LD	
Analyse Afsset :	Évaluateur de risques sanitaires au sein d'ICF Environnement jusqu'en 2004 Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la thématique de la saisine	
LA ROCCA Bénédicte		14 avril 2008
	LD	Démission en mars 2011
Analyse Afsset :	Ingénieur toxicologue à l'INERIS (jusqu'en juillet 2010) Aucun lien déclaré	
LAFON Dominique	(membre du CES « Évaluation des risques liés aux substances chimiques »)	14 avril 2008
	LD	
Analyse Afsset :	Médecin du travail pour Dassault Falcon Service Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la thématique de la saisine	
MAXIMILIEN Rémi		14 avril 2008
Analyse Afsset :	Aucun lien déclaré	22 septembre 2008
	/	
MEEK Bette		14 mai 2008
Analyse Afsset :	Aucun lien déclaré /	
MULLOT Jean-Ulrich		05 avril 2008
Analyse Afsset :	Aucun lien déclaré	07 janvier 2009
	/	
OULD-ELHKIM Mostafa		26 mai 2008
Analyse Afsset :	Aucun lien déclaré	26 septembre 2008
	/	
ROUDOT Alain-Claude	(membre du CES « Évaluation des risques liés aux substances chimiques »)	26 mars 2008
Analyse Afsset :	Aucun lien déclaré /	
TISSOT Sylvie		05 mai 2008

LD	Démission en mars 2011
Responsable de l'unité expertise collective des substances chimiques à l'INERIS	
Analyse Afsset : Aucun lien déclaré	
VIAN Laurence	14 avril 2008
Aucun lien déclaré	Démission avril en 2010
Analyse Afsset : /	

Notes



Agence nationale de sécurité sanitaire
de l'alimentation, de l'environnement et du travail
27-31 avenue du général Leclerc
94701 Maisons-Alfort Cedex
www.anses.fr