

UNIVERSITE PARIS-SUD XI

UFR DE PHARMACIE

M E M O I R E

présenté par

Emel Belkebir

pour l'obtention du

**MASTER:
Médicaments et autres produits de santé**

Parcours professionnel

**« TOXICOLOGIE ET VIGILANCE
DES PRODUITS DESTINES À L'HOMME »**

Problématique de la prise en compte systématique des ajustements temporels dans la construction des valeurs toxicologiques de référence (VTR).

—

Responsables du Diplôme : M. le Professeur PALLARDY

Directeur de Stage : Mme le Docteur BONVALLOT

Lieu de Stage : Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail

—

ANNEE 2007 - 2008

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier Monsieur Henri Poinsignon, directeur général par intérim de l'afssset, Monsieur Gérard Lasfargues, chef du département expertises en santé environnement travail (DESET) et Monsieur Jean-Nicolas Ormsby, adjoint chef du département DESET, pour m'avoir accueillie au sein de l'unité toxicologie du département DESET de l'afssset et pour m'avoir permis de réaliser un stage riche en apprentissage.

Plus particulièrement, je remercie Nathalie Bonvallot, pour le temps qu'elle m'a consacrée au cours de ces 6 mois, pour ses précieux conseils, sa confiance, son investissement et ses enseignements en tant que maître de stage, et de m'avoir donnée l'opportunité d'évoluer au cours de ce stage à côté de personnes compétentes, pédagogues et humaines.

Je remercie tous les membres de l'unité toxicologie pour leur sympathie, leur soutien et la qualité de l'encadrement apporté au cours de mon stage, en particulier Monsieur Laurent Bodin et Monsieur Christophe Rousselle, chef d'unité, avec qui j'ai été ravie de partager un bureau.

Je remercie toutes les personnes des autres départements et services, et plus particulièrement Monsieur Cédric Duboudin, pour les conseils et les réponses qu'ils m'ont apportés, mais également pour leur disponibilité et leur sympathie.

Enfin, je remercie M. le professeur Pallardy, responsable auprès de la Faculté de pharmacie de Châtenay-Malabry du Master 2 de toxicologie et de vigilance des produits destinés à l'homme.

TABLE DES MATIERES

| | |
|---|-----------|
| LISTE DES ABREVIATIONS | 4 |
| 1. INTRODUCTION ET OBJECTIF..... | 6 |
| 1.1. L'AFSSET | 6 |
| 1.2. LA DEMARCHE D'EVALUATION QUANTITATIVE DES RISQUES SANITAIRES | 6 |
| 1.3. PROBLEMATIQUE, OBJECTIF ET CONTOUR DE L'ETUDE | 7 |
| 2. MATERIEL | 8 |
| 2.1. LES VALEURS TOXICOLOGIQUES DE REFERENCE (VTR)..... | 8 |
| 2.1.1. Définition générale..... | 8 |
| 2.1.2. Méthode de construction des VTR à seuil | 9 |
| 2.1.3. Recueil des VTR à seuil..... | 10 |
| 2.2. LA LOI DE HABER | 11 |
| 2.2.1. Historique..... | 11 |
| 2.2.2. Principe méthodologique | 12 |
| 3. METHODE..... | 13 |
| 3.1. RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE | 13 |
| 3.2. RECHERCHE DE CAS PRATIQUES | 13 |
| 3.3. EXPLOITATION DES BASES DE DONNEES | 14 |
| 4. RESULTATS | 16 |
| 4.1. APPLICATIONS ACTUELLES DE LA LOI DE HABER DANS LA CONSTRUCTION DES VTR | 16 |
| 4.2. ETUDES DE CAS | 18 |
| 4.2.1. Le formaldéhyde..... | 18 |
| 4.2.1.1. Caractérisation des dangers du formaldéhyde..... | 18 |
| 4.2.1.2. VTR..... | 19 |
| 4.2.1.3. Applicabilité de la loi de Haber..... | 20 |
| 4.2.2. Le tétrachlorure de carbone..... | 22 |
| 4.2.2.1. Caractérisation des dangers du tétrachlorure de carbone..... | 22 |
| 4.2.2.2. VTR..... | 23 |
| 4.2.2.3. Applicabilité de la loi de Haber..... | 23 |
| 4.2.3. Le benzène..... | 26 |
| 4.2.3.1. Caractérisation des dangers du benzène..... | 26 |
| 4.2.3.2. VTR..... | 27 |
| 4.2.3.3. Applicabilité de la loi de Haber..... | 27 |
| 4.2.4. Le trichloroéthylène | 29 |
| 4.2.4.1. Caractérisation des dangers du trichloroéthylène..... | 29 |
| 4.2.4.2. VTR..... | 30 |
| 4.2.4.3. Applicabilité de la loi de Haber..... | 30 |
| 4.3. CARACTERISATION EMPIRIQUE DE LA RELATION CONCENTRATION-TEMPS-REPOSE | 32 |

| | |
|---|-----------|
| 5. DISCUSSION | 34 |
| 5.1. LIMITES DE L'APPLICATION DE LA LOI DE HABER | 34 |
| 5.1.1. <i>Relations dose-réponse et temps-réponse</i> | 37 |
| 5.1.2. <i>Equilibre toxicocinétique / toxicodynamique</i> | 38 |
| 5.2. CAS PARTICULIER DE L'IRRITATION..... | 40 |
| | |
| 6. CONCLUSION ET PERSPECTIVES | 42 |
| | |
| REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES..... | 45 |
| | |
| ANNEXES..... | 54 |
| ANNEXE 1 : LE FORMALDEHYDE..... | 54 |
| ANNEXE 2 : LE TETRACHLORURE DE CARBONE | 57 |
| ANNEXE 3 : LE BENZENE | 60 |
| ANNEXE 4 : LE TRICHLOROETHYLENE..... | 64 |

LISTE DES ABREVIATIONS

| | |
|----------------|---|
| ADN | Acide DésoxyriboNucléique |
| Afsset | Agence Française de Sécurité Sanitaire de l'Environnement et du Travail |
| ALAT | Alanine Transaminase |
| ARN | Acide RiboNucléique |
| ATSDR | Agency for Toxic Substances and Disease Registry |
| BMD | BenchMark Dose |
| CFU-S | Colony Forming Unit-Spleen |
| CIRC | Centre International de Recherche sur le Cancer |
| CYP | Cytochrome P450 |
| DESET | département expertises en santé environnement travail |
| GOT | Glutamic-Oxaloacetic Transaminase |
| GPT | Glutamate Pyruvate Transaminase |
| GPx | Glutathion Peroxydase |
| GSH | glutathion sous forme réduite |
| GST | glutathion transférase |
| HpCDD | 1,2,3,4,6,7,8-heptachlorodibenzo-p-dioxine |
| IRIS | Integration Risk Information System |
| LDH | lactate dehydrogenase |
| LOAEL | Lowest Observed Adverse Effect Level |
| LOAELaj | Lowest Observed Adverse Effect Level adjusted |
| MRL | Minimal Risk Level |
| NAD | Nicotinamide Adénine Dinucléotide |
| NOAEL | No Observed Adverse Effect Level |
| NOAELaj | No Observed Adverse Effect Level adjusted |
| NRC | National Research Council |
| NTP | National Toxicology Program |
| OCT | OCT (ornithine transcarbamylase) |
| OEHHA | Office of Environmental Health Hazard Assessment |
| OMS | Organisation Mondiale de la Santé |
| PBPK | Physiologically Based Pharmacokinetic |
| ppm | partie par million |

| | |
|--------------------------------|--|
| REL | Reference Exposure Level |
| RfC | Reference Concentration for Chronic inhalation exposure |
| RfD | Reference Dose for Chronic Oral Exposure |
| RIVM | National Institute for Public Health and the Environment |
| SDH | sorbitol-déshydrogénase |
| SGPT | Serum Glutamic Pyruvic Transaminase |
| TGF α | Transforming Growth Factor alpha |
| TGF β | Transforming Growth Factor bêta |
| TNFα | Tumor Necrosis Factor alpha |
| UF | Uncertainty factor |
| US EPA | United States Environmental Protection Agency |
| VTR | Valeur Toxicologique de Référence |

1. INTRODUCTION ET OBJECTIF

1.1. L'Afsset

L'Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail (Afsset) est un établissement public administratif de l'état placé sous la tutelle des ministres chargés de la santé, de l'écologie et du travail. L'agence a pour mission de contribuer à la protection de la santé publique face aux expositions environnementales et professionnelles. Dans ce cadre, l'Afsset est chargée d'assurer la sécurité sanitaire dans les milieux de vie, d'évaluer les risques sanitaires liés à l'environnement, de coordonner l'expertise en santé/ environnement et en santé au travail et d'informer le public.

1.2. La démarche d'évaluation quantitative des risques sanitaires

La méthode d'évaluation quantitative du risque sanitaire a été codifiée par le National Research Council (NRC) en 1983 (NRC, 1983). C'est une méthode largement utilisée par les agences sanitaires et réglementaires en France et en Europe. Elle est composée de quatre étapes que sont l'identification du danger, la caractérisation du danger, la détermination de l'exposition et la caractérisation du risque. Lors de la caractérisation des dangers, l'extrapolation de données expérimentales est souvent mise en jeu car il n'est pas toujours possible d'exploiter des études épidémiologiques : ces études présentent des inconvénients qui peuvent rendre difficile, voire impossible, l'établissement d'associations quantitatives entre une exposition précise à la substance et un effet sanitaire étudié, en raison de l'absence de caractérisation précise des expositions ou encore de co-expositions fréquentes. Ces relations causales sont nécessaires à l'élaboration de VTR. Elles sont observées chez l'animal grâce à l'emploi de doses élevées qui permet une meilleure détermination des effets.

Ainsi, l'une des difficultés de l'évaluation de la relation dose-réponse est l'extrapolation, à la population générale, de données expérimentales obtenues lors des études de toxicité animales réalisées dans des conditions spécifiques. Pour y remédier, des facteurs d'incertitude (UF pour « uncertainty factors ») sont employés lors de la construction des valeurs toxicologiques de référence (VTR), afin de tenir compte des incertitudes concernant l'extrapolation des données animales chez l'homme, la variabilité interindividuelle, l'extrapolation d'une dose critique chronique à partir d'une dose critique obtenue dans des conditions d'exposition

subchroniques ou encore d'un NOAEL (No Observed Adverse Effect Level) à partir d'un LOAEL (lowest observed adverse effect level) ou d'une benchmark dose.

1.3. Problématique, objectif et contour de l'étude

L'Afsset a entrepris de mettre en place une méthode d'élaboration de VTR afin de pouvoir construire des VTR en France sur la base d'une démarche consensuelle validée. Dans ce contexte, l'agence a mis en place des groupes de travail sur les VTR. Les premiers travaux concernant les VTR à seuil de toxicité, spécifiques aux effets sur la reproduction et le développement embryofœtal, ont été publiés en juillet 2007. L'expertise mettait en évidence un certain nombre de points critiques dans la construction de VTR qu'il reste à approfondir. Le groupe de travail recommandait en particulier qu'une réflexion soit menée sur la problématique de l'ajustement temporel des données toxicologiques obtenues chez l'animal (3). Dans les études toxicologiques par inhalation, les animaux sont généralement exposés de 4 à 6 heures par jour, 5 jours par semaine. Les doses critiques (NOAEL, LOAEL...) sont alors moyennées sur des durées continues afin d'être applicables chez l'homme pour des expositions continues (24 heures sur 24 et 7 jours sur 7). Ces ajustements conduisent à l'application systématique d'un coefficient d'ajustement à la dose critique dont les fondements toxicologiques ne sont pas toujours compris.

L'objectif de ce travail est de réaliser **une analyse approfondie des fondements toxicologiques à la base de l'application de l'ajustement temporel**. Cette analyse permettra de comprendre, à partir d'exemple de substances, les possibilités et les conditions d'emploi de tels ajustements dans le but d'améliorer la démarche de caractérisation des dangers. Pour mener à bien cette réflexion, il a été décidé de se concentrer sur **les substances présentant un seuil de dose** (construction de VTR à seuil) car l'application d'un ajustement temporel pour les substances sans seuil de dose est plus facilement justifiée par la notion de cumul d'effet (en particulier pour les substances cancérigènes génotoxiques), **pour des expositions par inhalation**, car c'est dans ce contexte que les ajustements temporels sont systématiquement proposés.

2. MATERIEL

2.1. Les Valeurs toxicologiques de référence (VTR)

2.1.1. Définition générale

Une VTR est un indice permettant d'établir une relation qualitative, voire quantitative, entre une exposition à une substance chimique et un effet sanitaire chez l'homme. Les VTR sont spécifiques d'une substance donnée, d'un effet, d'une période et d'une voie d'exposition. Elles sont élaborées pour des périodes d'exposition continues. Ces valeurs de référence sont construites par différents organismes tels que l'ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry), l'US EPA (United States Environmental Protection Agency), l'OEHHA (Office of Environmental Health Hazard Assessment), le RIVM (Institut de Santé Publique des Pays-Bas) et l'OMS (Organisation mondiale de la santé). Les VTR diffèrent selon qu'elles sont conçues dans le but de protéger d'un effet dit « à seuil » ou « sans seuil » de dose. Un effet à seuil est un effet qui n'apparaît qu'à partir d'une certaine dose d'exposition. Au-delà du seuil, l'intensité ou la nature de l'effet augmente avec la dose d'exposition. En deçà de ce seuil, on suppose que le risque est négligeable. Les substances dont l'effet est généralement considéré comme « à seuil de dose » sont les substances provoquant des effets non cancérogènes ou cancérogènes non génotoxiques. Un effet sans seuil de dose se définit comme pouvant survenir quelle que soit la dose d'exposition, même infime. Dans ce cas, ce n'est pas l'intensité de l'effet mais la probabilité que ce dernier apparaisse qui augmente avec la dose. La notion d'absence de seuil concerne généralement les substances cancérogènes génotoxiques. Ce sont donc les hypothèses formulées sur les mécanismes d'action des substances qui permettent de faire un choix entre VTR « à seuil » et VTR « sans seuil ».

Les VTR à seuil s'expriment comme des doses (ou concentrations) journalières admissibles et correspondent à une estimation théorique de la quantité de substance à laquelle un individu peut être exposé sans constat d'effet sanitaire néfaste. Les VTR sans seuil s'expriment comme des excès de risque unitaires et correspondent à la probabilité théorique qu'un individu contracte une pathologie s'il est exposé pendant sa vie entière à une unité de dose de la substance.

Les VTR sont employées dans la démarche d'évaluation quantitative du risque sanitaire. Elles sont comparées aux expositions réelles afin de caractériser ou d'estimer un risque.

2.1.2. Méthode de construction des VTR à seuil

L'élaboration d'une VTR est basée sur le profil toxicologique de la substance. A partir des informations disponibles, la construction d'une VTR est constituée de plusieurs étapes :

- le choix d'une étude source : le choix de l'étude source doit être déterminé par l'évaluation de la qualité des études disponibles. Les études épidémiologiques et toxicologiques peuvent être évaluées en fonction de critères tels que leur conception et hypothèses, la méthode de mesure et de choix des effets, la durée et la pertinence de l'étude pour la construction d'une VTR donnée ;
- le choix d'un effet critique : l'effet critique identifié doit être pertinent pour l'homme et le type d'exposition ;
- la détermination de la dose critique : NOAEL, LOAEL ou benchmark dose (BMD) à partir des données épidémiologiques ou expérimentales sélectionnées : la dose critique applicable à l'homme peut ensuite être déterminée à l'aide d'un ajustement allométrique. De tels ajustements permettent de déterminer une « concentration équivalente humaine » lorsque l'étude source a été réalisée chez l'animal. Ils sont appliqués dans le but de prendre en compte les variations de doses inhalées entre différentes espèces dans le cas d'une exposition par voie respiratoire, ou les variations du métabolisme général lorsque l'exposition est orale. Dans le cas de la voie respiratoire, les doses critiques sont souvent obtenues à partir d'études dont le protocole d'exposition n'est pas continu mais de type 6 heures par jour et 5 jours par semaine. Dans ces cas, la dose critique est généralement systématiquement ajustée au temps à l'aide d'une extrapolation linéaire afin d'être applicable à une exposition de 24 heures par jour et de 7 jours par semaine ;
- l'application de facteurs d'incertitude, choisis en fonction des données disponibles sur la toxicité de la substance afin de tenir compte des différences lors de l'extrapolation de données provenant souvent d'études animales. L'objectif est d'obtenir un niveau d'exposition de sécurité acceptable et applicable pour l'homme. Parmi ces facteurs, il peut être appliqué :
 - o un UF_A qui prend en compte la variabilité interespèce. Ce facteur permet d'estimer le NOAEL, pour la population humaine générale, à partir d'une étude source animale, lorsque les études épidémiologiques sont insuffisantes. Sa valeur par défaut est de 10 ;

- un UF_H , facteur de variabilité interindividuelle, qui permet d'estimer le NOAEL dans une population sensible. En absence de données sur cette variabilité, sa valeur par défaut est de 10 ;
- un UF_L , facteur d'extrapolation du NOAEL à partir du LOAEL, qui est appliqué dans le cas où le NOAEL ne peut être déterminé au vu des données disponibles. Un facteur de 10 est généralement utilisé afin de prendre en compte l'incertitude liée au fait que le LOAEL correspond à une dose plus élevée que le NOAEL que l'on souhaite estimer ;
- un UF_S qui prend en compte l'incertitude liée à l'utilisation d'un NOAEL obtenu à partir d'une étude subchronique dans la construction d'une VTR s'appliquant à la vie entière. L'emploi de ce facteur suppose qu'un effet observé lors d'expositions de moyen terme sera également observé pour des expositions chroniques à plus faible dose. La valeur choisie pour ce facteur est souvent de 10. Cependant, cette valeur peut être moindre sur la base d'un jugement toxicologique ;
- un UF_D , facteur d'incertitude lié un manque de données ou à la confiance qui est accordée aux études toxicologiques ou aux effets considérés. Sa valeur varie généralement entre 3 et 10 si son application est jugée nécessaire.

La VTR est ensuite calculée en divisant la dose critique ajustée (ajustements allométriques, temporels) par le facteur d'incertitude total :

$$VTR = \frac{\text{Dose critique ajustée}}{UF_t}$$

Soit :

$$VTR = \frac{\text{Dose critique ajustée}}{UF_A \times UF_H \times UF_L \times UF_S \times UF_D}$$

2.1.3. Recueil des VTR à seuil

Pour les effets à seuil de dose, l'US EPA élabore des VTR pour des effets chroniques que sont les RfD (Reference Dose for Chronic Oral Exposure) et les RfC (Reference Concentration for Chronic Inhalation Exposure). La base de données IRIS (Integration Risk Information

System) porte sur la construction de ces VTR (RfC, RfD). Elle permet la recherche des VTR existantes, en fonction de la substance en cause, des facteurs d'incertitudes employés, de l'effet critique choisi ou de sa date d'élaboration. Il est par exemple possible de rechercher toutes les RfC dont la construction implique l'emploi d'un facteur d'extrapolation des effets chroniques à partir des données obtenues lors d'une étude subchronique. Cette base de données permet l'accès aux informations relatives à environ 550 substances référencées.

L'ATSDR construit des VTR, nommées MRL (Minimal Risk Level), pour des expositions aiguës (inférieures ou égales à 14 jours), intermédiaires (de 14 jours à 1 an) et chroniques (supérieures à 1 an). L'ATSDR met à disposition sur son site Internet la liste de tous les MRL (aigus, intermédiaires et chroniques). Il ne s'agit, dans ce cas, que de VTR pour les effets non cancérogènes. Environ 150 substances sont référencées par ordre alphabétique, ainsi que plus de 300 VTR. Les données disponibles pour chaque VTR de chaque substance sont : le nom de la substance, la voie d'exposition et la durée d'exposition, la valeur du MRL, les valeurs des facteurs d'incertitude, le type d'effet concerné et la date de construction.

L'OEHHA dispose de deux listes de VTR pour les effets à seuil par voie respiratoire, l'une concernant les expositions aiguës et l'autre les expositions chroniques, nommées REL (Reference Exposure Level). Ces REL ont pour fonction de protéger de l'effet néfaste le plus pertinent et le plus sensible retrouvé dans la littérature médicale et toxicologique concernant la substance étudiée. Ces listes renseignent également sur différents éléments de construction du REL tels que sa valeur, l'effet critique retenu, la durée d'exposition concernée et l'espèce utilisée dans l'étude source

2.2. La loi de Haber

2.2.1. Historique

La première corrélation quantitative entre la concentration d'une substance et la durée d'exposition de celle-ci fut établie par Warren en 1900 lorsqu'il étudiait la toxicité du chlorure de sodium chez les daphnies (Warren, 1900, cité dans 41).

Au début du vingtième siècle, un chimiste allemand, Fritz Haber, étudia la toxicité aiguë de gaz de combats sur le chat exposé pendant des durées de quelques minutes à plusieurs heures (Haber, 1924, cité dans 97). Suite à ses recherches, Haber observa une relation constante entre la concentration (« c », en mg/m^3) de gaz dans l'air et la durée d'exposition (« t », en minutes)

menant à la mort d'un animal. Cette relation a été exprimée à l'aide d'une formulation mathématique simple $c \times t = k$ (où k est un effet constant) et est connue sous le nom de **loi de Haber**. Bien que cette relation soit connue sous le nom de loi de Haber, c'est en réalité Flury qui publia les premières données en 1921. La mortalité induite par certains gaz tels que le chlore, le gaz moutarde et l'acide cyanhydrique fut étudiée chez le chat et il fut observé que le produit de la concentration du toxique dans l'air par la durée d'exposition induisant la mort de l'animal était approximativement constant. Cependant, le temps nécessaire à l'observation de la mortalité n'avait été déterminé que chez un seul chat pour une concentration donnée de la substance (Flury, 1921, cité dans 97).

Par la suite, Bliss publia, dans les années 1930, une série d'articles portant sur les relations dose-mortalité et temps-mortalité pour différents insecticides (Bliss, 1935, 1937, cité dans 41). Cet auteur approuva une équation proposée 30 ans plus tôt par Ostwald et Dernoschek sous la forme de $(c - c_0)^n \times t = k$ dans laquelle c_0 est une concentration seuil et n et k sont des constantes. Bliss conclut que la relation $c \times t = k$ pourrait plutôt être remplacée par $c^x \times t = k$ ou $c \times t^x = k$ (Bliss, 1940, Ostwald et Dernoschek, 1910 cités dans 41).

2.2.2. Principe méthodologique

Selon la loi de Haber, la concentration et le temps sont considérés comme des paramètres d'influence équivalente sur la toxicité. Selon cette théorie, des produits identiques de la concentration d'une substance dans l'air par la durée d'exposition induiraient le même effet toxique. Ceci conduit à considérer que l'incidence et/ou la sévérité d'un effet dépend de l'exposition totale à une substance potentiellement toxique sans faire de distinction entre les pics d'exposition et les expositions plus étalées dans le temps. Par conséquent, pour une substance donnée, une exposition de quinze minutes à une concentration de 3 mg/m^3 mènerait, par exemple, au même niveau de réponse qu'une exposition de trois minutes à une concentration de 15 mg/m^3 . Cette loi suppose qu'une exposition constante aboutit à un nombre constant de lésions par unité de temps.

3. METHODE

3.1. Recherche bibliographique

La méthode employée dans ce travail est basée sur une réflexion portant sur le principe de base de la loi de Haber. Cet exercice a consisté en premier lieu en une recherche bibliographique afin de disposer de l'ensemble des connaissances et études déjà menées sur ce thème. Ces informations ont été recherchées sur la base de données « Pubmed » de la bibliothèque nationale de médecine américaine de mars à avril 2008 à l'aide des mots-clés suivant : « Haber's law, Haber's rule, Haber, concentration-time relationship, time extrapolation ». Cette recherche a été complétée par une analyse de l'application de la loi de Haber par les agences américaines US EPA et OEHHA (66, 67, 88, 89).

3.2. Recherche de cas pratiques

Dans un second temps, des substances d'intérêt ont été choisie afin d'illustrer des cas pratiques. Les substances étudiées ont été choisies selon plusieurs critères de pertinence et de faisabilité :

- selon leur mécanisme d'action toxique, dans le but de prendre en compte des effets variés ;
- selon l'existence de données bibliographiques suffisantes ;
- selon la construction de leur VTR, impliquant un ajustement temporel de la dose critique à l'aide d'une extrapolation linéaire.

Les informations nécessaires ont été recherchées sur la base de données « Pubmed » de la bibliothèque nationale de médecine américaine et sur celle des organismes internationaux construisant des VTR (ATSDR, US EPA et OEHHA). Les données disponibles portant sur le mécanisme d'action toxique, la toxicocinétique et la toxicodynamie ont été analysées dans le but d'apprécier leur adéquation avec la loi de Haber. Cette recherche a été réalisée en mars 2008 sur la base des mot clés suivant : « formaldehyde, benzene, trichoroethylene, carbon tetrachloride, toxicity, toxicokinetic, mechanism, mode of action, metabolism ».

3.3. Exploitation des bases de données

La relation entre les doses critiques subchroniques et chroniques a été examinée dans le but de comprendre s'il était possible d'établir, pour différentes substances ou types d'effets, un ajustement temporel précis (en calculant la valeur de n dans l'équation : $c \times t^n = k$). Pour cela, les bases de données de l'US EPA, de l'ATSDR et de l'OEHHA ont été exploitées de mai à juin 2008 en raison de leur facilité d'utilisation et du nombre important de renseignements qu'elles apportent (<http://cfpub.epa.gov/ncea/iris/index.cfm>, <http://www.atsdr.cdc.gov/mrls/> et http://www.oehha.org/air/toxic_contaminants/index.html). Il est également possible d'accéder aux références et aux informations relatives aux études sources choisies lors de l'élaboration de ces VTR.

Les substances d'intérêt ont été recherchées sur la base d'une sélection de substances possédant des valeurs de références subchronique et chronique pour un même effet et obtenu sur une même espèce. Ces valeurs de références ont d'abord été recherchées sur la base de donnée de l'ATSDR. Par la suite, les résultats étant jugés insuffisant, la recherche a été étendue aux bases de données de l'US EPA et de l'OEHHA.

Pour chaque substance sélectionnée, une recherche approfondie de l'effet critique, de l'étude source et de la dose critique a été réalisée. Cette analyse a permis de ne retenir que les doses critiques comparables selon les critères suivants :

- effet retenu identique ;
- même espèce ;
- mode d'exposition similaire.

Enfin, une exploitation complémentaire dans la base de données du NTP (National Toxicology Program) a permis de sélectionner des substances pour lesquelles des doses critiques (NOAEL ou LOAEL) peuvent être déterminées pour différentes périodes d'exposition. Le NTP propose sur son site internet une liste de rapports d'études de toxicité subchroniques et chroniques réalisées à l'aide d'un protocole identique pour une même substance. Cette recherche, effectuée entre juin et juillet 2008 à l'aide du mot-clé : « inhalation », avait pour but de comparer des doses critiques d'une même substance, pour les mêmes effets, sur une même espèce et pour un protocole similaire. Ces doses critiques ont été comparées en fonction de la durée d'exposition.

A partir des doses critiques sélectionnées, nous avons calculé la valeur de la puissance « n » selon la méthode suivante :

Si on prend comme hypothèse que la toxicité d'une substance est dépendante de la concentration et de la durée d'exposition, alors la relation concentration-temps-réponse peut être exprimée par l'équation :

$$C \times T^n = K$$

Où :

- c est la concentration de la substance dans l'air nécessaire à l'induction d'un effet donné
- t est la durée d'exposition nécessaire à l'induction d'un effet donné
- K est un effet constant

Soit

$$\log C + n \log T = k$$

D'où

$$\log C_s + n \log T_s = \log C_c + n \log T_c$$

Où :

- C_s est la concentration de la substance dans l'air nécessaire à l'induction d'un effet donné lors d'une exposition subchronique.
- T_s est la durée de l'exposition subchronique nécessaire à l'induction d'un effet donné
- C_c est la concentration de la substance dans l'air nécessaire à l'induction d'un effet donné lors d'une exposition chronique.
- T_c est la durée de l'exposition chronique nécessaire à l'induction d'un effet donné

Soit

$$n = - \frac{(\log C_s - \log C_c)}{(\log T_s - \log T_c)}$$

4. RESULTATS

4.1. Applications actuelles de la loi de Haber dans la construction des VTR

Selon l'US EPA et l'OEHHA, dans l'exemple d'un NOAEL obtenu à partir d'une étude de toxicité par inhalation d'une substance X, durant laquelle des animaux sont exposés à une concentration de 100 mg/m^3 pendant six heures par jour et cinq jours par semaine, l'ajustement temporel est utilisé dans le but d'extrapoler le NOAEL pour une exposition continue :

$$\text{NOAELaj} = 100 (\text{mg/m}^3) \times 6/24 (\text{heures}) \times 5/7 (\text{jours}).$$

Dans le cadre de l'extrapolation d'une exposition continue à partir d'une exposition intermittente, l'US EPA recommande que les doses critiques soient ajustées au temps, par défaut, pour les études de toxicité par administrations répétées et par inhalation. D'ailleurs, la plupart des VTR référencées dans la base IRIS sont construites à partir d'une dose critique ajustée (NOAELaj par exemple). Néanmoins, selon la ligne directrice relative aux ajustements temporels des expositions intermittentes par inhalation, les évaluateurs sont encouragés à rechercher les données disponibles qui confirmeraient l'applicabilité de la loi de Haber ou qui offriraient une méthode alternative à cette extrapolation linéaire (89). L'US EPA précise que l'application de l'ajustement temporel est une décision de gestion et que cette méthode est utilisée par défaut. L'OEHHA recommande la même approche par défaut (67). D'ailleurs, la plupart des VTR chroniques de l'OEHHA sont également construites à partir d'une dose critique ajustée.

La seule exception concerne les effets sur le développement embryofœtal : dans le cas de VTR construites à partir d'études de toxicité prénatale, l'US EPA recommande de ne pas appliquer l'ajustement au temps par défaut (des expositions continues à partir des expositions discontinues) à moins que des données toxicocinétiques disponibles indiquent une accumulation de la substance en cas d'exposition continue. En effet, parmi les substances induisant une toxicité du développement, il a été montré que les effets de certaines sont plus une fonction du pic de concentration et que les effets des autres sont liés à la durée de l'exposition et à l'étape du développement affecté (88). De même, l'OEHHA recommande de ne pas appliquer d'extrapolation au temps pour les effets de toxicité du développement (66).

Dans le cas des VTR aiguës (exposition de 24 heures ou moins), les limites du modèle $c \times t$ étant reconnues, la formule $c^n \times t$ a été développée, n étant dérivée de façon empirique (66). La détermination de la valeur de n est basée sur la publication de ten Berge *et al.* (85), selon laquelle, pour un certain nombre de substances, la valeur de n est comprise entre 0,8 et 3,5 pour des effets aigus. Cependant, l'approche qui est choisie actuellement par l'US EPA est de considérer $n=1$ (88). Néanmoins, selon les recommandations de l'OEHHA (66), lorsque la durée de l'exposition de l'étude diffère de celle pour laquelle le REL aigu est calculé, la relation $c^n \times t$ doit être utilisée comme ajustement au temps. Ainsi, quand la valeur de n est disponible dans la littérature, celle-ci doit être utilisée. Dans le cas contraire, une valeur de n par défaut est utilisée comme suit :

- $n = 2$ pour extrapoler les effets d'une exposition de 1 heure à partir d'une exposition plus longue ;
- $n = 1$ pour extrapoler les effets d'une exposition de 1 heure à partir d'une exposition plus courte (plus protecteur).

D'autre part, la loi de Haber peut permettre l'extrapolation d'effets d'une exposition subchronique à chronique. Par exemple, l'US EPA emploie un UF_s de 10 par défaut pour ajuster la durée d'exposition lorsqu'une étude subchronique est utilisée pour construire une VTR chronique (89). L'hypothèse considérée est qu'un effet induit par une exposition subchronique d'une substance donnée apparaît à une concentration 10 fois supérieure à celle induisant un effet suite à une exposition chronique (83, 89). En pratique, 35% des VTR de la base IRIS disposent d'un UF_s. Parmi les 32 RfC construites à l'aide d'un UF_s, 12 présentent un facteur 3 et 20 un facteur 10. De plus, parmi ces 12 RfC qui possèdent un UF_s de 3, dans 9 cas la valeur de 3 est expliquée, par l'US EPA, par le non suivi de la loi de Haber de façon directe ou indirecte. En ce qui concerne les autres RfC qui sont construites à l'aide d'un UF_s de 3, cette valeur n'est pas expliquée. Pour illustrer cette observation, la VTR respiratoire chronique du 1,2-dichloropropane basée sur des effets respiratoires (hyperplasie de la muqueuse nasale), est, par exemple élaborée à l'aide d'un UF_s de 3. Cette valeur est justifiée par le fait que l'effet critique progresse peu avec le temps. Cette explication signifie que la loi de Haber n'est pas applicable dans ce cas.

4.2. Etudes de cas

A partir de la méthode proposée et des critères de sélection fondés sur la disponibilité des données, la diversité des mécanismes d'action toxiques impliqués, les substances suivantes ont été retenues car elles présentent ces caractéristiques et leur VTR sont construites par extrapolation temporelle de la dose critique:

- le formaldéhyde ;
- le tétrachlorure de carbone ;
- le benzène ;
- le trichloroéthylène.

4.2.1. Le formaldéhyde

4.2.1.1. Caractérisation des dangers du formaldéhyde

Lors d'une exposition par voie respiratoire, l'exposition systémique est faible. Cette substance est rapidement métabolisée et sa durée de demi-vie dans le sang est très courte (de l'ordre de 1,5 minutes chez l'homme). Sa concentration sanguine est d'environ 2,5 mg.L⁻¹ chez l'animal et l'homme et ne varie que très peu après une exposition par inhalation, même à des concentrations importantes (2). Ce phénomène peut être expliqué par le fait que le formaldéhyde se dépose au niveau du site de contact, par la rapidité de son métabolisme et sa forte réactivité. Au niveau pulmonaire, il est éliminé par un mécanisme de clairance mucociliaire.

L'inhalation aiguë et chronique de formaldéhyde induit des irritations des yeux, du nez et de la gorge (2, 5). Un phénomène d'inflammation non spécifique de la muqueuse nasale ainsi que l'altération de la clairance mucociliaire provoqués par le formaldéhyde ont également été observés (43, 44, 45). La toxicité du formaldéhyde est liée à sa forte réactivité avec les molécules de l'organisme. En tant que composé électrophile, le formaldéhyde est capable de réagir avec les groupements aminés et thiols des constituants de l'organisme (protéines, ADN, glutathion), provoquant par exemple des adduits à l'ADN au niveau des cellules en contact. Cette réponse serait dose-dépendante et non linéaire (2). Les effets sanitaires, la toxicocinétique et le mécanisme d'action toxique du formaldéhyde sont détaillés dans l'annexe 1.

4.2.1.2. VTR

Les VTR respiratoires du formaldéhyde sont construites pour des expositions aiguës, intermédiaires et chroniques, élaborées par l'ATSDR et l'OEHHA. Elles sont rassemblées dans l'annexe 1.

L'ATSDR a proposé un MRL pour des expositions intermédiaires de 0,03 ppm en 1999. Cette VTR provient de l'analyse d'une expérimentation chez des singes *Cynomolgus* exposés à différentes concentrations durant 22 heures par jour, 5 jours par semaine pendant 26 semaines (Rusch *et al.*, 1983, cité dans 14). Des signes cliniques d'irritation du nasopharynx et des lésions de l'épithélium (hyperplasie et métaplasie) ont été mis en évidence à la dose de 2,95 ppm (LOAEL). Aucun effet n'a été observé à la concentration de 0,98 ppm, dose identifiée comme étant le NOAEL. Cette dose critique n'a pas été ajustée au temps. Un facteur d'incertitude global de 10 a été appliqué. L'ATSDR a également proposé un MRL chronique de 0,008 ppm pour les effets d'irritation oculaire et de lésions de l'épithélium nasal modérées à partir d'une étude épidémiologique sur des durées moyennes de 10,4 ans (Holmstrom *et al.*, 1989, cité dans 14). Les auteurs ont mis en évidence des modifications histologiques au niveau nasal chez 70 travailleurs de l'industrie chimique exposés. L'ATSDR a utilisé la valeur de 0,24 ppm comme LOAEL sans ajustement au temps et a appliqué un facteur d'incertitude global de 3 pour l'utilisation d'un LOAEL et de 10 pour la variabilité individuelle (14). **L'ATSDR n'a pas appliqué d'ajustement temporel aux doses critiques utilisées pour construire les MRL du formaldéhyde.** Ce choix a été justifié par les résultats d'une étude (92) selon laquelle la concentration est plus impliquée que le produit $c \times t$ dans la détermination de la sévérité des dommages de l'épithélium du tractus respiratoire supérieur induits par le formaldéhyde.

L'OEHHA propose un REL de 0,002 ppm, pour des expositions chroniques, construit par exploitation de données épidémiologiques humaines en milieu professionnel sur la base d'une irritation ressentie portant sur 66 travailleurs de l'industrie chimique (Wilhelmsson et Holmstrom, 1992, cité dans 62). **L'OEHHA a effectué un ajustement au temps du NOAEL tenant compte de l'exposition intermittente en milieu professionnel pour obtenir une valeur de NOAEL applicable pour une exposition continue.** Cet ajustement a été réalisé à l'aide d'une extrapolation linéaire. Néanmoins, l'OEHHA précise que les effets du formaldéhyde sur l'épithélium respiratoire ne semblent pas influencés par la durée

d'exposition à partir de la comparaison des résultats de différentes études chez le rat et la souris. Cette comparaison mettait en évidence que les NOAEL et LOAEL obtenus sont similaires malgré des durées d'exposition différentes comprises entre 13 semaines et 28 mois (tableau I) (62). Selon l'OEHHA, ces observations ne permettent toutefois pas de conclure que la toxicité respiratoire de cette substance est indépendante de la durée d'exposition car les études comparées ont été conduites indépendamment et donc dans des conditions expérimentales différentes.

4.2.1.3. Applicabilité de la loi de Haber

Des auteurs ont montré que le taux de prolifération cellulaire induit par le formaldéhyde dépend plus de la concentration de la substance dans l'air que de la dose totale $c \times t$ d'exposition (84). La prolifération cellulaire a été déterminée chez des rats exposés à la même dose totale journalière de 36 ppm/h mais pour différentes durées et concentrations ; 12 ppm \times 3 heures, 6 ppm \times 6 heures et 3 ppm \times 12 heures. Cette étude a permis de comparer les effets de différents scénarios d'expositions de même produit $c \times t$. Il a alors été constaté que l'augmentation de la cytotoxicité et de la prolifération cellulaire au niveau nasal était plus influencée par la concentration d'exposition que par la dose totale (84).

La toxicité du formaldéhyde semble présenter les mêmes caractéristiques lors d'expositions plus longues. Pour rechercher si le fractionnement d'une exposition durant 4 semaines pouvait affecter la cytotoxicité du formaldéhyde sur l'épithélium nasal, 5 groupes de 10 rats Wistar ont été exposés au formaldéhyde à la concentration de :

- 0 ppm (contrôle) ;
- 5 et 10 ppm de façon continue (8 heures par jour) ;
- ou à 10 ou 20 ppm de façon intermittente (alternance de période de 30 minutes d'exposition et 30 minutes sans exposition durant 8 heures).

Ces expositions ont été réalisées 5 jours par semaine durant 4 semaines (92). Les auteurs ont observé que la sévérité des lésions nasales induites par l'exposition intermittente de 20 ppm (80 ppm.h/jour) est supérieure à celle des lésions induites par l'exposition de 10 ppm en continu de même dose totale (80 ppm.h/jour). De même, l'exposition intermittente de 10 ppm de formaldéhyde (40 ppm.h/jour) a provoqué des lésions nasales plus sévères que l'exposition de 5 ppm continue (40 ppm.h/jour). Ces lésions consistent en des rhinites ainsi que des altérations et des phénomènes de métaplasie de l'épithélium respiratoire. Cependant, les

auteurs n'ont pas détaillé les résultats avec précision. Ces constatations mènent à la conclusion que la concentration d'exposition du formaldéhyde influe plus sur la sévérité des effets cytotoxiques de cette substance que la dose totale dans le temps. Ces mêmes auteurs se sont demandés si des expositions plus faibles et plus longues permettaient d'aboutir à la même conclusion. Dans cette optique, ils ont mené une étude durant laquelle des rats étaient exposés à 0, 1 ou 2 ppm en continu ou à 2 ou 4 ppm par intermittence avec les mêmes schémas d'exposition que précédemment (93). Ils ont alors observé que certaines lésions nasales étaient induites par les expositions intermittentes à plus fortes concentrations. De plus, l'inhalation continue de formaldéhyde aux concentrations de 1 et 2 ppm ne semble pas provoquer ces mêmes dommages. Les auteurs ont donc conclu que la concentration de la substance dans l'air est majoritairement responsable de l'effet du formaldéhyde sur l'épithélium nasal pour des expositions allant jusqu'à plusieurs mois. Ces constatations s'opposent à la relation $c \times t = k$ et le formaldéhyde n'obéirait donc pas à la loi de Haber.

Le tractus respiratoire des hommes et des rongeurs dispose de mécanismes de protection, en particulier l'appareil mucociliaire. Ce système protège le tractus respiratoire supérieur des particules qui peuvent se déposer à la surface de l'épithélium et des composés gazeux irritants comme le formaldéhyde. Le formaldéhyde inhibe les fonctions mucociliaires nasales et entraîne une diminution de l'écoulement du mucus nasal chez l'homme (5) et l'animal (43). Cette altération de la fonction mucociliaire est spécifique de certaines régions nasales et corrélée à la concentration et à la durée d'exposition au formaldéhyde chez le rat (45). De plus, la distribution des lésions de l'épithélium nasal est liée à celle de l'inhibition mucociliaire (45). Un état de saturation de détoxification par le glutathion pour des concentrations supérieures à 4 ppm (5 mg/m^3) chez le rat a également été observé, phénomène corrélé avec l'augmentation non linéaire de la formation d'adduits ADN-protéines (2). La relation dose-réponse non linéaire influe sur la relation concentration-temps-réponse. **Ainsi, le faible taux de passage systémique (dû au dépôt au niveau du site de contact et au métabolisme rapide) et la modulation des systèmes de détoxification par le formaldéhyde sont des phénomènes qui peuvent influencer la relation concentration-temps-réponse et, donc, expliquer que cette substance n'obéisse pas à la loi de Haber.**

Par ailleurs, l'augmentation de la dose d'exposition au formaldéhyde par voie respiratoire ne semble pas augmenter la concentration de formaldéhyde libre ou lié de façon réversible au niveau de la muqueuse nasale murine (84). De même, la variation de cette exposition ne paraît

pas induire une augmentation de la concentration de cette molécule dans le sang (84). Ces phénomènes pourraient être expliqués par le métabolisme rapide de cette substance.

Ainsi, la toxicité du formaldéhyde au niveau du tractus respiratoire supérieur dépendrait davantage de sa concentration d'exposition plutôt que de la dose totale $c \times t$. Par conséquent, un pic d'exposition induirait une toxicité plus importante que la même dose totale étalée dans le temps.

4.2.2. Le tétrachlorure de carbone

4.2.2.1. Caractérisation des dangers du tétrachlorure de carbone

Le tétrachlorure de carbone est rapidement absorbé par voie respiratoire chez l'homme et le rat Sprague-Dawley (75). Une augmentation par 10 de la concentration inhalée (de 100 à 1000 ppm) produit approximativement une augmentation par 13 de la concentration maximale et par 15 de l'aire sous la courbe (75). Ce phénomène pourrait être associé à une saturation du métabolisme ou de l'élimination. De ce fait, la dose interne ne semble pas être une fonction croissante et linéaire de la dose d'exposition (Figure 1). Le métabolisme de cette molécule est majoritairement hépatique et initié par le CYP2E1 (cytochromes P450 2E1) chez différentes espèces de rongeurs et sur microsomes hépatiques humains (100). L'action du CYP2E1 sur le tétrachlorure de carbone aboutit à la formation du radical trichlorométhyle, CCl_3 . Ce dernier peut être, entre autres, biotransformé en radical trichlorométhylpéroxyde par voie aérobie (13) (Figure 2).

Les altérations hépatiques dues à cette substance peuvent se manifester par des signes cliniques tels que les ictères, des modifications biochimiques comme l'augmentation des transaminases hépatiques dans le sang et de la bilirubinémie (30, 46). Des stéatoses induites par des expositions relativement faibles ainsi que des nécroses hépatocellulaires, des fibroses et des phénomènes de cirrhose chez l'animal et l'homme lors d'expositions chroniques plus importantes ont également été observées.

L'hépatotoxicité de cette molécule implique la formation de radicaux libres par l'intermédiaire de sa biotransformation (36; 90). La réactivité du radical trichlorométhyle est alors à l'origine de l'initiation d'un phénomène de peroxydation lipidique entraînant des dommages cellulaires (90). Les effets sanitaires, la toxicocinétique et le mécanisme d'action toxique du tétrachlorure de carbone sont détaillés dans l'annexe 2.

4.2.2.2. VTR

Les VTR respiratoires du tétrachlorure de carbone sont construites pour des expositions aiguës, intermédiaires et chroniques, par l'OEHHA et l'ATSDR. Elles sont rassemblées dans l'annexe 2. L'ATSDR a proposé un MRL intermédiaire de 0,03 ppm pour les effets hépatotoxiques (augmentation du poids du foie et induction de lésions histopathologiques) à partir d'une exposition de rats 7 heures sur 24, 5 jours sur 7 pendant 173 à 205 jours (Adams *et al.*, 1952, cité dans 13). L'ATSDR a utilisé la valeur de 5 ppm comme **NOAEL qui a ensuite été ajusté linéairement au temps** afin d'obtenir une dose critique applicable pour une exposition continue 7 jours sur 7, 24 heures sur 24 (13). L'ATSDR a également construit un MRL pour des expositions chroniques de 0,03 ppm en 2005. Cette VTR provient de l'analyse d'une étude chez le rat sur une exposition de 104 semaines, 6 heures par jour, 5 jours par semaine (Japan Bioassay Research Center, 1998, cité dans 13). Il a alors été retenu un **NOAEL de 5 ppm, également ajusté au temps** par l'intermédiaire de la loi de Haber. **On remarque que les MRL proposés pour des durées d'expositions différentes sont égaux. On remarque également que le NOAEL obtenu à partir de l'étude de 173 à 205 jours est égal à celui observé lors de l'étude de 104 semaines.**

Une VTR aiguë a été proposée par l'OEHHA. Ce REL est de 0,3 ppm. Il a été construit à partir d'une étude chez le rat exposé pendant 9 jours, 7 heures sur 24 (Schwetz *et al.*, 1974, cité dans 64). La dose critique retenue est un LOAEL de 300 ppm et celui-ci n'a pas été ajusté à une exposition continue. L'OEHHA a également élaboré un REL protégeant d'une exposition chronique de 0,006 ppm. Cette valeur de référence est construite par exploitation de données obtenues chez le cobaye exposé 7 heures par jour, 5 jours par semaines pendant 203 jours (Adams *et al.*, 1952, cité dans 63). Le LOAEL de 5 ppm obtenu a été ajusté linéairement au temps.

L'OEHHA a donc proposé un ajustement temporel uniquement pour la VTR chronique.

4.2.2.3. Applicabilité de la loi de Haber

David *et al.* (30) ont observé que la sévérité des lésions hépatiques induites par le tétrachlorure de carbone est plus influencée par la concentration inhalée que par l'exposition totale en fonction du temps. Leur étude a consisté à exposer, par inhalation, 12 rats Wistar mâles par groupe au tétrachlorure de carbone. Les conditions d'exposition ont été réalisées afin d'obtenir le même produit $c \times t$ de 300 ppm.h dans chaque groupe durant 4 jours successifs :

- 50 ppm durant 6 heures ;
- 250 ppm durant 72 minutes ;
- 1000 ppm durant 18 minutes ;
- 1000 ppm durant 6 fois 3 minutes à une heure d'intervalle.

Les auteurs ont observé que l'exposition 1000 ppm / 18 minutes induisait une augmentation de l'activité des transaminases, qui traduit une atteinte hépatique, plus importante que l'exposition 250 ppm / 72 minutes qui elle-même induit une augmentation plus importante que l'exposition 50 ppm / 6 heures. Dans le cas de l'exposition fractionnée 1000 ppm / 6 fois 3 minutes, l'augmentation de l'activité SGPT (Serum Glutamic Pyruvic Transaminase) est considérablement moins importante que dans le cas des autres types d'exposition. Cependant, quelques réserves peuvent être émises sur la méthodologie d'obtention des témoins, la comparaison du taux d'enzyme étant réalisée entre la moyenne du groupe avant et après traitement. De plus, les moyennes de l'activité SGPT avant exposition diffèrent d'un groupe à l'autre. Une autre série d'expositions a été réalisée avec un produit $c \times t$ de 600, 5 jours par semaine durant 4 semaines :

- 100 ppm durant 6 heures par jour ;
- 500 ppm durant 72 minutes par jour.

Douze rats ont été exposés à chaque concentration et 6 rats ont été employés comme contrôle (air). L'activité de la SGPT dans le sang a été déterminée avant la première exposition puis tous les 2 jours durant la période d'exposition. L'activité d'autres enzymes hépatiques a été déterminée au niveau sanguin et hépatique. Une analyse histologique du foie a également été réalisée. L'activité SGPT observée semble globalement plus importante chez les rats exposés à 500 ppm que chez ceux exposés à 100 ppm malgré une variabilité inter-individuelle relativement importante. Les activités de GPT (glutamate-pyruvate transaminase), LDH (lactate déshydrogénase) et OCT (ornithine transcarbamylyase) dans le sang sont augmentées par rapport aux contrôles. L'augmentation des activités de la GPT et de la LDH est plus importante dans le groupe exposé à de fortes concentrations sur une courte période. Cependant, aucune différence significative de modulation de ces enzymes, des triglycérides et du glycogène au niveau hépatique entre les 2 groupes d'exposition n'a été observée. Enfin, lors de l'analyse histologique, les auteurs n'ont pas mis en évidence de différences qualitatives entre les modifications observées dans les 2 groupes de doses. Cependant, certaines altérations constatées telles que la nécrose cellulaire et l'accumulation du glycogène

au niveau des zones centrales et péricentrales sont plus fréquentes dans le groupe 500 ppm / 72 minutes que dans le groupe 100 ppm / 6 heures.

D'autres auteurs ont également étudié la relation concentration-temps-réponse du tétrachlorure de carbone dans des groupes de 4 rats Sprague-Dawley exposés suivant différents scénarios d'exposition. Les rats ont été exposés à des concentrations variant entre 1350 et 6900 ppm (1350, 2500, 3400, et 6900 ppm) et pendant des durées d'exposition de 1 à 6 heures (1, 2, 3, et 6 heures). L'activité d'une transaminase, la GOT (glutamic-oxaloacetic transaminase) a été mesurée en tant que paramètre de toxicité. Les auteurs ont quantifié l'expression de la relation concentration-temps-réponse, différente de $c \times t = k$. Ils ont remarqué que la concentration exerçait une influence plus importante que la durée d'exposition sur l'effet toxique (87). Cependant, le nombre d'animaux par groupe n'est que de 4. Ceci peut rendre l'interprétation des résultats plus difficile.

Par conséquent, l'hépatotoxicité du tétrachlorure de carbone semble plus influencée par la concentration que par le temps. Néanmoins, pour une même dose totale, une exposition intermittente semble induire une toxicité moins importante qu'une exposition continue. De ce fait, l'extrapolation d'une exposition continue à partir d'une exposition discontinue pourrait aboutir à une sous-estimation du risque.

Plusieurs hypothèses expliquant que le tétrachlorure de carbone n'obéit pas à la loi de Haber peuvent être énoncées. D'une part, la toxicocinétique de cette substance pourrait être à l'origine de la déviation de la relation concentration-temps-réponse. En effet, lorsque des rats sont exposés au tétrachlorure de carbone par gavage, l'augmentation des enzymes sériques, SDH (sorbitol-déshydrogénase) et ALAT (Alanine Transaminase) est supérieure à celle induite par la même dose de cette substance administrée par instillation gastrique. En outre, l'inhibition enzymatique du CYP est plus marquée chez les rats ayant reçu le bolus que chez ceux exposés par infusion gastrique (75) (tableau II). Ces résultats peuvent être expliqués par l'effet majorant de l'exposition par gavage sur l'aire sous la courbe de la substance. Il semble donc que la toxicité du tétrachlorure de carbone soit influencée par le scénario d'exposition et qu'un pic d'exposition peut induire une toxicité plus importante qu'une exposition plus étalée dans le temps pour un même produit $c \times t$.

Le tétrachlorure de carbone est également capable de moduler des systèmes enzymatiques impliqués dans son mécanisme d'action toxique et, de cette façon, d'influer sur la relation

concentration-temps-réponse. Une diminution de différents composants du système anti-oxydant hépatique a été observée chez des rats Wistar traités deux fois par semaines et pendant neuf semaines par le tétrachlorure de carbone par voie intrapéritonéale (22). Cette substance semble induire une réduction de la GPx (glutathion peroxydase), du GSH (glutathion sous forme réduite) et de la GST (glutathion transférase). Ces modulations pourraient être impliquées dans l'hépatotoxicité du tétrachlorure de carbone. Cependant, elles n'ont été observées qu'à partir de la 7^{ème} semaine de traitement. La relation temps-réponse du tétrachlorure de carbone pourrait donc être non linéaire, ce qui influencerait sur la relation $c \times t = k$. En outre, le radical trichlorométhyle est connu pour être un substrat suicide du CYP2E1. De ce fait, le taux de métabolisme diminue graduellement durant la période d'exposition (13). Ce phénomène pourrait également être une des raisons pour laquelle la concentration de substance dans l'air est un facteur d'influence plus important que la durée d'exposition sur l'hépatotoxicité du tétrachlorure de carbone.

Enfin, la différence de toxicité induite par les différents types d'expositions pourrait être expliquée par un phénomène de saturation. En effet, si la durée d'exposition est assez courte ou si l'intervalle entre deux expositions est assez long, la concentration sanguine de tétrachlorure de carbone ne peut pas atteindre l'état d'équilibre. Ainsi, la concentration sanguine de tétrachlorure de carbone lors d'une exposition continue est supérieure à celle d'une exposition discontinue à la même concentration. Les effets hépatotoxiques du tétrachlorure de carbone étant réversibles (13, 68), le fractionnement de l'exposition pourrait permettre la réparation des altérations induites entre deux expositions.

4.2.3. Le benzène

4.2.3.1. Caractérisation des dangers du benzène

Le benzène est rapidement absorbé par voie respiratoire chez l'homme et l'animal (8). Il est métabolisé au niveau hépatique et dans les tissus où il s'accumule, comme la moelle osseuse. Le métabolisme du benzène implique, en premier lieu, le CYP2E1 qui permet l'oxydation du benzène en époxybenzène et en oxépine de benzène. Dans un second temps, un réarrangement non enzymatique de l'époxybenzène aboutit à la formation de phénol. En présence de CYP2E1 et de myelopéroxydases, le phénol peut être oxydé en métabolites réactifs : les 1,2- et 1,4-benzoquinones (8, 81) (figure 3).

Dans le cas de l'exposition par inhalation, l'organe cible majeur du benzène est le système hématopoïétique. Chez l'homme et l'animal, l'inhalation chronique de cette substance peut induire une lymphopénie, une neutropénie et une thrombocytopénie. L'exposition à cette molécule a été associée à une diminution dose-dépendante des cellules souches hématopoïétiques (32, 69, 86).

La moelle osseuse, cible principale du benzène, est le site de production des cellules souches hématopoïétiques qui permettent la formation des cellules sanguines. L'hématotoxicité du benzène met en jeu les métabolites réactifs : les métabolites phénoliques peuvent être à l'origine de radicaux semi-quinones et quinones hautement réactifs, capables d'induire la production d'espèces réactives de l'oxygène. Ces radicaux sont capables de se lier de manière covalente aux macromolécules cellulaires telles que des protéines, l'ARN et l'ADN (82). Par conséquent, la cytopénie périphérique induite par l'exposition au benzène fait suite à l'atteinte de ces cellules souches. Toutefois, le mécanisme par lequel le benzène induit une hématotoxicité n'est pas complètement compris. Les effets sanitaires, la toxicocinétique et le mécanisme d'action toxique du benzène sont détaillés dans l'annexe 3.

4.2.3.2. VTR

Les VTR respiratoires du benzène sont construites par l'ATSDR, l'OEHHA et l'US EPA pour des expositions aiguës, intermédiaires et chroniques. Elles sont rassemblées dans l'annexe 3. Toutes les VTR chroniques ont été construites sur la base d'études épidémiologiques durant lesquelles l'exposition présentait un caractère intermittent. **Les doses critiques alors retenues ont toutes été ajustées à une exposition continue par extrapolation linéaire au temps à l'aide de la loi de Haber.**

4.2.3.3. Applicabilité de la loi de Haber

Les effets du scénario d'exposition sur l'hématotoxicité induite par l'inhalation du benzène chez la souris ont été étudiés (27). Une exposition de 2 jours a été comparée avec une exposition de la même dose totale étalée sur 19 jours. Dans cette optique, des souris mâles CBA/Ca ont été exposées à :

- 316 ppm, 6 heures par jour, 5 jours par semaine sur un total de 19 expositions ;
- 3000 ppm, 6 heures par jour pendant 2 jours.

Les auteurs ont alors observé que l'exposition au benzène de 19 jours induisait une lymphopénie plus importante que l'exposition de 3000 ppm pendant 2 jours. Ces mesures ont été réalisées le jour suivant la dernière exposition. Les auteurs ont également remarqué que, 214 jours après l'exposition, cette différence d'effet persiste. De plus, l'exposition de 316 ppm sur 19 jours induit une diminution de la cellularité médullaire et des cellules souches hématopoïétiques CFU-S (Colony Forming Unit-Spleen) plus importante que l'exposition sur 2 jours de la même dose totale. **Ainsi, pour une même dose totale, une exposition longue à de faibles concentrations de benzène semble induire des effets hématotoxiques plus importants qu'une exposition plus courte à des concentrations plus élevées.**

Cette différence d'effet en fonction du type d'exposition pourrait être due à la saturation des enzymes du métabolisme du benzène à fortes doses. En effet, chez les souris CD-1 mâles exposées au benzène par voie respiratoire pendant 5 jours à raison de 6 heures par jour, la réduction des cellules sanguines, corrélée à une diminution de la cellularité au niveau de la moelle osseuse, atteint un plateau lorsque les souris sont exposées à des concentrations variant de 306 à 4862 ppm. Chez la souris B6C3F₁ et le rat F344/N, le taux de métabolites formés suite à l'inhalation de benzène atteint un plateau lorsque la concentration de benzène dans l'air est augmentée (74). Ce phénomène pourrait être expliqué par la saturation du mécanisme toxique du benzène à des concentrations d'exposition supérieures à 300 ppm chez la souris. Il est reconnu que ce mécanisme implique les métabolites réactifs du benzène dont la formation fait intervenir le CYP2E1. Dans le cas où cette voie de métabolisation serait saturée à des concentrations supérieures à 300 ppm, la quantité de métabolites toxiques produite ne serait pas dépendante de la concentration de substance dans l'air au-delà de ce seuil. Les voies métaboliques responsables de la formation de métabolites présumés toxiques correspondraient, en outre, à un processus saturable à des doses relativement faibles (34) car chez le rat F344/N et la souris B6C3F₁, l'augmentation de la dose de benzène inhalée est associée à une diminution du pourcentage de métabolisation. Ce phénomène pourrait s'expliquer par le fait que, chez la souris, lors d'une inhalation de benzène, celui-ci est conjugué au glutathion aux fortes doses (8). Ainsi, aux fortes concentrations d'exposition, les voies de détoxification de cette substance mises en jeu sont différentes de celles impliquées aux faibles doses.

La réversibilité des effets hématotoxiques du benzène a été observée après exposition de rats (27, 28, 29). Chez la souris, l'exposition sur le long terme à la concentration de 316 ppm a été associée à des dommages irréversibles, alors que les effets hématotoxiques causés par une exposition à court terme à des concentrations 10 fois supérieures se sont révélés réversibles (27). Ce phénomène, lié au cycle cellulaire, pourrait expliquer, du moins en partie, qu'une exposition au benzène sur le long terme à des concentrations faibles induise une hématotoxicité plus importante qu'une exposition plus courte à des concentrations élevées.

Chez le rat, l'absorption du benzène par inhalation augmente de façon linéaire par rapport à la concentration lorsque celle-ci n'excède pas 200 ppm. A partir de cette dose d'exposition, le taux d'absorption n'augmente pas de façon linéaire par rapport à la concentration de la substance dans l'air. Le pourcentage de benzène inhalé absorbé, suite à une exposition de 6 heures, diminue de 33 à 15 % chez le rat et de 50 à 10 % chez la souris lorsque la concentration d'exposition augmente de 10 à 1000 ppm (73). Ces données pourraient s'expliquer par un phénomène de saturation du CYP.

Par conséquent, dans le cas du benzène, la durée d'exposition semble plus impliquée dans la toxicité que la concentration de la substance dans l'air.

4.2.4. Le trichloroéthylène

4.2.4.1. Caractérisation des dangers du trichloroéthylène

Chez l'homme et chez le rat, l'absorption du trichloroéthylène est rapide par voie respiratoire. Le phénomène est saturable chez le rat (12). Cette substance est majoritairement métabolisée dans le foie aux doses inhalées chez l'homme : les principaux métabolites sont le trichloroéthanol, l'acide urochloralique et l'acide trichloroacétique. Le métabolisme du trichloroéthylène présente 2 voies principales : l'oxydation en chloral et/ou en oxyde de trichloroéthylène par le système des CYP microsomal et la conjugaison au glutathion en S-dichlorovinylglutathion (12, 38).

L'exposition au trichloroéthylène par inhalation, chez l'homme et l'animal, a été associée à différents effets neurologiques tels que des vertiges, céphalées et somnolences (19, 23, 37). Des études de courte et de longue durée à des concentrations élevées de trichloroéthylène ont permis de mettre en évidence des effets sur le nerf trijumeau et la perte d'audition (12, 17).

Le métabolisme joue un rôle important dans la toxicité du trichloroéthylène car plusieurs de ses métabolites présentent eux-mêmes une toxicité. Le mécanisme toxique de cette substance au niveau du système nerveux central est très mal connu. Il pourrait faire intervenir des interactions entre le trichloroéthylène et les membranes neuronales (12). Il a été observé que l'altération des fonctions de la rétine est associée à des modifications de l'électrorétinogramme chez le lapin suite à l'injection intraveineuse de trichloroéthylène et qu'une modification de potentiel évoqué visuel peut être induite par une exposition respiratoire à cette molécule (12). Les effets sanitaires, la toxicocinétique et le mécanisme d'action toxique du trichloroéthylène sont détaillés dans l'annexe 4.

4.2.4.2. VTR

L'ATSDR et l'OEHHA ont construit des VTR respiratoires du trichloroéthylène protégeant d'expositions aiguës, intermédiaires et chroniques. Elles sont rassemblées dans l'annexe 4.

L'ATSDR a proposé un MRL pour des expositions aiguës de 2 ppm en 1997. Cette VTR provient de l'analyse d'une étude humaine suite à une exposition de 7 heures par jour durant 5 jours consécutifs (12). Le LOAEL alors obtenu, pour des effets neurologiques, a été ajusté au temps à l'aide de la loi de Haber. L'ATSDR a également proposé une MRL intermédiaire de 0,1 ppm pour des effets neurologiques à partir d'une étude chez le rat exposé 8 heures par jour, 5 jours par semaine durant 6 semaines (12). Le LOAEL obtenu a également été ajusté afin d'être applicable pour une exposition continue (12). L'OEHHA a construit un REL chronique de 0,1 ppm concernant les effets neurologiques du trichloroéthylène suite à une exposition respiratoire. Le LOAEL a été obtenu à partir d'une étude épidémiologique, faisant suite à une exposition de 8 heures sur 24, 5 jours sur 7 pendant 8 ans (12). Cette dose critique a également été ajustée à une exposition continue par extrapolation linéaire au temps.

L'ATSDR et l'OEHHA ont donc appliqué un ajustement temporel sur les doses critiques pour construire les VTR du trichloroéthylène.

4.2.4.3. Applicabilité de la loi de Haber

La validité de la loi de Haber concernant les effets induits par le trichloroéthylène a été étudiée chez l'animal.

D'une part, la comparaison des effets auditifs de cette substance induits par différents scénarios d'exposition par inhalation a été réalisée chez le rat mâle Long-Evans (26). Une

exposition à 6000 ppm durant une journée a, alors, induit une toxicité auditive similaire à celle rapportée après une exposition de 3200 ppm pendant 1 semaine ou de 2400 ppm durant 4 ou 13 semaines. Ces résultats suggèrent que le mécanisme d'action de l'ototoxicité du trichloroéthylène est moins dépendant de la durée que de la concentration d'exposition. Cependant, lors d'une exposition plus longue, cette toxicité est principalement déterminée par la concentration de la substance dans l'air. La loi de Haber ne serait donc pas applicable dans ce cas.

D'autre part, suite à une exposition par inhalation chez le rat mâle Long-Evans, l'effet du trichloroéthylène sur le comportement n'est pas constant pour un produit $c \times t$ donné. Suite à des expositions de $800 \text{ ppm} \cdot \text{h}^{-1}$ ($800 \text{ ppm} / 1 \text{ heure}$, $1200 \text{ ppm} / 0,67 \text{ heure}$ et $2400 \text{ ppm} / 0,33 \text{ heure}$), des effets comportementaux n'ont été induits que chez les rats exposés à 2400 ppm (21). D'autres observations empiriques ont montré que la loi de Haber n'est pas suivie dans le cas des effets induits par le trichloroéthylène sur les fonctions auditives et visuelles ainsi que sur le comportement chez le rat mâle Long-Evans. Effectivement, d'autres auteurs ont remarqué que cette toxicité est plus liée à la concentration de la substance dans l'air qu'au produit $c \times t$ (18, 19).

La linéarité de la relation dose-réponse du trichloroéthylène est souvent supposée, bien que cette hypothèse ait été contestée. Dans le cas de l'exposition à des faibles doses, l'induction des voies de détoxification peut être suffisante pour réduire au minimum les effets toxiques. Cependant, la saturation de ces systèmes peut se produire à des doses plus élevées, conduisant, potentiellement, à la production des métabolites plus toxiques. Un effet de seuil peut se produire pendant l'exposition chronique ou à de fortes doses, menant à des modifications de la relation dose-réponse (12). Ce phénomène pourrait expliquer que la concentration de cette substance dans l'air ait une influence plus importante que la durée d'exposition sur la toxicité qu'elle induit.

Ainsi, la concentration de trichloroéthylène dans l'air semble bien être plus impliquée dans ses effets que la durée de l'exposition. De ce fait, dans le cadre de la caractérisation de la relation concentration-temps-réponse des effets neurotoxiques du trichloroéthylène, la relation $c^n \times t = k$ avec $n > 1$ serait plus pertinente que l'expression de la loi de Haber

simplifiée $c \times t = k$. Par conséquent, l'hypothèse basée sur la loi de Haber surestime la concentration nécessaire pour produire un effet donné.

4.3. Caractérisation empirique de la relation concentration-temps-réponse

Dans un premier temps, la recherche effectuée à partir de la base de données de l'ATSDR a permis de sélectionner 5 substances pour lesquelles nous disposons de doses critiques comparables sur la même espèce pour des durées subchroniques et chroniques. Ces résultats nous semblant insuffisants, nous avons choisi d'étendre la recherche aux bases de données de l'OEHHA et de l'US EPA. Suite à cela, 7 substances ont pu être sélectionnées au total. Ce travail a alors, dans un second temps, été poursuivi par la collecte de données provenant des études du NTP. Nous avons ainsi sélectionné **21 substances** pour lesquelles les doses critiques sont disponibles pour des durées d'exposition différentes, pour un même effet et sur une même espèce. Les données subchroniques et chroniques de 13 de ces molécules ont été obtenues à partir d'une même étude et donc à partir du même protocole d'étude, ce qui accroît la comparabilité des données. Ces données sont rassemblées dans le tableau III. Ces informations ont permis de comparer la concentration d'une substance donnée dans l'air nécessaire à l'induction d'un effet toxique donné pour différentes durées d'exposition. Ces résultats ont également permis de calculer la valeur empirique de l'exponentielle « n » de la relation $c \times t^n = k$. En effet, si on prend comme hypothèse que la toxicité d'une substance est dépendante de la concentration et de la durée d'exposition, alors la relation concentration-temps-réponse peut être exprimée par l'équation :

$$c \times t^n = k$$

Lorsque $n < 1$, cela signifie que la toxicité est plus dépendante de la concentration que de la durée d'exposition et inversement lorsque $n > 1$. Par ailleurs, la loi de Haber telle qu'elle est employée lors de la construction des VTR est vérifiée lorsque $n = 1$. Les calculs employés sont expliqués, précédemment, dans le chapitre méthodologie de l'exploitation des bases de données. Ce calcul permet d'estimer de façon quantitative, l'importance relative de la concentration de la substance et de la durée d'exposition lors de l'induction d'un effet toxique donné.

Les valeurs calculées sont également reportées dans le tableau III. Nous avons observé que, dans le cas de ces substances, la valeur de m est comprise entre 0 et 1,26. Aucune des valeurs de « n » calculées n'est égale à 1. Ces résultats ne permettent pas de réfuter la loi de Haber mais de montrer que celle-ci n'est pas applicable de façon systématique. La valeur moyenne obtenue est de 0,4. De plus, parmi 15 de ces 21 cas, nous remarquons que la valeur de « n » calculée est inférieure à 0,5 et que la loi de Haber ne serait pas applicable pour ces cas. Ces données ne permettent pas d'affirmer, mais plutôt d'envisager, que la toxicité d'une substance donnée est souvent plus dépendante de la concentration que de la durée d'exposition. Ce travail nous a ensuite amené à regrouper les résultats par similitude. Nous avons alors remarqué que, parmi ces 21 cas, 11 concernent des lésions du tractus respiratoire supérieur sachant que, pour de tels effets, la valeur de « n » calculée est comprise entre 0 et 0,34, à l'exception d'une valeur de 0,44. Ces effets ne seraient donc peu ou pas dépendants de la durée d'exposition.

5. DISCUSSION

5.1. *Limites de l'application de la loi de Haber*

L'analyse des études de cas met en évidence que la loi de Haber ne s'applique pas dans le cas de certains effets induits par le formaldéhyde, le tétrachlorure de carbone, le benzène et le trichloroéthylène. **Le plus souvent, c'est la concentration dans l'air qui aurait une influence plus importante que la durée d'exposition sur l'induction des effets toxiques.**

La toxicité du formaldéhyde au niveau du tractus respiratoire supérieur dépendrait davantage de sa concentration d'exposition plutôt que de la dose totale $c \times t$. Ceci peut être dû à des paramètres toxicocinétiques et toxicodynamiques : l'inhibition des systèmes de protection de l'organisme, un phénomène de saturation de la détoxification, la rapidité de son métabolisme et sa forte réactivité. Par ailleurs, le formaldéhyde réagissant avec les protéines de la muqueuse nasale, un phénomène de saturation de la fixation de cette substance pourrait être impliqué. Ce mécanisme pourrait expliquer la moindre influence de la durée d'exposition sur les effets d'irritation respiratoire.

L'hépatotoxicité du tétrachlorure de carbone semble également plus influencée par la concentration que par la durée d'exposition. Ainsi, un pic d'exposition peut induire une toxicité plus importante qu'une exposition plus étalée dans le temps pour un même produit $c \times t$. Cette observation pourrait être expliquée par son mécanisme d'action toxique. Le tétrachlorure de carbone est capable de moduler des systèmes enzymatiques impliqués dans son mécanisme d'action toxique et, de cette façon, de réduire la formation de métabolites toxiques. Cette substance est donc capable d'influer sur sa propre relation concentration-temps-réponse. Cependant, pour une même dose totale, une exposition intermittente semble induire une toxicité moins importante qu'une exposition continue. Cette constatation pourrait être associée à la réversibilité des effets hépatotoxiques induits par cette molécule.

La toxicité du trichloroéthylène sur les fonctions auditives et visuelles ainsi que sur le comportement du rat semble plus liée à la concentration de la substance dans l'air qu'au produit $c \times t$. La saturation de processus de détoxification, qui peut se produire à des doses élevées, pourrait être à l'origine de ce phénomène.

Dans le cas du formaldéhyde, du tétrachlorure de carbone et du trichloroéthylène, l'hypothèse basée sur la loi de Haber surestime la concentration nécessaire pour produire une toxicité et donc surestime le risque résultant d'une exposition de longue durée extrapolé à partir d'une étude plus courte. Dans le cadre de la caractérisation de la relation concentration-temps-réponse de la toxicité de ces substances, la relation $c^n \times t = k$ avec $n > 1$ serait plus pertinente que l'expression de la loi de Haber simplifiée $c \times t = k$.

Pour le benzène, la durée d'exposition semble plus impliquée que la concentration dans l'hématotoxicité. Cette différence d'effet en fonction du type d'exposition pourrait être due à la saturation des enzymes du métabolisme du benzène à fortes doses, sachant que les métabolites de cette molécule sont impliqués dans le mécanisme toxique. Le non suivi de la loi de Haber dans le cas du benzène pourrait également être associé à des paramètres toxicocinétiques et toxicodynamiques : un phénomène de saturation de l'absorption, à une détoxification majorée aux fortes doses et à la réversibilité des effets hématotoxiques. De ce fait, lors de l'évaluation de risque, **une extrapolation des données sur le long terme à partir de résultats obtenus lors d'une exposition à de plus fortes doses sur un court terme pourrait aboutir à une sous-estimation du risque.**

Ce travail a permis de montrer que la loi de Haber ne pouvait être appliquée de manière systématique sans créer une incertitude complémentaire sur la VTR. Si de nombreux organismes proposent son application de manière systématique, il faut garder à l'esprit qu'il s'agit d'un élément de gestion plutôt que d'une décision strictement scientifique. D'ailleurs, la loi de Haber a été discutée par différents auteurs. Bien que ce principe réapparaisse dans différents contextes expérimentaux, diverses exceptions émergent au fil du temps. C'est le cas par exemple de l'acrylamide dont la relation concentration-temps-réponse a été étudiée en 1996 (25). Selon cette étude, la neurotoxicité de cette substance chez le rat exposé pendant de courtes périodes par inhalation est caractérisée par des déficits fonctionnels transitoires. L'augmentation de la durée d'exposition aboutit à l'apparition de dysfonctions comportementales et de dommages au niveau des fibres nerveuses. L'augmentation de la durée d'exposition nécessite une augmentation du produit $c \times t$ requis pour induire la neurotoxicité (figure 4) (25). De plus, ces auteurs ont observés que l'acrylamide ne s'accumule pas au niveau de l'organe cible. Le processus de réparation tissulaire et de réversibilité est indépendant de la durée d'exposition et le temps de demi-vie de l'acrylamide

est court (de l'ordre de 1 à 2 heures). Ce phénomène pourrait être à l'origine de la déviation de la relation $c \times t = k$. Dans ce cas, l'ajustement temporel d'une dose critique lors de la construction d'une VTR aboutirait à une surestimation du risque.

Il a également été souligné que la loi de Haber est, en réalité, un cas particulier d'une relation plus générale : $c^m \times t = k$, $c \times t^n = k$ ou $c^\alpha \times t^\beta = k$. Par conséquent, la loi de Haber n'est suivie que lorsque $n = 1$, $m = 1$ ou $\alpha = \beta$ (41). Selon Miller, dans le cas où α et β sont supérieurs à 1, la loi de Haber surestime le temps nécessaire à l'apparition de l'effet dans la plupart des cas. Inversement, lorsque α et β sont inférieurs à 1, la loi induit une sous-estimation de ce temps. De plus, quand l'un de ces paramètres est inférieur et l'autre supérieur à 1, certaines combinaisons sont trop conservatrices et d'autres pas assez. Ten Berge *et al.* ont également mené des travaux sur la relation concentration-temps-mortalité de certaines substances. Dans cette optique, une vingtaine d'études portant sur la toxicité aiguë par inhalation de substances chimiques ont été sélectionnées. Seules les études analysant des concentrations et des durées d'exposition variables ont été incluses. Les données issues de ces études ont ensuite été réévaluées à l'aide d'une modélisation mathématique :

$$Y = b_0 + b_1 \ln c + b_2 \ln t$$

Où c est la concentration d'exposition, t la durée d'exposition et b_0 , b_1 et b_2 sont des coefficients de régression. Pour chaque substance étudiée, les valeurs de b_0 , b_1 et b_2 ont été déterminées ainsi que celle de l'exponentielle n de la relation $c^m \times t = k$ ($m = b_1 / b_2$). Les auteurs ont remarqué que la valeur de n calculée varie largement d'une substance à l'autre et est souvent différente de 1. De ce fait, cette étude mène à conclure qu'il n'existe pas de loi générale concernant la valeur de n et que la loi de Haber n'est pas suivie par toutes les substances. Ces auteurs ont, par conséquent, souligné que la valeur de n devrait être déterminée de façon empirique à partir d'études de toxicité aiguë pour lesquelles la concentration et la durée d'exposition sont des variables.

Il est reconnu qu'un effet toxique est directement lié à la concentration de la substance en cause et à la durée d'exposition. Cependant, l'une des problématiques de la loi de Haber est la prise en compte du devenir de la substance dans l'organisme et l'action de celui-ci sur le toxique. En effet, le temps est un paramètre plus complexe et la durée d'exposition n'intègre pas certains éléments de la toxicocinétique et de la toxicodynamie. Dans ce cadre, Rozman et Doull (70) ont porté leur réflexion sur les différents paramètres de temps pouvant influencer sur

un effet toxique. La toxicocinétique peut être abordée comme une balance entre l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'excrétion qui détermine le temps de résidence de la substance au sein de l'organisme. L'action de l'organisme peut influencer ces événements par divers mécanismes tels que les phénomènes de saturation ou de détoxification plus ou moins rapide. En outre, l'action de la substance sur l'organisme peut également influencer son devenir. Les molécules capables de réguler des fonctions physiologiques telles que les inhibiteurs et inducteurs enzymatiques pourraient en être des exemples. Enfin, la toxicodynamie d'une substance est également un facteur capable de moduler une réponse toxique. Rozman et Doull (70) ont défini la pharmacodynamie comme une balance entre les dommages induits par le composé en cause, la réversibilité, la réparation et la capacité d'adaptation qui détermine la cinétique d'un effet toxique sur l'organisme.

Ainsi, l'application de la loi de Haber pourrait aboutir à la négligence de certains aspects de la toxicologie qui auraient un impact sur les relations dose- et temps-réponse et, par conséquent, sur la relation concentration-temps-réponse.

5.1.1. Relations dose-réponse et temps-réponse

Dans le cas d'un effet à seuil, celui-ci ne se manifeste, théoriquement, pas en dessous du seuil. Par conséquent, la loi de Haber n'est pas applicable sous ce seuil. De ce fait, l'extrapolation d'effets induits par une exposition de courte durée à forte dose vers une exposition de longue durée à faible dose peut être biaisée si la concentration de substance est inférieure au seuil. Une relation plus adaptée aux effets à seuil a été proposée : $(c-c_0)^{\alpha} \times t^{\beta} = k$ où k est une constante associée à un niveau de réponse fixé et c_0 est le seuil de concentration sous lequel aucune réponse n'est théoriquement mesurable (41).

La dose inhalée est généralement supposée constante et équivalente à la concentration d'exposition bien que la concentration de produit inhalé dépende de différents facteurs tels que des facteurs physiologiques liés à l'absorption. Ainsi, la loi de Haber est basée sur l'hypothèse que la dose interne est une fonction croissante et linéaire de la dose d'exposition. Cependant, il existe des cas pour lesquels cette hypothèse n'est pas vérifiée tels que dans la situation de phénomènes de saturation. Lorsque le seuil de saturation est atteint, la dose interne n'est plus dépendante de la dose externe et la relation dose-réponse est donc modulée. La relation temps-réponse influe également sur la relation $c \times t = k$. De ce fait, certains processus biologiques, capables de modifier la relation temps-réponse, peuvent parallèlement

moduler l'importance de l'influence du temps et de la concentration sur la toxicité. Ainsi, dans l'éventualité où le mécanisme toxique d'une substance implique une bioactivation métabolique et que le taux de formation des métabolites n'est pas constant dans le temps, la substance en cause risque de ne pas obéir à la loi de Haber.

5.1.2. Equilibre toxicocinétique / toxicodynamique

Durant ses recherches, Flury a reconnu que, dans le cas de l'acide cyanhydrique, la toxicité semble plus influencée par la concentration que par la durée d'exposition. Il expliqua cette observation par le fait que de faibles concentrations d'acide cyanhydrique sont susceptibles d'être détoxifiées chez le chat (20, 97). Cette constatation suggère que l'exactitude de la loi de Haber requiert une cinétique d'apparition de l'effet toxique plus rapide que celle de la détoxification de la substance. Dans ce cadre, Hayes a reconnu également l'importance du taux de détoxification, ainsi que de la fraction de gaz inhalée dans la relation entre le temps et la concentration en se basant sur l'exemple de l'acide cyanhydrique (Hayes, 1975 cité dans 41). Ces observations semblent représenter, en réalité, un cas particulier d'une problématique plus générale. En effet, il a été observé que la relation concentration-temps-réponse était influencée par les conditions toxicocinétiques et toxicodynamiques de la substance en cause et plus particulièrement par l'état d'équilibre entre ces deux paramètres. La toxicodynamie d'une molécule intègre les phénomènes de réparation ou de réversibilité des effets ainsi que l'adaptation de l'organisme à un effet. Dans le cas où la cinétique de réversibilité de l'adaptation ou de la réparation est plus lente que la cinétique de la substance dans l'organisme, la toxicodynamie serait, alors, un facteur d'influence déterminant sur la toxicité de la molécule en question. Inversement, si le temps de demi-vie de la substance est plus long que le temps nécessaire à la réversibilité d'un effet, alors, la toxicocinétique deviendrait un paramètre prépondérant.

Plus récemment, Rozman et Doull (71) ont également suggéré que les conditions toxicocinétiques (détoxification, métabolisme, élimination) et toxicodynamiques (temps nécessaire à la réversibilité d'un effet donné) d'une substance sont capables de moduler la relation concentration-temps-réponse et de remettre en question la validité de la loi de Haber. Ils ont également proposé un scénario (71) pour lesquels la loi de Haber pourrait ou non être valide. Obéiraient, par exemple, à la loi de Haber les substances telles que la 1,2,3,4,6,7,8-heptachlorodibenzo-p-dioxine (HpCDD), dont le temps de demi-vie est très long comparé au

temps nécessaire à l'induction de l'effet toxique. Dans l'exemple de la HpCDD, le temps de demi-vie, chez le rat, est de 200 à 300 jours alors que le temps moyen nécessaire à l'observation de la mortalité est de 70 jours après exposition à une dose unique. Dans ce cas, la relation $c \times t = k$ a été observée pour la toxicité aiguë et serait expliquée par un état d'équilibre cinétique (71).

Pour les substances de temps de demi-vie cinétique ou dynamique très courts, l'élimination ou la réversibilité rapide diminue l'influence du temps sur la toxicité et la fréquence d'exposition commence à devenir déterminante. De ce fait, ces composés présentent un effet toxique plus influencé par la concentration après des expositions discontinues. En effet, dans le cas de fractionnement de la dose dans le temps, la réversibilité des effets mais également la détoxification, la biotransformation ou l'élimination de la substance entre deux expositions successives peuvent entraîner une diminution de la toxicité par rapport à celle induite par la même dose totale en continu. Dans le cas d'une exposition intermittente, la loi de Haber ne pourrait donc être suivie que si le temps de demi-vie est supérieur à un jour, selon Rozman et Doull, afin de permettre l'établissement de l'état d'équilibre pendant l'intervalle entre les expositions. Cependant, si l'intervalle entre deux expositions est long (48 heures), la loi de Haber ne serait suivie que pour des molécules de temps de demi-vie plus longs. Ainsi, lors de protocoles d'exposition de type 6 heures par jour, 5 jours par semaines, la loi de Haber est discutable car après 6 heures d'exposition, la réversibilité peut avoir lieu durant 18 heures et 66 heures pendant le week-end, du moins pour les substances ayant un temps de demi-vie court.

En conséquence, l'état d'équilibre toxicocinétique/toxicodynamique et/ou l'irréversibilité d'un effet donné seraient des conditions nécessaires à l'applicabilité de la relation $c \times t = k$. Il semble néanmoins important de souligner que l'état d'équilibre toxicodynamique et que l'irréversibilité absolue d'un effet toxique sont rarement rencontrés lors d'expositions environnementales. Ainsi, la complexité du facteur temps ne doit pas être sous-estimée car les paramètres cinétiques, dynamiques et de fréquence d'exposition sont mis en jeu dans la toxicité. Ces différents aspects doivent prendre en compte, entre autres, le métabolisme, la détoxification, la biodisponibilité les dommages et les phénomènes de réparation.

5.2. Cas particulier de l'irritation

Dans le cadre du travail effectué à partir de l'exploitation des bases de données, nous avons envisagé l'hypothèse que la loi de Haber ne soit pas applicable pour les cas d'effets sur le tractus respiratoire supérieur. Par ailleurs, nous avons remarqué que de nombreuses VTR concernant la voie respiratoire sont construites pour des effets d'irritation respiratoire et/ ou oculaire. C'est pour ces raisons qu'il nous a semblé intéressant d'approfondir la réflexion portant sur la validité de la loi de Haber dans le cas de l'irritation. Cette réaction peut être définie comme une réponse physiopathologique à la substance caractérisée par une réaction inflammatoire et se manifestant par des rougeurs, un prurit et/ou des douleurs. Les effets d'irritation respiratoire et oculaire peuvent également induire des effets sensoriels par stimulation des terminaisons nerveuses locales du nerf trijumeau. Dans ce cas, on parle d'irritation sensorielle. Ce type d'effet peut aboutir à une diminution de la fréquence respiratoire qui est une réponse de protection de l'organisme dont l'objectif est de réduire la quantité de substance inhalée (6).

Dans le cas de périodes d'exposition très courtes par inhalation, la concentration d'ammoniac, de chlore, de formaldéhyde et de 1-octène dans l'air semble être un paramètre d'influence plus important que la durée d'exposition sur les effets d'irritation sensorielle respiratoire (78, 95). Dans les cas du dioxyde de carbone et de l'éthanol, des augmentations approximatives de la durée d'exposition de 3,4 et 5,8 fois, respectivement, sont nécessaires pour compenser une diminution de la concentration de 2 fois (94, 96). Par conséquent, l'extrapolation des effets de ces substances *via* la loi de Haber pourrait aboutir à une sous-évaluation de l'influence de la concentration sur la toxicité et donc à une surestimation du risque (dans le cas d'extrapolation de courtes vers de longues périodes) ou à une sous-estimation du risque (dans le cas de l'extrapolation de longues vers de courtes périodes).

De ce fait, la loi de Haber ne serait pas applicable aux effets d'irritation induits par inhalation et la relation $c \times t^n = k$ avec $n \neq 1$ serait plus adéquate et pertinente. Cependant, ces résultats concernent des périodes d'exposition très courtes et la prédiction des effets irritants induits par des durées d'exposition longues reste encore à analyser. En outre, lors de ces études, l'évaluation de l'irritation sensorielle a été réalisée sur des critères subjectifs.

Enfin, l'exploitation des données effectuée dans ce travail a permis de mettre en évidence que la durée d'exposition pourrait exercer une influence relativement faible sur l'induction de lésions nasales par rapport à la concentration de la substance dans l'air. **La valeur de « n » dans le cas de la relation $c \times t^n = k$ semble approximativement comprise entre 0 et 0,4.** Il semble d'ailleurs pertinent de supposer que les effets induits par contact direct au niveau de la muqueuse nasale soient directement liés à la concentration d'exposition.

Le non suivi de la loi de Haber dans le cas des substances irritantes pourrait être expliqué par des contraintes toxicocinétiques telles que des phénomènes de clairance, d'adaptation ou de saturation. Dans le cas du formaldéhyde, une période de latence avant l'apparition des effets d'irritation a été observée (60). Cette substance étant très réactive, il est possible que les effets d'irritation sensorielle n'apparaissent qu'après saturation de la fixation du formaldéhyde sur les protéines de la muqueuse nasale. Ainsi, les appuis mécanistiques concernant une substance telle que celle-ci pourraient remettre en cause l'extrapolation des effets au long terme à partir d'une exposition de court terme et l'applicabilité de la loi de Haber.

6. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Concernant les expositions par inhalation et les effets se produisant au-delà d'un seuil de dose, ce travail a mis en évidence que la loi de Haber ne s'applique pas de façon systématique. Les observations obtenues lors de l'analyse des études de cas et de l'exploitation des bases de données ne sont néanmoins pas suffisantes pour réfuter la loi de Haber dans tous les cas, mais apportent des éléments sur son applicabilité sous forme de critères de validité ou de non validité. Ces éléments sont autant de notions qui pourraient être prises en compte lors de l'ajustement des doses critiques dans le contexte de la construction de VTR, en vue d'en améliorer la précision.

Dans le cas de substances dont la cinétique de réversibilité des effets est plus lente que la cinétique d'élimination, la relation $c \times t = k$ pourrait être observée. Rozman et Doull (71) ont notamment conclu, suite à leur réflexion, que lorsqu'un effet toxique est induit par une substance dont la toxicocinétique ou la cinétique de réversibilité de l'effet sont lentes, l'exposition continue ne serait pas nécessaire pour établir la valeur k de la loi de Haber.

Cependant, dans les cas où la relation dose-réponse et/ou temps-réponse n'est pas linéaire, le principe de base de la loi Haber ne semble pas cohérent. La loi de Haber peut donc être remise en cause dans divers cas car de nombreux phénomènes influent sur ces relations.

Il peut s'agir de cas où la toxicité d'une substance est plus dépendante de la concentration de la substance dans l'air que de la durée d'exposition. C'est le cas par exemple :

- des événements modulant l'absorption tels que les mécanismes de saturation de cette étape ;
- des phénomènes interférant avec le métabolisme : de tels phénomènes peuvent être illustrés par la saturation du métabolisme ou la modulation des systèmes enzymatiques impliqués dans son mécanisme d'action toxique (dans le cas où le mécanisme d'action toxique fait intervenir des métabolites actifs) ;
- des phénomènes de saturation de processus de détoxification, pouvant se produire à des doses élevées ;
- des phénomènes d'inhibition d'un système de protection de l'organisme par la substance toxique elle-même.

Il peut également s'agir de cas où la durée d'exposition représente un paramètre d'influence plus important sur la toxicité d'une substance que la concentration de celle-ci dans l'air. C'est le cas par exemple :

- de phénomènes d'activation de systèmes d'adaptation aux fortes doses ;
- de phénomènes de réversibilité des effets observés associés ou non à un temps de demi-vie très court de la substance en cause.

Dans le cas des substances dont le temps de demi-vie est très court, il semble particulièrement pertinent de se pencher sur la question de l'applicabilité de la loi de Haber dans ce cas. Cette loi ne permet pas de prendre en compte la réversibilité des effets intervenant lors d'une exposition continue. L'extrapolation linéaire au temps d'une dose critique applicable pour une exposition continue à partir d'une exposition intermittente pourrait aboutir à une **sous-estimation du risque**.

Ce travail a également permis d'envisager l'hypothèse selon laquelle la loi de Haber ne serait pas applicable dans le cas d'un effet spécifique, l'irritation respiratoire et/ ou oculaire. Nous avons constaté qu'un faisceau d'arguments conduit à penser que, dans ce cadre, la durée d'exposition n'exerce que peu ou pas d'influence sur la toxicité et que la concentration d'exposition serait un paramètre prépondérant. Lors de la construction de VTR protégeant de l'irritation respiratoire et/ ou oculaire, il pourrait donc être envisagé de ne pas appliquer d'ajustement temporel des doses critiques ou d'utiliser la relation $c \times t^n = k$ avec une valeur de n comprise entre 0 et 0,4

Ces éléments sont en faveur d'une analyse détaillée des données toxicocinétiques et toxicodynamiques des substances pour lesquelles sera appliqué un ajustement temporel afin d'apprécier au cas par cas l'applicabilité de la loi de Haber pour une substance et un effet donné. Cette analyse doit prendre en compte des éléments tels que le type d'effet et leur réversibilité, les propriétés cinétiques de la substance tels que sa demi-vie d'élimination, son métabolisme et les possibles phénomènes de saturation.

Le choix de la méthode à envisager afin d'obtenir des doses critiques applicables pour une exposition continue est complexe. Dans le cas où des éléments montrent que la loi de Haber n'est pas applicable, la démarche à adopter n'est actuellement pas définie. Il apparaît

important de mener une réflexion plus approfondie sur les démarches à adopter ainsi que d'élargir cette réflexion au cas des effets sans seuil de dose. Par ailleurs, la mise en place d'une étude permettant de comparer les effets induits par différentes durées d'exposition à des substances données sur le long terme compléterait ce travail. Il serait également intéressant d'étendre l'analyse de l'applicabilité de la loi de Haber en fonction du type d'effet, comme cela a été réalisé pour le cas de l'irritation. Ce travail permettrait d'établir des critères de validité de cette loi et d'apporter des critères de décision en ce qui concerne l'application et/ou la méthodologie d'un ajustement au temps de la dose critique lors de la construction d'une VTR.

L'une des perspectives intéressantes serait l'utilisation de modèles toxicocinétiques afin de simuler différents scénarios d'exposition. Ces modèles permettent d'estimer la concentration sanguine et l'aire sous la courbe de la substance ainsi que la dose interne et la cinétique de la substance au niveau des organes cibles. Par exemple, un modèle PBPK du trichloroéthylène a été utilisé dans le but d'explorer la relation entre la dose interne de cette substance chez le rat Long-Evans et les effets neurologiques. La concentration de cette molécule au niveau cérébral au moment du test semble prédire l'intensité de l'effet du trichloroéthylène sur le potentiel évoqué visuel (19, 80). Toutefois, la plus grande limite des modèles PBPK est la nécessité de disposer d'un grand nombre de données de cinétique. Il existe, de ce fait, peu de modèles validés chez l'homme.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (1) Afsset, rapport d'expertise collective CES « Evaluation des risques liés aux milieux aériens ». Proposition de valeurs guides de qualité d'air intérieur. 2008.
- (2) Afsset, évaluation des risques sanitaires liés à la présence de formaldéhyde dans les environnements intérieurs et extérieurs. 2007.
- (3) Afsset, valeurs toxicologiques de référence (VTR) pour les substances reprotoxiques - Méthode de construction de VTR fondées sur des effets toxiques pour la reproduction et le développement. 2007.
- (4) Agence Française de Sécurité SANitaire des Produits de Santé (Afssaps), unité de veille toxicologique et d'évaluation non clinique. Evaluation de la toxicité du formaldéhyde contenu dans les produits de santé. 2005.
- (5) Andersen.I. and Molhave.L., Controlled human studies with formaldehyde, in Gibson.J.E. (ed.), Formaldehyde Toxicity, Hemisphere Publishing Corp. 1983, New York, pp. 154-165.
- (6) Arts J.H., de Heer C., Woutersen R.A. Local effects in the respiratory tract: relevance of subjectively measured irritation for setting occupational exposure limits. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*. 2006 Apr; 79(4):283-98. Review.
- (7) ATSDR. Toxicological Profile for Acrolein (update). Atlanta: Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 2007.
- (8) ATSDR. Toxicological Profile for Benzene (update). Atlanta: Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 2007.
- (9) ATSDR. Toxicological Profile for Chlorine. Atlanta: Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 2007.
- (10) ATSDR. Toxicological Profile for Chloroform (update). Atlanta: Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 1997.
- (11) ATSDR. Toxicological Profile for Dichlorvos. Atlanta: Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 1997.
- (12) ATSDR. Toxicological Profile for Trichloroethylene (update). Atlanta: Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 1997.

- (13) ATSDR. Toxicological Profile for Carbon tetrachloride (update). U.S. Department of health service. 2005.
- (14) ATSDR. Toxicological Profile for Formaldehyde. U.S. Department of health service. 1999.
- (15) ATSDR. Toxicological Profile for Nickel (update). U.S. Department of health service. 2005.
- (16) ATSDR. Toxicological Profile for Titanium tetrachloride. U.S. Department of health service. 1995.
- (17) Barton H.A., Clewell H.J. Evaluating non cancer effects of trichloroethylene: dosimetry, mode of action, and risk assessment. *Environ. Health. Perspect.* 2000 May; 108 Suppl. 2:323-34.
- (18) Boyes W.K., Bercegeay M., Ali J.S., Krantz T., McGee J., Evans M., Raymer J.H., Bushnell P.J., Simmons J.E. Dose-based duration adjustments for the effects of inhaled trichloroethylene on rat visual function. *Toxicol. Sci.* 2003 Nov.; 76(1) :121-30.
- (19) Boyes W.K., Philip J., Bushnell, Crofton K.M., Evans M., Simmons J.E. Neurotoxic and Pharmacokinetic Responses to Trichloroethylene as a Function of Exposure Scenario. *Environ. Health. Perspect.* 2000; 108 (suppl. 2):317-322.
- (20) Bunce N.J, Remillard R.B.J. Haber's Rule: The Search for Quantitative Relationships in Toxicology. *Human and Ecological Risk Assessment.* 2003; 9 (4): 973-985.
- (21) Bushnell P.J. Concentration-time relationships for the effects of inhaled trichloroethylene on signal detection behavior in rats. *Fundam. Appl. Toxicol.* 1997 Mar; 36(1):30-8.
- (22) Cabré M., Camps J., Paternáin J.L., Ferré N., Joven J. Time-course of changes in hepatic lipid peroxidation and glutathione metabolism in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2000 Sep; 27(9):694-9.
- (23) Chiu W.A., Caldwell J.C., Keshava N., Scott C.S. Key scientific issues in the health risk assessment of trichloroethylene. *Environ. Health. Perspect.* 2006 Sep; 114(9):1445-9. Review.
- (24) Chiu W.A., Okino M.S., Lipscomb J.C., Evans M.V. Issues in the pharmacokinetics of trichloroethylene and its metabolites. *Environ. Health. Perspect.* 2006 Sep; 114(9):1450-6. Review.
- (25) Crofton K.M., Padilla S., Tilson H.A., Anthony D.C., Raymer J.H., Macphail R.C. The impact of dose rate on the neurotoxicity of acrylamide: The interaction of administered dose, target tissue concentrations, tissue damage, and functional effects. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1996; 139, 163–176.

- (26) Crofton K.M., Zhao X. The ototoxicity of trichloroethylene: extrapolation and relevance of high-concentration, short-duration animal exposure data. *Fundam. Appl. Toxicol.* 1997 Jul; 38(1) :101-6.
- (27) Cronkite E.P., Drew R.T., Inoue T., Hirabayashi Y., Bullis J.E. Hematotoxicity and carcinogenicity of inhaled benzene. *Environ. Health. Perspect.* 1989 Jul; 82:97-108.
- (28) Cronkite E.P., Inoue T., Carsten A.L., Miller M.E., Bullis J.E., Drew R.T. Effects of benzene inhalation on murine pluripotent stem cells. *J. Toxicol. Environ. Health.* 1982 Mar; 9(3):411-21.
- (29) Cronkite E.P., Drew R.T., Inoue T., Bullis J.E. Benzene hematotoxicity and leukemogenesis. *Am. J. Ind. Med.* 1985; 7(5-6):447-56.
- (30) David A., Frantík E., Holusa R., Nováková O. Role of time and concentration on carbon tetrachloride toxicity in rats. *Int. Arch. Occup. Environ Health.* 1981; 48(1) :49-60.
- (31) Edling C., Hellquist H., Odkvist L. Occupational exposure to formaldehyde and histopathological changes in the nasal mucosa. *Br. J. Ind. Med.* 1988 Nov; 45(11) :761-5.
- (32) Farris G.M., Robinson S.N., Wong B.A., Wong V.A., Hahn W.P., Shah R. Effects of benzene on splenic, thymic, and femoral lymphocytes in mice. *Toxicology.* 1997; 118: 137- 148.
- (33) Hayes R.B., Yin S.N., Dosemeci M., Li G.L., Wacholder S., Travis L.B., Li C.Y., Rothman N., Hoover R.N., Linet M.S. Benzene and the dose-related incidence of hematologic neoplasms in China. Chinese Academy of Preventive Medicine--National Cancer Institute Benzene Study Group. *J. Natl. Cancer Inst.* 1997 Jul 16; 89(14):1065-71.
- (34) Henderson R.F., Sabourin P.J., Bechtold W.E., Griffith W.C., Medinsky M.A., Birnbaum L.S., Lucier G.W. The effect of dose, dose rate, route of administration, and species on tissue and blood levels of benzene metabolites. *Environ. Health. Perspect.* 1989 Jul; 82:9-17.
- (35) Holmstrom M., Wilhelmsson B., Hellquist H. Histological changes in the nasal mucosa in persons occupationally exposed to formaldehyde alone and in combination with wood dust. *Acta. Otolaryngol.* 1989; 107:120-129.
- (36) Jeong H.G. Inhibition of CYP2E1 expression by oleanolic acid: hepatoprotective effects against carbon tetrachloride-induced hepatic injury. *Toxicol. Lett.* 1999; 105: 215–222.
- (37) Kishi R., Harabuchi I., Ikeda T., Katakura Y., Miyake H. Acute effects of trichloroethylene on blood concentrations and performance decrements in rats and their relevance to humans. *Br. J. Ind. Med.* 1993 May; 50(5):470-80.

- (38) Lash L.H., Fisher J.W., Lipscomb J.C., Parker J.C. Metabolism of trichloroethylene. *Environ. Health. Perspect.* 2000 May; 108 Suppl 2:177-200. Review
- (39) McGregor D., Lang M. Carbon tetrachloride: genetic effects and other modes of action. *Mutat. Res.* 1996 Dec; 366(3):181-95.
- (40) McLaughlin J.K. Formaldehyde and cancer: a critical review. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* 1994; 66(5):295-301. Review.
- (41) Miller FJ, Schlosser PM, Janszen DB. Haber's rule: a special case in a family of curves relating concentration and duration of exposure to a fixed level of response for a given endpoint. *Toxicology.* 2000 Aug 14; 149(1):21-34.
- (42) Monticello T.M., Swenberg J.A., Gross E.A., Leininger J.R., Kimbell J.S., Seilkop S., Starr T.B., Gibson J.E., Morgan K.T. Correlation of regional and nonlinear formaldehyde-induced nasal cancer with proliferating populations of cells. *Cancer. Res.* 1996 Mar ; 56(5):1012-22.
- (43) Morgan K.T., Gross E.A., Patterson D.L. Distribution, progression, and recovery of acute formaldehyde-induced inhibition of nasal mucociliary function in F-344 rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1986 Dec; 86(3):448-56.
- (44) Morgan K.T., Monticello T.M. Airflow, gas deposition, and lesion distribution in the nasal passages. *Environ. Health. Perspect.* 1990 Apr; 85 :209-18.
- (45) Morgan K.T., Patterson D.L., Gross E.A. Responses of the nasal mucociliary apparatus of F-344 rats to formaldehyde gas. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1986; 82 :1-13.
- (46) Nagano K., Umeda Y., Saito M., Nishizawa T., Ikawa N., Arito H., Yamamoto S., Fukushima S. Thirteen- week inhalation toxicity of carbon tetrachloride on rats and mice. *J. Occup. Health.* 2007 ;49 :249-259.
- (47) National Research Council (NRC). National Risk Assessment in the Federal Government: Managing the Process. *The national academies press.*1983.
- (48) National Toxicology Program. NTP Toxicology and Carcinogenesis Studies of Allyl Glycidyl Ether (CAS No. 106-92-3) in Osborne-Mendel Rats and B6C3F1 Mice (Inhalation Studies). *Natl. Toxicol. Program. Tech. Rep. Ser.* 1990 Jan; 376:1-219.
- (49) National Toxicology Program. NTP Toxicology and Carcinogenesis Studies of 2-Chloroacetophenone (CAS No. 532-27-4) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Inhalation Studies). *Natl Toxicol Program Tech Rep Ser.* 1990; 379:1-191.

-(50) National Toxicology Program. NTP Toxicology and Carcinogenesis Studies of CS₂ (94% o-Chlorobenzalmalononitrile, CAS No. 2698-41-1) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Inhalation Studies). *Natl. Toxicol. Program. Tech. Rep. Ser.* 1990; 377:1-211.

-(51) National Toxicology Program. NTP Toxicology and Carcinogenesis Studies of Chloroprene (CAS No. 126-99-8) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Inhalation Studies). *Natl. Toxicol. Program. Tech. Rep. Ser.* 1998; 467:1-379.

-(52) National Toxicology Program. NTP Toxicology and Carcinogenesis Studies of Divinylbenzene-HP (CAS No. 1321-74-0) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Inhalation Studies). *Natl. Toxicol. Program. Tech. Rep. Ser.* 2006; 534:1-290.

-(53) National Toxicology Program. NTP Toxicology and Carcinogenesis Studies of Hexachlorocyclopentadiene (CAS No. 77-47-4) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Inhalation Studies). *Natl. Toxicol. Program. Tech. Rep. Ser.* 1994 Feb; 437:1-308

-(54) National Toxicology Program. Toxicology and Carcinogenesis Studies of Indium Phosphide (CAS NO. 22398-80-7) in F344/N Rats and B6C3F₁ Mice (Inhalation Studies). *Natl. Toxicol. Program. Tech. Rep. Ser.* 2001; 499 :7-340.

-(55) National Toxicology Program. NTP Toxicology and Carcinogenesis Studies of Isobutyraldehyde (CAS No. 78-84-2) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Inhalation Studies). *Natl. Toxicol. Program. Tech. Rep. Ser.* 1999 Feb; 472:1-242.

-(56) National Toxicology Program. NTP Toxicology and Carcinogenesis Studies of Nitromethane (CAS No. 75-52-5) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Inhalation Studies). *Natl. Toxicol. Program. Tech. Rep. Ser.* 1997 Feb; 461:1-289.

-(57) National Toxicology Program. NTP Toxicology and Carcinogenesis Studies of Ozone (CAS No. 10028-15-6) and Ozone/NNK (CAS No. 10028-15-6/ 64091-91-4) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Inhalation Studies). *Natl. Toxicol. Program. Tech. Rep. Ser.* 1994; 440:1-314.

-(58) National Toxicology Program. NTP Toxicology and Carcinogenesis Studies of Tetrafluoroethylene (CAS No. 116-14-3) in F344 Rats and B6C3F1 Mice (Inhalation Studies). *Natl. Toxicol. Program. Tech. Rep. Ser.* 1997; 450:1-321.

-(59) National Toxicology Program. NTP Toxicology and Carcinogenesis Studies of Vinyl Toluene (Mixed Isomers) (65%-71% meta-isomer and 32-35% para-isomer) (CAS No. 25013-15-4) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Inhalation Studies). *Natl. Toxicol. Program. Tech. Rep. Ser.* 1990 Mar; 375:1-191.

- (60) Nielsen G.D., Wolkoff P., Alarie Y. Sensory irritation: risk assessment approaches. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 2007 Jun; 48(1):6-18.
- (61) Office of Environmental Health Hazard Assessment (OEHHA). EPA California. Determination of chronic reference exposure levels for airborne toxicants. Chronic Toxicity Summary. Acrolein. 2000.
- (62) Office of Environmental Health Hazard Assessment (OEHHA). EPA California. Determination of chronic reference exposure levels for airborne toxicants. Chronic Toxicity Summary. Formaldehyde. 1999.
- (63) Office of Environmental Health Hazard Assessment (OEHHA). EPA California. Determination of chronic reference exposure levels for airborne toxicants. Chronic Toxicity Summary. Carbon tetrachloride. 2000.
- (64) Office of Environmental Health Hazard Assessment (OEHHA). EPA California. Determination of acute reference exposure levels for airborne toxicants. Acute Toxicity Summary. Carbon tetrachloride. 1999.
- (65) Office of Environmental Health Hazard Assessment (OEHHA). EPA California. Determination of chronic reference exposure levels for airborne toxicants. Chronic Toxicity Summary. Chlorine. 1999.
- (66) Office of Environmental Health Hazard Assessment (OEHHA). Air toxic hot spots program risk assessment guidelines - Part I. The determination of acute reference exposure levels for airborne toxicants. 1999. (<http://www.oehha.org/air/pdf/acuterel.pdf>).
- (67) Office of Environmental Health Hazard Assessment (OEHHA). Air toxic hot spots program risk assessment guidelines - Part III. Technical Support Document for the Determination of Non cancer Chronic Reference Exposure Levels. 2000. (http://www.oehha.org/air/chronic_rels/pdf/relsP32k.pdf).
- (68) Rao P.S., Mangipudy R.S., Mehendale H.M. Tissue injury and repair as parallel and opposing responses to CCl₄, hepatotoxicity: a novel dose-response. *Toxicology*. 1997; 118: 181-193.
- (69) Rothman N., Smith M.T., Hayes R.B., Li G.L., Irons R.D., Dosemeci M., Haas R., Stillman W.S., Linet M., Xi L.Q., Bechtold W.E., Wiemels J., Campleman S., Zhang L., Quintana P.J., Titenko-Holland N., Wang Y.Z., Lu W., Kolachana P., Meyer K.B., Yin S. An epidemiologic study of early biologic effects of benzene in Chinese workers. *Environ. Health. Perspect.* 1996 Dec; 104 Suppl 6:1365-70.
- (70) Rozman K. K., Doull J. Dose and time as variables of toxicity. *Toxicology*. 2000; 144: 169–178.

- (71) Rozman K.K., Doull J. The role of time as a quantifiable variable of toxicity and the experimental conditions when Haber's c x t product can be observed: implications for therapeutics. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2001 Mar; 296(3):663-8.
- (72) Rusch G., Clary J.J., Rinehart W.E. and Bolte H.F. A 26 Week Inhalation Toxicity Study with Formaldehyde in the Monkey, Rat and Hamster. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1983; 68: 329-343.
- (73) Sabourin PJ, Chen BT, Lucier G, Birnbaum LS, Fisher E, Henderson. Effect of dose on the absorption and excretion of [14C]benzene administered orally or by inhalation in rats and mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1987 Feb; 87(2):325-36.
- (74) Sabourin PJ, Bechtold WE, Griffith WC, Birnbaum LS, Lucier G, Henderson RF Effect of exposure concentration, exposure rate, and route of administration on metabolism of benzene by F344 rats and B6C3F1 mice. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1989 Jul; 99(3):421-44.
- (75) Sanzgiri UY, Kim HJ, Muralidhara S, Dallas CE, Bruckner JV. Effect of route and pattern of exposure on the pharmacokinetics and acute hepatotoxicity of carbon tetrachloride. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1995 Sep; 134(1):148-54.
- (76) Sanzgiri U.Y., Srivatsan V., Muralidhara S., Dallas C.E., Bruckner J.V. Uptake, distribution, and elimination of carbon tetrachloride in rat tissues following inhalation and ingestion exposures. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1997 Mar; 143(1):120-9.
- (77) Shafer T.J., Bushnell P.J., Benignus V.A., Woodward J.J. Perturbation of voltage-sensitive Ca²⁺ channel function by volatile organic solvents. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2005 Dec; 315(3) :1109-18.
- (78) Shusterman D., Matovinovic E., Salmon A. Does Haber's law apply to human sensory irritation? *Inhal. Toxicol.* 2006 Jun; 18(7):457-71.
- (79) Simeonova P.P., Gallucci R.M., Hulderman T., Wilson R., Kommineni C., Rao M., Luster M.I. The role of tumor necrosis factor-alpha in liver toxicity, inflammation, and fibrosis induced by carbon tetrachloride. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2001 Dec 1; 177(2):112-20.
- (80) Simmons J.E., Boyes W.K., Bushnell P.J., Raymer J.H., Limsakun T., McDonald A., Sey Y.M., Evans M.V.. A physiologically based pharmacokinetic model for trichloroethylene in the male Long-Evans rat. *Toxicol Sci.* 2002 Sep; 69(1):3-15.
- (81) Snyder R. and Hedli C.C. An Overview of Benzene Metabolism. *Environ. Health. Perspect.* 1996; 104 (6): 1165-1171.
- (82) Snyder R., Witz G., Goldstein B.D. The Toxicology of Benzene. *Environ. Health. Perspect.* 1993; 100: 293-306.

- (83) Stedeford T., Zhao Q.J., Dourson M.L., Banasik M., Hsu C.H. The application of non-default uncertainty factors in the U.S. EPA's integrated risk information system (IRIS). Part I: UF_L, UF_s, and "other uncertainty factors". *J. Environ. Sci. Health C. Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev.* 2007 Jul-Sep; 25(3):245-79.
- (84) Swenberg J.A., Barrow C.S., Boreiko C.J., Heck H.A., Levine R.J., Morgan K.T. and Starr T.B. Non-linear biological responses to formaldehyde and their implications for carcinogenic risk assessment. *Carcinogenesis*. 1983; 4(8): 945-952.
- (85) Ten Berge W. F., Zwart A. and Appelman L. M. Concentration-time mortality response relationship of irritant and systemically acting vapours and gases. *Journal of Hazardous Materials*. 1986; 13: 301-309.
- (86) Tunek A., Olofsson T., Berlin M. Toxic effects of benzene and benzene metabolites on granulopoietic stem cells and bone marrow cellularity in mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1981 Jun 15; 59(1):149-56.
- (87) Uemitsu N., Minobe Y., Nakayoshi H. Concentration-time-response relationship under conditions of single inhalation of carbon tetrachloride. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1985 Feb; 77(2):260-6.
- (88) US EPA. A review of the reference dose and reference concentration processes. 2002. ([http://www.epa.gov/NCEA/iris/RFD_FINAL\[1\].pdf](http://www.epa.gov/NCEA/iris/RFD_FINAL[1].pdf)).
- (89) US EPA. Methods for derivation of inhalation reference concentrations and application of inhalation dosimetry. 1994. (<http://cfpub.epa.gov/ncea/cfm/recordisplay.cfm?deid=71993>).
- (90) Weber L.W.D., Meinrad B., Stampfl A. Hepatotoxicity and Mechanism of Action of Haloalkanes: Carbon Tetrachloride as a Toxicological Model Critical Reviews in Toxicology. 2003; 33(2, 1):105-136.
- (91) Wilhelmsson B., Holmstrom M. Possible mechanisms of formaldehyde-induced discomfort in the upper airway. *Scand. J. Work. Environ. Health*. 1992; 18(6):403-407.
- (92) Wilmer J.W., Woutersen R.A., Appelman L.M., Leeman W.R., Feron V.J. Subacute (4-week) inhalation toxicity study of formaldehyde in male rats: 8-hour intermittent versus 8-hour continuous exposures. *J. Appl. Toxicol.* 1987 Feb; 7(1):15-6.
- (93) Wilmer J.W., Woutersen R.A., Appelman L.M., Leeman W.R., Feron V.J. Subchronic (13-week) inhalation toxicity study of formaldehyde in male rats: 8-hour intermittent versus 8-hour continuous exposures. *Toxicol. Lett.* 1989 Jun; 47(3):287-93.

- (94) Wise P.M., Canty T.M., Wysocki C.J. Temporal integration in nasal lateralization of ethanol. *Chem. Senses*. 2006 Mar; 31(3):227-35.
- (95) Wise P.M., Canty T.M., Wysocki C.J. Temporal integration of nasal irritation from ammonia at threshold and supra-threshold levels. *Toxicol. Sci.* 2005 Sep; 87(1):223-31.
- (96) Wise P.M., Radil T., Wysocki C.J. Temporal integration in nasal lateralization and nasal detection of carbon dioxide. *Chem. Senses*. 2004 Feb; 29(2):137-42.
- (97) Witschi H. Some notes on the history of Haber's Law. *Toxicol. Sci.* 1999; 50:164-8.
- (98) Yin S.N., Hayes R.B., Linet M.S., Li G.L., Dosemeci M., Travis L.B., Zhang Z.N., Li D.G., Chow W.H., Wacholder S., Blot W.J. An expanded cohort study of cancer among benzene-exposed workers in China. Benzene Study Group. *Environ. Health. Perspect.* 1996 Dec; 104 Suppl 6:1339-41.
- (99) Yoon B.I., Li G.X., Kitada K., Kawasaki Y., Igarashi K., Kodama Y., Inoue T., Kobayashi K., Kanno J., Kim D.Y., Inoue T., Hirabayashi Y. Mechanisms of benzene-induced hematotoxicity and leukemogenicity: cDNA microarray analyses using mouse bone marrow tissue. *Environ. Health. Perspect.* 2003; 111(11):1411-20.
- (100) Zangar R.C., Benson J.M., Burnett V.L., Springer D.L. CYP2E1 is the primary enzyme responsible for low-dose carbon tetrachloride metabolism in human liver microsomes. *Chemico-Biological Interactions*. 2000 ; 125 : 233-243.

ANNEXES

Annexe 1 : Le Formaldéhyde

Le formaldéhyde est une substance chimique qui est employée dans une grande variété de secteurs tels que l'industrie chimique, celle du textile et les hôpitaux. Cette molécule est volatile, soluble dans l'eau mais instable et donc très réactive. Ces propriétés expliquent le pouvoir irritant du formaldéhyde et plus particulièrement au niveau des muqueuses de l'œil et du tractus respiratoire supérieur qui en est l'organe cible chez l'homme et l'animal.

1. Toxicocinétique

Lors d'une exposition par voie respiratoire, la majorité des molécules de formaldéhyde se dépose au niveau de l'appareil respiratoire supérieur où elles forment des liaisons intra- et inter-moléculaires avec les protéines et l'ADN (acide désoxyribonucléique) dans les cellules au niveau du site de contact. L'exposition systémique est, dans ce cas, faible. Cette substance est rapidement métabolisée en formiate puis en dioxyde de carbone et l'enzyme la plus impliquée est la formaldéhyde déshydrogénase NAD⁺-dépendante (Nicotinamide Adénine Dinucléotide+-dépendante) dont le cofacteur est le glutathion. Le formaldéhyde réagit rapidement avec le glutathion pour former l'hydroxyméthylglutathion qui est, par la suite, oxydé en S-formylglutathion. L'hydrolyse de ce composé libère un ion formiate qui peut être oxydé en dioxyde de carbone.

La durée de demi-vie du formaldéhyde dans le sang est très courte (de l'ordre de 1,5 minutes chez l'homme). Sa concentration sanguine est d'environ 2,5 mg.L⁻¹ chez l'animal et l'homme et ne varie que très peu après une exposition par inhalation, même à des concentrations importantes (2). Ce phénomène peut être expliqué par le fait que le formaldéhyde se dépose au niveau du site de contact, par la rapidité de son métabolisme et sa forte réactivité. Le formaldéhyde est majoritairement éliminé sous forme de dioxyde de carbone dans l'air expiré et de formiate au niveau urinaire. Au niveau pulmonaire, il est éliminé par un mécanisme de clairance mucociliaire.

2. Effets sanitaires

L'inhalation aiguë et chronique de formaldéhyde induit des irritations des yeux, du nez et de la gorge accompagnées de larmoiements, de sécheresse buccale et de céphalées chez l'homme (2, 5). Il a également été observé que le formaldéhyde provoque un phénomène

d'inflammation non spécifique de la muqueuse nasale (44) et l'altération de la clairance mucociliaire (43, 45). L'exposition chronique par voie respiratoire provoque des lésions histopathologiques de l'épithélium nasal chez l'homme (31). L'exposition au formaldéhyde par voie respiratoire a également été liée à un excès de mortalité par cancer du nasopharynx chez l'homme en milieu professionnel. Il existe aujourd'hui de nombreuses études épidémiologiques portant sur les effets cancérigènes de cette substance (2, 14, 40). Ces études sont à la base de la classification du formaldéhyde par le Centre international de Recherche sur le Cancer (CIRC) en groupe 1 (des preuves épidémiologiques suffisantes permettent d'affirmer que le formaldéhyde entraîne des cancers du nasopharynx chez l'homme).

Chez le rat exposé au formaldéhyde, à forte dose par inhalation, des lésions pulmonaires avec œdème et épaississement de la paroi alvéolaire ont été constatées (2). Une incidence accrue des tumeurs des fosses nasales a également été observée chez le rat exposé à cette molécule par inhalation (42). L'ensemble des études *in vitro* et *in vivo* montre que le formaldéhyde est un composé génotoxique pour lequel les effets sont principalement observés au niveau du site de contact pour des concentrations élevées (4).

3. Mécanisme d'action

La toxicité du formaldéhyde est liée à sa forte réactivité avec les molécules de l'organisme. En tant que composé électrophile, le formaldéhyde est capable de réagir avec les groupements aminés et thiols des constituants de l'organisme (protéines, ADN, glutathion), provoquant par exemple des adduits à l'ADN au niveau des cellules en contact. Cette réponse serait dose-dépendante et non linéaire (2). La cancérogénicité au niveau du tractus respiratoire supérieur est plus largement décrite par une cytotoxicité induisant une augmentation de la prolifération régénératrice des cellules épithéliales de la muqueuse. L'augmentation de la réplication de l'ADN aboutirait, alors, à l'augmentation de la probabilité de formation d'adduits. Ce sont les erreurs de réplication et la fixation de mutations qui seraient à l'origine de l'apparition des cancers du nasopharynx (2). La cytotoxicité de cette molécule implique un de ces métabolites, l'acide formique, qui est capable d'inactiver la cytochrome-oxydase II induit un épuisement des réserves de glutathion, une modification de l'homéostasie calcique (avec une augmentation de la concentration de calcium intracellulaire), une acidose et l'inhibition de fonctions respiratoires mitochondriales (14). Cette inhibition a pour conséquence la perturbation de l'intégrité membranaire, des systèmes enzymatiques et du métabolisme énergétique cellulaire.

4. Valeurs toxicologiques de référence du formaldéhyde pour des expositions par inhalation.

| Organisme | Méthode de construction | Effet critique | Dose critique (BMD/NOAEL/LOAEL) | UF | VTR |
|---------------------------------|-------------------------|---|--|---|----------------------------------|
| Exposition aiguë | | | | | |
| OEHHA (1999) | BMC ₀₅ | Irritation oculaire | BMC ₀₅ de 0.44 ppm Exposition humaine de 3h. (Kulle <i>et al.</i> , 1987) BMC ₀₅ ajusté au temps selon l'équation $c^2 \times t = k$ (AICE, 1989 à chercher). | 10 -10 : variabilité intraespèce | 0.076 ppm |
| ATSDR (1999) | LOAEL | Irritation nasale et oculaire | LOAEL de 0,4 ppm Exposition humaine 2h. (Pazdrak <i>et al.</i> , 1993) NOAEL non ajusté au temps | 10 -3 : utilisation de LOAEL -3 : variabilité intraespèce | 0,04 ppm |
| Exposition intermédiaire | | | | | |
| ATSDR (1999) | NOAEL/FE | Irritation nasopharyngiale et lésions de l'épithélium nasal | NOAEL de 0,98 ppm Exposition de primates non humains 22h/24, 7j/7, 26 semaines (Rusch <i>et al.</i> , 1983) NOAEL non ajusté au temps | 30 -3 : variabilité interespèce -10 : variabilité intraespèce | 0.03 ppm |
| Exposition chronique | | | | | |
| ATSDR (1999) | LOAEL/FE | Irritation oculaire et du tractus respiratoire supérieur, lésions de l'épithélium nasal | LOAEL de 0,24 ppm Etude épidémiologique, 10,4 ans en moyenne (Holmstrom <i>et al.</i> , 1989) LOAEL non ajusté au temps. | 30 -3 : utilisation de LOAEL -10 : variabilité intraespèce | 0.008 ppm |
| OEHHA (1999) | NOAEL | Irritation oculaire et nasale, obstruction nasale, lésions histopathologiques nasales | NOAEL de 0.09 mg/m ³ Etude épidémiologique, 8h/24, 5j/7, 10 ans en moyenne. (Wilhelmsson <i>et al.</i> , 1992) NOAEL ajusté au temps | 10 -10 : variabilité intraespèce | 0.002 ppm (3 µg/m ³) |

Annexe 2 : Le tétrachlorure de carbone

Le tétrachlorure de carbone appartient à la famille des composés organiques volatils, et plus particulièrement des hydrocarbures aliphatiques halogénés qui, pour un grand nombre, sont connus pour être hépatotoxiques et cancérogènes chez le rongeur. Les études animales associées aux observations limitées chez l'homme indiquent que les principaux organes cibles du tétrachlorure de carbone sont le système nerveux central, le foie et le rein.

1. Toxicocinétique

Le tétrachlorure de carbone est rapidement absorbé par voie respiratoire et gastro-intestinale chez l'homme et le rat Sprague-Dawley (75). Une augmentation par 10 de la concentration inhalée (de 100 à 1000 ppm) produit approximativement une augmentation par 13 de la concentration maximale et par 15 de l'aire sous la courbe (75). De ce fait, la dose interne ne semble pas être une fonction croissante et linéaire de la dose d'exposition (Figure 1). Ce phénomène pourrait être associé à une saturation du métabolisme ou de l'élimination.

Le tétrachlorure de carbone est distribué dans la majeure partie des organes dont le foie, le rein, les glandes salivaires, la muqueuse gastro-intestinale, le cerveau, le tissu adipeux, le cœur et les poumons (76). Le métabolisme de cette molécule est majoritairement hépatique et est initié par le CYP2E1 (CYP2E1) qui est le cytochrome le plus impliqué. Le CYP3A4 est également mis en jeu pour de fortes concentrations. L'implication de ces systèmes enzymatiques est retrouvée chez différentes espèces de rongeurs et sur microsomes hépatiques humains (100). Ces voies métaboliques semblent donc similaires chez les rongeurs et chez l'homme. L'action du CYP2E1 sur le tétrachlorure de carbone aboutit à la formation du radical trichlorométhyle, CCl_3 . Ce dernier peut être biotransformé en radical trichlorométhylperoxy et en phosgène par voie aérobie ou en chloroforme, hexachloroéthane ou monoxyde de carbone par voie anaérobie (Figure 2). La voie majoritaire d'élimination du tétrachlorure de carbone est la voie respiratoire mais il peut aussi être excrété au niveau des fèces ou urinaire, cette dernière étant minoritaire (13).

2. Effets sanitaires

Le potentiel hépatotoxique du tétrachlorure de carbone chez l'homme et l'animal est bien connu depuis de nombreuses années. Les altérations hépatiques dues à cette substance peuvent se manifester par des signes cliniques tels que les ictères, des modifications

biochimiques comme l'augmentation des transaminases hépatiques dans le sang et de la bilirubinémie (30, 46). Des stéatoses induites par expositions relativement faibles ainsi que des nécroses hépatocellulaires, des fibroses et des phénomènes de cirrhose chez l'animal et l'homme lors d'expositions chroniques plus importantes ont également été observées. De plus, les expositions chroniques et subchroniques au tétrachlorure de carbone par voies orale et respiratoire induisent l'apparition d'hépatomes et de carcinomes hépatocellulaires chez la souris et le rat à des doses supérieures à celles induisant une cytotoxicité (13, 46). Le CIRC a classé le tétrachlorure de carbone en groupe 2B, possible cancérogène chez l'homme.

D'autres types d'effet ont été mis en évidence. La toxicité aiguë du tétrachlorure de carbone non métabolisé peut se manifester par une dépression du système nerveux central, incluant maux de tête, faiblesses, troubles de la vision puis le coma chez l'homme. Une néphrotoxicité a également été observée. Elle se manifeste par des néphropathies caractérisées par une anurie, une oligurie, une protéinurie et des atteints glomérulaires pouvant évoluer vers l'insuffisance rénale. Toutefois, la néphrotoxicité et la neurotoxicité du tétrachlorure de carbone ont été observées pour des doses plus élevées que celle à l'origine des effets hépatiques (46).

Enfin, des effets hématologiques peuvent se manifester par une anémie chez l'animal et chez l'homme lors d'expositions aiguës ou chroniques (diminution modérée de certains paramètres hématologiques chez l'homme par rapport aux sujets non exposés sans relation dose-réponse (13).

3. Mécanisme d'action

Le foie est un organe particulièrement sensible à la toxicité du tétrachlorure de carbone en raison de son abondance en CYP2E1 et plus particulièrement au niveau des régions centrolobulaires. En effet, l'hépatotoxicité de cette molécule implique la formation de radicaux libres par l'intermédiaire de sa biotransformation (36, 90). Le radical trichlorométhyle formé est capable de former des adduits à l'ADN et de réagir avec l'oxygène pour aboutir à la formation du radical trichlorométhylperoxy $\text{CCl}_3\text{OO}\cdot$, espèce hautement réactive. La réactivité du radical trichlorométhyle est alors à l'origine de l'initiation d'un phénomène de peroxydation lipidique qui altère les acides gras polyinsaturés et, en particulier, ceux associés aux phospholipides. Ces réactions affectent la perméabilité mitochondriale et celle du réticulum endoplasmique, aboutissant à un trouble de l'homéostasie calcique, contribuant à l'induction de dommages cellulaires (90).

Au niveau moléculaire, le tétrachlorure de carbone induit la libération de TNF α (tumor necrosis factor *alpha*), ainsi que de TGF α et β (transforming growth factor *alpha* et *bêta*), suggérant l'implication de processus inflammatoires à l'origine d'induction apoptotique (pour TNF α) et de phénomènes de fibrose (79, 90).

4. Valeurs toxicologiques de référence du tétrachlorure de carbone pour des expositions par inhalation.

| Organisme | Méthode de construction | Effet critique | Dose critique (BMD/NOAEL/LOAEL) | UF | VTR |
|--------------------------|-------------------------|---|--|--|-----------|
| Exposition aiguë | | | | | |
| OEHHA (1999) | LOAEL/FE | Retard de croissance foetale | LOAEL de 300 ppm Exposition rat, 7h/24, 9j (Schwetz <i>et al.</i> , 1974) LOAEL non ajusté au temps | 1000 -10 : utilisation de LOAEL -10 : variabilité interespèce -10 : variabilité intraespèce | 0,3 ppm |
| Exposition intermédiaire | | | | | |
| ATSDR (2005) | NOAEL/FE | Augmentation du poids du foie, et lésions histopathologiques | NOAEL de 5 ppm Exposition de rats 7h/24, 5j/7, 173 à 205 jours. (Adams <i>et al.</i> , 1952) NOAEL ajusté au temps. | 30 -3 : variabilité interespèce -10 : variabilité intraespèce | 0.03 ppm |
| Exposition chronique | | | | | |
| ATSDR (2005) | NOAEL/FE | Augmentation du poids du foie, augmentation des enzymes hépatiques dans le sang, lésions histopathologiques | NOAEL de 5 ppm Exposition de rats 6h/24, 5j/7, 104 semaines. (Japan Bioassay Research Center, 1998) NOAEL ajusté au temps. | 30 -3 : variabilité interespèce -10 : variabilité intraespèce | 0.03 ppm |
| OEHHA (2000) | LOAEL /FE | Augmentation du poids du foie et des lipides au niveau hépatique | LOAEL de 5 ppm exposition de cobayes 7h/24, 5j/7, 203 jours (Adams <i>et al.</i> , 1952) LOAEL ajusté au temps | 300 -3 : utilisation de LOAEL -3 : extrapolation du subchronique au chronique -3 : variabilité interespèce -10 : variabilité intraespèce | 0.006 ppm |

Annexe 3 : Le benzène

Le benzène était largement utilisé comme solvant dans l'industrie. Cependant, en raison de son profil toxicologique, l'emploi de cette substance a diminué au cours des dernières décennies. Le tabagisme ou encore la circulation automobile constituent des sources d'exposition au benzène.

1. Toxicocinétique

Le benzène est aisément et rapidement absorbé par voie respiratoire chez l'homme. Les données animales confirment que cette substance est rapidement absorbée au niveau pulmonaire (8). Il est, par la suite, distribué dans l'ensemble de l'organisme mais s'accumule préférentiellement dans les tissus riches en lipides.

Son métabolisme a été largement étudié et semble, qualitativement, similaire entre l'homme et l'animal. Il est métabolisé au niveau hépatique et dans les tissus où il s'accumule comme la moelle osseuse. Le métabolisme du benzène implique, en premier lieu, le CYP2E1 qui permet l'oxydation du benzène en époxybenzène et en oxépine de benzène. Dans un second temps, un réarrangement non enzymatique de l'époxybenzène aboutit à la formation de phénol. En présence de CYP2E1, le phénol peut être oxydé en catéchol ou en hydroquinone qui seront eux-mêmes respectivement oxydés, par la myelopéroxydase, en métabolites réactifs : les 1,2- et 1,4-benzoquinones. Une autre voie de métabolisation de l'époxybenzène peut mener à la formation de dihydrodiol de benzène par l'intermédiaire d'une époxyde hydrolase. Ce métabolite pourra conduire à la formation de catéchol grâce à la dihydrodiol déshydrogénase (8, 81). L'époxybenzène présente également d'autres voies de métabolisation dont la formation d'acide S-phénylmercapturique et d'acide trans, trans-muconique *via* le réactif intermédiaire trans, trans-muconaldéhyde. Chaque métabolite phénolique du benzène, dont le phénol, le catéchol et l'hydroquinone, peut subir une conjugaison sulfonique ou gluconique (82) (figure 3).

Le benzène non métabolisé est principalement éliminé par exhalation et la voie d'excrétion majoritaire de ses métabolites est la voie urinaire (8).

2. Effets sanitaires

Dans le cas de l'exposition par inhalation, l'organe cible majeur du benzène est le système hématopoïétique. Chez l'homme, l'inhalation chronique de cette substance peut induire une diminution de certaines cellules sanguines plus particulièrement une lymphopénie, une neutropénie et une thrombocytopenie qui peuvent aboutir à une pancytopenie. Les effets du benzène ne se limitent pas au secteur périphérique du système hématopoïétique. L'exposition à cette molécule a été associée à une diminution dose-dépendante des cellules souches hématopoïétiques (69). Cette toxicité du benzène au niveau central peut être divisée en 2 étapes : une augmentation suivie d'une diminution de la prolifération cellulaire (8). Une exposition continue au benzène peut également aboutir à une anémie aplasique ou à des formes de leucémies et plus particulièrement des leucémies aiguës myéloblastiques. Le benzène pourrait également être un facteur de risque du développement d'autres formes de cancer tels que des lymphomes Hodgkiniens, des myélomes multiples et des cancers du poumon (8, 33, 98).

Des études expérimentales ont, également, permis de mettre en évidence des effets de diminution de cellules souches et des modifications histopathologiques au niveau de la moelle osseuse ainsi que des réductions des différentes lignées cellulaires au niveau sanguin (érythrocytes, lymphocytes, polynucléaires neutrophiles, et diminution de l'hématocrite et de l'hémoglobine) (32, 86).

Chez l'homme, des expositions aiguës, subchroniques et chroniques au benzène induisent également des effets neurologiques tels que des céphalées, vertiges, tremblements et des troubles de la conscience.

3. Mécanisme d'action

La moelle osseuse, cible principale du benzène, est le site de production des cellules souches hématopoïétiques qui permettent la formation des cellules sanguines. Les métabolites du benzène jouent un rôle critique dans le mécanisme d'action toxique de cette substance. En effet, l'hématotoxicité du benzène met en jeu les métabolites réactifs : les métabolites phénoliques peuvent être à l'origine de radicaux semi-quinones et quinones hautement réactifs, capables d'induire la production d'espèces réactives de l'oxygène. Ces radicaux sont capables de se lier de manière covalente aux macromolécules cellulaires telles que des protéines, l'ARN et l'ADN (82). De ce fait, ces métabolites peuvent induire des altérations de la tubuline, des histones, de la topoisomérase II, et d'autres protéines associées à l'ADN ainsi

que des altérations de l'ADN (1, en cours de publication). De plus, l'interaction synergique entre les métabolites phénoliques exacerbe la toxicité du benzène puisque la production d'espèces réactives de l'oxygène induit des dommages des cellules hématopoïétiques. Par conséquent, la cytopénie périphérique induite par l'exposition au benzène fait suite à l'atteinte de ces cellules souches.

La sensibilité de la moelle osseuse au benzène pourrait être due à un taux relativement important de myélopéroxydases et autres peroxydases, enzymes impliquées dans le métabolisme de cette substance, présentes à ce niveau (82). Toutefois, le mécanisme par lequel le benzène induit une hématotoxicité n'est pas complètement compris. Au niveau moléculaire, celui-ci impliquerait la modulation de l'expression de gènes cibles (tels que les gènes codant pour la cycline G1, la caspase 11 et le gène suppresseur de tumeurs p53) impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN et le stress oxydant (99).

4. Valeurs toxicologiques de référence du benzène pour des expositions par inhalation.

| Organisme | Méthode de construction | Effet critique | Dose critique (BMD/NOAEL/LOAEL) | UF | VTR |
|--------------------------|-------------------------|--|--|---|-----------|
| Exposition aiguë | | | | | |
| OEHHA (1999) | NOAEL/FE | Reprotoxicité : diminution du poids fœtal. | NOAEL de 40 ppm Exposition de 6h/24, 5 jours consécutifs (Coate <i>et al.</i> , 1984) | 100 -10 : variabilité interindividuelle -10 : variabilité interspèce | 0.4 ppm |
| ATSDR (2007) | LOAEL/FE | Immunotoxicité : diminution des lymphocytes périphériques | LOAEL de 10,2 ppm Exposition souris 6h/24, 6 jours consécutifs (Rozen <i>et al.</i> , 1984). LOAEL ajusté au temps | 300 -10 : utilisation du LOAEL -3 : variabilité interspèce -10 : variabilité interindividuelle | 0.009 ppm |
| Exposition intermédiaire | | | | | |
| ATSDR (2007) | LOAEL/FE | Immunotoxicité : altération de l'activité cytotoxique lymphocytaire. | LOAEL de 10 ppm Exposition souris, 6h/24, 5J/7, 20 jours (Rosenthal <i>et al.</i> , 1987). LOAEL ajusté au temps | 300 -10 : utilisation du LOAEL -3 : variabilité interspèce -10 : variabilité interindividuelle | 0,006 ppm |
| | | | | | |

| Organisme | Méthode de construction | Effet critique | Dose critique (BMD/NOAEL/LOAEL) | FE | VTR |
|----------------------|-------------------------|--|--|---|--|
| Exposition chronique | | | | | |
| ATSDR (2007) | BMCL/FE | Immunotoxicité : diminution des lymphocytes B. | BMCL0.25sd de 0.10 ppm Etude épidémiologique, 6,1 ans en moyenne (Lan <i>et al.</i> , 2004) NOAEL ajusté au temps. | 10 -10 : variabilité intraespèce | 0,003 ppm |
| US EPA (2003) | BMCL/FE | Immunotoxicité : lymphopénie | BMCL = 8.2 mg/m ³ Etude épidémiologique, 6,3 ans en moyenne (Rothman <i>et al.</i> , 1996) BMCL ajusté au temps | 300 -3 : utilisation d'une BMCL -10 : variabilité intraespèce - 3 : extrapolation subchronique/chronique -3 : manque de données | 3 x 10 ⁻² mg/m ³ |
| OEHHA | NOAEL /FE | Hématotoxicité. | NOAEL de 0,53 ppm étude épidémiologique, 8h/24, 5j/7, 1 à 20 ans (Tsai <i>et al.</i> , 1983) NOAEL ajusté au temps | 10 -10 : variabilité intraespèce | 0.02 ppm |

Annexe 4 : Le trichloroéthylène

Le trichloroéthylène appartient à la famille des composés organiques volatils. Cette substance est un solvant incolore d'abord utilisé comme décapant. Il est actuellement employé comme dégraissant, agent de nettoyage à sec et lors de la production de peinture, de cires et de pesticides. Cette substance est fréquemment retrouvée comme contaminant environnemental dans l'eau du sol et l'air.

1. Toxicocinétique

Chez l'homme et chez le rat, l'absorption du trichloroéthylène est rapide par voie respiratoire. Le phénomène est saturable chez le rat. Plusieurs études chez l'homme après exposition par inhalation ont permis d'observer que le trichloroéthylène, une fois dans la circulation sanguine, était rapidement transporté vers différents organes tels que les poumons, le foie, les reins et le système nerveux, où il peut être métabolisé (12, 24, 38).

Le trichloroéthylène est majoritairement métabolisé dans le foie aux doses inhalées chez l'homme : les principaux métabolites sont le trichloroéthanol, l'acide urochloralique et l'acide trichloroacétique. Le métabolisme du trichloroéthylène présente 2 voies principales : l'oxydation en chloral et/ou en oxyde de trichloroéthylène par le système des cytochromes p450 microsomal et la conjugaison au glutathion en S-dichlorovinylglutathion. En ce qui concerne l'oxydation du trichloroéthylène, qui est quantitativement la voie majoritaire de ce métabolisme, le CYP2E1 serait le plus impliqué. D'autre part, en présence d'eau, le chloral forme l'hydrate de chloral qui est rapidement métabolisé en trichloroéthanol et en acide trichloroacétique (12, 38). Le trichloroéthanol peut également subir une glucuro-conjugaison. Le métabolite alors formé peut passer dans la circulation et subir le cycle entéro-hépatique. Cette molécule est alors sécrétée dans la bile et transportée jusqu'au niveau de l'intestin où elle pourra être réabsorbée (24).

Suite à des expositions respiratoires au trichloroéthylène chez l'homme et l'animal, les composés métabolisés sont principalement éliminés par voie urinaire. C'est le cas, notamment, du trichloroéthanol et de l'acide trichloroacétique. Cependant, la voie respiratoire est la voie d'élimination majoritaire du trichloroéthylène sous forme inchangée (12, 24).

2. Effets sanitaires

Les principaux organes cibles du trichloroéthylène chez l'homme et l'animal sont le système nerveux, le foie, le cœur et les reins : l'exposition au trichloroéthylène par inhalation a été associée à différents effets neurologiques chez l'homme. Dans le cas d'expositions aiguës, vertiges, céphalées et somnolences ont été observées (23), ainsi que des pertes de sensation faciale et des difficultés d'ingestion (12). Des effets similaires ont été observés suite à des expositions chroniques (19). Les effets neurologiques observés chez l'animal sont semblables à ceux mis en évidence chez l'homme : une exposition unique chez le rat peut induire une dépression du système nerveux central qui se traduit par des troubles d'ordre comportementaux (37). Des études de courte durée à des concentrations élevées de trichloroéthylène ont permis de mettre en évidence des effets sur le nerf trijumeau et la perte d'audition (12). Le même type d'effets est observé lors d'expositions animales plus longues (17). Les expositions respiratoires aiguës ou chroniques au trichloroéthylène induisent par ailleurs des modifications biochimiques au niveau du système nerveux central chez l'animal (12).

3. Mécanisme d'action

Le métabolisme joue un rôle important dans la toxicité du trichloroéthylène car plusieurs de ses métabolites présentent eux-mêmes une toxicité. Le mécanisme toxique de cette substance au niveau du système nerveux central est très mal connu. Il pourrait faire intervenir des interactions entre le trichloroéthylène et les membranes neuronales (12). La neurotoxicité des composés organiques volatils est bien connue et est souvent associée à leur capacité à perturber la fluidité de la membrane plasmique des cellules neuronales. L'altération des fonctions de la rétine a été associée à des modifications de l'électrorétinogramme chez le lapin suite à l'injection de trichloroéthylène et des auteurs ont observé une modification de potentiel évoqué visuel pouvant être induite par une exposition respiratoire à cette molécule (12). Le trichloroéthylène est également capable de perturber les fonctions des canaux calciques voltages dépendants *in vitro* sur une lignée cellulaire utilisée comme modèle pour étudier les neurotoxiques (77). Ces canaux sont impliqués dans la régulation de fonctions neuronales importantes telles que la libération de neurotransmetteurs. Il est connu que certaines régions transmembranaires de ces canaux sont impliquées dans leur inactivation. On peut donc émettre l'hypothèse selon laquelle ces régions transmembranaires seraient

impliquées dans le mécanisme d'action toxique du trichloroéthylène qui agirait en altérant des courants calciques neuronaux.

4. Valeurs toxicologiques de référence du trichloroéthylène pour des expositions par inhalation.

| Organisme | Méthode de construction | Effet critique | Dose critique (BMD/NOAEL/LOAEL) | UF | VTR |
|---------------------------------|-------------------------|--|--|---|---------|
| Exposition aiguë | | | | | |
| ATSDR (1997) | LOAEL/FE | Neurotoxicité : effets neurologiques subjectifs | LOAEL de 200 ppm Exposition humaine 7h/24, 5 jours consécutifs (Stewart et al. 1970). LOAEL ajusté au temps | 30 -10 : utilisation du LOAEL -3 : variabilité interindividuelle | 2 ppm |
| Exposition intermédiaire | | | | | |
| ATSDR (1997) | LOAEL/FE | Neurotoxicité : trouble du sommeil, somnolence. | LOAEL de 50 ppm Exposition rat, 8h/24, 5j/7, 6 semaines (Arito et al. 1994). LOAEL ajusté au temps | 300 -10 : utilisation du LOAEL -3 : variabilité interspèce -10 : variabilité interindividuelle | 0.1 ppm |
| Exposition chronique | | | | | |
| OEHHA | LOAEL /FE | Neurotoxicité : Somnolence, céphalée, irritation oculaire, fatigue | LOAEL de 32 ppm étude épidémiologique, 8h/24, 5j/7, 8 ans (Vandervort et Polnkoff, 1973) LOAEL ajusté au temps | 100 -10 : utilisation du LOAEL -10 : variabilité intraespèce | 0,1 ppm |